

CLAUDIA MOREAU

**L'HYPERTENSION ASSOCIÉE À L'ADMINISTRATION D'ÉRYTHROPOÏÉTINE EN INSUFFISANCE  
RÉNALE CHRONIQUE: IMPLICATION DES FACTEURS ENDOTHÉLIAUX**

**Mémoire  
présenté  
à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M. Sc.)**

**Médecine Expérimentale  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL**

AVRIL 2000

© Claudia Moreau, 2000



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-51154-5

Canada

## *RÉSUMÉ*

L'r-HuEPO est utilisée pour corriger l'anémie en insuffisance rénale chronique (IRC). Cependant, l'administration d'r-HuEPO à des patients insuffisants rénaux peut causer l'hypertension ou aggraver une hypertension préexistante. Cette hypertension est présente seulement en urémie et sa pathogénie est encore très mal connue. Le but de nos travaux est d'élucider le mécanisme de cette forme iatrogénique d'hypertension. Nous avons émis l'hypothèse que l'administration d'r-HuEPO accentue la dysfonction endothéliale déjà présente en IRC et cause l'augmentation de la pression artérielle. À cette fin, nous avons évalué le rôle de certains facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium, soit l'endothéline-1 (ET-1), le monoxyde d'azote (NO), la thromboxane (TX)<sub>A2</sub> et la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) dans un modèle expérimental de néphrectomie subtotale 5/6.

Afin d'investiguer le rôle du NO dans la réponse pressive à l'r-HuEPO, nous avons administré le L-NAME, un inhibiteur de la synthèse du NO, à des animaux témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO. Le L-NAME induit une augmentation de la pression artérielle systolique (PAS) autant chez les animaux témoins que chez les rats urémiques. L'r-HuEPO aggrave légèrement l'hypertension des rats témoins traités au L-NAME, et augmente significativement celle des rats urémiques traités au L-NAME. Conjointement, le taux d'ET-1 dans l'aorte thoracique est plus élevé chez les animaux témoins et urémiques recevant le L-NAME et l'r-HuEPO comparativement à ceux recevant le L-NAME seulement. Cependant, dans le lit artériel mésentérique et dans le cortex rénal, les taux d'ET-1 ne sont pas changés de façon significative par le traitement avec le L-NAME. Ces résultats démontrent l'importance du NO pour contrer l'effet des facteurs vasopresseurs sur le tonus vasculaire. L'inhibition de la synthèse du NO accentue l'effet presseur de l'r-HuEPO. Le L-NAME augmente la concentration d'ET-1 dans les gros vaisseaux de conductance, mais non dans les petits vaisseaux de résistance, suggérant une régulation différente de la production d'ET-1 selon le lit vasculaire durant l'inhibition chronique de la synthèse de NO.

Nous nous sommes ensuite attardés à déterminer l'implication des icosanoïdes endothéliaux, la PGI<sub>2</sub> et la TXA<sub>2</sub>, d'abord chez les rats urémiques hypertendus et ensuite chez les rats

urémiques traités à l'r-HuEPO. Nous avons d'abord établi des valeurs de références pour ces deux facteurs. La concentration de TXA<sub>2</sub> est augmentée dans les vaisseaux sanguins des rats urémiques comparativement aux rats témoins, et cette augmentation est accentuée par le traitement à l'r-HuEPO. Cependant, le taux de PGI<sub>2</sub> dans les vaisseaux n'est que légèrement augmenté en IRC et le traitement à l'r-HuEPO n'a aucun effet sur celui-ci. Afin d'évaluer plus à fond le rôle de la TXA<sub>2</sub>, nous avons administré le ridogrel, un inhibiteur de la synthèse et du récepteur de la TXA<sub>2</sub> à des animaux urémiques ainsi qu'à des rats urémiques traités à l'r-HuEPO. Ce traitement réduit la PAS des animaux urémiques et ramène la PAS des animaux urémiques recevant l'r-HuEPO au même niveau que celle des animaux urémiques non traités, suggérant l'implication de la TXA<sub>2</sub> dans l'hypertension induite par l'r-HuEPO.

En conclusion, nos travaux démontrent l'importance du système NO dans la réponse pressive à l'r-HuEPO. Ces travaux montrent aussi le rôle important que jouent les icosanoïdes endothéliaux, principalement la TXA<sub>2</sub> dans cette forme iatrogénique d'hypertension artérielle.

**REMERCIEMENTS**

Je voudrais remercier toute l'équipe et le support technique avec qui j'ai évolué ces 2 dernières années, et plus particulièrement les Drs Richard Larivière et Marcel Lebel pour leur support et leurs judicieux conseils qui m'ont permis d'aller jusqu'au bout.

Je voudrais aussi souligner la présence constante de mes amis, à mes côtés ou éloignés, avec qui j'ai partagé des moments inoubliables et qui m'ont épaulée tout au long de ce périple, merci.

Enfin, un merci tout spécial à mes parents et ma famille qui m'ont toujours encouragée à aller courageusement de l'avant.

*Ces travaux ont été subventionnés par le Conseil de Recherches Médicales, programme Université/Industrie (Janssen-Ortho Inc.) et j'ai été moi-même soutenue financièrement par la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle et le Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR).*

**À tous ceux que j'aime...**  
**L'univers conspire toujours en faveur de ceux qui rêvent...**

## *TABLE DES MATIÈRES*

<b>1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>1-2</b>
	<i>1.1 L'érythropoïétine.....</i>	<i>1-2</i>
	1.1.1 Historique.....	1-2
	1.1.2 Synthèse.....	1-2
	1.1.3 Récepteur de l'EPO et mécanisme d'action.....	1-3
	<i>1.2 La fonction rénale normale.....</i>	<i>1-4</i>
	1.2.1 Formation de l'urine.....	1-5
	1.2.1.1 Filtration glomérulaire.....	1-5
	1.2.1.2 Taux de filtration glomérulaire.....	1-5
	1.2.1.3 Réabsorption tubulaire.....	1-6
	1.2.1.4 Sécrétion tubulaire.....	1-6
	1.2.1.5 Régulation du volume de l'urine.....	1-7
	<i>1.3 L'insuffisance rénale chronique (IRC).....</i>	<i>1-8</i>
	1.3.1 Définition et causes de l'IRC.....	1-8
	1.3.2 Complications associées à l'IRC.....	1-8
	1.3.2.1 L'hypertension.....	1-8
	1.3.2.2 L'anémie.....	1-9
	<i>1.4 L'utilisation de l'érythropoïétine humaine recombinante en irc.....</i>	<i>1-9</i>
	<i>1.5 L'hypertension associée au traitement à l'r-HuEPO en irc.....</i>	<i>1-10</i>
	1.5.1 Viscosité sanguine.....	1-10
	1.5.2 Hémodynamie cardiaque.....	1-10
	1.5.3 Catécholamines.....	1-10
	1.5.4 Système rénine-angiotensine.....	1-11
	1.5.5 Calcium intracellulaire.....	1-11
	1.5.6 Effet direct vasopresseur de l'r-HuEPO.....	1-11
	1.5.7 Action sur l'endothélium.....	1-12
	1.5.7.1 L'endothéline-1.....	1-12
	1.5.7.1.1 Synthèse et structure de l'ET-1.....	1-12
	1.5.7.1.2 Récepteur de l'ET-1 et mécanisme d'action.....	1-13
	1.5.7.1.3 Effets de l'ET-1 sur le rein.....	1-15
	1.5.7.1.4 L'ET-1 en IRC.....	1-16
	1.5.7.1.5 Effet de l'r-HuEPO sur l'ET-1.....	1-16

1.5.7.2	Le monoxyde d'azote .....	1-17
1.5.7.2.1	Synthèse et dégradation .....	1-17
1.5.7.2.2	Mécanisme d'action du NO .....	1-19
1.5.7.2.3	Effets physiologiques du NO .....	1-19
1.5.7.2.4	Effets rénaux du NO .....	1-19
1.5.7.2.5	Rôle du NO en IRC .....	1-20
1.5.7.2.6	Effet de l'r-HuEPO sur le NO .....	1-21
1.5.7.3	La prostacycline (PGI <sub>2</sub> ) et la thromboxane (TX) A <sub>2</sub> .....	1-21
1.5.7.3.1	Synthèse de la PGI <sub>2</sub> et de la TXA <sub>2</sub> .....	1-21
1.5.7.3.2	Récepteur et mécanisme d'action de la PGI <sub>2</sub> et de la TXA <sub>2</sub> .....	1-24
1.5.7.3.3	Rôles physiologiques de la PGI <sub>2</sub> .....	1-24
1.5.7.3.4	Rôles physiologiques de la TXA <sub>2</sub> .....	1-25
1.5.7.3.5	Rôle de la PGI <sub>2</sub> et de la TXA <sub>2</sub> en IRC .....	1-26
1.5.7.3.6	Effet de l'r-HuEPO sur les prostanoides .....	1-26
<b>2</b>	<b>Hypothèse de recherche.....</b>	<b>2-28</b>
2.1	<i>Rationnelle</i> .....	2-28
2.2	<i>Hypothèse</i> .....	2-28
2.3	<i>Objectifs de l'étude</i> .....	2-28
<b>3</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>3-31</b>
3.1	<i>Modèle expérimental d'IRC, néphrectomie subtotale 5/6</i> .....	3-31
3.2	<i>Mesure de la pression artérielle systolique</i> .....	3-31
3.3	<i>Prélèvements sanguins pendant l'étude</i> .....	3-32
3.4	<i>Administration de l'r-HuEPO</i> .....	3-32
3.5	<i>Administration du L-NAME et du ridogrel</i> .....	3-32
3.6	<i>Collecte urinaire</i> .....	3-33
3.7	<i>Prélèvements à la fin de l'étude</i> .....	3-33
3.8	<i>Mesure de l'ET-1 immunoréactive</i> .....	3-33
3.9	<i>Mesure des icosanoïdes</i> .....	3-34



3.10	<i>Autres analyses biochimiques</i> .....	3-35
3.11	<i>Analyses statistiques</i> .....	3-35
<b>4</b>	<b>Résultats</b> .....	<b>4-38</b>
4.1	<i>Effet du L-NAME sur la pression artérielle et le taux d'ET-1 chez les animaux témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO.</i> .....	4-38
4.1.1	Introduction .....	4-38
4.1.2	Matériel et méthodes .....	4-38
4.1.3	Résultats .....	4-38
4.1.4	Conclusion.....	4-39
4.1.5	CHRONIC NITRIC OXIDE INHIBITION AGGRAVATES HYPERTENSION IN ERYTHROPOIETIN-TREATED RENAL FAILURE RATS .....	4-40
4.3	<i>Rôle des icosanoïdes endothéliaux PGI<sub>2</sub> et TXA<sub>2</sub> dans la réponse pressive à l'r-HuEPO en IRC.</i> .....	4-58
4.3.1	Rôle des icosanoïdes dans l'hypertension associée à l'IRC.....	4-58
4.3.1.1	Introduction.....	4-58
4.3.1.2	Objectifs.....	4-58
4.3.1.3	Protocole expérimental .....	4-58
4.3.1.4	Résultats.....	4-59
4.3.1.5	Sommaire.....	4-65
4.3.1.6	Conclusion .....	4-65
4.3.2	L'hypertension associée à l'administration d'r-HuEPO en IRC: Implication des prostanoides..	4-66
4.3.2.1	Introduction.....	4-66
4.3.2.2	Objectifs.....	4-66
4.3.2.3	Protocole expérimental .....	4-66
4.3.2.4	Résultats.....	4-67
4.3.2.5	Sommaire.....	4-73
4.3.2.6	Conclusion .....	4-74
<b>5</b>	<b>Discussion</b> .....	<b>5-76</b>
5.1	<i>Effet du L-NAME sur la pression artérielle et le taux d'ET-1 chez les animaux témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO.</i> .....	5-76
5.2	<i>Effet du ridogrel sur la pression artérielle des animaux urémiques.</i> .....	5-77

5.3	<i>L'hypertension associée à l'administration d'r-HuEPO en IRC: implication des icosanoïdes.....</i>	<i>5-80</i>
6	<b>Conclusion.....</b>	<b>6-84</b>
7	<b>Bibliographie .....</b>	<b>7-86</b>
8	<b>Annexe .....</b>	<b>8-93</b>
8.1	<i>Lettre de l'éditeur .....</i>	<i>8-93</i>
8.2	<i>Curriculum vitae.....</i>	<i>8-94</i>

**LISTE DES FIGURES**

<i>1.1.1</i>	Séquence en acides aminés de l'EPO.	1-2
<i>1.1.2</i>	Production de l'EPO et action sur l'érythropoïèse.	1-3
<i>1.2.1</i>	Mécanismes de régulation du taux de filtration glomérulaire.	1-6
<i>1.5.1</i>	Schéma de la structure en acides aminés de l'ET-1 (A) et mécanisme de régulation de la production vasculaire endothéliale de l'ET-1 (B).	1-13
<i>1.5.2</i>	Mécanismes de signalisation intracellulaire de l'ET-1: voies de la phospholipase A <sub>2</sub> , des MAP kinases ainsi que de l'inositol triphosphate et du diacylglycérol.	1-14
<i>1.5.3</i>	Synthèse du NO par les NOS (A) et mécanisme par lequel les NOS libèrent le NO suite à différents stimuli (B).	1-18
<i>1.5.4</i>	Voie enzymatique de la cyclo-oxygénase aboutissant à la formation de la PGI <sub>2</sub> et de la TXA <sub>2</sub> .	1-22
<i>4.2.1</i>	Corrélations entre la pression artérielle systolique et la concentration de TXB <sub>2</sub> dans l'aorte thoracique et le lit artériel mésentérique chez les animaux témoins et urémiques.	4-61
<i>4.2.2</i>	Pression artérielle systolique des animaux urémiques non traités ou traités avec le ridogrel en fonction du temps.	4-63
<i>4.2.3</i>	Pression artérielle systolique des animaux témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO en fonction du temps.	4-67
<i>4.2.4</i>	Corrélations positives entre la pression artérielle systolique et la concentration de TXB <sub>2</sub> dans l'aorte et le lit artériel mésentérique des animaux traités ou non à l'r-HuEPO.	4-70
<i>4.2.5</i>	Corrélations entre la pression artérielle systolique et la concentration d'irET-1 dans le cortex rénal et dans l'urine des rats témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO.	4-72
<i>4.2.6</i>	Pression artérielle systolique en fonction du temps chez les animaux urémiques non traités et traités à l'r-HuEPO ou à l'r-HuEPO et au ridogrel.	4-73

***LISTE DES FIGURES DE L'ARTICLE***

- Figure 1** Time course of systolic blood pressure in control (A) and uremic rats (B). 4-56
- Figure 2** Immunoreactive endothelin-1 (ir-ET-1) concentrations in thoracic aorta, mesenteric arterial bed and renal cortex in control rats and in uremic rats. 4-57

**LISTE DES TABLEAUX**

1.5.1	Localisation et rôles des NOS dans le rein.	1-20
4.2.1	Paramètres mesurés à la fin de l'étude chez les rats témoins et urémiques.	4-59
4.2.2	Concentration de la TXB <sub>2</sub> et de la 6-keto-PGF <sub>1α</sub> dans le lit artériel mésentérique, le cortex rénal et l'urine des animaux témoins et urémiques.	4-60
4.2.3	Concentration d'irET-1 dans le plasma, l'urine et le cortex rénal chez les animaux témoins et urémiques.	4-62
4.2.4	Hématocrite, créatinine sérique, clairance de la créatinine et protéinurie chez les animaux urémiques non traités ou traités avec le ridogrel.	4-63
4.2.5	Concentration de la TXB <sub>2</sub> et de la 6-keto-PGF <sub>1α</sub> dans le lit artériel mésentérique, le cortex rénal et l'urine chez les rats urémiques non traités ou traités avec le ridogrel.	4-64
4.2.6	Concentration d'irET-1 dans l'aorte thoracique, le cortex rénal, le plasma et l'urine des animaux urémiques non traités ou traités avec le ridogrel.	4-64
4.2.7	Paramètres mesurés à la fin de l'étude chez les rats témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO.	4-68
4.2.8	Concentration de 6-keto-PGF <sub>1α</sub> et de TXB <sub>2</sub> dans l'aorte et le lit artériel mésentérique des animaux témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO.	4-69
4.2.9	Concentration d'irET-1 dans le cortex rénal et dans l'urine des animaux témoins et urémiques traités ou non l'r-HuEPO.	4-71

***LISTE DES TABLEAUX DE L'ARTICLE***

<b>Table 1</b>	Hematocrit, serum creatinine and plasma ir-ET-1 concentrations in control rats at the end of the study.	4-47
<b>Table 2</b>	Hematocrit, serum creatinine and plasma ir-ET-1 concentrations in uremic rats at the end of the study.	4-47
<b>Table 3</b>	Wet weights (mg) of thoracic aorta segments and of mesenteric arterial beds, and their ratios over total body weights (in parenthesis) in control and uremic rats.	4-48

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

AA :	Acide arachidonique
ACE :	Enzyme de conversion de l'angiotensine
Ach :	Acétylcholine
ADMA :	« Asymmetric dimethyl arginine »
AMPc :	adénosine 3' 5'-monophosphate cyclique
ANP :	« Atrial natriuretic peptide »
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
BFU-E :	« Burst forming unit-erythrocyte »
Bk :	Bradykinine
Ca :	Calcium
CAM :	Calmoduline
CFU-E :	« Colony forming unit-erythrocyte »
COX :	Cyclo-oxygénase
DAG :	Diacylglycérol
ECE :	Enzyme de conversion de l'endothéline
EPO :	Érythropoïétine
ET :	Endothéline
GCs :	Guanylate cyclase soluble
GMPc :	Guanosine 3', 5'-monophosphate cyclique
Hct :	Hématocrite
IP <sub>3</sub> :	Inositol triphosphate
IRC :	Insuffisance rénale chronique
IrET-1 :	Endothéline-1 immunoréactive
LAM :	Lit artériel mésentérique
L-NAME :	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginine méthyl ester
L-NMMA :	N <sup>G</sup> -monométhyl-L-arginine
MAPK :	« Mitogen-activated protein kinase »
NO :	Monoxyde d'azote
NOS :	« Nitric oxide synthase »

PAS :	Pression artérielle systolique
PGD <sub>2</sub> :	Prostaglandine D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub> :	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub> :	Prostaglandine F <sub>2α</sub>
PGG <sub>2</sub> :	Prostaglandine endoperoxyde
PGH <sub>2</sub> :	Prostaglandine endoperoxyde
PGI <sub>2</sub> :	Prostacycline
PKC :	Protéine kinase C
PLA <sub>2</sub> :	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC :	Phospholipase C
r-HuEPO :	Érythropoïétine humaine recombinante
s.c. :	Sous-cutané
TCC :	Tubule collecteur cortical
TCME :	Tubule collecteur de la médulla externe
TCMI :	Tubule collecteur de la médulla interne
TFG :	Taux de filtration glomérulaire
TGF :	« Tubuloglomerular feedback »
TGF-β :	« Transforming growth factor β »
T.K. :	Tyrosine kinase
TXA <sub>2</sub> :	Thromboxane A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub> :	Thromboxane B <sub>2</sub>
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
6-keto-PGF <sub>1α</sub> :	6-keto-prostaglandine F <sub>1α</sub>



# Chapitre 1

*Introduction*

## 1.1 L'ÉRYTHROPOÏÉTINE

### 1.1.1 Historique

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone servant à stimuler la production érythrocytaire dans la moelle osseuse. Elle est relarguée en réponse à des stimuli tels l'hypoxie et l'anémie. L'EPO a été découverte en 1954 par Stohlman et collègues (Stohlman, F. et al. 1954), mais c'est en 1977 que l'hormone est purifiée pour la première fois par Miyake et collègues (Miyake, T. et al. 1977).

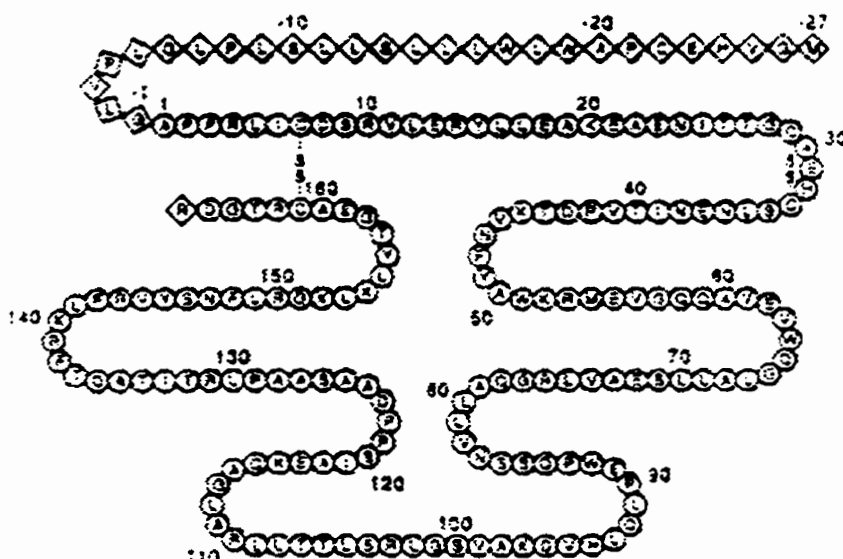


Figure 1.1.1 : Séquence en acides aminés de l'EPO.  
 Cercles : Acides aminés ; Losanges : Acides aminés de la séquence signal ;  
 -s s- : Ponts disulfures ; # : Numéro de l'acide aminé.  
 Tiré de (Erslev, AJ. et Besarab, A. 1997).

### 1.1.2 Synthèse

L'EPO est une hormone glycoprotéique de 34 kD contenant 166 acides aminés dont une séquence signal de 27 acides aminés. Le rein a depuis longtemps été identifié comme le principal organe producteur d'EPO (Jacobson, LO. et al. 1957). Plus précisément, ce sont les cellules péritubulaires corticales qui sont impliquées dans la formation de l'EPO (Koury, ST.



récepteurs de l'EPO sur les cellules endothéliales vasculaires. Lorsque l'EPO se lie à son récepteur, il y a activation du récepteur par phosphorylation de résidus tyrosine. Les kinases Janus (JAK) se lient ensuite au récepteur activé. Suite à la phosphorylation de résidus tyrosine de STAT-5 (Signal transducers and activators of transcription), celle-ci subit une translocation rapide du cytosol vers le noyau de la cellule où elle active la transcription de gènes menant à la prolifération de la cellule. L'effet de l'EPO sur les cellules endothéliales serait donc médié par des voies kinases (Haller, H. et al. 1996).

## 1.2 LA FONCTION RÉNALE NORMALE

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein. Chaque néphron se divise en deux parties, soit le corpuscule rénal et le tubule rénal. Le corpuscule rénal se compose du glomérule et de la capsule glomérulaire et le tubule rénal comprend le tubule contourné proximal, l'anse de Henlé et le tubule contourné distal qui se déverse dans un tubule collecteur desservant plusieurs néphrons.

Une partie importante du néphron est l'appareil juxta-glomérulaire. Il est localisé à l'endroit où le tubule contourné distal s'appuie contre l'artériole afférente, près du glomérule. À cet endroit, les deux structures sont modifiées : la paroi de l'artériole afférente contient des cellules juxta-glomérulaires sensibles aux variations de pression artérielle tandis que la *macula densa*, formée de cellules spécialisées du tubule distal, réagit aux variations de la concentration des solutés dans le filtrat. Ce sont les cellules juxta-glomérulaires qui synthétisent la rénine. La rénine clive l'angiotensinogène, produit par le foie, qui libère l'angiotensine-I. L'angiotensine-I est alors convertie en angiotensine-II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), située principalement dans le poumon, mais aussi dans le rein. L'angiotensine-II est un puissant vasoconstricteur périphérique très important dans le contrôle de la pression artérielle. L'angiotensine-II stimule aussi la corticosurrénale à produire l'aldostérone qui augmentera la réabsorption du  $\text{Na}^+$  (et de l'eau) dans le tubule.

### **1.2.1 Formation de l'urine**

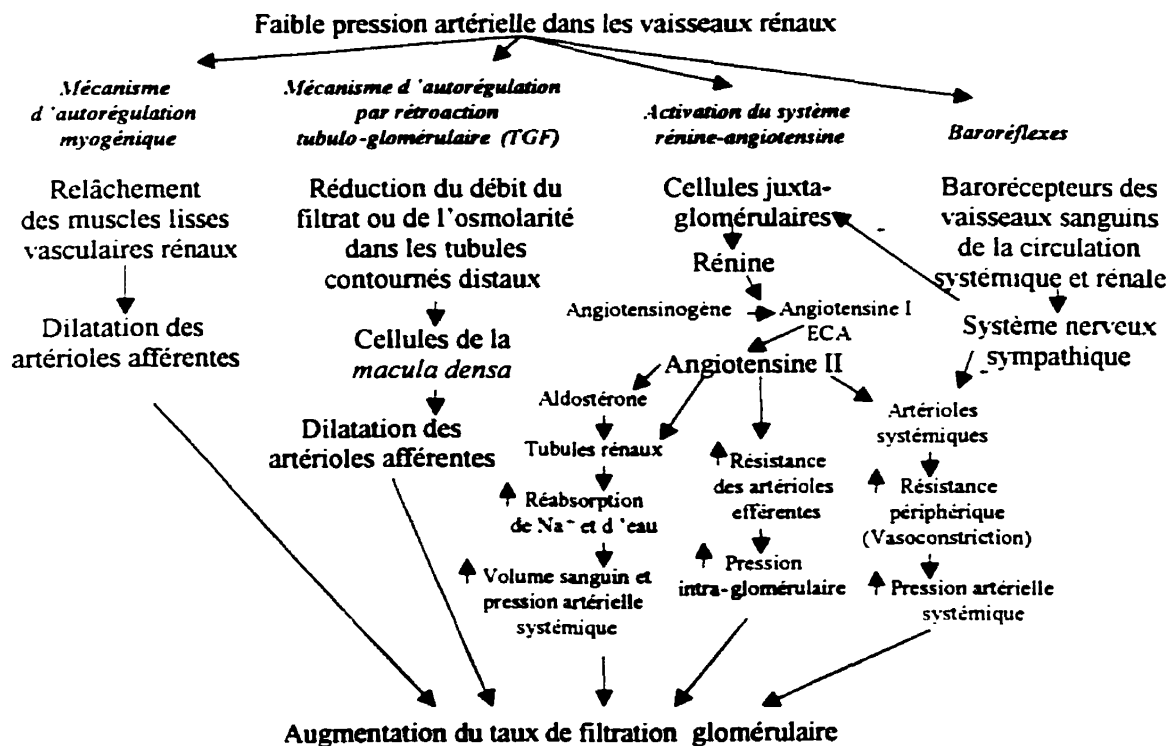
La production de l'urine dépend de trois processus, soit la filtration glomérulaire, la réabsorption tubulaire et la sécrétion tubulaire.

#### **1.2.1.1 Filtration glomérulaire**

La filtration glomérulaire est un processus passif qui dépend de la pression hydrostatique dans le glomérule (55 mmHg). La filtration est non sélective puisque la membrane de filtration laisse librement passer l'eau et les solutés de faible poids moléculaire. Ainsi, le filtrat contient principalement l'eau, le glucose, les acides aminés, les déchets azotés et les ions tels que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{HCO}_3^-$ .

#### **1.2.1.2 Taux de filtration glomérulaire**

Le taux de filtration glomérulaire est représenté par la quantité de liquide filtré du sang par unité de temps. Ce taux dépend de trois facteurs : la surface de filtration, la perméabilité de la membrane de filtration et la pression nette de filtration. Lorsque la pression artérielle systémique fluctue, la pression intraglomérulaire subit elle aussi un changement. Cependant, le taux de filtration glomérulaire est régulé pour éviter l'endommagement des glomérules. Cette régulation s'effectue de façon intrinsèque et extrinsèque selon quatre mécanismes principaux décrits à la figure 1.2.1.



**Figure 1.2.1 :** Mécanismes de régulation du taux de filtration glomérulaire.  
 ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine ; TGF : « Tubuloglomerular feedback ».  
 Inspiré de (Marieb, EN. 1993).

### 1.2.1.3 Réabsorption tubulaire

La réabsorption tubulaire peut être un processus actif (contre le gradient) ou passif (diffusion facilitée, osmose). Elle se produit surtout dans le tubule proximal. La réabsorption est très importante pour régler la composition de l'urine puisque le filtrat glomérulaire, résultat d'un processus non sélectif, contient la majorité des éléments qui composent le plasma à l'exception des protéines. Les ions  $\text{Na}^+$  sont très importants dans ce processus puisque 80% de l'énergie consommée par le transport actif est consacrée à leur réabsorption. Le glucose, les acides aminés, l'acide lactique, les vitamines et la plupart des ions sont réabsorbés en cotransport avec les ions  $\text{Na}^+$ .

### 1.2.1.4 Sécrétion tubulaire

La sécrétion tubulaire s'acquitte principalement de 4 fonctions : elle permet d'éliminer des substances qui ne se trouvent pas déjà dans le filtrat, d'éliminer des substances nuisibles qui

ont été réabsorbées passivement comme l'urée, de débarrasser l'organisme des ions  $K^+$  en excès, et de régler le pH sanguin.

#### *1.2.1.5 Régulation du volume de l'urine*

Le mécanisme à contre-courant est responsable de la régulation du volume de l'urine, qui lui-même dépend de la concentration de l'urine. Il s'agit de l'interaction entre le filtrat dans l'anse de Henlé et le sang dans les *vasa recta*. Le rôle de l'anse de Henlé est de créer un gradient osmotique tandis que les *vasa recta* servent à maintenir ce gradient. Dans la portion descendante de l'anse de Henlé, très perméable à l'eau, mais peu au NaCl, l'eau est réabsorbée dans l'interstitium, ce qui provoque une augmentation de l'osmolarité dans le tubule. Par contre, la branche ascendante de l'anse de Henlé est imperméable à l'eau, mais perméable au NaCl qui est réabsorbé activement dans l'interstitium. Plus les ions  $Na^+$  sont réabsorbés dans l'anse ascendante et rendent l'interstitium hypertonique, plus l'eau est réabsorbée dans l'anse descendante. La réabsorption de l'eau dans l'anse descendante est donc tributaire de la réabsorption du NaCl dans l'anse ascendante. La réabsorption de l'eau est aussi provoquée par un gradient osmotique maintenu du cortex rénal vers la médulla interne, probablement dû à la concentration d'urée dans la médulla. Suivant ce gradient, les *vasa recta*, très perméables à l'eau et aux solutés, absorbent le NaCl et rejettent l'eau en descendant vers la médulla interne et vice versa en remontant vers le cortex.

Lors de son arrivée dans le tubule collecteur, le filtrat est relativement dilué puisque le NaCl a été réabsorbé dans la partie ascendante de l'anse de Henlé. L'urine ainsi formée sera donc une urine diluée. Cependant, en présence d'hormone antidiurétique (ADH), le tubule collecteur devient perméable à l'eau et l'urine produite sera plus concentrée. La capacité à diluer et à concentrer les urines est une fonction importante du rein et l'une des premières à être altérée lors d'insuffisance rénale (Marieb, EN. 1993; Valtin, H. et Schafer, JA. 1995).

### 1.3 L'INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE (IRC)

#### 1.3.1 *Définition et causes de l'IRC*

L'IRC se définit comme la diminution du nombre de néphrons fonctionnels dans le rein. Dans cette situation, le nombre de néphrons restants est insuffisant pour accomplir la fonction d'un rein normal. Les principales causes de l'insuffisance rénale sont le diabète, la glomérulonéphrite, les maladies vasculaires rénales y compris l'hypertension et la néphropathie initiale inconnue (Institut canadien d'information sur la santé. 1999).

Sur le plan histologique, dépendamment de la maladie rénale, on peut retrouver de la sclérose glomérulaire, une atrophie tubulaire et/ou de la fibrose interstitielle. Ces changements structuraux se traduisent par des altérations fonctionnelles telles la diminution du taux de filtration glomérulaire et du débit sanguin rénal, des troubles de la fonction tubulaire (désordres électrolytiques et acidose), ainsi que la rétention hydrosodée entraînant la surcharge hydrique, l'œdème et l'hypertension (Guyton, AC. 1986; Klahr, S. et al. 1988). Ainsi, la diminution de l'épuration des déchets de l'organisme aboutira à l'urémie. La mesure de la créatinine et de l'urée sériques de même que la clairance de la créatinine sont donc des indices utilisés pour quantifier la fonction rénale. La protéinurie peut aussi donner un reflet des altérations glomérulo-tubulaires (Guyton, AC. 1986; Klahr, S. et al. 1988).

#### 1.3.2 *Complications associées à l'IRC*

##### 1.3.2.1 *L'hypertension*

Le rein joue un rôle primordial dans le maintien de la pression artérielle. En effet, celui-ci règle la volémie, sa dysfonction pouvant donc entraîner une surcharge volémique (ou rétention). Le rein peut aussi activer le système rénine-angiotensine qui joue un rôle très important dans la régulation de la pression artérielle. Lors d'IRC, l'administration d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine diminue la pression artérielle systémique et intraglomérulaire et atténue la progression de l'IRC (Jonhston, CI. et al. 1993; Rosenberg, ME. et al. 1994).



L'IRC s'accompagne aussi d'un déséquilibre de certains facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium vasculaire; par exemple, l'endothéline-1 (ET-1), un vasoconstricteur puissant, est augmentée (voir section 1.5.7.1); le monoxyde d'azote (NO), un puissant vasodilatateur, est diminué (voir section 1.5.7.2); et la thromboxane (TX) A<sub>2</sub>, aussi un puissant vasopresseur, est plus élevée (voir section 1.5.7.3). Tous ces changements sont en faveur de l'augmentation de la résistance vasculaire périphérique et peuvent mener à l'hypertension artérielle.

#### *1.3.2.2 L'anémie*

L'anémie en IRC est causée par la diminution de la production d'EPO par les reins déficients. On observe aussi une diminution de la durée de vie des érythrocytes en IRC (Erslev, AJ. et Besarab, A. 1997). La prise fréquente d'échantillons sanguins et l'endommagement des érythrocytes lors de l'hémodialyse contribuent à accentuer le déséquilibre entre la production et la perte des globules rouges et l'anémie s'installe.

### **1.4 L'UTILISATION DE L'ÉRYTHROPOÏÉTINE HUMAINE RECOMBINANTE EN IRC**

Avant l'avènement de l'érythropoïétine humaine recombinante (r-HuEPO), la transfusion sanguine était utilisée pour corriger l'anémie en IRC. Cependant, certains effets indésirables comme des infections et des allergies compliquaient le traitement. L'utilisation de l'r-HuEPO s'est avérée très efficace pour améliorer l'anémie des insuffisants rénaux (Eschbach, JW. et al. 1987). Actuellement, environ 80% des patients dialysés reçoivent l'r-HuEPO. En plus de son effet bénéfique sur l'anémie, l'r-HuEPO améliore la qualité de vie et augmente la tolérance à l'exercice des patients (Canadian erythropoietin group. 1991). Cependant, une ombre au tableau, l'r-HuEPO cause chez presque tous les patients insuffisants rénaux une augmentation de la pression artérielle qui peut mener à une hypertension *de novo* ou aggraver une hypertension préexistante (Buckner, FS. et al. 1990; Canadian erythropoietin group. 1991).

## **1.5 L'HYPERTENSION ASSOCIÉE AU TRAITEMENT À L'R-HUEPO EN IRC**

L'hypertension associée à l'administration chronique d'r-HuEPO survient chez l'humain (Lebel, M. et al. 1995) ainsi que chez le rat (Lacasse-M, S. et al. 1997), seulement en situation d'IRC. En effet, le traitement à l'r-HuEPO ne produit pas d'élévation de la pression artérielle chez des sujets sains (Berglund, B. et Eckblom, B. 1991), ou chez des patients atteints de myélome multiple (Ludwig, H. et al. 1990) ou porteurs du VIH (Fischl, M. et al. 1990).

Plusieurs hypothèses ont été formulées quant à la cause de cette élévation de la pression artérielle suite à l'administration d'r-HuEPO en IRC. Voici les principales :

### ***1.5.1 Viscosité sanguine***

L'augmentation de la masse érythrocytaire suite à l'administration d'r-HuEPO provoque l'élévation de la viscosité sanguine. Cependant, plusieurs investigateurs ont prouvé qu'il n'existe aucune corrélation entre l'augmentation de l'hématocrite et l'hypertension artérielle (Lebel, M. et al. 1994; Lebel, M. et al. 1995; Samtleben, W. et al. 1988). De plus, nos travaux antérieurs ont démontré que des rats urémiques traités à l'r-HuEPO recevant une diète faible en fer deviennent hypertendus malgré la persistance de l'anémie (Brochu, E. et al. 1999c).

### ***1.5.2 Hémodynamie cardiaque***

Lorsque l'anémie s'installe et que le taux d'oxygène diminue dans l'organisme, il y a augmentation du débit cardiaque et diminution de la résistance périphérique ou « vasodilatation hypoxémique ». Si on corrige l'anémie par l'r-HuEPO, le débit cardiaque diminue et la résistance périphérique augmente (Lebel, M. et al. 1997). Cependant, il semble que l'augmentation de la résistance périphérique est disproportionnellement élevée, ce qui explique en partie le développement de l'hypertension.

### ***1.5.3 Catécholamines***

L'effet de l'r-HuEPO sur les catécholamines n'est pas clairement démontré. En fait, quelques expériences ont suggéré une augmentation de la réponse à la noradrénaline (Bode-B, SM. et al. 1992). Vaziri et collaborateurs (Vaziri, ND. et al. 1996) ont cependant démontré *in vivo*

que cette augmentation de la réponse aux agonistes  $\alpha_1$ -adrénergiques était la même chez les rats urémiques non traités à l'r-HuEPO. Ainsi, l'r-HuEPO ne serait pas responsable de cet effet sur les catécholamines.

#### **1.5.4 Système rénine-angiotensine**

Il a été suggéré que la réponse pressive à l'r-HuEPO en IRC serait due à une augmentation du système rénine-angiotensine tissulaire puisqu'on ne retrouve pas d'augmentation plasmatique de rénine ou d'angiotensine-II chez les patients insuffisants rénaux (Eggena, P. et al. 1991). Cependant, il s'avère que la réponse à l'angiotensine-II n'est pas altérée chez des animaux urémiques traités à l'r-HuEPO comparé à des animaux urémiques non traités (Vaziri, ND. 1999).

#### **1.5.5 Calcium intracellulaire**

Une élévation du calcium intracellulaire a été démontrée chez l'humain et l'animal atteints d'IRC traité à l'r-HuEPO (Neusser, M. et al. 1993; Vaziri, ND. et al. 1996; Vaziri, ND. et al. 1995). De plus, l'administration d'un bloqueur des canaux calciques a un effet bénéfique sur l'hypertension artérielle des animaux urémiques traités à l'r-HuEPO (Vaziri, ND. et al. 1996), suggérant que le calcium intracellulaire pourrait être en partie impliqué dans cette forme d'hypertension.

#### **1.5.6 Effet direct vasopresseur de l'r-HuEPO**

Heideinreich et collègues (Heideinreich, S. et al. 1991) ont suggéré un effet direct vasopresseur de l'r-HuEPO. Ce mécanisme serait, selon eux, dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$ , mais indépendant de l'endothélium. En fait, l'r-HuEPO agirait directement sur le muscle lisse. Cependant, les doses d'r-HuEPO utilisées lors de cette étude (*in vitro*) étaient beaucoup plus importantes que les doses utilisées en clinique pour le traitement de l'anémie. On a aussi observé dans notre laboratoire une augmentation de la pression artérielle chez des rats normaux traités à une dose plus élevée d'r-HuEPO (150U/kg, 3 fois par semaine) par la voie intrapéritonéale. Cependant, à la dose utilisée en clinique de 100U/kg, 3 fois par semaine par voie sous-cutanée, on n'observe aucune élévation de pression artérielle chez le rat ayant une fonction rénale intacte (Lacasse-M, S. et al. 1997).

### ***1.5.7 Action sur l'endothélium***

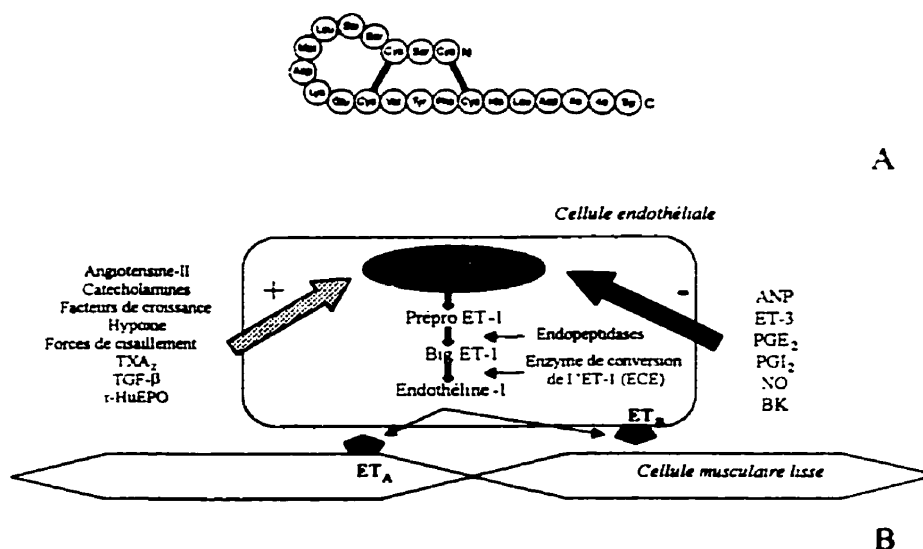
Comme mentionné plus haut, la cellule endothéliale possède des récepteurs de l'EPO (Anagnostou, A. et al. 1994). Suite à la stimulation de cellules endothéliales avec l'EPO, la concentration de divers facteurs tels l'ET-1 et les prostanoides vasoconstricteurs (TXA<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>) augmente (Bode-B, SM. et al. 1992; Carlini, RG. et al. 1993), ce qui peut contribuer à l'effet presseur de l'r-HuEPO en IRC. Les prochaines sections traiteront des désordres endothéliaux pouvant survenir suite au traitement à l'r-HuEPO en IRC. Je me concentrerai principalement sur les facteurs suivant : L'ET-1, le NO et deux icosanoïdes, la PGI<sub>2</sub> et la TXA<sub>2</sub>.

#### ***1.5.7.1 L'endothéline-1***

L'endothéline (ET) a été isolée initialement du milieu de culture de cellules endothéliales porcines par Yanagisawa et collaborateurs en 1988 (Yanagisawa, M. et al. 1988). Il y a trois isoformes d'ET, soit l'ET-1, 2 et 3. L'ET-1 est un puissant vasoconstricteur synthétisé principalement par les cellules endothéliales, mais aussi dans le rein où elle agirait autant sur l'hémodynamie rénale que sur les tubules. L'ET-2 est produite principalement dans le rein et dans l'intestin, mais aussi en plus petite quantité dans le myocarde, le placenta et l'utérus. L'ET-2 n'a pas de fonction physiologique connue. Comme l'ET-1, l'ET-3 circule dans le plasma, mais sa source est inconnue. Cependant, on retrouve l'ET-3 en grande quantité dans le cerveau, mais aussi dans le tractus gastro-intestinal, les poumons et les reins. Il semble que l'ET-1 soit la seule forme à agir sur le système cardiovasculaire, c'est pourquoi je me concentrerai principalement sur celle-ci (Levin, ER. 1995).

##### **1.5.7.1.1 Synthèse et structure de l'ET-1**

La structure de l'ET-1 est représentée à la figure 1.5.1(A). Le gène de l'ET-1 est situé sur le chromosome 6 et code pour la prépro ET-1, protéine précurseur de 203 acides aminés. La prépro ET-1 est clivée par des endopeptidases spécifiques en big-ET-1, pro-hormone inactive de 39 acides aminés. L'enzyme de conversion de l'ET clive ensuite la big-ET-1 en ET-1, peptide actif de 21 acides aminés.



**Figure 1.5.1 :** Schéma de la structure en acides aminés de l'ET-1 (A) et mécanisme de régulation de la production vasculaire endothéliale de l'ET-1 (B).  
 TXA<sub>2</sub> : Thromboxane A<sub>2</sub> ; TGF-β : « Transforming growth factor-β » ;  
 ANP : « Atrial natriuretic peptide » ; PGE<sub>2</sub> : Prostaglandine E<sub>2</sub> ; PGI<sub>2</sub> : Prostacycline ; NO : Monoxyde d'azote ; BK : Bradykinine.  
 Adapté de (King, AJ. 1995; Levin, ER. 1995).

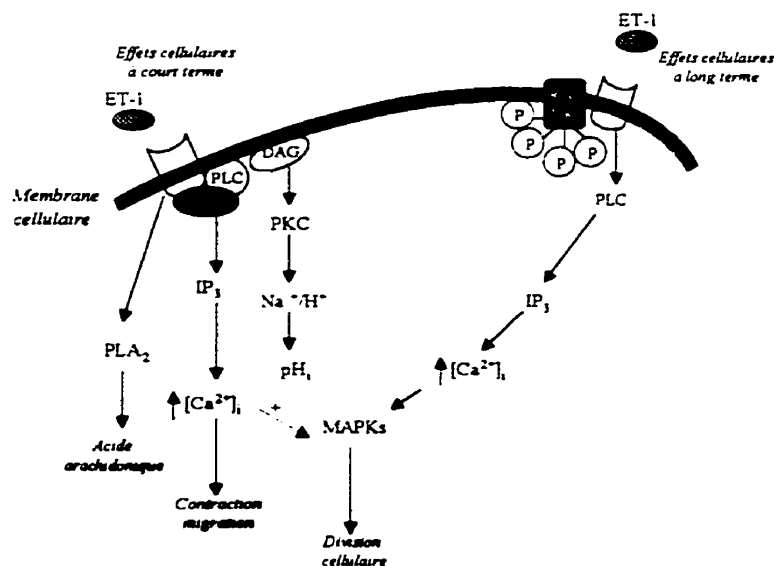
La synthèse de l'ET-1 est constitutive dans les cellules endothéliales, mais elle peut être augmentée ou diminuée par différents stimuli (King, AJ. 1995; Levin, ER. 1995) tels que décrits à la figure 1.5.1(B).

Environ 80% de l'ET-1 produite dans les cellules endothéliales est relarguée du côté abluminal et agit de façon paracrine et autocrine sur le muscle lisse et l'endothélium. De plus, la concentration circulante d'ET-1 est généralement faible puisqu'elle est rapidement éliminée de la circulation par les poumons et le foie. Le mécanisme de clairance de l'ET-1 est principalement médié par le récepteur ET<sub>B</sub> (Kohan, DE. 1997).

#### 1.5.7.1.2 Récepteur de l'ET-1 et mécanisme d'action

Les effets de l'ET-1 sont médiés par deux types de récepteurs, soit les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. Ces récepteurs sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Plusieurs mécanismes intracellulaires différents sont utilisés selon le type d'effet cellulaire de

l'ET-1, soit les effets à long terme et les effets à court terme. Ces mécanismes sont résumés à la figure 1.5.2.



**Figure 1.5.2 :** Mécanismes de signalisation intracellulaire de l'ET-1: voies de la phospholipase A<sub>2</sub>, des MAP kinases ainsi que de l'inositol triphosphate et du diacylglycérol.

PLC : Phospholipase C ; PLA<sub>2</sub> : Phospholipase A<sub>2</sub> ; DAG : Diacylglycérol ; PKC : Protéine kinase C ; IP<sub>3</sub> : Inositol triphosphate ; MAPK : « Mitogen-activated protein kinase ».

Inspiré de (Schiffirin, EL. et Touyz, M. 1998).

Dans le système cardiovasculaire, le récepteur ET<sub>A</sub> est exprimé principalement dans les cellules musculaires lisses (King, AJ. 1995). La contraction du muscle lisse est médiée principalement par le récepteur ET<sub>A</sub>, et dans certaines situations par le récepteur ET<sub>B</sub> (Battistini, B. et al. 1993; Davenport, AP. et Maguire, JJ. 1994; Haynes, WG. et al. 1995; King, AJ. 1995). Le récepteur ET<sub>B</sub> est exprimé dans les cellules endothéliales et est responsable de la vasodilatation observée après l'administration d'ET-1 exogène et précédant la vasoconstriction soutenue du muscle lisse (Yanagisawa, M. et al. 1988). La vasodilatation induite par l'activation du récepteur ET<sub>B</sub> est de courte durée puisqu'il se produit une rapide internalisation du récepteur suite à son activation (Oksche, A. et al. 1999). Les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> peuvent aussi induire l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> (Schiffirin, EL. et Touyz, M. 1998) qui libère l'acide arachidonique, précurseur de la TXA<sub>2</sub> et de la PGI<sub>2</sub>. La TXA<sub>2</sub> serait impliquée en partie dans certains effets vasoconstricteurs de l'ET-1 (Moreau, P. et al. 1996)

suite à l'activation du récepteur  $ET_A$ . Par contre, le récepteur  $ET_B$  pourrait contrebalancer l'effet du récepteur  $ET_A$  en induisant la relâche de  $PGI_2$  (Filep, JG. et al. 1991) et de NO (Hirata, Y. et al. 1993; De Nucci, G. et al. 1988).

Le récepteur  $ET_A$  est aussi responsable de l'effet mitogénique de l'ET-1 ainsi que de l'adhésion et la migration des cellules et de la déposition de la matrice extracellulaire (King, AJ. 1995). Par contre, le récepteur  $ET_B$  jouerait un rôle dans l'effet apoptotique de l'ET-1 sur le muscle lisse et probablement sur le remodelage vasculaire. Aussi, le récepteur  $ET_B$  serait impliqué dans la réponse inflammatoire ainsi que dans la nociception (Cattaruzza, M. et al. 19990; Griswold, DE. et al. 1999).

#### 1.5.7.1.3 Effets de l'ET-1 sur le rein

Les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  sont tous deux présents dans le rein. Le récepteur  $ET_A$  est prédominant dans les artérioles afférente et efférente et dans les cellules endothéliales des vaisseaux rénaux tandis que le récepteur  $ET_B$  se retrouve plutôt dans l'endothélium des vaisseaux rénaux et des capillaires glomérulaires ainsi que dans les cellules épithéliales des tubules rénaux. Les deux récepteurs sont présents dans les cellules mésangiales (Haynes, WG. et al. 1995; King, AJ. 1995).

L'infusion d'ET-1 dans le rein cause une vasoconstriction des artérioles afférente et efférente, ce qui provoque une diminution du débit sanguin rénal et du taux de filtration glomérulaire. L'ET-1 induit la contraction des cellules mésangiales, ce qui cause une réduction de la surface de filtration des capillaires glomérulaires, donc une diminution du coefficient de filtration (King, AJ. 1995). Cependant, en situation physiologique normale, l'administration d'anticorps anti-ET-1 ou d'antagonistes des récepteurs de l'ET-1 n'ont aucun effet sur le taux de filtration glomérulaire ou le débit sanguin rénal, ce qui suggère que l'ET-1 en situation normale n'est pas un modulateur important de l'hémodynamie rénale. De plus, la présence des récepteurs  $ET_B$  dans le glomérule, en relarguant des facteurs vasodilatateurs endogènes tels que le NO et la  $PGI_2$ , peut moduler la production d'ET-1 (King, AJ. 1995; Kohan, DE. 1997).

Les effets de l'ET-1 exogène sur l'excrétion sodée dépendent de la dose d'ET-1 administrée et des changements du taux de filtration glomérulaire et de la pression de perfusion rénale. L'ET-1 à forte dose réduit le taux de filtration glomérulaire, donc la fraction de sodium filtrée, ce qui a pour conséquence la diminution de l'excrétion du sodium. Cependant, lorsque l'ET-1 est infusée à une dose pressive, qui a peu d'effet sur le taux de filtration glomérulaire, la natriurèse est modérée (King, AJ. 1995; Kohan, DE. 1997).

La production locale d'ET-1 dans la médulla interne (cellules épithéliales des tubules) semble jouer un rôle important dans la modulation de l'excrétion hydrosodée dans le rein. En effet, l'ET-1 locale cause la natriurèse et la diurèse via l'activation du récepteur ET<sub>B</sub> (Haynes, WG. et al. 1995; Pollock, DM. et al. 2000). L'infusion d'ET-1 exogène cause aussi la diurèse et ce malgré la réduction du taux de filtration glomérulaire. L'urine produite est donc plus diluée, suggérant un effet direct sur la réabsorption de l'eau. L'ET-1 inhibe l'action de l'arginine vasopressine (AVP) et cause une diminution de l'activité Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase dans le tubule rénal (King, AJ. 1995).

#### 1.5.7.1.4 L'ET-1 en IRC

Ohta et collaborateurs (Ohta, K. et al. 1991) ont observé une augmentation de l'excrétion urinaire d'ET-1 chez des patients insuffisants rénaux comparés à des sujets normaux. Aussi, les taux plasmatiques sont élevés chez les patients dialysés (Lebel, M. et al. 1994). De façon similaire, nous avons démontré chez des rats urémiques une augmentation de l'excrétion urinaire d'ET-1 ainsi qu'une augmentation de la concentration d'ET-1 dans les glomérules et les vaisseaux rénaux. L'excrétion urinaire d'ET-1 corrèle avec la créatinine sérique et la protéinurie, deux paramètres importants en IRC (Larivière, R. et al. 1997). Par ailleurs, l'administration d'un antagoniste des récepteurs ET<sub>A</sub> prévient l'aggravation de l'hypertension et la progression de l'insuffisance rénale chez le rat urémique démontrant le rôle important de l'ET-1 dans ces conditions pathologiques (Brochu, E. et al. 1999b).

#### 1.5.7.1.5 Effet de l'r-HuEPO sur l'ET-1

La stimulation de cellules endothéliales avec l'r-HuEPO provoque l'augmentation de la concentration d'ET-1 dans le milieu suggérant que l'ET-1 pourrait être impliquée dans



l'hypertension associée à l'administration d'r-HuEPO en IRC (Bode-B, SM. et al. 1992; Carlini, RG. et al. 1993). Bien que chez le rat urémique traité à l'r-HuEPO la concentration plasmatique d'ET-1 est inchangée, on note une élévation de la concentration d'ET-1 dans les vaisseaux sanguins (Lebel, M. et al. 1998). La concentration plasmatique inchangée d'ET-1 malgré l'augmentation de la production vasculaire de celle-ci peut s'expliquer par le fait que l'ET-1 est sécrétée principalement de façon abluminale. De plus la quantité minimale relarguée dans la circulation en est rapidement éliminée par les mécanismes décrits plus haut. Pour vérifier l'implication de l'ET-1 dans l'hypertension due à l'r-HuEPO en IRC, nous avons administré des antagonistes des récepteurs de l'ET-1 à des rats urémiques traités à l'r-HuEPO (Brochu, E. et al. 1999a). Le bosentan, un antagoniste non sélectif ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>, n'a eu aucun effet sur la pression artérielle des rats urémiques traités à l'r-HuEPO tandis que le LU135252, un antagoniste ET<sub>A</sub>, a réduit la progression de l'hypertension. Ainsi l'ET-1 serait en partie responsable de l'effet hypertenseur de l'r-HuEPO en IRC par la stimulation du récepteur ET<sub>A</sub>.

#### *1.5.7.2 Le monoxyde d'azote*

Les facteurs vasoactifs endothéliaux interagissent entre eux pour maintenir l'homéostasie de la pression artérielle. Ainsi, l'ET-1 stimule la relâche de NO (Boulanger, C. et Lüscher, TF. 1990) qui atténue sa production locale ainsi que ses effets biologiques dont la vasoconstriction.

En 1980, Furchgott et collaborateurs (Furchgott, RF. et Zawadzki, JV. 1980) démontraient que la vasodilatation induite par l'acétylcholine est dépendante de l'endothélium et médiée par un facteur humoral qu'ils nommèrent EDRF (endothelium-derived relaxing factor). Quelques années plus tard, on identifia ce facteur relaxant dérivé de l'endothélium comme étant le monoxyde d'azote (NO) (Palmer, R. et al. 1987).

##### 1.5.7.2.1 Synthèse et dégradation

Le NO est synthétisé par les NO synthases (NOS), qui transforment la L-arginine en L-citrulline en libérant le NO en présence de NADPH et d'oxygène comme illustré à la figure 1.5.3.(A).



#### 1.5.7.2.2 Mécanisme d'action du NO

Le NO diffuse dans la cellule musculaire lisse et se lie à la guanylate cyclase soluble. La guanylate cyclase soluble transforme le GTP en GMP cyclique (GMPc), second messager qui active différentes protéines kinases dépendantes du GMPc. C'est l'augmentation du GMPc qui entraîne la vasorelaxation du muscle lisse (Figure 1.5.3(B)).

#### 1.5.7.2.3 Effets physiologiques du NO

Le NO est effectif dans plusieurs systèmes, par exemple, il inhibe l'agrégation des plaquettes, il peut agir comme neurotransmetteur dans les terminaisons nerveuses systémiques, il a une activité inflammatoire qui peut être bénéfique pour l'organisme, mais qui peut aussi devenir pathologique, par exemple dans le cas du choc septique (Moncada, S. et al. 1991).

Les effets du NO ont été mis en évidence surtout en présence d'inhibiteurs des NOS tels que le L-NMMA et le L-NAME, tous des analogues de la L-arginine. Le blocage du NO entraîne l'augmentation de la pression artérielle systémique par deux mécanismes, soit la diminution de l'effet vasodilatateur du NO et le renforcement de l'effet hypertenseur des systèmes vasoconstricteurs tels l'ET-1 et l'angiotensine-II et le système nerveux sympathique (Martin, P-Y. et Féraïlle, E. 1999). Lors de l'administration de doses uniques, l'effet presseur des inhibiteurs des NOS est dû à l'augmentation de la vasoconstriction causée par l'ET-1 (Banting, JD. et al. 1996; Baylis, C. 1987; Richard, V. et al. 1995). Cependant, il semble que l'effet de l'inhibition chronique de la synthèse du NO soit plutôt médié par l'augmentation de l'effet presseur de l'angiotensine-II et de la norépinéphrine (Lahera, V. et al. 1991). Ainsi, l'inhibition de ces systèmes presseurs réduit l'augmentation de la pression artérielle chez l'animal traité avec un inhibiteur des NOS (Lahera, V. et al. 1991; Mene, P. et Dunn, MJ. 1986).

#### 1.5.7.2.4 Effets rénaux du NO

Le NO module le débit sanguin rénal et l'excrétion hydrosodée. L'administration d'analogues de la L-arginine entraîne une vasoconstriction des artéioles afférente et efférente ainsi qu'une augmentation de la résistance vasculaire rénale causant une diminution du débit sanguin rénal, du taux de filtration glomérulaire et du coefficient d'ultrafiltration glomérulaire ainsi qu'une

augmentation de la pression hydraulique glomérulaire et de la protéinurie (Lahera, V. et al. 1991). Ces dommages rénaux sont principalement dus à l'augmentation de l'activité du système rénine-angiotensine et à la participation de la TXA<sub>2</sub> (Voir section 1.5.7.3). Le tableau 1.5.1 résume les effets hémodynamiques rénaux et tubulaires du NO.

*Tableau 1.5.1 : Localisation et rôles des NOS dans le rein.*

<b>ISOFORMES</b>	<b>PRINCIPALE LOCALISATION INTRARÉNALE</b>	<b>RÔLES PHYSIOLOGIQUES</b>
nNOS	Macula Densa  Appareil juxtaglomérulaire Cellules principales du TCC, anse grêle ascendante de Henle	Inhibition de la sécrétion de rénine  Régulation de la pression glomérulaire et du TFG Régulation de la sécrétion K <sup>+</sup> et de la réabsorption Na <sup>+</sup> ; modulation de la réabsorption d'eau
iNOS	TCC, TCME, TCMI  Tubules proximaux Anse ascendante large de Henle	Adaptation aux apports sodiques
eNOS	Artérioles afférentes et efférentes, capillaires glomérulaires Vasa recta descendantes  Tubules proximaux  Tubes collecteurs	Régulation de la pression glomérulaire  Régulation de la pression interstitielle médullaire Régulation de la natriurèse de pression Contre-régulation de l'angiotensine II

TCC : Tube collecteur cortical ; TCME : Tube collecteur de la médulla externe ; TCMI : Tube collecteur de la médulla interne ; TFG : Taux de filtration glomérulaire.

Tiré de (Martin, P-Y. et Féraïlle, E. 1999).

#### 1.5.7.2.5 Rôle du NO en IRC

Chez les patients atteints d'IRC, il se produit une augmentation sérique d'un analogue de la L-arginine, la diméthylarginine asymétrique (ADMA) (Vallance, P. et al. 1992). Chez ces patients, l'excrétion d'ADMA diminue, donc la concentration plasmatique augmente. L'accumulation d'ADMA dans le sang des patients insuffisants rénaux peut donc inhiber la

synthèse de NO et contribuer à l'élévation de la pression artérielle. En effet, l'infusion d'ADMA à des animaux normaux provoque une augmentation de la pression artérielle moyenne. Aussi, chez des volontaires sains, l'infusion de cet analogue de la L-arginine cause une diminution locale du débit sanguin (Vallance, P. et al. 1992).

#### 1.5.7.2.6 Effet de l'r-HuEPO sur le NO

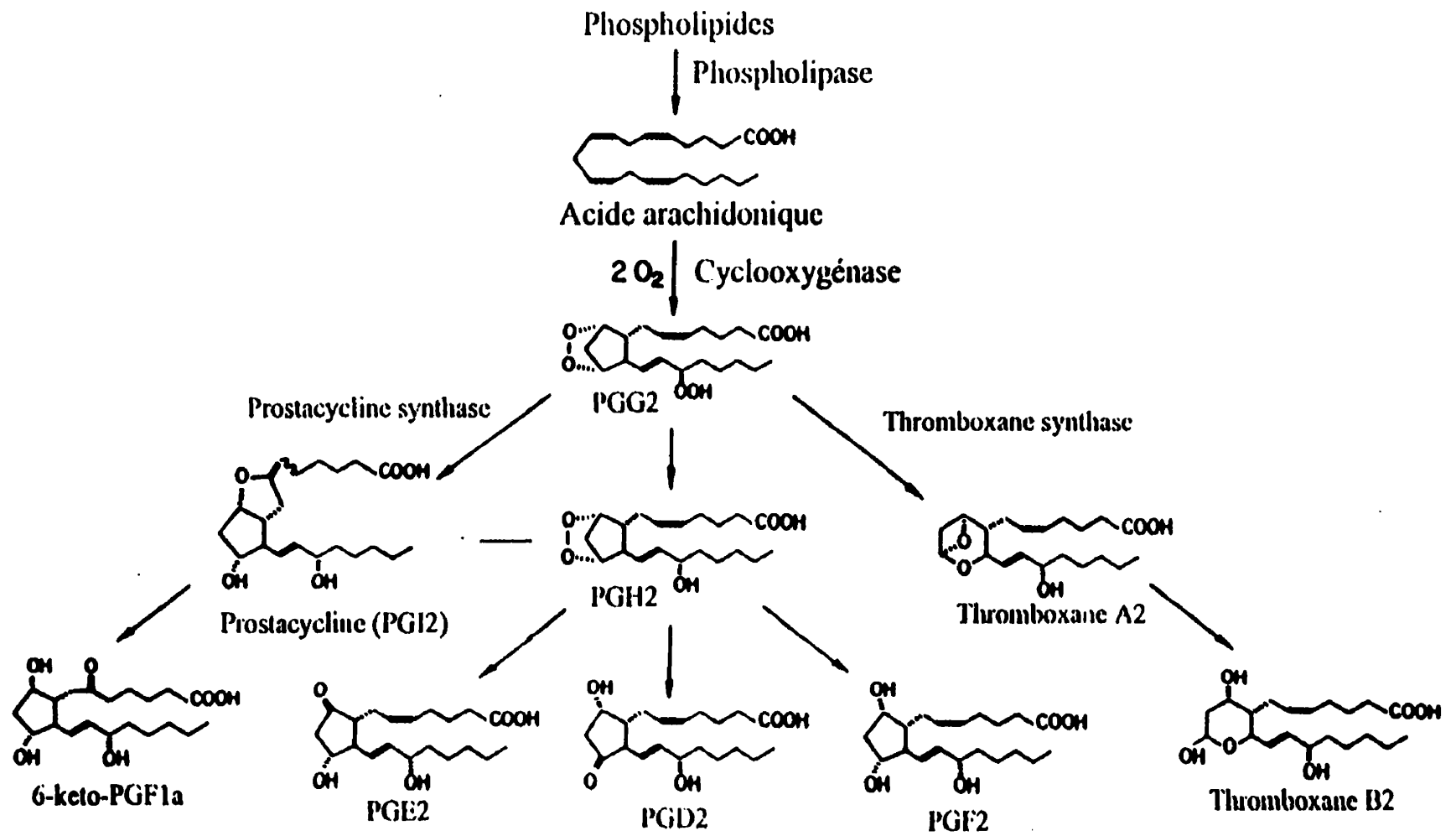
Chez l'animal ayant une fonction rénale intacte, à des doses employées en clinique, l'r-HuEPO n'a aucun effet sur la pression artérielle et semble augmenter l'activité du système NO (Del Castillo, D. et al. 1995; Tsukahara, H. et al. 1997; Wilcox, CS. et al. 1993). Le NO agit probablement comme mécanisme compensatoire de la vasoconstriction induite par l'r-HuEPO. Au contraire, la stimulation directe de cellules endothéliales d'artère coronaire humaine avec l'r-HuEPO semble diminuer l'expression de la eNOS (Wang, XQ. et Vaziri, ND. 1999).

En IRC, l'excrétion de nitrates et nitrites ainsi que l'expression des NOS dans l'aorte et le rein diminuent. Le traitement à l'r-HuEPO chez l'animal urémique ne provoque aucun changement de l'excrétion des nitrates/nitrites ou de l'expression des NOS tissulaires si on compare aux animaux urémiques non traités (Ni, Z. et al. 1998). Cependant, Ni et collaborateurs (Ni, Z. et al. 1998) ont démontré une augmentation de la résistance à la vasorelaxation causée par le NO chez l'animal urémique traité à l'r-HuEPO. Ainsi, le NO semble en partie impliqué dans l'effet presseur de l'r-HuEPO en IRC.

#### *1.5.7.3 La prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et la thromboxane (TX) A<sub>2</sub>*

##### 1.5.7.3.1 Synthèse de la PGI<sub>2</sub> et de la TXA<sub>2</sub>

Les produits dérivés de l'acide arachidonique (AA) sont appelés icosanoïdes puisque l'AA est un acide gras poly insaturé à 20 carbones (C<sub>20</sub>). L'AA est formé dans le foie par l'élongation et la désaturation de l'acide linoléique (C<sub>18</sub>). Après sa formation, l'AA est estérifié dans les phospholipides membranaires. Suite à différents stimuli provoquant l'activation de phospholipases cellulaires, principalement la phospholipase A<sub>2</sub> cytosolique (PLA<sub>2</sub>), mais aussi la phospholipase C (PLC), l'AA lié à la membrane cellulaire subit un clivage esterolytique qui mène au relarguage dans la cellule de l'AA libre. Ce mécanisme s'effectue via une protéine G et est dépendant du Ca<sup>2+</sup> et de la calmoduline. L'AA libre peut ensuite s'engager dans 3 voies



**Figure 1.5.4 :** Voie enzymatique de la cyclo-oxygénase aboutissant à la formation de la PGI<sub>2</sub> et de la TXA<sub>2</sub>.

enzymatiques principales, soit la voie de la cyclo-oxygénase (COX) (décrite à la figure 1.5.4), la voie de la lipoxygénase et celle du cytochrome P-450 (Breyer, MD. et Badr, KF. 1996).

La COX est une enzyme de 72 kd présente dans les membranes cytoplasmiques, nucléaires et probablement mitochondriales dans les cellules endothéliales des artères et des artérioles, les cellules mésangiales, les cellules épithéliales glomérulaires et les cellules interstitielles rénales; et dans presque tous les segments du tubule rénal. La COX se retrouve sous deux formes, soit constitutive (COX-1) ou inductible (COX-2) qui possèdent approximativement 75% d'homologie et proviennent de deux gènes distincts. La COX-1 est la principale enzyme présente dans les tissus, et l'enzyme dominante sinon la seule dans le rein en situation physiologique. La COX-2 peut être induite par les cytokines (principalement l'interleukine-1 (IL-1) et le « tumor necrosis factor » (TNF)) libérées durant le processus inflammatoire et lors d'endommagement et réparation des cellules, et peut être inhibée par les glucocorticoïdes. Les COX 1 et 2 diffèrent dans leur susceptibilité aux agents anti-inflammatoires, ce qui explique pourquoi un agent sélectif pour la COX-2 agirait au site d'inflammation sans toutefois provoquer les effets secondaires courant des anti-inflammatoires (ulcères gastriques ou diminution de la fonction rénale) (Quilley, J. et al. 1995).

La COX catalyse la formation des prostaglandines (PGs) endoperoxydes  $\text{PGG}_2$  et  $\text{PGH}_2$  à partir de l'AA. La  $\text{PGH}_2$  est ensuite convertie en  $\text{PGE}_2$  et  $\text{PGD}_2$  par des isomérases et en  $\text{PGE}_2$  et  $\text{PGF}_{2\alpha}$  par des réductases (Campbell, WB. et Halushka, PV. 1994) (figure 1.5.4).

La prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) synthase est l'enzyme qui catalyse la conversion de la  $\text{PGG}_2$  en  $\text{PGI}_2$ . La  $\text{PGI}_2$  synthase est une protéine de 50 kD présente principalement dans les cellules endothéliales. La  $\text{PGI}_2$  est un composé très instable, sa  $\frac{1}{2}$  vie métabolique est d'environ 3 minutes (Breyer, MD. et Badr, KF. 1996). La  $\text{PGI}_2$  est ensuite métabolisée par hydrolyse en 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  et par  $\beta$ -oxydation en 2,3-dinor-6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ , des métabolites stables inactifs (Campbell, WB. et Halushka, PV. 1994).

La  $\text{TXA}_2$  est synthétisée à partir de la  $\text{PGG}_2$  par la TX synthase. La  $\text{TXA}_2$  est rapidement métabolisée ( $t_{1/2}=30\text{sec}$ ) par hydrolyse en  $\text{TXB}_2$ . Une partie de la  $\text{TXB}_2$  est ensuite

transformée en 2,3-dinor-TXB<sub>2</sub> par  $\beta$ -oxydation ou en 11-dehydro-TXB<sub>2</sub> par une réaction de réduction.

#### 1.5.7.3.2 Récepteur et mécanisme d'action de la PGI<sub>2</sub> et de la TXA<sub>2</sub>

Le récepteur de la PGI<sub>2</sub> est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G. Suite à la liaison de la PGI<sub>2</sub> à son récepteur, la protéine G activée interagit avec l'effecteur, l'adénylate cyclase. L'adénylate cyclase catalyse la formation d'AMPc intracellulaire qui active une protéine kinase A responsable de la phosphorylation de protéines effectrices. La stimulation de la voie de l'AMPc par la PGI<sub>2</sub> est maximale après 30 secondes et se maintient pendant environ 2 minutes pour diminuer graduellement sur 30 minutes. La PGI<sub>2</sub> pourrait aussi activer directement l'adénylate cyclase dans des préparations de membranes isolées {Moncada, S. 1979}. L'activation du récepteur de la PGI<sub>2</sub> provoque aussi l'ouverture de canaux potassium pouvant causer une hyperpolarisation (Thierauch, KH. et al. 1994).

Le récepteur de la TXA<sub>2</sub> est aussi un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G. Dans le cas de la TXA<sub>2</sub>, la protéine G active la phospholipase C qui provoque l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4-5 diphosphate (PIP<sub>2</sub>). Il y a alors production de 2 seconds messagers, l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub>, hydrosoluble, provoque la libération de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire par interaction avec des récepteurs aux sites de stockage (les endosomes). Le DAG, plus liposoluble, se loge dans la membrane cellulaire où il active la protéine kinase C et permet l'ouverture de canaux calciques et l'entrée de calcium dans la cellule. Tous ces mécanismes favorisent l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et la contraction cellulaire.

#### 1.5.7.3.3 Rôles physiologiques de la PGI<sub>2</sub>

La PGI<sub>2</sub>, découverte en 1976 par Moncada et collaborateurs (Moncada, S. et al. 1976; Simons, JL. et al. 1994), est une des principales substances produites par les cellules endothéliales. Dans le système cardiovasculaire, la PGI<sub>2</sub> provoque une hypotension (relaxation des cellules musculaires lisses) accompagnée d'une élévation de la fréquence cardiaque par un mécanisme réflexe. La PGI<sub>2</sub> est un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. Elle est aussi un



médiateur des réactions inflammatoires et elle a des effets au niveau des systèmes rénal, gastro-intestinal et reproducteur (Campbell, WB. et Halushka, PV. 1994; Moncada, S. et Vane, JR. 1979). La PGI<sub>2</sub> peut aussi réguler le tonus vasculaire et atténuer la croissance cellulaire en réduisant entre autre les effets et la production d'ET-1. En fait la PGI<sub>2</sub> agirait au niveau de la transcription et de la traduction du peptide (Prins, BA. et al. 1994).

La PGI<sub>2</sub> est le principal dérivé de la COX produit dans les cellules endothéliales du glomérule. Elle est aussi produite dans les cellules mésangiales et en plus petite proportion dans les tubules rénaux. La PGI<sub>2</sub> provoque la relaxation des muscles lisses vasculaires rénaux incluant l'artériole afférente et l'artériole efférente, ce qui permet la préservation du débit sanguin rénal et du taux de filtration glomérulaire. Lorsqu'elle est produite dans les cellules mésangiales, la PGI<sub>2</sub> atténue la contraction induite par des vasoconstricteurs tels l'angiotensine-II, la noradrénaline, l'ET-1 et l'AVP. La PGI<sub>2</sub> peut induire la relâche de rénine. La PGI<sub>2</sub> joue aussi un rôle dans l'excrétion hydrosodée à la fois en augmentant le débit sanguin rénal et en agissant sur la réabsorption du Na<sup>+</sup> et la régulation de l'AVP dans le tubule collecteur. L'infusion de PGI<sub>2</sub> cause la natriurèse et la diurèse (Breyer, MD. et Badr, KF. 1996; Campbell, WB. et Halushka, PV. 1994).

#### 1.5.7.3.4 Rôles physiologiques de la TXA<sub>2</sub>

La TXA<sub>2</sub> fut découverte en 1974 par Willis et Kuhn (Willis, A. et Kuhn, DC. 1974). La TXA<sub>2</sub> possède des effets opposés à ceux de la PGI<sub>2</sub> : elle est un puissant vasoconstricteur et un activateur de l'agrégation plaquettaire (Campbell, WB. et Halushka, PV. 1994).

Dans le rein, la TXA<sub>2</sub> cause la vasoconstriction des vaisseaux incluant les artérioles afférente et efférente. Elle cause la diminution du débit sanguin rénal et du taux de filtration glomérulaire ainsi qu'une sévère diminution de la fraction de filtration, suggérant une action prédominante préglomérulaire. La TXA<sub>2</sub> participe aussi au rétrocontrôle tubulo-glomérulaire (Breyer, MD. et Badr, KF. 1996; Campbell, WB. et Halushka, PV. 1994).

Cependant, la TXA<sub>2</sub> est synthétisée en très petite quantité dans l'endothélium vasculaire et rénal en situation physiologique normale. En effet, l'inhibition de la synthèse de la TXA<sub>2</sub>

n'entraîne aucun changement de la résistance vasculaire rénale (Breyer, MD. et Badr, KF. 1996). Cependant, lors de pathologies comme l'IRC, sa production augmente (Klahr, S. et al. 1988) (Ikeda, T. et al. 1989).

#### 1.5.7.3.5 Rôle de la PGI<sub>2</sub> et de la TXA<sub>2</sub> en IRC

Dans le cas de l'IRC, la TXA<sub>2</sub> est impliquée dans les réactions inflammatoires intrarénales, les accidents thrombotiques intraglomérulaires, la protéinurie et l'hypertension. Lors de l'inhibition chronique de la synthèse ou du récepteur de la TXA<sub>2</sub> en IRC, il y a amélioration du taux de filtration glomérulaire, diminution de la protéinurie et préservation de l'histologie rénale (Hora, K. et al. 1990; Purkerson, ML. et al. 1985; Remuzzi, A. et al. 1985; Zoja, C. et al. 1990).

En résumé, chez les patients atteints d'IRC, la PGI<sub>2</sub> joue un rôle protecteur tandis que la TXA<sub>2</sub> a un effet délétère. Des études cliniques seraient requises pour établir les effets bénéfiques de l'inhibition de la TXA<sub>2</sub> chez les patients insuffisants rénaux (Breyer, MD. et Badr, KF. 1996).

#### 1.5.7.3.6 Effet de l'r-HuEPO sur les prostanoïdes

Seulement quelques études ont été menées révélant l'implication de la PGI<sub>2</sub> et de la TXA<sub>2</sub> dans l'hypertension associée à l'r-HuEPO en IRC. Bode-B et collaborateurs (Bode-B, SM. et al. 1992; Bode-B, SM. et al. 1996) ont démontré un changement dans la production d'icosanoïdes en faveur des dérivés responsables de la vasoconstriction. Ils ont observé *in vitro* une augmentation de la relâche de TXA<sub>2</sub> et de PGF<sub>2α</sub> et une diminution de la relâche de PGI<sub>2</sub>. De plus, il a été démontré lors d'études cliniques que l'incidence de l'hypertension induite par l'r-HuEPO diminue avec l'administration d'un inhibiteur de la COX (Aspirine, Indométacine) (Caravaca, F. et al. 1994).

## **Chapitre 2**

*Hypothèse de recherche*

## 2.1 RATIONNELLE

Comme je l'ai déjà mentionné, l'EPO possède des récepteurs à la surface des cellules endothéliales (Anagnostou, A. et al. 1994). La cellule endothéliale en culture peut réagir à une stimulation à l'EPO en libérant certains facteurs vasoactifs tels l'ET-1 et les icosanoïdes vasoconstricteurs (Bode-B, SM. et al. 1992; Bode-B, SM. et al. 1996; Carlini, RG. et al. 1993). De façon similaire, nous avons démontré *in vivo* qu'il existait une augmentation de la production vasculaire d'ET-1 chez le rat urémique traité à l'r-HuEPO (Lebel, M. et al. 1998). De plus, il semble exister des anomalies du système NO-GMPc dans cette forme d'hypertension artérielle (Ni, Z. et al. 1998; Vaziri, ND. et al. 1996; Wang, XQ. et Vaziri, ND. 1999).

## 2.2 HYPOTHÈSE

L'hypertension en IRC s'accompagne d'un débalancement des facteurs endothéliaux tels l'ET-1, le NO, la PGI<sub>2</sub> et la TXA<sub>2</sub>. Nous émettons l'hypothèse que l'r-HuEPO pourrait exagérer la dysfonction endothéliale retrouvée dans l'IRC, ce qui expliquerait l'aggravation de la pression artérielle chez les patients et les rats urémiques traités à l'r-HuEPO.

## 2.3 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

1. Dans un premier temps, cette étude a pour but d'éclaircir le rôle du NO dans la réponse pressive à l'r-HuEPO en IRC. Pour ce faire, nous allons :
  - Étudier l'effet du L-NAME, un inhibiteur de la synthèse du NO, chez les rats normaux traités ou non à l'r-HuEPO.
  - Étudier l'effet du L-NAME chez les animaux urémiques recevant ou non l'r-HuEPO.

2. Dans un deuxième temps, nous voulons évaluer le rôle de certains icosanoïdes endothéliaux, la  $TXA_2$  et la  $PGI_2$ , chez le rat urémique avec ou sans traitement à l'r-HuEPO.

*Rôle des icosanoïdes en IRC. Les objectifs spécifiques sont :*

- Déterminer les concentrations basales de  $PGI_2$  et  $TXA_2$  dans les tissus et l'urine des animaux témoins et urémiques.
- Évaluer les effets du blocage de l'action de la  $TXA_2$  chez les animaux urémiques.

*Rôle de la  $PGI_2$  et de la  $TXA_2$  dans la réponse pressive à l'r-HuEPO en IRC. Les objectifs spécifiques de cette partie de l'étude sont :*

- Déterminer les concentrations basales de  $PGI_2$  et de  $TXA_2$  dans les tissus des rats témoins et urémiques traités à l'r-HuEPO.
- Évaluer l'effet de l'inhibition de l'action de la  $TXA_2$  chez des animaux urémiques traités à l'r-HuEPO.

# **Chapitre 3**

*Matériel et méthodes*

Cette section décrit notre modèle expérimental d'IRC ainsi que les techniques chirurgicales et les techniques de dosages biochimiques et radio-immunologiques.

### **3.1 MODÈLE EXPÉRIMENTAL D'IRC, NÉPHRECTOMIE SUBTOTALE 5/6**

Les animaux utilisés sont des rats mâles Wistar (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) pesant entre 200 et 250 g à l'arrivée. La néphrectomie est effectuée en deux étapes sous anesthésie à l'isoflurane (1-2% Abbott Laboratories, Montréal, Québec, Canada). La première étape consiste en l'ablation des pôles inférieur et supérieur du rein gauche : une incision est pratiquée sur le flanc de l'animal, le rein est sorti de la cavité abdominale et l'excision des pôles est effectuée à l'aide d'une lame de scalpel. Un agent hémostatique (Gelfoam, Upjohn, Don Mills, Ontario, Canada) est apposé sur les parties incisées du rein pour accélérer la coagulation sanguine. Quelques jours après, la néphrectomie totale du rein droit est effectuée en coupant l'artère et la veine rénales ainsi que l'uretère à la base du rein après ligature de celles-ci.

Comme chez l'humain insuffisant rénal, l'urémie, l'anémie et l'hypertension artérielle s'installent chez l'animal après néphrectomie 5/6 au cours des 3 à 5 semaines suivantes. Dans le modèle d'ablation des pôles, l'hypertension est dépendante du volume, c'est-à-dire qu'elle est due en grande partie à l'augmentation du volume sanguin suite à l'incapacité du rein restant à maintenir l'équilibre hydrique (Gretz, N. et al. 1993).

### **3.2 MESURE DE LA PRESSION ARTÉRIELLE SYSTOLIQUE**

Les rats sont placés dans une chambre chauffée à environ 25-30°C pendant 15 minutes afin d'obtenir une circulation maximale dans l'artère caudale. Le rat est ensuite placé dans une cage à contention et une lampe à lumière incandescente est dirigée sur la queue afin de maintenir la température à environ 29°C. Les pulsations de la queue sont mesurées à l'aide d'un détecteur pulsatile photoélectrique (B60-3/4 et B60-7/16). Le senseur est muni d'une bande de caoutchouc qui se gonfle selon le même principe qu'un manomètre avec brassard.

La pulsation est amplifiée par un système de mesure de pression artérielle (IITC, modèle 29, Life Science, Woodland Hills, CA, USA). Cet appareil est relié à un ordinateur par un interface analogue-digital (Biopac System, modèle MP100, Goleta, CA, USA). Les données sont analysées avec le logiciel « Acqknowledge » (Microsoft Corporation, version 3.0). La valeur de pression artérielle systolique (PAS) retenue correspond au début de l'augmentation de l'amplitude des pulsations sur le tracé. La valeur de PAS enregistrée correspond à la moyenne d'au moins 3 mesures.

### **3.3 PRÉLÈVEMENTS SANGUINS PENDANT L'ÉTUDE**

Le rat est anesthésié à l'isoflurane. Des échantillons d'environ 1cc de sang sont prélevés par ponction dans la veine jugulaire à l'aide d'une seringue de 3cc et d'une aiguille 25G 5/8 rincée avec une solution d'EDTA 7.5%. Les échantillons recueillis sont utilisés pour mesurer l'hématocrite ainsi que les paramètres biochimiques (urée, créatinine). Pour la mesure de l'hématocrite, le sang total est recueilli dans 2 capillaires héparinés. Après centrifugation pendant 2 minutes à 19 200 rpm, l'hématocrite est déterminé en mesurant la proportion d'érythrocytes sur celle du sang total et exprimé en %.

### **3.4 ADMINISTRATION DE L'R-HUEPO**

L'r-HuEPO (Eprex, OrthBiothec, Don Mills, Ontario, Canada) est administrée par injection sous-cutanée de 100 unités/kg trois fois par semaine avec une seringue de 1cc munie d'une aiguille 27G ½.

### **3.5 ADMINISTRATION DU L-NAME ET DU RIDOGREL**

Ces médicaments sont administrés dans l'eau à boire. Le L-NAME est dissout directement dans l'eau du robinet. La concentration est ajustée selon le poids des animaux à une dose de 100 mg/kg/jour. Le ridogrel est d'abord dissout dans un petit volume de NaOH 0.02N et complété au volume désiré avec l'eau du robinet. Le pH est ensuite ajusté à 7.0 avec du HCl 1N. La concentration est ajustée selon le poids des animaux à une dose de 25 mg/kg/jour.



### 3.6 COLLECTE URINAIRE

Pour la récolte de l'urine, les rats sont placés en cages métaboliques pendant 24h pour l'acclimatation et la collecte urinaire est ensuite effectuée pendant 24h. Le volume urinaire est mesuré. L'urine des animaux témoins doit être diluée 2.5 fois pour l'analyse des paramètres biochimiques (protéinurie, créatinine).

### 3.7 PRÉLÈVEMENTS À LA FIN DE L'ÉTUDE

Les animaux sont anesthésiés au pentobarbital (65 mg/kg i.p., MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada) et sacrifiés par exsanguination par ponction de l'aorte abdominale. Le sang est utilisé pour la mesure de l'hématocrite. Le sérum est ensuite conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour la mesure ultérieure de la créatinine et de l'urée sériques tandis que le plasma est gardé à  $-20^{\circ}\text{C}$  et conservé avec de l'aprotinine (500 U/mL de sang, Boehringer Mannheim) pour mesurer l'ET-1. Un segment de l'aorte thoracique de la 1<sup>ière</sup> à la 8<sup>ième</sup> côte, et le lit artériel mésentérique entier, de la 1<sup>ière</sup> artère craniale jusqu'à la bordure de l'intestin, sont prélevés, dégraissés et congelés. Le cœur est ensuite prélevé et pesé. Enfin, le rein est coupé longitudinalement et la papille est éliminée alors que le cortex est conservé et congelé. Les tissus sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour la mesure ultérieure de l'ET-1 ou des icosanoïdes.

### 3.8 MESURE DE L'ET-1 IMMUNORÉACTIVE

Les tissus congelés sont pesés et homogénéisés sur glace trois fois 15 secondes à l'aide d'un polytron (Biospec Products, Bartlesville, Okla., USA) dans 2 mL d'une solution d'extraction acide composée d'HCl 1N, d'acide acétique 1%, d'acide trifluoroacétique (TFA) 1% et de NaCl 1%. Les homogénats sont ensuite centrifugés à 3000 rpm pendant 30 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant des tissus homogénéisés ou des échantillons de 2 mL de plasma ou d'urine sont acidifiés avec du TFA 0.2%. L' $\text{I}^{125}$ -ET-1 (~1000 cpm) (Dupont NEN, Boston, Mass., USA) est ensuite ajouté avant l'extraction sur une colonne  $\text{C}_{18}$  Sep-Pak (Waters, Milford, Mass., USA). L'ET-1 est éluée avec de l'acétonitrile 60% et du TFA 0.1%. Les échantillons sont

évaporés à sec pendant la nuit dans un Speed-Vac (Savant instruments Inc., Farmingdale, N.Y., USA) et reconstitués dans un tampon d'essai radioimmunologique (RIA) contenant du phosphate de sodium 100mM pH 7.4, du NaCl 50mM, de l'albumine de sérum bovin 0.1%, du triton X-100 0.1% et de l'azide de sodium 0.01%. La radioactivité recouvrée après extraction est déterminée par comptage des échantillons dans un compteur gamma. Le recouvrement de l' $I^{125}$ -ET-1 est de 90 à 95% dans les tissus et de 75 à 85% et dans le plasma et l'urine. De l'antisérum de lapin dilué 1/10 000 dans du tampon RIA est ajouté à l'échantillon ou à de l'ET-1 standard (Peninsula Laboratories, Belmont, Calif., USA) à des concentrations variant entre 0.5 et 128 pg. L'antisérum de lapin est spécifique à l'ET-1 avec une réactivité croisée d'environ 30.5, 62 et 30.9% avec la big-ET-1, l'ET-2 et l'ET-3 respectivement. Après 24 heures d'incubation à 4°C, l' $I^{125}$ -ET-1 (15 000 cpm) est ajouté et incubé à nouveau pendant 24 heures à 4°C. Un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin (Immunocorp., Montréal, Québec, Canada) est ajouté pour séparer les complexes antigène-anticorps liés de l'antigène non lié. Après 2 heures d'incubation à la température de la pièce, 0.5 mL de tampon RIA est ajouté et les échantillons sont centrifugés pendant 20 minutes à 2500 rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot conservé pour la mesure de la radioactivité dans un compteur gamma. La concentration d'ET-1 est déterminée avec une courbe standard d'ET-1 et est corrigée avec les recouvrements obtenus après l'extraction pour tenir compte des pertes.

### 3.9 MESURE DES ICOSANOÏDES

Les tissus sont homogénéisés dans un tampon phosphate salin 10mM contenant du  $NaH_2PO_4$  2mM, du  $Na_2HPO_4$  8mM à pH 4.0 et du NaCl 5mM. 3000 cpm de  $H^3$ -TXB<sub>2</sub> (NEN™ Life Science Products, Inc. Boston, MA, USA) et de  $H^3$ -6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  (NEN™ Life Science Products, Inc. Boston, MA, USA) sont ajoutés à 4 mL d'urine ou d'homogénat tissulaire et le pH est ajusté à 3.0. Les échantillons sont extraits sur une colonne C<sub>18</sub> Sep Pak. L'échantillon est élué avec de l'éthyl acétate, évaporé et resuspendu dans 1 goutte de méthanol et 2 gouttes d'un mélange contenant 50% de dichlorométhane, 5% de méthanol, 45% d'isooctane et 0.1% d'acide acétique. Les échantillons sont ensuite purifiés sur une colonne de Sephadex LH20 (Pharmacia, Upsala, Sweden) et élués avec le même mélange de solvants pour la séparation

des fractions de 6-keto-PGF<sub>1α</sub> et de TXB<sub>2</sub>. Le recouvrement est d'environ 60% pour la TXB<sub>2</sub> et 40% pour la 6-keto-PGF<sub>1α</sub>. Des RIAs spécifiques sont effectués sur deux aliquotes de chaque échantillon. La H<sup>3</sup>-TXB<sub>2</sub> (5000 cpm/100 μL) est ajoutée aux échantillons suivi de l'ajout d'éthylène glycol et d'une évaporation sous vide. La courbe standard de la TXB<sub>2</sub> est préparée dans le méthanol et les concentrations varient entre 10 et 300 pg/100 μL. La H<sup>3</sup>-6-keto-PGF<sub>1α</sub> (6000 cpm/25 μL) est ajoutée après l'évaporation puisqu'elle est préparée dans l'eau. De façon similaire, la courbe standard de la 6-keto-PGF<sub>1α</sub> n'est pas évaporée puisqu'elle est aussi préparée dans l'eau, les concentrations varient entre 10 et 300 pg/25 μL. L'anticorps spécifique dilué 1/100 000 pour la TXB<sub>2</sub> et 1/25 000 pour la 6-keto-PGF<sub>1α</sub> est ajouté. La réactivité croisée des anticorps avec les autres icosanoïdes est de moins de 0.1% pour la TXB<sub>2</sub> et de moins de 2% pour la 6-keto-PGF<sub>1α</sub>. Après 24h d'incubation, les échantillons sont ajoutés à une suspension contenant 5% de charbon, 0.5% de dextran T 70 et de la gamma globuline 5%. Les échantillons sont agités vigoureusement pour permettre au charbon de se fixer à la fraction non liée de l'antigène. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 20 minutes à 3000 rpm pour la séparation des complexes et le liquide à scintillation est ajouté. La radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation de type bêta. La limite inférieure de détection de l'essai est entre 5 et 10 pg.

### **3.10 AUTRES ANALYSES BIOCHIMIQUES**

Le sérum est obtenu à partir du sang total recueilli dans un tube Eppendorf incubé à la température de la pièce pendant 1h et centrifugé pendant 2 minutes à 19 200 rpm. La créatinine sérique ainsi que la protéinurie et la créatinine urinaire sont mesurées à l'aide d'un système d'autoanalyse (Ilab 1800, Lexington, Mass., USA).

### **3.11 ANALYSES STATISTIQUES**

Les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel « GraphPad InStat » (version 3.00, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Les valeurs sont comparées par analyse de variances (ANOVA) sur les différents groupes suivie d'un test de Tukey pour comparer

chaque groupe entre eux. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Les différences sont considérées significatives si  $p < 0.05$ .

# **Chapitre 4**

*Résultats*

#### **4.1 EFFET DU L-NAME SUR LA PRESSION ARTÉRIELLE ET LE TAUX D'ET-1 CHEZ LES ANIMAUX TÉMOINS ET URÉMIQUES TRAITÉS OU NON À L'R-HUEPO.**

##### **4.1.1 Introduction**

On a récemment démontré l'altération de la production de NO et d'ET-1 dans l'hypertension induite par l'administration d'r-HuEPO chez les rats en IRC. Dans la présente étude, pour mieux définir le rôle compensatoire du NO lors du traitement à l'r-HuEPO, nous avons évalué l'effet du L-NAME, un inhibiteur de la synthèse du NO, sur la pression artérielle systolique (PAS) et la production d'ET-1 dans les vaisseaux sanguins chez des rats témoins et urémiques traités ou non avec l'r-HuEPO.

##### **4.1.2 Matériel et méthodes**

L'insuffisance rénale est induite par néphrectomie subtotale 5/6. Les rats témoins et urémiques sont étudiés séparément et divisés en 4 groupes : véhicule, r-HuEPO, L-NAME, L-NAME + r-HuEPO. Le L-NAME (100 mg/kg/jour) et l'r-HuEPO (100 U/kg, s.c., 3X/sem) ou le véhicule sont administrés pendant 4 semaines pour les rats témoins et pendant 2 semaines pour les rats urémiques. La PAS est mesurée avant et après le début du traitement à la semaine 2 et 4 chez les animaux témoins et à la semaine 1 et 2 chez les animaux urémiques. L'hématocrite, la créatinine sérique ainsi que les concentrations d'irET-1 dans le plasma et les tissus (aorte thoracique, lit artériel mésentérique et cortex rénal) sont mesurées à la fin du protocole.

##### **4.1.3 Résultats**

La PAS des animaux témoins et urémiques augmente significativement suite au traitement au L-NAME et l'augmentation est encore plus marquée chez les animaux urémiques recevant l'r-HuEPO ( $222 \pm 7$  mmHg vs  $198 \pm 6$  mmHg,  $p < 0.05$ ). La concentration d'irET-1 dans l'aorte thoracique chez les rats témoins et urémiques augmente après traitement au L-NAME. Cependant, la concentration d'irET-1 dans le lit artériel mésentérique et dans le cortex rénal

reste inchangée dans les deux protocoles. La concentration d'irET-1 dans l'aorte thoracique est encore plus élevée chez les rats L-NAME (témoins et urémiques) recevant l'r-HuEPO.

#### **4.1.4 Conclusion**

Ces résultats démontrent le rôle important du NO en tant que mécanisme régulateur de l'effet de différents vasoconstricteurs tel l'ET-1 sur l'homéostasie vasculaire. Ce mécanisme compensatoire semble plus important encore chez les animaux urémiques recevant de l'r-HuEPO. Cette étude démontre aussi que le traitement au L-NAME augmente la concentration d'irET-1 dans les vaisseaux de gros calibre, mais non dans les vaisseaux de résistance, suggérant une différence dans la régulation de la production locale d'ET-1 dans les différents lits vasculaires après inhibition chronique du NO.

Les détails de cette étude apparaissent dans le manuscrit ci-joint (sous presse) (section 4.1.5).

#### **4.1.5 CHRONIC NITRIC OXIDE INHIBITION AGGRAVATES HYPERTENSION IN ERYTHROPOIETIN-TREATED RENAL FAILURE RATS**

C. Moreau, R. Larivière, I. Kingma, J.H. Grose and M. Lebel  
Research Centre and Division of Nephrology, CHUQ, L'Hôtel-Dieu de Québec Hospital and  
Department of Medicine, Laval University, Quebec, Canada

**Key words :** Erythropoietin, hypertension, renal failure, nitric oxide, L-NAME, endothelin-1, cGMP.

#### **ABSTRACT**

Alterations in nitric oxide (NO) and endothelin-1 (ET-1) production have recently been reported in erythropoietin (r-HuEPO)-induced hypertension in renal failure rats. The present study was designed to evaluate the effect of NO synthase inhibition with the L-arginine analog N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on blood pressure (BP) and ET-1 production in control and in uremic rats treated or not treated with r-HuEPO. Renal failure was induced by a two-stage 5/6 nephrectomy. Control and uremic rats were studied separately and subdivided into four groups: vehicle, r-HuEPO, L-NAME + vehicle and L-NAME + r-HuEPO. L-NAME (100 mg/kg/day), r-HuEPO (100 U/kg, subcutaneously, three times per week), the vehicle or both were administered during 4 weeks in control rats and during 2 weeks in uremic rats. Systolic BP was recorded before and after the onset of treatment at weeks 2 and 4 in control rats and at weeks 1 and 2 in uremic rats. Hematocrit, serum creatinine, plasma, blood vessel (thoracic aorta and mesenteric artery bed) and renal cortex immunoreactive (ir) ET-1 concentrations were measured at the end of the protocol. L-NAME enhanced BP in control and uremic rats and the increase was significantly higher in uremic rats under r-HuEPO therapy ( $222 \pm 7$  mmHg vs  $198 \pm 6$  mmHg,  $p < 0.05$ ). L-NAME induced an increase in thoracic aorta ir-ET-1 concentrations in control and uremic rats. In contrast, ir-ET-1 concentrations were unchanged in the mesenteric arterial bed and the renal cortex of control and uremic animals. R-HuEPO increased thoracic aorta ir-ET-1 contents in L-NAME treated control and uremic rats. These results underline the important role of NO release in opposing the action of vasopressors on blood vessel tone which appears more important in uremic rats treated with r-HuEPO. L-NAME treatment increased large vessel, but not small resistance artery ir-ET-1 concentrations, suggesting differential regulation of ET-1 production in different vascular beds under chronic NO synthase inhibition.



Abbreviated title: **NO synthase inhibition in r-HuEPO-induced hypertension.**

Correspondence : **Marcel Lebel, M.D.**  
**CHUQ, L'Hôtel-Dieu de Québec Hospital**  
**11 côte du Palais, Québec (Qué.)**  
**Canada, G1R 2J6**  
**Tel : (418) 691-5580**  
**Fax : (418) 691-5562**  
**Email: [marcel.lebel@crhdq.ulaval.ca](mailto:marcel.lebel@crhdq.ulaval.ca)**

## **INTRODUCTION**

In anemic patients with chronic renal failure, replacement therapy with recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) increases blood pressure and may lead to *de novo* hypertension or the exacerbation of existing hypertension (1-4). The pressor effect appears to occur almost exclusively in uremic patients. Indeed, hypertension has not been reported in clinical trials in which r-HuEPO was administered in cases of non-renal anemia (5-7) or in healthy volunteers (8). Similarly, in renal failure (5/6 nephrectomy) rats chronic r-HuEPO administration induced hypertension while control rats remained normotensive (9). Hypertension, however, has been observed in normal rats treated with higher doses of r-HuEPO (10) or using the peritoneal route of injection (11).

The r-HuEPO-induced hypertension in renal failure can be ascribed to many mechanisms such as inappropriate increase in peripheral vascular resistance (12), direct vasopressor action of r-HuEPO (13), and enhanced tissue renin-angiotensin activity (14); more recently, imbalances in endothelium-derived vasoactive autacoids have also been documented. Indeed, Vaziri *et al* (15) reported alterations in nitric oxide (NO) metabolism. EPO receptors are present on the surface of vascular endothelial cells (16) and these cells are capable of releasing endothelin-1 (ET-1) under the influence of r-HuEPO (17,18). Similarly, we recently reported an increase in blood vessel ET-1 concentration in hypertensive uremic rats treated with r-HuEPO (19) and that this progression of hypertension can be prevented by treatment with selective ET<sub>A</sub> receptor antagonists (20).

The mechanisms by which blood pressure remains normal in r-HuEPO-treated control rats (9) or healthy volunteers (8) have not been thoroughly explained. A few investigators reported an increase in urinary excretion of the stable NO metabolites, nitrite and nitrate (21,22), or of urinary cGMP (23) suggesting compensatory mechanisms that might limit the pressor effect of ET-1 overproduction with r-HuEPO treatment. The effect of r-HuEPO on plasma and blood vessel ET-1 concentrations has not been documented in normal rats compared to uremic rats, with or without NO synthase inhibition.

In the present study, in order to evaluate the potential compensatory NO-mediating vasodilation during chronic r-HuEPO therapy, we investigated the effect of chronic NO synthase inhibition with the L-arginine analog N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on blood pressure and ET-1 production in normal and in uremic (5/6 nephrectomy) rats treated or not treated with r-HuEPO.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animal experiments**

The research protocols and experimental manipulations were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Protection of Animals and were approved by the Animal Care Committee of Laval University. Male Wistar rats (220g) were obtained from Charles River (St-Constant, Quebec, Canada) and allowed to acclimatize one week in our animal facilities with temperature and humidity control and a 12h dark/light cycle prior to any experimental intervention. Food (standard rat chow) and tap water were available *ad libitum*. Control and uremic animals were studied in two different experimental protocols. Under both protocols, animals were randomly divided into 4 subgroups: vehicle, r-HuEPO, L-NAME + vehicle and L-NAME+r-HuEPO. Renal failure was induced by a two-stage 5/6 nephrectomy procedure (9). Briefly, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital (somnotol, 65 mg/kg i.p. MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada) and, via a left flank incision, approximately two-thirds of the left kidney was removed by excision of the upper and lower poles. Blood loss was minimized by the application of gelatin sponges (Gelfoam, Upjohn, Don Mills, Ontario, Canada). One week later, the right kidney was removed through a right lateral flank incision. r-HuEPO (Eprex, OrthoBiotech, Don Mills, Ontario, Canada: 100 U/kg) or the vehicle (NaCl 0.9%) were administered subcutaneously three times per week. This dosage is commonly used to treat anemia in renal failure patients (1,2). We previously reported that this concentration was adequate to significantly increase blood pressure in uremic rats but had no effect on the blood pressure of control rats (9). L-NAME (Sigma Chemical Co. St.-Louis. MO. USA: 100 mg/kg/day) was given in drinking water. We previously showed that this L-NAME dosage was effective to induce hypertension in rats (24). Treatment with r-HuEPO, L-NAME or a combination of both lasted 4 weeks in the group of control rats and 2 weeks in the group of uremic rats; in a pilot study, we observed that uremic animals receiving L-NAME + r-HuEPO developed severe hypertension within 2 weeks. Systolic blood pressure was recorded prior to treatment and at weeks 2 and 4 in control rats. In uremic rats, systolic blood pressure was measured after 5/6 nephrectomy prior to treatment and at weeks 1 and 2. Hematocrit, serum creatinine and plasma immunoreactive ET-1 (ir-ET-1) were measured at the time of sacrifice; the animals were anesthetized with pentobarbital (65 mg/kg i.p.) and exsanguinated by abdominal aortic puncture. Blood samples for ir-ET-1 determinations were collected in aprotinin (500 kallikrein inhibitory units/ml: Boehringer Mannheim GmbH, Germany) and EDTA (1 mg/ml). A segment of renal cortex, of thoracic aorta from the 1<sup>st</sup> to the 8<sup>th</sup> caudal ribs and the complete mesenteric vascular bed were removed, cleaned of adipose tissue, and then quickly frozen and stored at -80°C for ET-1 measurements.

## Methods

Systolic blood pressure was measured by the tail-cuff method after warming and with slight restriction using an I.I.T.C. blood pressure system fitted with a model 29 pulsar sensor (I.I.T.C. Life Science, Woodlands Hill, Ca, USA). Blood pressure was recorded using a computerized acquisition system (model NP100, Biopac System, Goleta, CA, USA) and the average of three readings was used for data analysis. Hematocrit was determined in duplicate in Pre-Cal micro-hematocrit tubes (Becton-Dickinson Company, Parsippony, N.J., USA) after centrifugation at 19,000 r.p.m. for 2 minutes. Serum creatinine levels were measured by autoanalyzer (Ilab 1800, Lexington, MA, USA). Plasma and tissue ir-ET-1 were measured by a specific radioimmunoassay in SepPak extracted samples (Water Associates, Milford, MA, USA) (25). One thoracic aorta segment or one mesenteric arterial bed was utilized per extraction and was assayed individually. The tissue samples were processed as described (26). The recovery of the extraction procedure varied from 75-80% and was corrected in the final calculations. The lower ET-1 detection limit was 1 pg/tube with 50% tracer displacement around 10 pg/tube on the standard curve. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 7 and 10%, respectively. Blood vessel ir-ET-1 concentrations were expressed as pg per total thoracic aorta segment or complete mesenteric arterial bed instead of pg per mg of tissue weight (19.26): this approach was taken because hypertensive uremic rats develop media hypertrophy which results in increased blood vessel weights, while the endothelium mass from which ET-1 is exclusively produced is likely unchanged.

### **Analysis of data**

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons within subgroups were analyzed first by ANOVA followed by Student-Newman-Keul's tests for multiple comparisons. Differences between groups of control and uremic rats were compared using unpaired Student t-test. The correlations were evaluated by linear regression analysis. Statistical significance was accepted at a value of  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Control rats**

The mean body weight was  $219 \pm 2$  g at the start of the study and was similar in all groups at the end of the four week study. Figure 1 (panel A) illustrates the changes in mean systolic blood pressure. Following treatment, the mean systolic blood pressure was similar in the groups receiving the vehicle and r-HuEPO ( $120 \pm 5$  mmHg vs  $123 \pm 4$  mmHg, NS). In the two groups receiving L-NAME, blood pressures were significantly increased ( $p < 0.01$ ) from the start to the end of treatment: blood pressure in the L-NAME + r-HuEPO group tended to be higher, but the values were not significantly different ( $184 \pm 9$  mmHg vs  $202 \pm 8$  mmHg, NS). Table 1 shows the hematocrit, serum creatinine and plasma ir-ET-1 concentrations following treatment. Hematocrit was significantly increased ( $p < 0.01$ ) in the two groups receiving r-HuEPO. Serum creatinine and plasma ir-ET-1 levels were similar in the four groups. Table 3 provides wet weights of thoracic aorta segments and mesenteric arterial beds as well as their ratios over total body weight in the four groups of rats receiving the vehicle, r-HuEPO, L-NAME + vehicle and L-NAME + r-HuEPO. There was a significant increase in mesenteric arterial bed weights in control rats receiving L-NAME + r-HuEPO as well as in the ratios over total body weights. Figure 2 illustrates ir-ET-1 concentrations in thoracic aorta, mesenteric arterial bed and renal cortex. There was no increase in thoracic aorta ir-ET-1 in normal rats treated with r-HuEPO compared with the vehicle. However, thoracic aorta ir-ET-1 contents were significantly enhanced by L-NAME treatment and the values were significantly higher in the L-NAME + r-HuEPO group vs L-NAME + vehicle ( $p < 0.05$ ). Ir-ET-1 concentrations in mesenteric arterial bed and renal cortex were comparable in the four groups. There was a positive and significant correlation ( $r = 0.71$ ,  $p < 0.01$ ) between thoracic aorta ir-ET-1 concentrations observed in the four groups of rats and blood pressure values.

### Uremic rats

The mean body weight was  $231 \pm 4$  g at the start of the study and was similar in all groups of animals at the end of the treatment period (2 weeks). Figure 1 (panel B) illustrates the course of systolic blood pressure changes over time. As expected, blood pressure values increased in uremic rats receiving the vehicle and r-HuEPO ( $146 \pm 6$  mmHg and  $162 \pm 8$  mmHg); although blood pressures were higher in r-HuEPO-treated rats, this difference did not reach statistical significance during the short period of treatment. In the two groups receiving L-NAME, a steep increase in blood pressure was observed and this difference was significantly higher in rats receiving r-HuEPO + L-NAME ( $222 \pm 7$  mmHg vs  $198 \pm 6$  mmHg,  $p < 0.05$ ). Table 2 shows hematocrit, serum creatinine and plasma ir-ET-1 concentrations at the end of the treatment period. Hematocrit was significantly increased ( $p < 0.01$ ) in the two groups receiving r-HuEPO. Serum creatinine was about 2.5 fold higher than values observed

in control rats ( $p < 0.01$ ). Plasma ir-ET-1 concentrations were comparable within the four groups. Table 3 provides wet weights of thoracic aorta segments and mesenteric arterial beds and their ratios over total body weights in the four groups of uremic rats. Weights of mesenteric arterial beds in the vehicle and r-HuEPO groups were significantly higher compared with the same groups in control rats. Figure 2 illustrates ir-ET-1 concentrations in thoracic aorta and mesenteric arterial bed. Thoracic aorta ir-ET-1 contents tended to be higher in r-HuEPO and in L-NAME treated rats and the difference reached significance in rats receiving L-NAME + r-HuEPO versus the vehicle ( $p < 0.05$ ). Mesenteric arterial bed and renal cortex ir-ET-1 concentrations (figure 2) were not significantly modified by the treatments. There was a positive correlation between ir-ET-1 concentrations in thoracic aorta and blood pressure values ( $r = 0.43$ ,  $p < 0.05$ ).

**Table 1**

Hematocrit, serum creatinine and plasma ir-ET-1 concentrations in control rats at the end of the study.

	<b>Hematocrit (%)</b>	<b>Serum Creatinine (<math>\mu</math>mol/L)</b>	<b>Plasma ir-ET-1 (pg/ml)</b>
Vehicle (n=8)	39 $\pm$ 1	37 $\pm$ 2	3.6 $\pm$ 0.7
r-HuEPO (n=8)	49 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	39 $\pm$ 1	5.2 $\pm$ 1.1
L-NAME +vehicle (n=8)	41 $\pm$ 0.9	43 $\pm$ 4	4.1 $\pm$ 0.4
L-NAME +r-HuEPO (n=5)	56 $\pm$ 3 <sup>ab</sup>	49 $\pm$ 5	7.0 $\pm$ 0.7

r-HuEPO, recombinant human erythropoietin; L-NAME, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester; ir-ET-1, immunoreactive endothelin-1; <sup>a</sup>, p<0.01 vs vehicle; <sup>b</sup>, p<0.01 vs L-NAME + vehicle.

**Table 2**

Hematocrit, serum creatinine and plasma ir-ET-1 concentrations in uremic rats at the end of the study.

	<b>Hematocrit (%)</b>	<b>Serum Creatinine (<math>\mu</math>mol/L)</b>	<b>Plasma ir-ET-1 (pg/ml)</b>
Vehicle (n=7)	33 $\pm$ 1	84 $\pm$ 5	4.4 $\pm$ 0.4
r-HuEPO (n=9)	44 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	98 $\pm$ 12	4.5 $\pm$ 0.4
L-NAME +vehicle (n=9)	38 $\pm$ 1	106 $\pm$ 8	4.3 $\pm$ 0.3
L-NAME +r-HuEPO (n=7)	47 $\pm$ 2 <sup>ac</sup>	123 $\pm$ 9 <sup>b</sup>	4.0 $\pm$ 0.3

r-HuEPO, recombinant human erythropoietin; L-NAME, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester; ir-ET-1, immunoreactive endothelin-1; <sup>a</sup>, p<0.01 vs vehicle; <sup>b</sup>, p<0.05 vs vehicle, <sup>c</sup>, p<0.01 vs L-NAME + vehicle.

**Table 3**

Wet weights (mg) of thoracic aorta segments and of mesenteric arterial beds, and their ratios over total body weights (in parenthesis) in control and uremic rats.

	Control rats		Uremic rats	
	Thoracic Aorta	Mesenteric arterial bed	Thoracic aorta	Mesenteric arterial bed
Vehicle	41 ± 4 (0.11 ± 0.01)	29 ± 3 (0.08 ± 0.01)	42 ± 3 (0.14 ± 0.01)	66 ± 13 <sup>c</sup> (0.21 ± 0.04) <sup>c</sup>
r-HuEPO	48 ± 5 (0.13 ± 0.01)	40 ± 2 (0.11 ± 0.01)	45 ± 4 (0.15 ± 0.02)	63 ± 7 <sup>c</sup> (0.22 ± 0.03) <sup>c</sup>
L-NAME + vehicle	47 ± 3 (0.13 ± 0.01)	43 ± 7 (0.12 ± 0.02)	47 ± 3 (0.18 ± 0.01) <sup>c</sup>	60 ± 9 (0.23 ± 0.04) <sup>d</sup>
L-NAME+ r-HuEPO	49 ± 3 (0.14 ± 0.01)	52 ± 1 <sup>a</sup> (0.15 ± 0.01) <sup>b</sup>	54 ± 3 (0.19 ± 0.01) <sup>c</sup>	56 ± 11 (0.20 ± 0.04)

r-HuEPO, recombinant human erythropoietin; L-NAME, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester; <sup>a</sup>, p<0.05 vs vehicle; <sup>b</sup>, p<0.01 vs vehicle; <sup>c</sup>, p<0.01 vs the same group in control rats; <sup>d</sup>, p<0.05 vs the same group in control rats.

## DISCUSSION

Compared to control rats, 5/6 nephrectomized animals developed uremia, anemia and hypertension which became evident 2 weeks after renal mass reduction. Treatment with r-HuEPO produced a similar increase in hematocrit in the two groups (26% vs 27%). As previously reported using the same dosage (9), chronic (4 weeks) r-HuEPO treatment had no effect on blood pressure in normal rats. However, compared to the vehicle, the blood pressure of uremic rats tended to be higher after only 2 weeks of r-HuEPO treatment (162 ± 8 vs 146 ± 6 mmHg, NS). Previous reports by us and others (9,11) showed that maximum blood pressure increases are usually attained after 3 to 5 weeks of treatment.

Chronic L-NAME administration induced a significant rise in blood pressure in normal animals as previously reported (27). These results support the notion that basal NO release from peripheral resistance vessels exerts a tonic vasorelaxant action *in vivo* in normal animals (28). Our study also indicates that this role of NO may be as important in chronic renal failure animals. Indeed, the magnitude of L-NAME treatment induced shifts in blood pressure (at week 2) are comparable to control rats; the steeper increase that occurred in uremic rats can probably be attributed to renal failure.



In a pilot study (not shown), we observed that a high percentage of uremic rats died spontaneously after the second week of L-NAME treatment as also reported by Fujihara *et al.* (29).

The major finding of this study is that the blood pressure increase in chronic renal failure rats treated with L-NAME + r-HuEPO was significantly higher than uremic animals receiving only L-NAME. It has been shown that r-HuEPO-induced erythrocytosis resulted in a compensatory stimulation of NO production in normal rats (21-23). However, the effect of chronic r-HuEPO administration on the L-arginine-NO system appears more complex in renal failure animals. Ni *et al.* (30) recently showed that uremic rats exhibited a down-regulation of NO synthase expression and NO production and that maintenance r-HuEPO therapy did not significantly affect NO production or NO synthase expression by vascular or renal tissue in chronic renal failure animals. Similarly, Wang *et al.* (31) showed a suppressive effect of r-HuEPO on NO production and endothelial NO synthase expression in human endothelial cells. These data, however, do not rule out an indirect upregulation of NO production in r-HuEPO-treated rats (via increased pressure, shear-stress and ET-1), with the net effect depending on the relative predominance of these opposing influences.

To further document the possible imbalance in endothelial derived vasoactive substances in this animal model, we measured ET-1, the vasopressor counterpart of NO. The results showed that chronic r-HuEPO treatment in normal rats does not modify plasma and tissue (thoracic aorta, mesenteric arterial bed and renal cortex) ET-1 concentrations. To our knowledge, this is the first report of the effect of r-HuEPO on vascular tissue ET-1 in normal rats. In contrast, uremic rats exhibit a tendency to increase vascular ET-1 concentrations after only two weeks of treatment. These results are in keeping with our previous report showing that chronic r-HuEPO administration (5 weeks) induced a significant increase in vascular ET-1 concentrations (17). This increased vascular ET-1 production may account, at least partly, for the pressor effect of r-HuEPO in chronic renal failure. The observation that selective ET<sub>A</sub> receptor blockade can prevent the aggravation of hypertension in r-HuEPO-treated rats supports this contention (20). L-NAME administration produced an increase in ET-1 concentration in thoracic aorta but not in mesenteric arterial bed and renal cortex in both normal and uremic rats although the values did not reach significance in renal failure animals. These data confirm previous reports showing that L-NAME increased thoracic aorta but not mesenteric arterial bed ET-1 concentrations in normal rats (24). Similarly, Li *et al.* (34) showed that ET-1 gene expression was enhanced in the endothelium of the aorta but not in small mesenteric arteries in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. The absence of hypertrophy in small arteries in rats receiving L-NAME may be related to lack of increase in ET-1 concentrations in peripheral beds (33). The unchanged ET-1 values in mesenteric arterial bed and in renal cortex suggest differential regulation of ET-1 production in different vascular

territories. The enhanced ET-1 production in thoracic aorta may be related to the higher blood pressure and sheer stress which have both been shown to induce ET-1 production in endothelial cells (35).

In conclusion, the increase in blood pressure in normal and uremic rats treated with L-NAME underline the importance of NO release in opposing the action of vasopressor substances including r-HuEPO on blood vessel tone. This role appears more important in uremic rats treated with r-HuEPO. This study also shows that L-NAME treatment increases ET-1 concentration in large vessels (thoracic aorta) but not in small resistance arteries (mesenteric arterial bed and renal cortex), suggesting a differential regulation of ET-1 production in different vascular beds under chronic NO synthase inhibition..

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada University-Industry (Janssen-Ortho, Inc.). We thank Danielle Paré and Claude Villeneuve for technical support, and Elisabeth Lemay for secretarial help.

### REFERENCES

1. Buckner FS, Eschbach JW, Haley NR, Davidson RC, Adamson JW: Hypertension following erythropoietin therapy in anemic hemodialysis patients. *Am J Hypertens* 1990; 3:947-955.
2. Abraham PA, Macres MG: Blood pressure in hemodialysis patients during amelioration of anemia with erythropoietin. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2:927-936.
3. Lebel M, Kingma I, Grose JH, Langlois S: Effect of recombinant human erythropoietin therapy on ambulatory blood pressure in normotensive and in untreated borderline hypertensive hemodialysis patients. *Am J Hypertens* 1994; 9:545-551.
4. Lebel M, Kingma I, Grose JH, Langlois S: Hemodynamic and hormonal changes during erythropoietin therapy in hemodialysis patients. *J Amer Soc Nephrol* 1998; 9:97-104.
5. Ludwig H, Fritz E, Kotzmann H, Höcker P, Gesslinger M, Barnes U: Erythropoietin treatment of anemia associated with multiple myeloma. *N Engl J Med* 1990; 322:1693-1699.
6. Pincus T, Olsen NJ, Russell J, Wolfe F, Harris ER, Schnitzer TJ, Boccagno JH, Krantz SB: Multicenter study of recombinant human erythropoietin in correction of anemia in rheumatoid arthritis. *Am J Med* 1990; 89:161-168.

7. Fischl M, Galpin JE, Levine JD, Groopman JE, Henry DH, Kennedy P, Miles S, Robbins W, Starrett B, Zalusky R, Abel RI, Tsai H, Rudnick SA: Recombinant human erythropoietin for patients with AIDS treated with zidovudine. *N Engl J Med* 1990; 322:1488-1493.
8. Berglund B, Ekblom B: Effect of recombinant human erythropoietin treatment on blood pressure and some haematological parameters in healthy men. *J Intern Med* 1991; 229:125-130.
9. Lacasse-M S, Kingma I, Larivière R, Grose JH, Lebel M: Uremia enhances the blood pressure response to erythropoietin. *Clin Exper Hypertension* 1997; 19:389-401.
10. Muntzel M, Hannedouche T, Lacour B, Drüeke TB: Erythropoietin increases blood pressure in normotensive and hypertensive rats. *Nephron* 1993; 65: 601-604.
11. Vaziri ND, Zhou XJ, Smith J, Oveisi F, Baldwin K, Purdy RE: *In vivo* and *in vitro* pressor effects of erythropoietin in rats. *Am J Physiol* 1995; 269 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 38): F838-F845.
12. Hori K, Onoyama K, Iseki K, Fujimi S, Fujishima M: Hemodynamic and volume changes by recombinant human erythropoietin in the treatment of anemic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 1990; 33:293-298.
13. Heidenreich S, Rahn K-H, Zidek W: Direct vasopressor effect of recombinant human erythropoietin on renal resistance vessels. *Kidney Int* 1991; 39:259-265.
14. Eggena P, Willsey P, Jamgotchian N, Truckenbrod L, Hu MS, Barrett JD, Eggena MP, Clegg K, Nakhoul F, Lee DBN: Influence of recombinant human erythropoietin on blood pressure and renin-angiotensin systems. *Am J Physiol* 1991; 261:E642-E646.
15. Vaziri ND, Zhou XJ, Naqvi F, Smith J, Oveisi F, Wang ZQ, Purdy RE: Role of nitric oxide resistance in erythropoietin-induced hypertension in rats with chronic renal failure. *Am J Physiol* 1996; 271 (Endocrinol Metab 34):E113-E122.

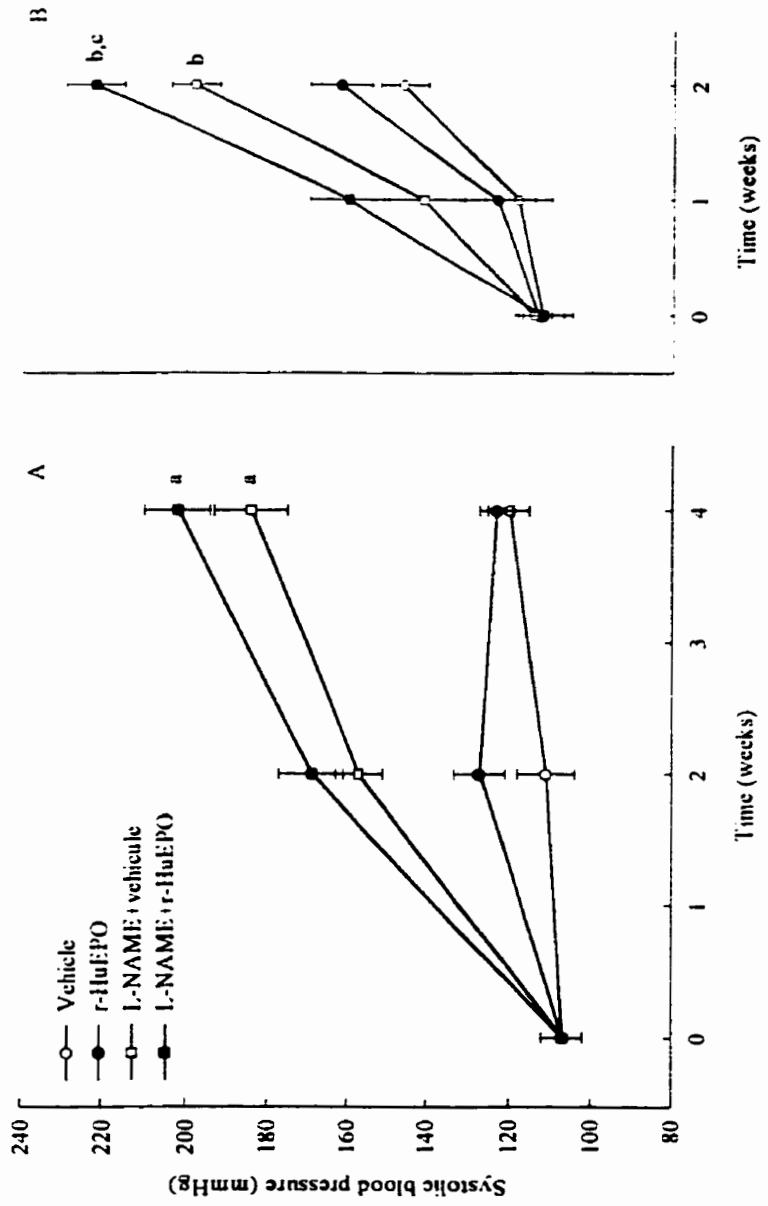
16. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT: Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:3974-3978.
17. Carlini PG, Dusso AS, Obialo CI, Alvarez UM, Rothstein M: Recombinant human erythropoietin increases endothelin-1 release by endothelial cells. *Kidney Int* 1993; 43:1010-1014.
18. Bode-Böger SM, Böger RH, Kuhn M, Radermachis J, Frölich JC: Recombinant human erythropoietin enhances vasoconstrictor tone via endothelin-1 and constrictor prostanoids. *Kidney Int* 1996; 50:1255-1261.
19. Lebel M, Lacasse-M S, Larivière R, Kingma I, Grose JH: Plasma and blood vessel endothelin-1 concentrations in hypertensive uremic rats treated with erythropoietin. *Clin Exper Hypertens* 1998; 20:939-951.
20. Brochu E, Lacasse-M S, Larivière R, Kingma I, Grose JH, Lebel M: Differential effects of endothelin-1 antagonists on erythropoietin-induced hypertension in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1999, in press.
21. Del Castillo D, Raij L, Schultz PJ, Tolins JP: The pressor effect of recombinant human erythropoietin is not due to decreased activity of the endogenous nitric oxide system. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10:505-508.
22. Tsukahara H, Hiraoka M, Hori C, Hata I, Okada T, Gejyo F, Sudo M: Chronic erythropoietin treatment enhances endogenous nitric oxide production in rats. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57:487-494.
23. Wilcox CS, Deng X, Doll AH, Snellen H, Welch WJ: Nitric oxide mediates renal vasodilation during erythropoietin-induced polycythemia. *Kidney Int* 1993; 44:430-435.
24. D'Amours M, Lebel M, Grose JH, Larivière R: Renal and vascular effects of chronic nitric oxide synthase inhibition: involvement of endothelin-1 and angiotensin II. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 77:8-16.

25. Lebel M, Grose JH, Kingma I, Langlois S: Plasma endothelin levels and blood pressure in hemodialysis and in CAPD patients. Effect of subcutaneous erythropoietin replacement therapy. *Clin Exper Hypertens (A)* 1994; 16:565-575.
26. Larivière R, D'Amours M, Lebel M, Kingma I, Grose JH, Caron L: Increased immunoreactive endothelin-1 levels in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass. *Kidney Blood Pressure Res* 1997; 20:372-380.
27. Baylis C, Mitruka B, Deng A: Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992; 90:278-281.
28. Aisaka K, Gross SS, Griffith OW, Levi R: N<sup>G</sup>-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160:881-886.
29. Fujihara CK, De Nucci G, Zatz R with the technical participation of Michelazzo SM and Miristeni dos Santos M: Chronic nitric oxide synthase inhibition aggravates glomerular injury in rats with subtotal nephrectomy. *J Am Soc Nephrol* 1995; 5:1498-1507.
30. Ni Z, Wang XQ, Vaziri ND: Nitric oxide metabolism in erythropoietin-induced hypertension. Effect of calcium channel blockade. *Hypertension* 1998; 32:724-729.
31. Wang XQ, Vaziri ND: Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells. *Hypertension* 1999; 33:894-899.
32. Poux J-M, Lartigue M, Chaisemartin R-A, Galen FX, Leroux-Robert C: Uraemia is necessary for erythropoietin-induced hypertension in rats. *Clin Exper Pharmacol Physiol* 1995; 22:769-771.
33. Arnal JF, Warin L, Michel JB: Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthetase. *J Clin Invest* 1992; 90:647-652.

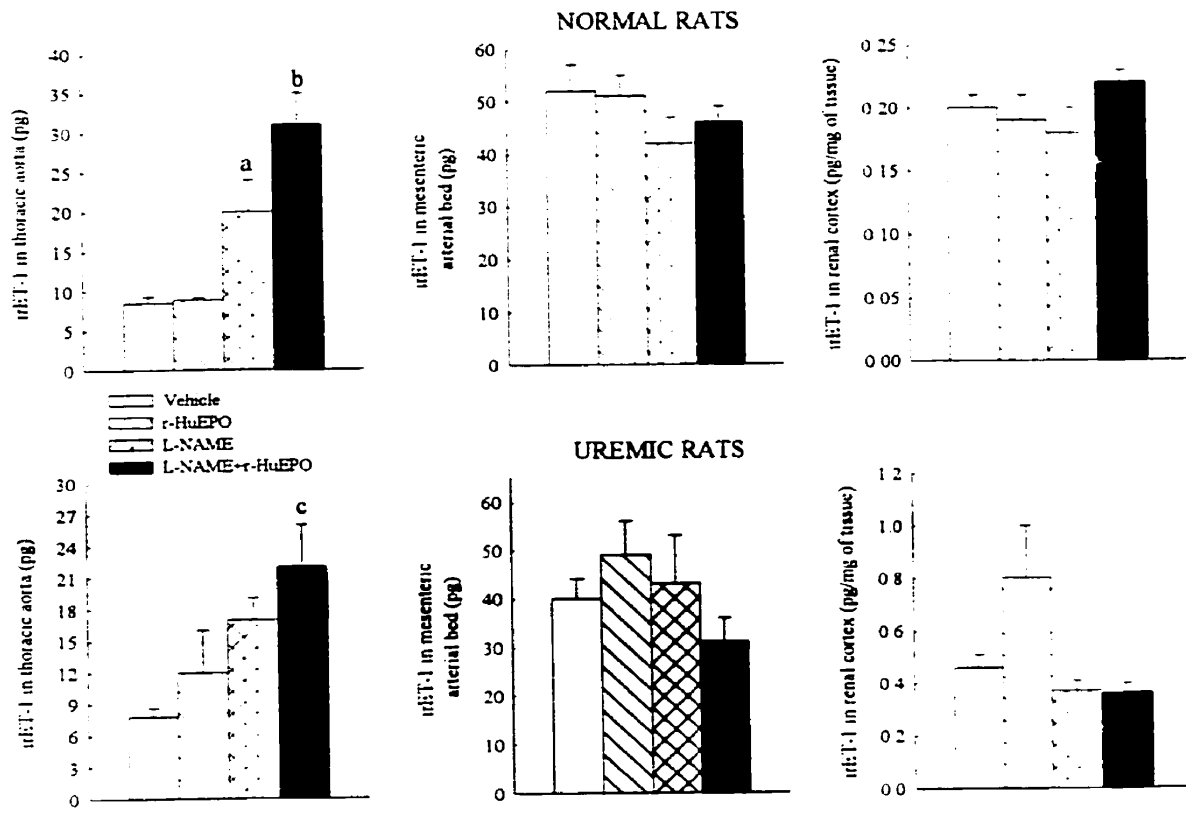
34. Li, J-S, Deng LY, Grove K, Deschepper CF, Schiffrin EL: Comparison of effect of endothelin antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition on blood pressure and vascular structure in spontaneously hypertensive rats treated with N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester: Correlation with topography of vascular endothelin-1 gene expression. *Hypertension* 1996; 28:188-195.
  
35. Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Yazaki Y: Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:859-864.

**Figure 1.** Time course of systolic blood pressure in control (A) and uremic rats (B). Time 0 in panel B corresponds to total right nephrectomy; <sup>a</sup>,  $p < 0.01$  vs beginning of treatment; <sup>b</sup>,  $p < 0.01$  vs vehicle and r-HuEPO; <sup>c</sup>,  $p < 0.05$  vs L-NAME + vehicle.

**Figure 2.** Immunoreactive endothelin-1 (ir-ET-1) concentrations in thoracic aorta, mesenteric arterial bed and renal cortex in control rats and in uremic rats. <sup>a</sup>,  $p < 0.05$  vs vehicle and r-HuEPO; <sup>b</sup>,  $p < 0.01$  vs all groups; <sup>c</sup>,  $p < 0.05$  vs vehicle.







### **4.3 RÔLE DES ICOSANOÏDES ENDOTHÉLIAUX PGI<sub>2</sub> ET TXA<sub>2</sub> DANS LA RÉPONSE PRESSIVE À L'R-HuEPO EN IRC.**

#### ***4.3.1 Rôle des icosanoïdes dans l'hypertension associée à l'IRC.***

##### ***4.3.1.1 Introduction***

Tel que mentionné dans l'introduction de ce mémoire, la pathogénie de l'hypertension artérielle accompagnant l'IRC est complexe. En plus de l'expansion volémique, il existe une augmentation de plusieurs vasopresseurs (angiotensine-II, ET-1, etc.) souvent compensée de façon incomplète par les systèmes vasodépresseurs (NO, adrénomudulline, etc.). Nos résultats préliminaires suggèrent qu'il existe aussi un débalancement des métabolites de l'acide arachidonique, plus spécifiquement la TXA<sub>2</sub> et la PGI<sub>2</sub>. Il est important d'établir les valeurs de base de ces produits vasoactifs chez le rat normal et urémique; ces données seront essentielles pour l'interprétation des résultats obtenus dans les expériences ultérieures où les animaux recevront l'r-HuEPO.

##### ***4.3.1.2 Objectifs***

1. Établir les valeurs de références chez les rats en IRC comparativement aux rats témoins.
2. Évaluer le rôle de ces icosanoïdes dans la pathogénie de l'hypertension artérielle présente dans l'IRC.
3. Vérifier la présence de corrélations entre les concentrations de ces produits vasoactifs et l'augmentation de la pression artérielle observée chez les animaux urémiques.
4. Étudier le lien possible avec le système ET-1.
5. Vérifier l'effet du ridogrel, un inhibiteur de la synthèse et du récepteur de la TXA<sub>2</sub>, sur la pression artérielle des animaux urémiques.

##### ***4.3.1.3 Protocole expérimental***

Dans un premier temps, l'IRC est induite chez la moitié des rats par néphrectomie subtotale 5/6 par la méthode d'ablation des pôles. La PAS est enregistrée et la concentration de 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, métabolite stable de la PGI<sub>2</sub>, et de TXB<sub>2</sub>, métabolite stable de la TXA<sub>2</sub>, est mesurée dans les tissus des rats témoins et urémiques à la fin du protocole. La concentration d'irET-1

est déterminée dans les tissus et liquides biologiques de ces animaux pour vérifier l'interaction entre ces facteurs endothéliaux.

Dans un deuxième temps, la synthèse et le récepteur de la TXA<sub>2</sub> sont inhibés avec le ridogrel chez des animaux urémiques et la PAS est mesurée ainsi que la concentration tissulaire de 6-keto-PGF<sub>1α</sub> et de TXB<sub>2</sub> chez les animaux urémiques traités et non traités à la fin du protocole. La concentration d'irET-1 est aussi déterminée à la fin du protocole.

#### 4.3.1.4 Résultats

##### *Protocole 1 : Concentration basale d'icosanoïdes chez les rats témoins et urémiques.*

Comme prévu, les animaux urémiques ont une protéinurie ( $p < 0.05$ ) et une créatinine sérique ( $p < 0.01$ ) plus élevées et une clairance de la créatinine plus basse ( $p < 0.01$ ) que les animaux témoins. Aussi, la PAS est augmentée chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins ( $p < 0.05$ ). La masse des rats urémiques est plus basse que celle des animaux témoins ( $p < 0.01$ ) et les rats urémiques sont anémiques ( $p < 0.01$ ) (Voir tableau 4.2.1).

*Tableau 4.2.1 :* Paramètres mesurés à la fin de l'étude chez les rats témoins et urémiques.

	PAS (mmHg)	Créatinine sérique ( $\mu\text{mol/L}$ )	Clairance de la créatinine (mL/min)	Protéinurie (mg/24h)	Poids (g)	Hct (%)
Témoin (n=7)	117 $\pm$ 4	46.7 $\pm$ 0.4	2.14 $\pm$ 0.07	26 $\pm$ 3	494 $\pm$ 10	0.41 $\pm$ 0.01
Urémique (n=9)	139 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	125 $\pm$ 14 <sup>b</sup>	0.76 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	110 $\pm$ 26 <sup>a</sup>	425 $\pm$ 13 <sup>b</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>

PAS : Pression artérielle systolique ; Hct : hématocrite.

a :  $p < 0.05$  vs témoin ; b :  $p < 0.01$  vs témoin.

Comme le démontre le tableau 4.2.2, la concentration de TXB<sub>2</sub> dans le lit artériel mésentérique, le cortex rénal et l'urine ( $p < 0.05$ ) est augmentée chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins. La concentration de 6-keto-PGF<sub>1α</sub> est légèrement augmentée dans le lit artériel mésentérique (NS) et le cortex rénal ( $p < 0.05$ ), mais inchangée dans l'urine des rats urémiques comparativement aux rats témoins.

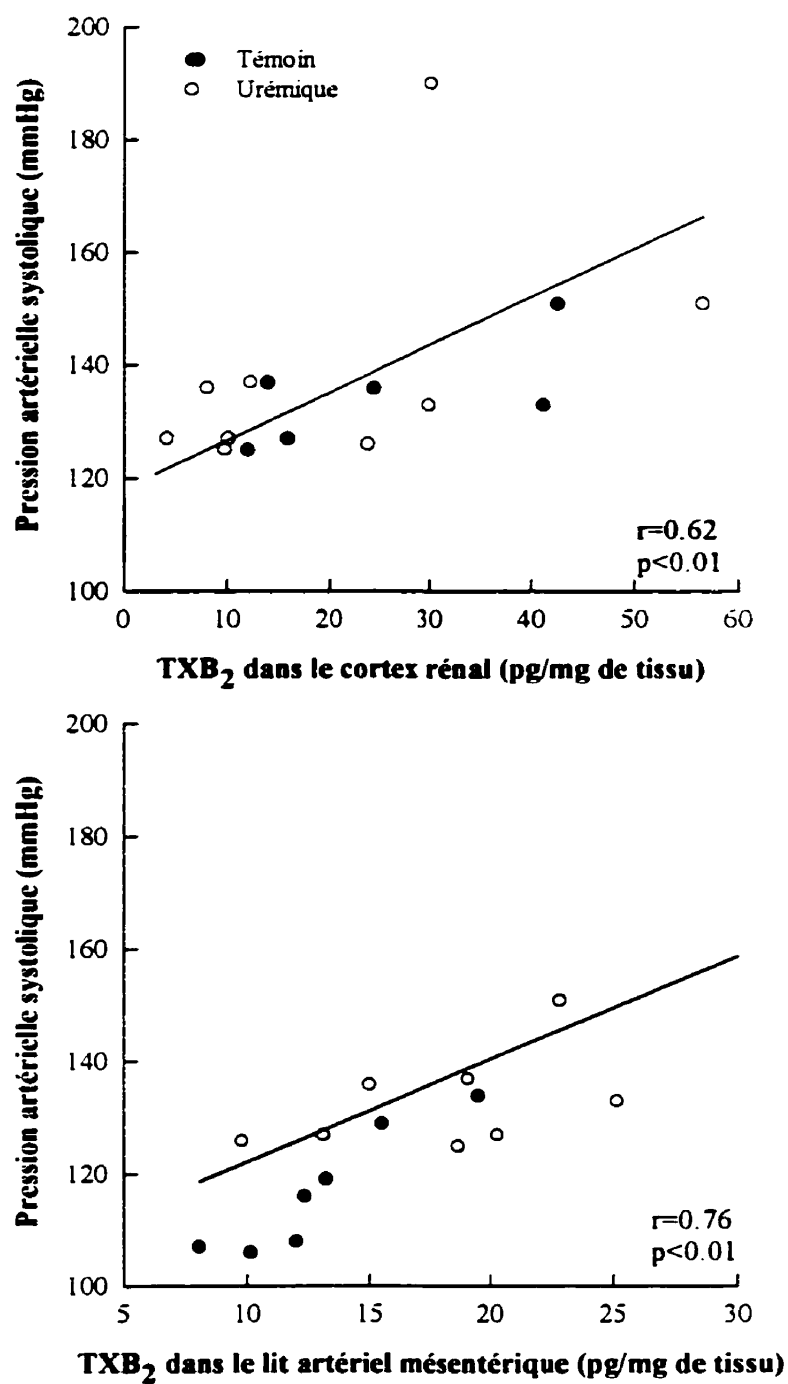
**Tableau 4.2.2 :** Concentration de la TXB<sub>2</sub> et de la 6-keto-PGF<sub>1α</sub> dans le lit artériel mésentérique, le cortex rénal et l'urine des animaux témoins et urémiques.

	TXB <sub>2</sub>			6-keto-PGF <sub>1α</sub>		
	LAM (pg/mg de tissu)	Cortex rénal (pg/mg de tissu)	Urine (ng/24h)	LAM (pg/mg de tissu)	Cortex rénal (pg/mg de tissu)	Urine (ng/24h)
<b>Témoin (n=7)</b>	13±1	4.1±0.3	4.8±0.3	165±27	31±2	7.4±0.5
<b>Urémique (n=9)</b>	19±2 <sup>a</sup>	21±6 <sup>a</sup>	10±2 <sup>a</sup>	204±30	58±10 <sup>a</sup>	5.9±0.6

LAM : Lit artériel mésentérique.

a : p<0.05 vs témoin.

Nous avons observé des corrélations positives entre la PAS et la concentration de TXB<sub>2</sub> dans le cortex rénal (r=0.62; p<0.01) et le lit artériel mésentérique (r=0.76; p<0.01) des rats témoins et urémiques suggérant une implication de la TXA<sub>2</sub> dans l'hypertension induite par l'r-HuEPO en IRC (Figure 4.2.1).



**Figure 4.2.1 :** Corrélations entre la pression artérielle systolique et la concentration de TXB<sub>2</sub> dans le cortex rénal et le lit artériel mésentérique chez les animaux témoins et urémiques.

Nous avons aussi mesuré la concentration d'irET-1 dans le plasma, l'urine et le cortex rénal. Comme nous l'avons observé antérieurement, cette dernière est augmentée dans le plasma ( $p<0.01$ ), l'urine (NS) et le cortex rénal ( $p<0.05$ ) des animaux urémiques comparativement aux rats témoins comme le démontre le tableau 4.2.3.

*Tableau 4.2.3 :* Concentration d'irET-1 dans le plasma, l'urine et le cortex rénal chez les animaux témoins et urémiques.

	<b>Plasma (pg/mL)</b>	<b>Urine (pg/24h)</b>	<b>Cortex rénal (pg/mg de tissu)</b>
<b>Témoin (n=7)</b>	5.2±0.5	59±9	0.23±0.01
<b>Urémique (n=9)</b>	8.0±0.5 <sup>a</sup>	248±84	1.1±0.3 <sup>b</sup>

a :  $p<0.01$  vs rats témoins ; b :  $p<0.05$  vs rats témoins.

*Protocole 2 : Effet du ridogrel sur la PAS des animaux urémiques.*

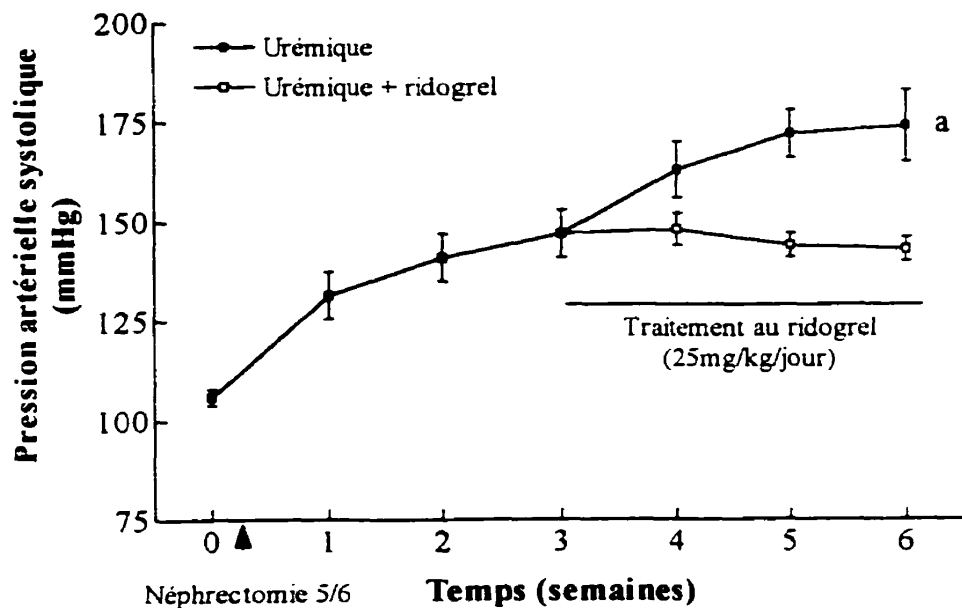
Comme le démontre le tableau 4.2.4, la protéinurie des animaux urémiques est semblable dans les 2 groupes avant le début du traitement. À la fin du protocole, la protéinurie est aggravée chez les animaux urémiques non traités ( $p<0.01$ ), mais le traitement avec le ridogrel prévient cette progression. Ainsi, la protéinurie à la fin de l'étude est significativement plus élevée chez les animaux non traités que chez les animaux recevant le ridogrel ( $p<0.05$ ). La clairance de la créatinine est légèrement diminuée (NS) chez les animaux urémiques non traités à la fin du protocole tandis qu'elle est inchangée chez les rats urémiques recevant le ridogrel. La créatinine sérique est augmentée chez les rats urémiques non traités ( $p<0.05$ ) et chez les animaux urémiques traités au ridogrel ( $p<0.01$ ) à la fin du protocole comparativement au début du traitement. Le traitement avec le ridogrel atténue cette augmentation (NS). Les rats urémiques sont anémiques à la fin de l'étude et le ridogrel n'a aucun effet sur l'anémie.

**Tableau 4.2.4 :** Hématocrite, créatinine sérique, clairance de la créatinine et protéinurie chez les animaux urémiques non traités ou traités avec le ridogrel.

	Pré-traitement			Fin de l'étude			
	Protéinurie (mg/24h)	Créatinine sérique ( $\mu\text{mol/L}$ )	Clairance créatinine (mL/min)	Protéinurie (mg/24h)	Créatinine sérique ( $\mu\text{mol/L}$ )	Clairance créatinine (mL/min)	Hct (%)
Urémique (n=11)	67 $\pm$ 12	118 $\pm$ 11	0.71 $\pm$ 0.09	202 $\pm$ 44 <sup>b</sup>	172 $\pm$ 25 <sup>b</sup>	0.63 $\pm$ 0.2	0.31 $\pm$ 0.01
Urémique + Ridogrel (n=10)	69 $\pm$ 12	104 $\pm$ 6	0.70 $\pm$ 0.06	77 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	127 $\pm$ 7 <sup>c</sup>	0.71 $\pm$ 0.08	0.28 $\pm$ 0.01

a :  $p < 0.05$  vs urémique à la fin de l'étude ; b :  $p < 0.05$  vs urémique pré-traitement ; c :  $p < 0.01$  vs urémique+ridogrel pré-traitement.

Comme le démontre la figure 4.2.2, le ridogrel prévient l'augmentation de la PAS chez les animaux urémiques.



a :  $p < 0.01$  vs urémique + ridogrel.

**Figure 4.2.2 :** Pression artérielle systolique des animaux urémiques non traités ou traités avec le ridogrel en fonction du temps.

Comme prévu, la concentration de TXB<sub>2</sub> dans le lit artériel mésentérique (p<0.01), le cortex rénal et l'urine (NS) est significativement réduite chez les rats traités avec le ridogrel (Tableau 4.2.5). Par contre, la concentration de 6-keto-PGF<sub>1α</sub> reste inchangée dans les tissus et l'urine.

**Tableau 4.2.5 :** Concentration de la TXB<sub>2</sub> et de la 6-keto-PGF<sub>1α</sub> dans le lit artériel mésentérique, le cortex rénal et l'urine chez les rats urémiques non traités ou traités avec le ridogrel.

	TXB <sub>2</sub>			6-keto-PGF <sub>1α</sub>		
	LAM (pg/mg de tissu)	Cortex rénal (pg/mg de tissu)	Urine (ng/24h)	LAM (pg/mg de tissu)	Cortex rénal (pg/mg de tissu)	Urine (ng/24h)
Urémique (n=11)	21±4	35±9	13±3	378±44	50±9	4.5±0.3
Urémique + ridogrel (n=16)	2.5±0.1 <sup>a</sup>	3.2±0.3 <sup>a</sup>	6.4±0.6	324±50	43±9	4.1±0.5

LAM : Lit artériel mésentérique.

a : p<0.01 vs urémique.

Enfin, nous avons établi des corrélations positives entre la PAS et la concentration de TXB<sub>2</sub> dans le cortex rénal (r=0.54; p<0.01) et dans le lit artériel mésentérique (r=0.68; p<0.01) de ces animaux.

Le tableau 4.2.6 montre que la concentration d'irET-1 reste inchangée les tissus et les liquides biologiques chez les animaux urémiques traités ou non avec l'inhibiteur de la synthèse et du récepteur de la TXA<sub>2</sub>.

**Tableau 4.2.6 :** Concentration d'irET-1 dans l'aorte thoracique, le cortex rénal, le plasma et l'urine des animaux urémiques non traités ou traités avec le ridogrel.

	Aorte (pg/mg de tissu)	Cortex rénal (pg/mg de tissu)	Plasma (pg/mL)	Urine (ng/24h)
Urémique (n=11)	0.37±0.05	1.2±0.2	7.7±0.2	317±71
Urémique+ Ridogrel (n=16)	0.36±0.05	1.1±0.2	7.6±0.4	346±88



#### *4.3.1.5 Sommaire*

- Comme prévu, les animaux urémiques sont hypertendus, contrairement aux animaux témoins.
- La concentration de TXB<sub>2</sub> dans les tissus et dans l'urine est significativement augmentée tandis que la concentration de 6-keto-PGF<sub>1α</sub> n'augmente que légèrement dans certains tissus.
- Nous observons des corrélations positives entre la PAS et la concentration de TXB<sub>2</sub> dans les tissus.
- Le taux d'ET-1 est aussi significativement plus élevé chez les rats urémiques que chez les animaux témoins, cependant, il ne subit aucun changement suite au traitement avec le ridogrel.
- Le ridogrel diminue significativement l'hypertension chez les rats urémiques, suggérant un rôle pour la TXA<sub>2</sub> dans l'hypertension associée à l'IRC.
- La concentration de TXB<sub>2</sub> est significativement réduite chez les rats traités au ridogrel tandis que la concentration de 6-keto-PGF<sub>1α</sub> est inchangée par le traitement, atténuant ainsi le déséquilibre entre ces deux icosanoïdes endothéliaux.

#### *4.3.1.6 Conclusion*

La concentration de TXA<sub>2</sub> est augmentée en urémie et cette augmentation n'est pas compensée de façon efficace par la PGI<sub>2</sub>. L'inhibition de l'action de la TXA<sub>2</sub> chez les animaux urémiques atténue l'hypertension associée à l'IRC. Le système ET-1 semble dissocié des icosanoïdes suite au traitement avec le ridogrel en IRC.

### **4.3.2 L'hypertension associée à l'administration d'r-HuEPO en IRC: Implication des prostanoïdes.**

#### **4.3.2.1 Introduction**

Tel que proposé dans notre hypothèse centrale, nous pensons que le traitement à l'r-HuEPO pourrait accentuer le déséquilibre endothélial présent dans l'IRC. Ainsi, les anomalies du métabolisme des icosanoïdes présentes en IRC pourraient être accentuées par l'r-HuEPO et contribuer à l'aggravation de l'hypertension artérielle chez les animaux urémiques.

#### **4.3.2.2 Objectifs**

1. Établir l'effet de l'r-HuEPO sur la concentration de  $TXA_2$  et de  $PGI_2$  dans les vaisseaux sanguins des rats normaux et urémiques.
2. Vérifier s'il existe des corrélations entre les changements de ces produits vasoactifs et l'augmentation de la pression artérielle observée chez les animaux urémiques traités à l'r-HuEPO.
3. Étudier s'il existe un lien entre la  $TXA_2$  et l'augmentation de l'ET-1 chez ces animaux.
4. Vérifier l'effet d'un bloqueur pharmacologique de la  $TXA_2$  sur l'hypertension artérielle induite par l'r-HuEPO en IRC.

#### **4.3.2.3 Protocole expérimental**

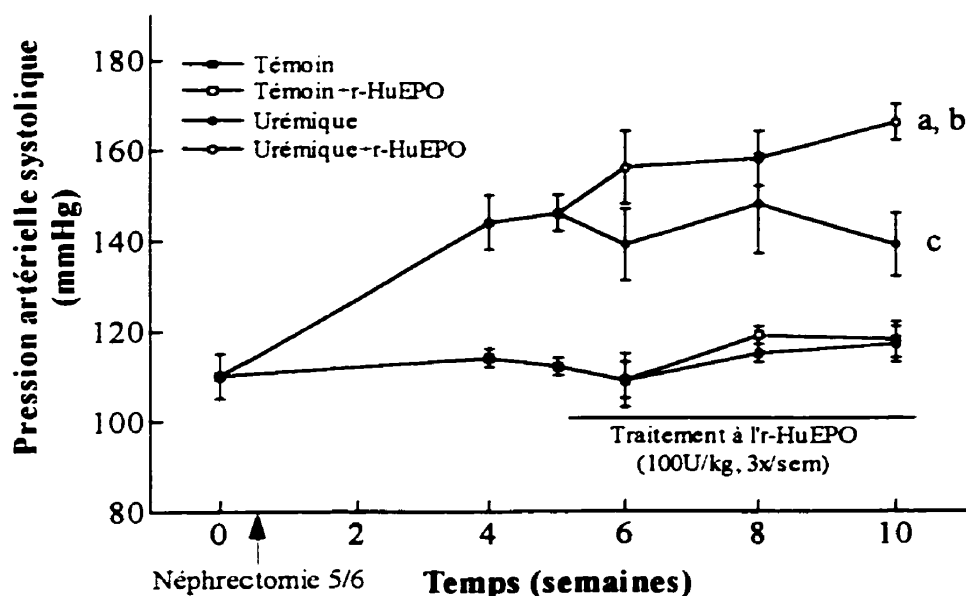
Dans une première étude, l'r-HuEPO est administrée à des rats témoins et urémiques. La PAS est mesurée et la concentration de 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ , métabolite stable de la  $PGI_2$ , et de  $TXB_2$ , métabolite stable de la  $TXA_2$ , est mesurée dans les tissus des rats témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO à la fin du protocole. La concentration d'irET-1 dans les tissus et liquides biologiques de ces animaux est aussi déterminée pour vérifier l'interaction entre ces facteurs endothéliaux.

Dans une deuxième étude, la synthèse et le récepteur de la  $TXA_2$  sont inhibés chez des animaux urémiques traités à l'r-HuEPO et la PAS de ces animaux est mesurée.

#### 4.3.2.4 Résultats

*Protocole 1 : Effet du traitement à l'r-HuEPO sur la concentration d'icosanoïdes chez les rats témoins et urémiques.*

Comme démontré auparavant (Lacasse-M, S. et al. 1997), la PAS des rats témoins est inchangée suite au traitement à l'r-HuEPO. La PAS des animaux urémiques augmente jusqu'à l'atteinte d'un plateau ( $p < 0.05$  vs rats témoins à la fin du protocole). Le traitement à l'r-HuEPO accentue l'augmentation de la PAS chez les animaux urémiques ( $p < 0.01$ ) (Figure 4.2.3).



a :  $p < 0.01$  vs urémique ; b :  $p < 0.01$  vs témoin et témoin+r-HuEPO ; c :  $p < 0.05$  vs témoin et témoin+r-HuEPO

**Figure 4.2.3 :** Pression artérielle systolique des animaux témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO en fonction du temps.

Comme le montre le tableau 4.2.7, les rats urémiques sont anémiques à la fin de l'étude. Le traitement à l'r-HuEPO corrige cette anémie ( $p < 0.01$ ). De façon similaire, l'hématocrite des rats témoins est significativement augmentée après le traitement à l'r-HuEPO ( $p < 0.05$ ). La protéinurie est inchangée chez les animaux témoins. Cependant, elle est significativement plus élevée chez les rats urémiques comparativement aux rats témoins traités ou non à l'r-HuEPO ( $p < 0.05$ ) et cette augmentation est accentuée suite au traitement à l'r-HuEPO chez les

animaux urémiques ( $p < 0.01$ ), probablement dû à l'augmentation de la PAS. La clairance de la créatinine et la créatinine sérique sont aussi inchangées chez les animaux témoins suite au traitement à l'r-HuEPO. La clairance de la créatinine diminue tandis que la créatinine sérique augmente significativement chez les animaux urémiques comparativement aux rats témoins traités ou non à l'r-HuEPO ( $p < 0.01$ ). Cependant, contrairement à la protéinurie, la clairance de la créatinine et la créatinine sérique ne sont pas affectées suite au traitement à l'r-HuEPO chez les rats urémiques, probablement vu la courte durée de l'étude. La masse des animaux urémiques est significativement diminuée comparativement à celle des rats témoins ( $p < 0.01$ ).

**Tableau 4.2.7 :** Paramètres mesurés à la fin de l'étude chez les rats témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO.

	<b>Créatinine sérique (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>Clairance créatinine (<math>\text{mL/min}</math>)</b>	<b>Protéinurie (<math>\text{mg/24h}</math>)</b>	<b>Masse (g)</b>	<b>Hématocrite (%)</b>
<b>Témoin (n=7)</b>	46.7 $\pm$ 0.4	2.14 $\pm$ 0.07	26 $\pm$ 3	494 $\pm$ 10	41 $\pm$ 1 <sup>c</sup>
<b>Témoin+r-HuEPO (n=6)</b>	49 $\pm$ 1	2.0 $\pm$ 0.2	23 $\pm$ 3	505 $\pm$ 19	54 $\pm$ 5
<b>Urémique (n=9)</b>	125 $\pm$ 14 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	110 $\pm$ 26 <sup>b</sup>	425 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	34 $\pm$ 1 <sup>d</sup>
<b>Urémique+r-HuEPO (n=8)</b>	136 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	0.67 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	238 $\pm$ 44 <sup>a</sup>	424 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	47 $\pm$ 3

a :  $p < 0.01$  vs témoin et témoin+r-HuEPO ; b :  $p < 0.05$  vs témoin et témoin+r-HuEPO ; c :  $p < 0.05$  vs témoin+r-HuEPO ; d :  $p < 0.01$  vs urémique+r-HuEPO et témoin+r-HuEPO.

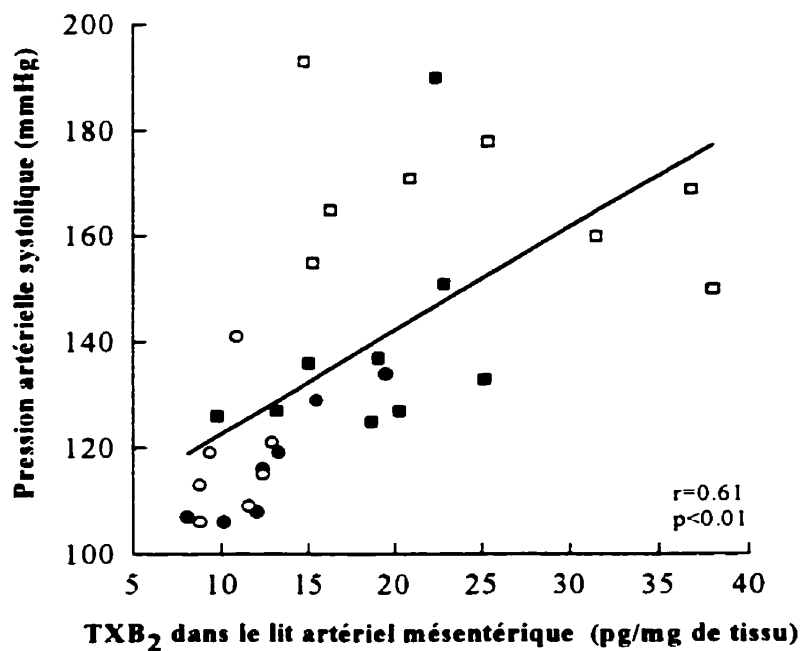
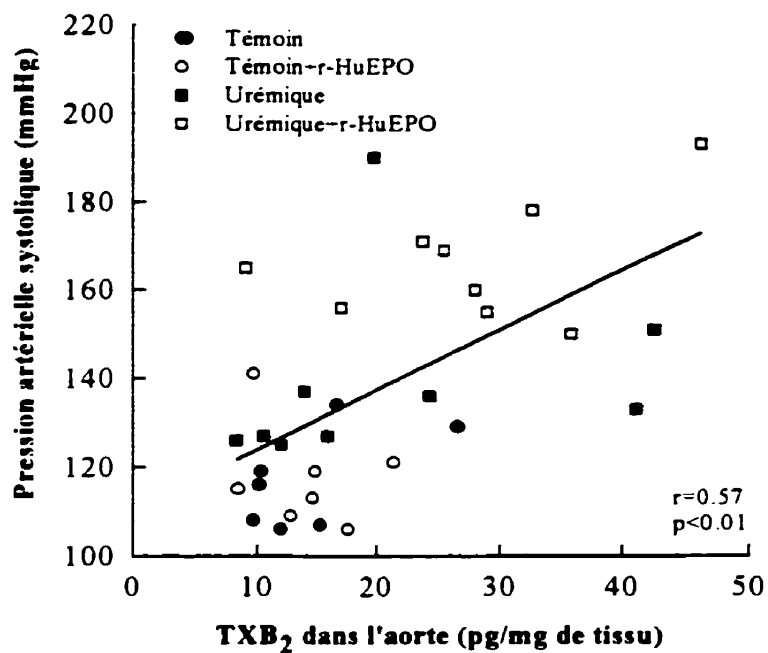
Le tableau 4.2.8 démontre que la concentration de 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , métabolite stable de la PGI<sub>2</sub>, est inchangée dans l'aorte et le lit artériel mésentérique des animaux témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO. Cependant, la concentration de TXB<sub>2</sub>, métabolite stable de la TXA<sub>2</sub>, est augmentée chez les animaux urémiques comparativement aux rats témoins dans l'aorte (NS) et dans le lit artériel mésentérique ( $p < 0.05$ ). Le traitement à l'r-HuEPO chez les rats urémiques accentue l'élévation de la concentration de TXB<sub>2</sub> dans ces vaisseaux ( $p < 0.05$  dans l'aorte;  $p < 0.01$  dans le lit artériel mésentérique).

**Tableau 4.2.8 :** Concentration de 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  et de TXB<sub>2</sub> dans l'aorte et le lit artériel mésentérique des animaux témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO.

	6-keto-PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub> (pg/mg de tissu)		TXB <sub>2</sub> (pg/mg de tissu)	
	Aorte	LAM	Aorte	LAM
Témoin (n=7)	1730±149	165±27	14±2	13±1
Témoin+r-HuEPO (n=7)	1608±259	268±29	14±2	10.6±0.6
Urémique (n=9)	875±215	204±30	21±4	19±2 <sup>b</sup>
Urémique+r-HuEPO (n=9)	1460±271	238±26	28±4 <sup>a</sup>	25±3 <sup>c</sup>

a : p<0.05 vs témoin et témoin+r-HuEPO ; b : p<0.05 vs témoin+r-HuEPO ; c : p<0.01 vs témoin et témoin+r-HuEPO.

Nous avons observé des corrélations positives entre la PAS et la concentration de TXB<sub>2</sub> dans l'aorte (r=0.57; p<0.01) et le lit artériel mésentérique (r=0.61; p<0.01) des animaux témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO (Voir figure 4.2.4).



*Figure 4.2.4 :* Corrélations positives entre la pression artérielle systolique et la concentration de TXB<sub>2</sub> dans l'aorte et le lit artériel mésentérique des animaux témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO.

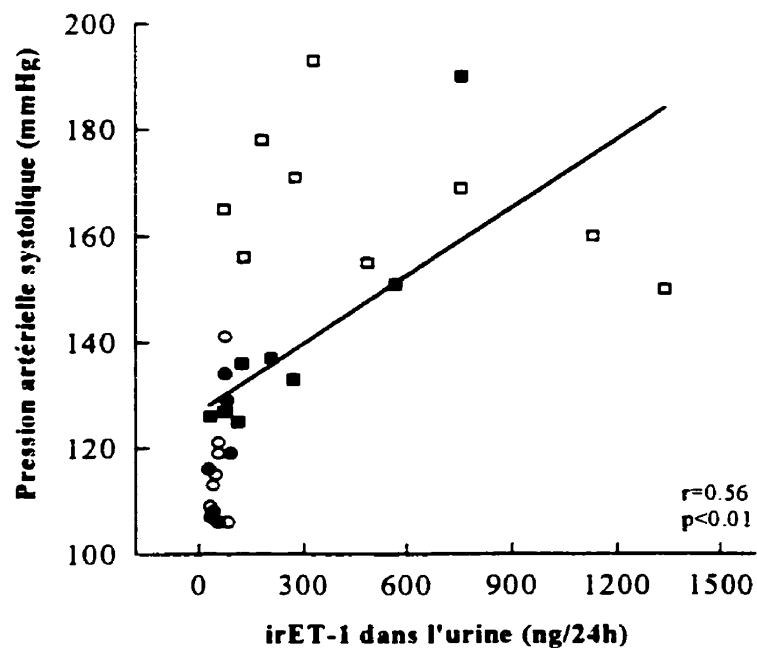
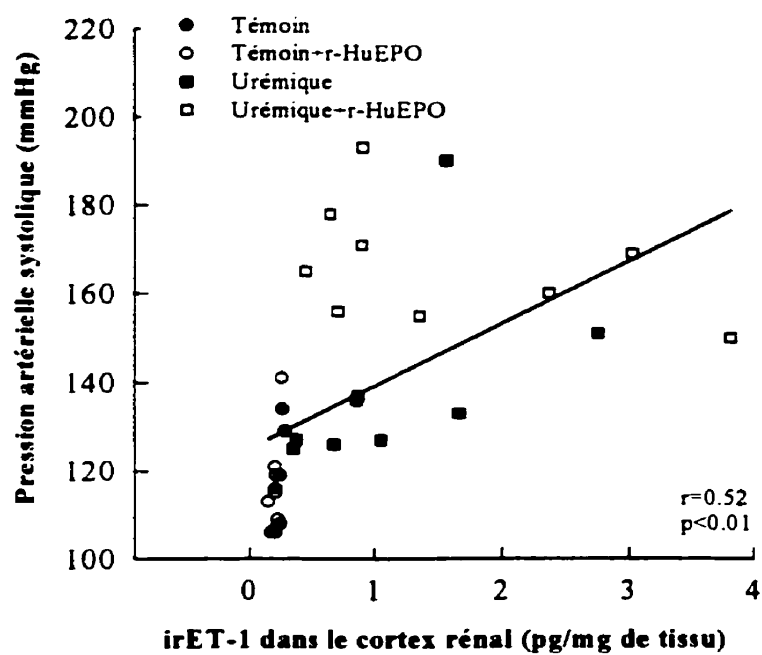
La concentration d'irET-1 est inchangée dans le cortex rénal et dans l'urine des animaux témoins. La concentration d'irET-1 est légèrement augmentée dans le cortex rénal et dans l'urine des animaux urémiques comparativement aux rats témoins (NS) et cette augmentation est encore plus marquée dans ces tissus chez les animaux urémiques traités à l'r-HuEPO ( $p < 0.05$ ) comme le montre le tableau 4.2.9.

**Tableau 4.2.9 :** Concentration d'irET-1 dans le cortex rénal et dans l'urine des animaux témoins et urémiques traités ou non l'r-HuEPO.

	<b>Cortex rénal (pg/mg de tissu)</b>	<b>Urine (ng/24h)</b>
<b>Témoin (n=7)</b>	0.23±0.01	59±9
<b>Témoin+r-HuEPO (n=7)</b>	0.20±0.01	56±7
<b>Urémique (n=9)</b>	1.1±0.3	248±84
<b>Urémique+r-HuEPO (n=9)</b>	1.6±0.4 <sup>a</sup>	522±152 <sup>b</sup>

a :  $p < 0.05$  vs témoin et  $p < 0.01$  vs témoin+r-HuEPO ; b :  $p < 0.05$  vs témoin et témoin+r-HuEPO

Nous avons aussi observé des corrélations positives entre la PAS de ces animaux et la concentration d'ET-1 dans le cortex rénal ( $r=0.52$ ;  $p < 0.01$ ) et dans l'urine ( $r=0.56$ ;  $p < 0.01$ ) (Voir figure 4.2.5).

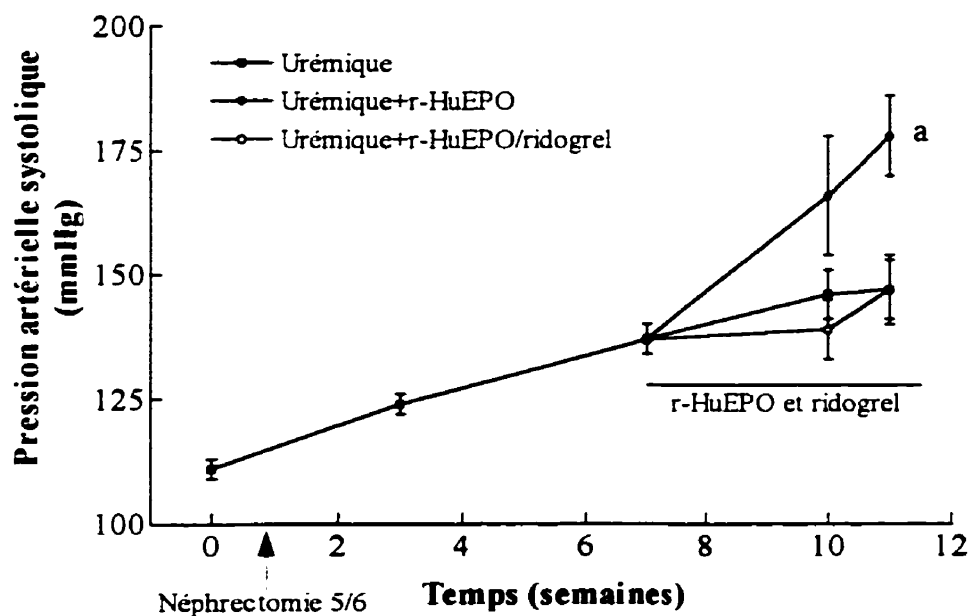


*Figure 4.2.5 :* Corrélations entre la pression artérielle systolique et la concentration d'irET-1 dans le cortex rénal et dans l'urine des rats témoins et urémiques traités ou non à l'r-HuEPO.



*Protocole 2: Effet du ridogrel sur la PAS des animaux urémiques traités à l'r-HuEPO.*

Comme le démontre la figure 4.2.6, l'administration d'un inhibiteur de la synthèse et du récepteur de la TXA<sub>2</sub> à des animaux urémiques traités à l'r-HuEPO maintient la PAS de ces animaux au même niveau que celle des rats urémiques non traités.



a :  $p < 0.05$  vs autres groupes.

**Figure 4.2.6 :** Pression artérielle systolique en fonction du temps chez les animaux urémiques non traités et traités à l'r-HuEPO ou à l'r-HuEPO et au ridogrel.

#### 4.3.2.5 Sommaire

- Comme prévu, l'administration d'r-HuEPO augmente la PAS des animaux urémiques alors que les rats témoins demeurent normotendus.
- Le traitement à l'r-HuEPO n'a aucun effet sur les taux d'icosanoïdes dans les vaisseaux sanguins des animaux témoins.
- La TXB<sub>2</sub> est augmentée chez le rat urémique comparativement au rat témoin.
- Le traitement des rats urémiques à l'r-HuEPO induit une augmentation additionnelle significative de la TXB<sub>2</sub> dans les tissus.

- Nous avons établi des corrélations positives entre les concentrations vasculaires de  $\text{TXB}_2$  et la PAS, suggérant que la  $\text{TXA}_2$  est impliquée dans la réponse pressive à l'r-HuEPO en IRC.
- La concentration de 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  n'est pas changée de façon significative dans tous les groupes de rats.
- Comme pour la  $\text{TXA}_2$ , le traitement à l'r-HuEPO augmente significativement la concentration d'irET-1 chez les rats urémiques, mais n'a aucun effet sur le taux d'ET-1 chez les animaux témoins.
- L'administration de ridogrel à des animaux urémiques traités à l'r-HuEPO prévient l'aggravation de la PAS.

#### 4.3.2.6 Conclusion

Ces résultats démontrent une augmentation marquée de la production vasculaire de la  $\text{TXA}_2$  non compensée par la  $\text{PGI}_2$  chez le rat urémique hypertendu traité à l'r-HuEPO. L'inhibition de l'action de la  $\text{TXA}_2$  avec le ridogrel atténue la réponse pressive à l'r-HuEPO suggérant que ce débalancement des icosanoïdes endothéliaux joue un rôle dans la pathogénèse de l'hypertension associée à l'administration d'r-HuEPO en IRC. Le système ET-1 semble intimement lié aux variations de production de  $\text{TXA}_2$ .

# Chapitre 5

*Discussion*

### **5.1 EFFET DU L-NAME SUR LA PRESSION ARTÉRIELLE ET LE TAUX D'ET-1 CHEZ LES ANIMAUX TÉMOINS ET URÉMIQUES TRAITÉS OU NON À L'R-HUEPO.**

L'altération des facteurs endothéliaux tels que l'ET-1 et le NO a été démontrée dans l'hypertension associée à l'administration d'r-HuEPO en IRC (Lebel, M. et al. 1998, Vaziri, ND. et al. 1996). Le but de l'étude présente est d'évaluer l'effet de l'inhibition chronique de la synthèse du NO (avec le L-NAME) sur la pression artérielle et la production d'ET-1 dans les vaisseaux sanguins d'animaux témoins et urémiques traités ou non avec l'r-HuEPO. Le traitement au L-NAME augmente la pression artérielle des animaux témoins et urémiques. La découverte majeure de cette étude est que la pression artérielle augmente significativement chez les rats urémiques traités au L-NAME et à l'r-HuEPO comparé aux rats urémiques traités au L-NAME seulement.

Conjointement à la pression artérielle, le traitement au L-NAME induit une augmentation de la concentration d'ET-1 dans l'aorte thoracique, mais non dans les lits artériels périphériques tel le lit mésentérique et le cortex rénal des rats témoins et urémiques. L'r-HuEPO accentue l'élévation de la concentration d'ET-1 dans l'aorte des rats témoins et urémiques traités au L-NAME, mais n'a aucun effet significatif sur la concentration d'ET-1 dans le lit artériel mésentérique et dans le cortex rénal.

Ces résultats démontrent l'importance du NO pour contrer l'effet des facteurs vasopresseurs sur le tonus vasculaire, phénomène qui semble plus important chez les rats urémiques traités avec l'r-HuEPO. Le L-NAME augmente la concentration d'ET-1 dans les gros vaisseaux de conductance, mais non dans les petits vaisseaux de résistance, suggérant une régulation différente de la production d'ET-1 selon le lit vasculaire au cours de l'inhibition chronique de la NOS. La discussion de cette partie de l'étude apparaît dans le manuscrit à la section 4.1.5.

## 5.2 EFFET DU RIDOGREL SUR LA PRESSION ARTÉRIELLE DES ANIMAUX URÉMIQUES.

En situation physiologique, les cellules endothéliales synthétisent la  $PGI_2$  et, en quantité moindre, la  $TXA_2$ . Normalement, la  $PGI_2$ , un puissant vasodilatateur, contrecarre l'effet presseur de la  $TXA_2$  et maintient l'homéostasie vasculaire. Cependant, en IRC, la production de  $TXA_2$  augmente, créant ainsi un déséquilibre vasculaire entre ces 2 icosanoïdes (Ikeda, T. et al. 1989; Klahr, S. et al. 1988). En IRC, l'augmentation de la  $TXA_2$  serait impliquée dans les réactions inflammatoires et thrombotiques intra-glomérulaires, la protéinurie et l'hypertension (Hora, K. et al. 1990; Purkerson, ML. et al. 1985; Remuzzi, A. et al. 1985; Zoja, C. et al. 1990).

Dans cette étude, l'atteinte rénale se manifeste par l'élévation de la protéinurie ainsi que par la diminution de la clairance de la créatinine. La pression artérielle systolique est significativement plus élevée chez les animaux urémiques que chez les animaux témoins comme il a déjà été observé dans nos travaux antérieurs.

Lors de cette étude, la concentration de  $TXB_2$ , métabolite stable de la  $TXA_2$ , et de 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ , métabolite stable de la  $PGI_2$ , est mesurée dans le lit artériel mésentérique, le cortex rénal et l'urine des animaux. La concentration de  $TXB_2$  dans tous ces tissus est augmentée de façon significative chez le rat urémique. La concentration de 6-keto- $PGF_{1\alpha}$  augmente légèrement dans le lit artériel mésentérique (NS) et dans le cortex rénal ( $p < 0.05$ ), mais est inchangée dans l'urine des rats urémiques. De plus, nous avons observé des corrélations positives entre la pression artérielle systolique et la concentration de  $TXB_2$  dans les tissus. En fait, nous croyons que l'augmentation de la concentration de  $PGI_2$  serait insuffisante pour contrer l'élévation du taux de  $TXA_2$  créant ainsi un déséquilibre entre la  $TXA_2$  et la  $PGI_2$  qui pourrait être en partie responsable de l'hypertension en IRC. D'ailleurs, d'autres investigateurs ont déjà suggéré l'implication de ce mécanisme chez les rats spontanément hypertendus (SHR) (Quest, DW. et Wilson, TW. 1998) et dans un modèle de néphrectomie par ligation (Zoja, C. et al. 1990).

Pour clarifier le rôle de la  $TXA_2$  dans l'hypertension secondaire à l'IRC, nous avons administré le ridogrel, un inhibiteur de la synthèse et du récepteur de la  $TXA_2$  à des animaux urémiques. Suite au traitement, la concentration de  $TXB_2$  dans les tissus diminue de façon marquée. Conjointement, la pression artérielle systolique des animaux traités est significativement moins élevée que celle des animaux non traités. Nous avons d'ailleurs établi des corrélations positives entre la pression artérielle systolique et la concentration de  $TXB_2$  dans les tissus. D'autres investigateurs ont aussi observé une diminution de la pression artérielle systolique chez des rats urémiques suite à l'administration d'un inhibiteur de la synthèse de la  $TXA_2$  (Purkerson, ML. et al. 1985). Ces résultats suggèrent une fois de plus l'implication de la  $TXA_2$  dans l'hypertension secondaire à l'IRC.

Lors d'une expérience préliminaire, nous avons traité des rats urémiques avec un inhibiteur de la cyclo-oxygénase, l'indométhacine. Le traitement à l'indométhacine accélère de façon dramatique la progression de l'IRC et plusieurs décès sont survenus rendant les données impossibles à analyser. Ces résultats confirment une fois de plus l'importance de maintenir un taux adéquat de  $PGI_2$  pour contrecarrer l'effet presseur de la  $TXA_2$  et maintenir un certain équilibre dans la circulation rénale et systémique.

La protéinurie est causée par l'altération de la membrane basale et l'hyperfiltration (Klahr, S. et al. 1988). D'autre part, l'augmentation de la  $TXA_2$  peut stimuler la production de la matrice extra-cellulaire (Coffman, TM. et al. 1998) et créer de la fibrose. Cette fibrose pourrait intervenir dans le processus de détérioration de la membrane basale. Aussi, l'effet de la  $TXA_2$  sur les cellules mésangiales (Mene, P. et Dunn, MJ. 1986) créant une vasoconstriction intra-glomérulaire peut intervenir dans le phénomène de détérioration du glomérule. Enfin, l'inhibition de la synthèse et du récepteur de la  $TXA_2$  dans cette étude ainsi que dans d'autres études (Purkerson, ML. et al. 1985; Remuzzi, A. et al. 1985; Yamashita, W. et al. 1988) diminue la progression de la protéinurie, ce qui vient appuyer l'hypothèse que la  $TXA_2$  serait impliquée dans la pathogénie de la protéinurie.

On sait que certains systèmes vasoconstricteurs comme le système rénine-angiotensine peuvent moduler la production d'ET-1 (Larivière, R. et al. 1997). Il a été démontré que dans

certaines conditions expérimentales une partie de l'effet presseur de l'ET-1 est médiée par la TXA<sub>2</sub> dans l'aorte des rats normotendus et hypertendus puisqu'un bloqueur de la synthèse ou du récepteur de la TXA<sub>2</sub> atténue l'effet vasoconstricteur de l'ET-1 (Lin, L. et Nasjletti, A. 1992; Simons, J.L. et al. 1994; Taddei, S. et Vanhoutte, P.M. 1993). Lors de la présente étude, comme démontré auparavant, nous observons une augmentation de la concentration d'ET-1 chez le rat urémique comparé au rat témoin (Larivière, R. et al. 1997). Cependant, après l'inhibition de la synthèse et du récepteur de la TXA<sub>2</sub>, la concentration d'ET-1 reste inchangée. Nous en concluons que l'inhibition de la TXA<sub>2</sub> n'a aucun effet sur l'ET-1 en IRC. Nous pensons que l'IRC romprait l'équilibre entre ces 2 facteurs endothéliaux et que les variations de la concentration de TXA<sub>2</sub> ne pourraient avoir d'effet sur la production d'ET-1. Cependant, l'effet inverse pourrait être vrai, c'est-à-dire que l'ET-1 pourrait agir sur la production de TXA<sub>2</sub> en IRC comme le suggèrent d'autres investigateurs qui ont démontré sur des vaisseaux isolés de rats normaux (Moreau, P. et al. 1996) et chez des rats diabétiques (Gonzalez, E. et al. 1999) que le bosentan, un antagoniste non sélectif ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>, peut inhiber la production de TXA<sub>2</sub>.

### 5.3 L'HYPERTENSION ASSOCIÉE À L'ADMINISTRATION D'R-HUEPO EN IRC: IMPLICATION DES ICOSANOÏDES

Comme démontré auparavant, le traitement à l'r-HuEPO corrige complètement l'anémie et accentue l'hypertension des animaux urémiques, contrairement aux animaux témoins (Lacasse-M, S. et al. 1997; Lebel, M. et al. 1998). La pathogénèse de cette forme d'hypertension est encore inconnue. Cependant, d'autres investigateurs ont observé un débalancement des icosanoïdes endothéliaux suite à la stimulation de cellules endothéliales ou de vaisseaux isolés avec l'r-HuEPO (Bode-B, SM. et al. 1992; Bode-B, SM. et al. 1996) ou suite à l'infusion d'r-HuEPO chez l'humain normal (Wada, Y. et al. 1999). Lors de la présente étude, nous avons évalué l'effet de l'r-HuEPO sur la concentration vasculaire de TXA<sub>2</sub> et de PGI<sub>2</sub> chez des rats témoins et urémiques. Chez les animaux témoins, le traitement chronique à l'r-HuEPO n'a aucun effet sur le taux d'icosanoïdes dans les vaisseaux étudiés. Par contre, chez les animaux urémiques, la concentration de TXB<sub>2</sub> augmente tandis que la concentration de 6-keto-PGF<sub>1α</sub> est inchangée. Aussi, l'augmentation de la concentration de TXB<sub>2</sub> dans les vaisseaux est accentuée par le traitement à l'r-HuEPO chez le rat urémique tandis que le taux de 6-keto-PGF<sub>1α</sub> reste inchangé, augmentant ainsi le débalancement entre ces deux icosanoïdes opposés. Nous avons d'ailleurs observé des corrélations positives entre la concentration de TXB<sub>2</sub> dans les vaisseaux et la PAS des animaux, suggérant un rôle pour la TXA<sub>2</sub> dans l'hypertension induite par le traitement chronique à l'r-HuEPO en IRC.

Pour mieux définir le rôle de la TXA<sub>2</sub> dans cette forme d'hypertension, nous avons administré un inhibiteur de la synthèse et un antagoniste du récepteur de la TXA<sub>2</sub>, le ridogrel, à des animaux urémiques traités à l'r-HuEPO. Le ridogrel prévient l'augmentation de la pression artérielle systolique chez les rats urémiques traités à l'r-HuEPO. Ces résultats rejoignent les observations cliniques rapportées par Caravaca (Caravaca, F. et al. 1995; Caravaca, F. et al. 1994) selon lesquelles un traitement antiplaquettaire diminuerait l'incidence de l'hypertension associée à l'administration d'r-HuEPO chez les patients insuffisants rénaux.

Lors de l'étude précédente, (sections 4.2 et 5.2), nous avons démontré une baisse significative de la PAS chez les rats urémiques traités au ridogrel. Dans l'étude présente, la PAS des



animaux traités au ridogrel et à l'r-HuEPO n'est pas inférieure à celle des animaux urémiques non traités. Il faut tenir compte du fait que le degré d'IRC des animaux dans l'étude précédente était de beaucoup supérieur à celui de l'étude présente. Le degré de sévérité de l'IRC étant intimement relié à la surproduction de TXA<sub>2</sub> dans les vaisseaux, ceci peut expliquer pourquoi le ridogrel est plus efficace lors d'IRC plus sévères.

Lors de cette étude, les concentrations d'ET-1 dans le cortex rénal et l'urine des rats urémiques traités à l'r-HuEPO sont significativement augmentées tel que rapporté précédemment dans les vaisseaux mésentériques et l'aorte (Lebel, M. et al. 1998). Cette étude confirme donc le rôle de l'ET-1 dans cette forme d'hypertension. Dans le même sens, un bloqueur du récepteur ET<sub>A</sub> de l'ET-1 prévient la progression de l'hypertension chez des rats urémiques traités à l'r-HuEPO (Brochu, E. et al. 1999a). Il est intéressant de noter que les concentrations d'ET-1 varient de pair avec les concentrations de TXB<sub>2</sub> dans les vaisseaux et que nous observons aussi des corrélations positives entre la pression artérielle systolique et les concentrations d'irET-1. Ces résultats suggèrent une interrelation entre ces deux systèmes vasoconstricteurs lors de l'hypertension associée à l'administration d'r-HuEPO en IRC.

Dans l'étude présente, l'r-HuEPO n'a aucun effet significatif sur la fonction rénale des animaux témoins. Cependant, la créatinine sérique et la protéinurie tendent à augmenter (NS) tandis que la clairance de la créatinine semble diminuer (NS) chez les rats urémiques traités à l'r-HuEPO comparativement aux rats urémiques non traités. Cet effet de l'r-HuEPO sur la fonction rénale en urémie est probablement dû à l'augmentation de la pression artérielle comme l'ont proposé Bellizzi et collaborateurs (Bellizzi, V. et al. 1998). Effectivement, on connaît les effets néfastes de la pression artérielle systémique sur la détérioration de la fonction rénale et la glomérulosclérose (Simons, J.L. et al. 1994).

En résumé, contrairement à ce que l'on observe chez les animaux normaux, l'r-HuEPO induit une augmentation significative de la production vasculaire de TXA<sub>2</sub> chez le rat urémique alors que la PGI<sub>2</sub> demeure inchangée. Cette augmentation de la TXA<sub>2</sub> corrèle avec la PAS. De plus, l'administration du ridogrel, un inhibiteur de la synthèse et un antagoniste du récepteur

de la  $\text{TXA}_2$ , prévient l'aggravation de l'hypertension artérielle chez le rat urémique traité avec l'r-HuEPO.

# **Chapitre 6**

*Conclusion*

## 6 CONCLUSION

Chez le rat normal, l'r-HuEPO n'a aucun effet sur la PAS, sur la fonction rénale et sur la concentration vasculaire des dérivés vasoactifs de l'endothélium (ET-1 et icosanoïdes). De plus, sous inhibition chronique de la NOS avec le L-NAME, l'r-HuEPO ne produit pas d'augmentation additionnelle significative de la PAS.

Par contre, chez le rat urémique hypertendu, nous avons démontré qu'il existe une dysfonction endothéliale qui se manifeste par une augmentation de la concentration vasculaire de l'ET-1 et de la TXA<sub>2</sub> non compensée par la PGI<sub>2</sub>. Notre travail a permis de démontrer pour la première fois que l'administration d'r-HuEPO accentue de façon significative la production anormale de TXA<sub>2</sub> par les vaisseaux et qu'il existe une corrélation avec la PAS. L'inhibition de la synthèse et du récepteur de la TXA<sub>2</sub> avec le ridogrel prévient l'augmentation de la PAS lors d'un traitement avec l'r-HuEPO chez l'animal urémique. De plus, l'administration chronique du L-NAME aggrave l'hypertension induite par l'r-HuEPO chez le rat urémique.

En conclusion, nos résultats démontrent que l'r-HuEPO accentue la dysfonction endothéliale présente dans l'urémie, ce qui pourrait expliquer en partie l'hypertension artérielle associée au traitement de l'anémie avec l'r-HuEPO dans l'IRC.

# **Chapitre 7**

*Bibliographie*

- Anagnostou. A, Lee, ES, Kessimian, N et Levinson, R. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of "USA"*. 87: 5978-5982, 1990.
- Anagnostou. A, Liu, Z, Steiner, M, Chin, K, Lee, ES, Kessimian, N et Noguchi, CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of "USA"*. 91: 3974-3979, 1994.
- Banting. JD, Friberg, P et Adams, MA. Acute hypertension after nitric oxide synthase inhibition is mediated primarily by increased endothelin vasoconstriction. *Journal of Hypertension*. 14(8): 975-981, 1996.
- Battistini. B, D'Orléans-J, P et Sirois, P. Biology of disease Endothelins: Circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Laboratory Investigation*. 68(6): 600-628, 1993.
- Baylis. C. Effects of administered thromboxanes on the intact, normal rat kidney. *Renal Physiology*. 10(2): 110-121, 1987.
- Bellizzi. V, Sabbatini. M, Fuiano, G, Sansone, G, Magri, P, Uccello, F, Andreucci, M, De Nicola, L et Cianciaruso. B. The impact of early normalization of haematocrit by erythropoietin on renal damage in the remnant kidney model. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 13: 2210-2215, 1998.
- Berglund. B et Eckblom, B. Effect of recombinant human erythropoietin treatment on blood pressure and some hematological parameters in healthy men. *Journal of Internal Medicine*. 229: 125-130, 1991.
- Bode-B. SM, Böger, RH, Kuhn, M, Radermacher, J et Frölich, JC. Endothelin release and shift prostaglandin balance are involved in the modulation of vascular tone by recombinant erythropoietin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 20(12): S25-S28, 1992.
- Bode-B. SM, Böger, RH, Kuhn, M, Radermacher, J et Frölich, JC. Recombinant human erythropoietin enhances vasoconstrictor tone via endothelin-1 and constrictor prostaglandins. *Kidney International*. 50: 1255-1261, 1996.
- Boulanger. C et Lüscher, TF. Release of endothelin from the porcine aorta. *Journal of Clinical Investigation*. 85: 587-590, 1990.
- Breyer. MD et Badr, KF. Arachidonic acid metabolites and the kidney. *The kidney*. Chap 18(fifth edition): 754-788, 1996
- Brochu. E, Lacasse-M. S, Larivière, R, Kingma, I, Grose, JH et Lebel, M. Differential effects of endothelin-1 antagonists on erythropoietin-induced hypertension in renal failure. *Journal of American Society of Nephrology*. 10: 1440-1446, 1999a.
- Brochu. E, Lacasse-M. S, Moreau, C, Lebel, M, Kingma, I, Grose, JH et Larivière, R. Endothelin ETA receptor blockade prevents the progression of renal failure and hypertension in uremic rats. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 14: 1881-1888, 1999b.
- Brochu. E, Lebel. M, Larivière, R, Kingma, I et Grose, JH. L'effet de l'érythropoïétine dans l'insuffisance rénale est indépendant de l'élévation de l'hématocrite. *Médecine/Sciences*. 13(Suppl. 1): 15, 1999c.
- Buckner. FS, Eschbach, JW, Haley, NR, Davidson, RC et Adamson, JW. Hypertension following erythropoietin therapy in anemic hemodialysis patients. *American Journal of Hypertension*. 3(12 Pt 1): 947-955, 1990.
- Campbell. WB et Halushka, PV. Lipid-derived autacoids. Eicosanoids and platelet-activating factor. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Chap 26: 601-616, 1994.

- Canadian erythropoietin group. Effect of recombinant human erythropoietin therapy on blood pressure in hemodialysis patients. *American Journal of Nephrology*. 11: 23-26, 1991.
- Caravaca. F, Lopez-M, JR, Arrobas, M, Cubero, J, Pizarro, JL, Cid, MC, Sanchez-C, E et Miranda, MP. Haemodynamic changes induced by the correction of anemia by erythropoietin: role of antiplatelet therapy. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 10: 1720-1724, 1995.
- Caravaca. F, Pizarro, JL, Arrobas, M, Cubero, JJ, Garcia, MC et Perez-M, M. Antiplatelet therapy and development of hypertension induced by recombinant human erythropoietin in uremic patients. *Kidney International*. 45: 845-851, 1994.
- Carlini. RG, Dusso, AS, Obialo, CI, Alvarez, UM et Rothstein, M. Recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) increases endothelin-1 release by endothelial cells. *Kidney International*. 43: 1010-1014, 1993.
- Cattaruzza. M, Ehreinreich, H, Saile, B et Hecker, M. Endothelin-1-induced endothelin B receptor-mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Sixth International Conference on Endothelin (Montréal, 1999)*. 1999.
- Coffman. TM, Spurney. RF, Mannon, RB et Levenson. R. Thromboxane A2 modulates the fibrinolytic system in the glomerular mesangial cells. *American Journal of Physiology*. 275(Renal physiol. 44): F262-F269, 1998.
- D'Andrea. AD, Lodish, HF et Wong, GG. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell*. 57: 277-285, 1989.
- Davenport. AP et Maguire. JJ. Is endothelin-induced vasoconstriction mediated only by ETA receptors in human? *Tips*. 15: 9-11, 1994.
- Del Castillo. D, Raij, L, Shultz, PJ et Tolins, JP. The pressor effect of recombinant human erythropoietin is not due to decreased activity of the endogenous nitric oxide system. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 10: 505-508, 1995.
- De Nucci. G, Thomas, R, D'Orléans-J, P, Antunes, E, Walder, C, Warner, TD, Vane, JR. Pressor effect of circulating endothelin are limited by its removal on the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 85: 9797-9800, 1988.
- Eggena. P, Willsey, P, Jamgotchian, X, Truckenbrod, L, Hu, MS, Barrett, JD, Eggena, MP, Klegg, K, Nakhoul, F et Lee. BN. Influence of recombinant human erythropoietin on blood pressure and tissue renin-angiotensin systems. *American Journal of Physiology*. 261: E642-E646, 1991.
- Erslev. AJ et Besarab, A. Erythropoietin in the pathogenesis and treatment of the anemia of chronic renal failure. *Kidney International*. 51: 622-630, 1997.
- Erslev. AJ, Caro, J, Kansu, E et Silver, R. Renal and extrarenal erythropoietin production in anaemic rats. *British Journal of Haematology*. 45(1): 65-72, 1980.
- Eschbach. JW, Egric, JC, Downing, MR, Browne, JK et Adamson, JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. *New England Journal of Medicine*. 316: 73-78, 1987.
- Filep. JG, Battistini, B, Côté, IP, Beaudouin, AR et Sirois, P. Endothelin-1 induces prostacyclin release from bovine aortic endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 177(1): 171-176, 1991.
- Fischl. M, Galpin, JE, Levine, JD, Groopman, JE, Henry, DH, Kennedy, P, Miles, S, Robins, W, Starett, B, Zalusky, R, Abels, RI, Tsai, H et Rudnick, SA. Recombinant human erythropoietin for patients with AIDS treated with zidovudine. *New England Journal of Medicine*. 322(21): 1488-1493, 1990.

- Furchgott, RF et Zawadzki, JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288: 373-376, 1980.
- Gonzalez, E, Jawerbaum, A, Sinner, D, Pustovrh, C, Xaus, C, Peralta, C, Gomez, G, Rosello-C, J, Gelpi, E et Gimeno, M. Evolution of streptozotocin-pancreatic damage in the rat: modulatory effect of endothelins on the nitridergic and prostanoid pathway. *Nitric oxide*. 3(6): 459-466, 1999.
- Gretz, N, Waldherr, R et Strauch, M. The remnant kidney model. *Experimental and Genetic Rat Models of Chronic Renal Failure*. 1-28, 1993.
- Griswold, DE, Douglas, SA, Martin, LD, Davis, TG, Schultz, LB, Luttmann, M, Pullen, M, Nambi, P, Hay, D et Ohlstein, EH. Targeted disruption of the ETB receptor gene attenuates inflammatory nociception and cutaneous inflammation in mice. *Sixth International Conference on Endothelin (Montréal, 1999)*. 1999.
- Guyton, AC. Renal disease, diuresis and micturition. *Textbook of Medical Physiology*. chap 38: 452-463, 1986.
- Haller, H, Christel, C, Danneberg, L, Thiele, P, Lindschau, C et Luft, FC. Signal transduction of erythropoietin in endothelial cells. *Kidney International*. 50: 481-488, 1996.
- Haynes, WG, Strachan, FE et Webb, DJ. Endothelin ETA and ETB receptors mediate vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation*. 92: 357-363, 1995.
- Heideinreich, S, Rahn, KH et Zidek, W. Direct vasopressor effect of recombinant human erythropoietin on renal resistance vessels. *Kidney International*. 39: 259-265, 1991.
- Hirata, Y, Emori, T, Egushi, S, Kanno, K, Imai, T, Ohta, K et Marumo, F. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*. 91: 1367-1373, 1993.
- Hora, K, Oguchi, H, Furukawa, T et Tokunaga, S. Effects of a selective thromboxane synthase inhibitor OKY-046 on experimental diabetic nephropathy. *Nephron*. 56(3): 297-305, 1990.
- Ikeda, T, Yuhara, M, Gomi, T, Ishimitsu, T et Uehara, Y. Alteration of vascular thromboxane in rats with chronic renal ablation. *Prostaglandins Leukotrienes and essential fatty acids*. 37: 157-161, 1989.
- Institut canadien d'information sur la santé. Dialyse et transplantations rénales. *Registre Canadien des insuffisances et des transplantations d'organes*. 1, 1999.
- Jacobson, LO, Goldwasser, E, Fried, W et Plzak, L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*. 179: 633-634, 1957.
- Jonhston, CI, Fabris, B et Jandeleit, K. Intrarenal renin-angiotensin system in renal physiology and pathology. *Kidney International*. 44(Suppl. 42): S59-S63, 1993.
- King, AJ. Endothelins: Multifunctional peptides with potent vasoactive properties. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Chapter 38, 1995.
- Klahr, S, Schreiner, G et Ichikawa, I. The progression of renal disease. *The New England Journal of Medicine*. 318(25): 1657-1666, 1988.
- Kohan, DE. Endothelins in the normal and diseased kidney. *American Journal of Kidney Disease*. 29(1): 2-26, 1997.
- Koury, ST, Bondurant, MC et Koury, MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood*. 71(2): 524-527, 1988.



- Lacasse-M. S, Kingma, I, Larivière, R, Grose, JH et Lebel, M. Uremia enhances the blood pressure response to erythropoietin. *Clinical and Experimental Hypertension*. 19(4): 389-401, 1997.
- Lahera, V, Salom, MG, Miranda-G, M, Moncada, S et Romero, C. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *American Journal of Physiology*. 261: F1033-F1037, 1991.
- Larivière, R, D'Amours, M, Lebel, M, Kingma, I, Grose, JH et Caron, L. Increase immunoreactive endothelin-1 levels in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass. *Blood Pressure Researc*. 20: 372-380, 1997.
- Lebel, M, Grose, JH, Kingma, I et Langlois, S. Plasma endothelin levels and blood pressure in hemodialysis and CAPD patients. Effect of subcutaneous erythropoietin replacement therapy. *Clinical and Experimental Hypertension*. 16(5): 565-575, 1994.
- Lebel, M, Kingma, I, Grose, JH et Langlois, S. Effect of recombinant human erythropoietin therapy on ambulatory pressure in normotensive and untreated borderline hypertensive hemodialysis patients. *American Journal of Hypertension*. 8: 545-551, 1995.
- Lebel, M, Kingma, I, Grose, JH et Langlois, S. Hemodynamic and hormonal changes during erythropoietin therapy in hemodialysis patients. *Journal of American Society of Nephrology*. 9: 97-104, 1997.
- Lebel, M, Lacasse-M, S, Larivière, R, Kingma, I et Grose, JH. Plasma and blood vessel endothelin-1 concentrations in hypertensive uremic rats treated with erythropoietin. *Clinical and Experimental Hypertension*. 1998.
- Levin, ER. Mechanisms of disease : Endothelins. *New England Journal of Medicine*. 333(6): 356-363, 1995.
- Lin, L et Nasjletti, A. Prostanoid-mediated vascular contraction in normotensive and hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 220: 49-53, 1992.
- Ludwig, H, Kotzmann, H, Höcker, P, Glisslinger, H et Barnas, U. Erythropoietin treatment of anemia associated with multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 322(24): 1693-1699, 1990.
- Marieb, EN. Le système urinaire. *Anatomie et Physiologie Humaines*. Chap. 26: 872-903, 1993.
- Martin, P-Y et Féraille, E. Le monoxyde d'Azote dans les maladies rénales. *Flammarion Médecine-Sciences-Actualités néphrologiques*. 1999.
- Mene, P et Dunn, MJ. Contractile effects of TxA2 and endoperoxide analogues on cultured rat glomerular mesangial cells. *American Journal of Physiology*. 251(6 Pt 2): F1029-F1035, 1986.
- Miyake, T, Kung, C et Goldwasser, E. Purification of human erythropoietin. *The Journal of Biological Chemistry*. 252(15): 5558-5564, 1977.
- Moncada, S, Gryglewski, R, Bunting, S et Vane, JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*. 263: 663-665, 1976.
- Moncada, S, Palmer, R et Higgs, A. Nitric oxide: Physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 43(2): 109-142, 1991.
- Moncada, S et Vane, JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2, and prostacyclin. *Pharmacological Reviews*. 30(3): 293-331, 1979.
- Moreau, P, Takase, H et Lüscher, TF. Effect of endothelin antagonists on the responses to prostanoid endothelium-derived contracting factor. *British Journal of Pharmacology*. 118: 1429-1432, 1996.

- Neusser, M, Tepel, M et Zidek, W. Erythropoietin increases cytosolic free calcium concentration in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*. 27: 1233-1236, 1993.
- Ni, Z, Wang, XQ et Vaziri, ND. Nitric oxide metabolism in erythropoietin-induced hypertension: Effect of calcium channel blockade. *Hypertension*. 32: 724-729, 1998.
- Ohta, K, Hirata, Y, Shichiri, M, Kanno, K, Emori, T, Tomita, K et Marumo, F. Urinary excretion of endothelin-1 in normal subjects and patients with renal disease. *Kidney International*. 39: 307-311, 1991.
- Oksche, A, Boese, G, Horstmeyer, A, Furkert, J, Beyermann, M et Rosenthal, W. ET-1 induced internalisation of the endothelin B receptor. *Sixth International Conference on Endothelin (Montréal, 1999)*. 1999.
- Palmer, R, Ferridge, AG et Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327: 524-526, 1987.
- Pollock, DM, Allock, GH, Krihnan, A, Dayton, BD et Pollock, JS. Upregulation of endothelin B receptors in kidneys of DOCA-salt hypertensive rats. *American Journal of Physiology*. 278(2): F279-F286, 2000.
- Prins, BA, Hu, R-M, Nazario, B, Pedram, A, Harrison, J, Weber, MA et Levins, R. Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 269(16): 11938-11944, 1994.
- Purkerson, ML, Joist, JH, Yates, J, Valdes, A, Morrison, A et Klahr, S. Inhibition of thromboxane synthesis ameliorates the progressive kidney disease of rats with subtotal renal ablation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 82(1): 193-197, 1985.
- Quest, DW et Wilson, TW. Effects of Ridogrel, a Thromboxane Synthase Inhibitor and Receptor Antagonist, on Blood Pressure in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Japan Journal of Pharmacology*. 78: 479-486, 1998.
- Quilley, J, Bell-Q, CP et McGiff, JC. Eicosanoids and hypertension. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. chapitre 57(second edition): 963-982, 1995.
- Remuzzi, A, Imberti, L, Rossini, M, Morelli, C, Carminati, C, Cattaneo, GM et Bertani, T. Increased glomerular thromboxane synthesis as a possible cause of proteinuria in experimental nephrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 75(1): 94-101, 1985.
- Richard, V, Hogie, M, Clozel, M, Löffler, BM et Thuillez, C. In vivo evidence of an endothelin-induced vasopressor tone after inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation*. 91(3): 771-775, 1995.
- Rosenberg, ME, Smith, LJ, Correa-R, R et Hostetter, TH. The paradox of the renin-angiotensin system in chronic renal disease. *Kidney International*. 45: 403-410, 1994.
- Samtleben, W, Baldamus, CA, Bommer, J, Fassbinder, W, Nannast-D, B et Gurland, HJ. Blood pressure changes during treatment with recombinant human erythropoietin. *Contribution Nephrology*. 66: 114-122, 1988.
- Schiffrin, EL et Touyz, M. Vascular biology of endothelin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 32(Suppl. 3): S2-S13, 1998.
- Sennequier, N et Vadon-L-G, S. Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO): mécanisme, régulation et contrôle. *Médecine-Sciences*. 14: 1185-1195, 1998.
- Simons, JL, Provoost, AP et Anderson, S. Modulation of glomerular hypertension defines susceptibility to progressive glomerular injury. *Kidney International*. 46: 396-404, 1994.

- Stohlman, F, Rath, CE et Rose, JC. Evidence for a humoral regulation of erythropoiesis: studies on a patient with polycythemia secondary to regional hypoxia. *Blood*. 9: 721-733, 1954.
- Taddei, S et Vanhoutte, PM. Role of endothelium in endothelin-evoked contractions in the rat aorta. *Hypertension*. 21: 9-15, 1993.
- Thierauch, KH, Dinter, H et Stock, G. Prostaglandins and their receptors: 2. Receptor structure and signal transduction. *Journal of Hypertension*. 12: 1-5, 1994.
- Tsukahara, H, Hiraoka, M, Hori, C, Hata, I, Okada, T, Gejyo, F et Sudo, M. Chronic erythropoietin treatment enhances endogenous production of nitric oxide in rats. *Scandinave Journal of Clinical Laboratory Investigation*. 57: 487-494, 1997.
- Vallance, P, Leone, A, Calver, A, Collier, J et Moncada, S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 339: 572-575, 1992.
- Valtin, H et Schafer, JA. *Renal function*. 1995.
- Vaziri, ND. Mechanism of erythropoietin-induced hypertension. *American Journal of Kidney Disease*. 33(5): 821-828, 1999.
- Vaziri, ND, Zhou, XJ, Naquvi, F, Smith, J, Oveisi, F, Wang, ZQ et Purdy, RE. Role of nitric oxide resistance in erythropoietin-induced hypertension in rats with chronic renal failure. *American Journal of Physiology*. 271: E113-E122, 1996.
- Vaziri, ND, Zhou, XJ, Smith, J, Oveisi, F, Baldwin, K et Purdy, RE. In vivo and in vitro pressor effect of erythropoietin in rats. *American Journal of Physiology*. 269: F838-F845, 1995.
- Wada, Y, Matsuoka, H, Tamai, O, Kohno, K, Okuda, S et Imaizumi, T. Erythropoietin impairs endothelium-dependent vasorelaxation through cyclooxygenase-dependent mechanisms in humans. *American Journal of Hypertension*. 12: 980-987, 1999.
- Wang, XQ et Vaziri, ND. Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells. *Hypertension*. 33: 894-899, 1999.
- Wilcox, CS, Deng, X, Doll, H, Snellen, H et Welch, WJ. Nitric oxide mediates renal vasodilatation during erythropoietin-induced polycythemia. *Kidney International*. 44: 430-435, 1993.
- Willis, A et Kuhn, DC. A new potential mediator of arterial thrombosis whose biosynthesis is inhibited by aspirin. *Prostaglandins*. 4: 127-130, 1974.
- Yamashita, W, Ito, Y, Weiss, MA, Ooi, BS et Pollack, VE. A thromboxane synthetase antagonist ameliorates progressive renal disease of Dahl-S rats. *Kidney International*. 33: 77-83, 1988.
- Yanagisawa, M, Kurihara, H, Kimura, K, Tomobe, Y, Kobayashi, M, Mitsui, Y, Yazaki, Y, Goto, K et Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by endothelial cells. *Nature*. 332: 411-415, 1988.
- Zoja, C, Perico, N, Corna, D, Benigni, A, Gabanelli, M, Morigi, M, Bertani, T et Remuzzi, G. Thromboxane synthesis inhibition increases renal prostacyclin and prevents renal disease progression in rats with remnant kidney. *Journal of American Society of Nephrology*. 1: 799-807, 1990.

# Chapitre 8

*Amorosa*

## 8.1 LETTRE DE L'ÉDITEUR

(Manuscript section 4.1.5)

*Clinical and Experimental*  
**HYPERTENSION****EDITOR**

Mustafa F. Lokhandwala, Ph.D.  
Institute for Cardiovascular Studies  
College of Pharmacy  
University of Houston  
Houston, TX 77204-5511 USA  
(713) 743-1252 Telephone  
(713) 743-1259 Facsimile

April 24, 2000

**ASSOCIATE EDITORS**

J.P. Chalmers, M.D., Ph.D.  
Research Chairman  
Royal North Shore Hospital  
University of Sydney  
Level 4, Vindin House  
St Leonards NSW 2065  
Australia

B.S. Jandhyala, Ph.D. (reviews)  
Institute for Cardiovascular Studies  
College of Pharmacy  
University of Houston  
Houston, TX 77204-5511 USA

M. Paul, M.D.  
German Institute for High  
Blood Pressure Research  
Wielandstr. 26  
69120 Heidelberg  
Germany

K. Abe, M.D.  
Second Department of Internal Medicine  
School of Medicine  
Tohoku University  
Seiryō-Cho, Aoba-Ku  
Sendai, Japan 980

Dr. Marcel Lebel  
Division of Nephrology  
CHUQ - L'Hotel-Dieu de Quebec  
11 cote du Palais  
Quebec (Que.)  
C A N A D A G1R 2J6

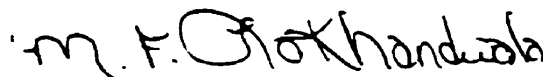
**RE: MS # 2220 - "Chronic Nitric Oxide Inhibition  
Aggravates Hypertension in Erythropoietin-Treated Renal  
Failure Rats"**

Dear Dr. Lebel:

I am pleased to inform you that your revised manuscript is acceptable for publication in *Clinical and Experimental Hypertension*. I am sending you a reprint order form which should be completed and sent directly to the publisher.

Thank you for submitting your interesting work to the journal.

Sincerely,



Mustafa F. Lokhandwala, Ph.D.  
Editor

MFL:ds

Enclosure

cc: Reviewers

Editorial Assistant  
D. Salazar

**8.2 CURRICULUM VITAE**

Claudia Moreau

(418) 661-2514

1798 DesRoches App. 5

Message : (418) 589-3672

Québec (Québec)

Courriel : clomoreau@hotmail.com

G1J 1T2

**FORMATION**

Maîtrise en Médecine Expérimentale, Université Laval

Avril 2000

Baccalauréat en Biologie Médicale, Université du Québec à Trois-Rivière Mai 1998

**PROJET DE MAÎTRISE**

Implication des facteurs vasoactifs endothéliaux tels l'endothéline-1, le monoxyde d'azote et les icosanoïdes (TXA<sub>2</sub> et PGI<sub>2</sub>) dans l'hypertension induite par l'administration d'érythropoïétine en insuffisance rénale.

- Résultats : Le déséquilibre entre les facteurs presseurs et relaxants étudiés dans les vaisseaux sanguins est une des causes de l'hypertension associée à l'administration d'érythropoïétine.
- Supervision d'étudiants : Formation pratique et théorique.
- Rédaction d'articles scientifiques.
- Travail d'équipe à l'intérieur du laboratoire et en collaboration avec d'autres laboratoires.
- Techniques employées : Chirurgie et hémodynamie chez le rat, préparation de tissus.

**EXPÉRIENCE EN RECHERCHE**

**Stagiaire en recherche, Département de Néphrologie et Cardiologie Été 1997**

**Projet : L'administration d'érythropoïétine chez la rat normal : Rôle du monoxyde d'azote et de l'endothéline-1.**

- **Le monoxyde d'azote contrecarre l'effet presseur de l'endothéline-1 dans les vaisseaux sanguins en situation normale → Aucun effet hypertenseur de l'érythropoïétine.**
- **Techniques employées : Traitements pharmacologiques et récolte de tissus chez le rat.**

**Stage en biologie médicale, Département de Néphrologie et Cardiologie 1998**

**Projet : Rôle du monoxyde d'azote et de l'endothéline-1 dans l'effet hypertenseur associé à l'administration d'érythropoïétine chez le rat urémique.**

- **L'augmentation de l'endothéline-1 et la diminution du monoxyde d'azote pourrait être une des causes de l'hypertension induite par l'érythropoïétine.**
- **Techniques employées : Dosage des facteurs par des techniques biochimiques et des essais radio-immunologiques spécifiques.**

## RÉALISATIONS PARASCOLAIRES

Membre du comité organisateur de la Journée Carrière de la Faculté de Médecine à l'Université Laval.

- Recrutement des compagnies pharmaceutiques.
- Organisation des lieux.

Organisatrice de la Journée Scientifique des Étudiants 1998 du Centre de Recherche de L'Hôtel-Dieu de Québec.

- Recrutement des participants.
- Présentation d'une affiche.
- Organisation des lieux.

Membre des Sociétés Québécoise et Canadienne d'Hypertension Artérielle (1998-).

- Présentation d'affiches aux congrès 1999 et 2000.

Aide aux devoirs en sciences pour des étudiants de secondaire IV      1999-2000

## BOURSES ET PRIX D'EXCELLENCE

□ Première au comité de sélection du FRSQ      1999-2000

□ Bourse de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle      1998-1999

□ Bourse d'été en recherche

Centre de Recherche de L'Hôtel-Dieu de Québec      Été 1997

□ Prix du meilleur résumé soumis par un étudiant

*The Canadian Society of Nephrology*      Mars 2000

□ Bourse de déplacement pour la réunion annuelle de la Société Canadienne  
D'Hypertension Artérielle



*Merk Frosst Canada*

Octobre 1999

- Bourse d'aide au congrès pour la Sixième Conférence Internationale sur l'Endothéline

Association des étudiantes et des étudiants de Laval inscrits aux études supérieures

Octobre 1999

## PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

### *Publications*

1. Moreau C, Larivière R, Kingma I, Grose JH, Lebel M. Chronic nitric oxide inhibition aggravates hypertension in erythropoietin-treated renal failure rats. *Exp Nephrol* (Soumis, 1999)
2. Brochu E, Lacasse-M S, Moreau C, Lebel M, Kingma I, Grose J H, Larivière R. Endothelin ET<sub>A</sub> receptor blockade prevents the progression of renal failure and hypertension in uremic rats. *Nephrol Dial Transplant* 14 :1881-1888, 1999.

### *Communications*

1. Moreau C, Lacasse-M S, Brochu E, Larivière R, Lebel M. Rôle du monoxyde d'azote dans l'effet hypertenseur associé à l'administration d'érythropoïétine humaine recombinante. *Med. Sci. Suppl.* 2 Vol. 14 : p.48, 1998 (Club de Recherches Cliniques du Québec, Mont-Tremblant, octobre 1998 ; Journée Scientifique des Étudiants 1998, Centre de Recherche de L'Hôtel-Dieu de Québec). Résumé finaliste pour le prix «Hans Selye» (Mont-Tremblant).
2. Moreau C, Lacasse-M S, Larivière R, Kingma I, Grose J-H, Lebel M. Rôle du monoxyde d'azote et de l'endothéline-1 dans l'effet hypertenseur associé à l'érythropoïétine humaine recombinante. *Med. Sci. Suppl.* 1 Vol. 15 : p.21, 1999.

- (Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Québec, janvier 1999 ; Journée de la Recherche de la faculté de Médecine 1998, Université Laval).
3. Moreau C, Larivière R, Kingma I, Grose JH, Lebel M. Interaction between endothelin-1 and thromboxane A<sub>2</sub> in erythropoietin-induced hypertension. (*Sixth International Conference on Endothelins*, Montréal, octobre 1999).
  4. Moreau C, Larivière R, Kingma I, Grose JH, Lebel M. Eicosanoid imbalance in erythropoietin-induced hypertension. *The Canadian J of Cardiol*. Vol. 15 Suppl. D : p.481, 1999. (*The Canadian Hypertension Society*, Québec, octobre 1999).
  5. Moreau C, Larivière R, Kingma I, Grose JH, Lebel M. Implication des icosanoïdes endothéliaux dans l'hypertension associée à l'administration d'érythropoïétine en insuffisance rénale. *Med. Sci. Suppl. 1* Vol. 16 : p.27, 2000. (Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Montréal, janvier 2000).
  6. C Moreau, R Larivière, I Kingma, JH Grose, M Lebel. Cyclooxygenase-products mediated mechanisms in erythropoietin-induced hypertension un chronic renal failure rats. (*The Canadian Society of Nephrology*, Montréal, mars 2000).  
Résumé récipiendaire du prix du meilleur résumé soumis par un étudiant.
  7. Moreau C, Larivière R, Kingma I, Grose JH, Lebel M. Involvement of thromboxane A<sub>2</sub> in erythropoietin-induced hypertension in uremic rats. (*The International Society of Hypertension*, Chicago, août 2000).
  8. Brochu E, Moreau C, Lebel M, Kingma I, Grose JH, Larivière R. Endothelin ET<sub>A</sub> receptor blockade prevents the worsening of hypertension in rats with chronic renal failure. *J. Hypertens*. Vol. 16(2):S100, 1998 (*The International Society of Hypertension*, Amsterdam, juin 1998).
  9. Brochu E, Moreau C, Lebel M, Kingma I, Grose JH, Larivière R. Specific endothelin ET<sub>A</sub> receptor blockade prevents the worsening of hypertension and

the progression of renal insufficiency in rats with reduced renal mass. *Clin. Invest. Med. Suppl.* S61, 1998 (*Canadian Societies for Clinical Investigation*, Toronto, septembre 1998).

**Autorisation de co-auteur(s) pour un article inclus dans le mémoire ou la thèse**

NOM de  
L'ÉTUDIANT-E

Claudia Moreau

NOM DU PROGRAMME

Médecine Expérimentale

TITRE DU MÉMOIRE  
OU DE LA THÈSE

L'hypertension associée à l'administration d'érythropoïétine en insuffisance rénale chronique : implication des facteurs endothéliaux

Par la présente, le(s) soussigné(s), co-auteur(s) d'un article intitulé :

Chronic nitric oxide inhibition aggravates hypertension in erythropoietin-treated renal failure rats

faisant partie du mémoire de maîtrise ou de la thèse de doctorat en titre qui est présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, autorise(nt) l'insertion de l'article dans ce mémoire ou cette thèse et l'éventuel microfilmage selon les règles de la Bibliothèque nationale du Canada (Service des thèses canadiennes).

SIGNATURE

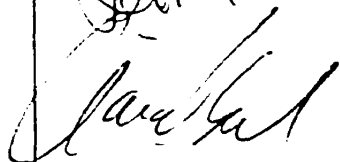
NOM EN CARACTÈRES D'IMPRIMERIE

DATE




John H. Grose

27-04-00



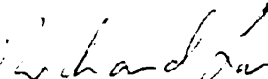
MARCEL LÉVESQUE

27/04/00



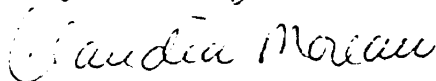
Iris Kuizuma

00/04/27



RICHARD LAVOIE

27/04/2000



Claudia Moreau

27/04/00