THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale CBS2

Unité de recherche PhyMedExp, INSERM, CNRS, Université de Montpellier, France

Atteintes cardiaques dans l'insuffisance rénale chronique. Etude clinique et expérimentale de marqueurs tissulaires et sanguins.

Présentée par Maëlle Plawecki
Le 06 juillet 2021

Sous la direction de Jean-Paul Cristol
et la codirection de Bernard Jover

Devant le jury composé de

Mr le Docteur Joost-Peter Schanstra	Président
Mr le Docteur Cyril Reboul	Rapporteur
Mme le Docteur Caroline Desmetz	Examinateur
Mr le Professeur Jean-Paul Cristol	Directeur de thèse
Mr le Docteur Bernard Jover	Membre invité

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.

A Madame le Docteur Caroline Desmetz, je vous remercie de votre aide scientifique et technique fournie tout au long de ce travail. Je vous remercie également d'avoir accepté d'être membre de ce jury de thèse.

A Monsieur le Docteur Cyril Reboul, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail, et des commentaires que vous avez ajoutés. J'espère que des collaborations se poursuivront.

A Monsieur le Docteur Joost-Peter Schanstra, je vous remercie très chaleureusement d'honorer ce travail de votre attention, en acceptant d'être rapporteur de cette thèse.

Monsieur le Professeur Jean-Paul Cristol, je vous remercie d'avoir dirigé cette thèse. Vous m'avez intégrée à votre équipe et vous m'avez donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Soyez assuré de notre profond respect et de toute ma gratitude pour ce que vous avez pu apporter au cours de mon cursus.

Monsieur le Docteur Bernard Jover, je te remercie d'avoir accepté de codiriger ce travail de thèse. La confiance et la disponibilité que tu m'as accordées m'ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions possibles. Tu m'as apporté ton aide avec bienveillance, et à travers ces quelques lignes et ce travail, je te prie de trouver l'expression de ma plus profonde gratitude et mes remerciements les plus sincères.

Je remercie l'ensemble des membres l'équipe 2, Marion, Fabrice, Eric, Pascal, Céline pour leur accueil, leur amabilité et le partage de leur expertise au quotidien. J'espère pouvoir partager longtemps nos idées et nos travaux. Je remercie également Pierre pour son aide dans la compréhension et l'analyse des échographies cardiaques menées au sein de PhyMedExp.

Je remercie l'ensemble de l'équipe du laboratoire de Biochimie-Hormonologie. Votre accueil et votre aide scientifique et technique dans la réalisation de cette thèse ont été précieux.

Je remercie également Madame le Professeur Anne-Dominique Lajoix de m'avoir accueillie au sein de l'équipe Biocommunication cardiométabolique ainsi que toute l'équipe.

Je remercie RD Néphrologie, en particulier Madame le Docteur Nathalie Gayrard et Karen Muyor pour leur aide scientifique et technique dans la réalisation de ce travail.

Enfin, je dédie cette thèse à mes parents, ma famille et ma belle-famille. Un grand merci pour votre soutien et votre amour.

A mes enfants, Margot et Marie, qui m'apportent beaucoup de bonheur et de joie.

A Guillaume, je te remercie profondément de toujours m'accompagner et me soutenir dans nos projets. Avec tout mon amour.

Résumé

Malgré les progrès médicaux réalisés récemment, les pathologies cardio-vasculaires représentent les principales causes de morbidité et de mortalité chez le patient insuffisant rénal chronique. Environ 50% des décès chez ces patients sont dus à un évènement cardiaque majeur. Si des facteurs de risque traditionnels sont bien identifiés, des facteurs de risque non traditionnels ont été mis en évidence. De nouvelles voies physiopathologiques comme la fibrose et le remodelage cardiaque sont actuellement étudiées. La fibrose et le remodelage cardiaque sont notamment impliqués dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

L'hypothèse principale de ce travail est qu'il est possible d'observer des modifications précoces de marqueurs d'atteinte cardiaque au cours de l'insuffisance rénale chronique au stade de la pré-dialyse. Ce travail regroupe plusieurs études permettant de répondre à l'hypothèse principale. Dans la première étude, nous avons montré l'intérêt d'utiliser un score clinico-biologique dans l'évaluation pronostique des évènements cardiaques majeurs, permettant d'améliorer la prise en charge de la maladie rénale chronique et de prévenir ses complications.

Dans la seconde étude, nous avons montré que l'insulino-résistance et l'obésité exacerbe le remodelage cardiaque en présence d'une insuffisance rénale chronique dans un modèle de rongeur. Nous avons également évoqué des phénomènes de transition endothélio-mésenchymateuse à l'origine des myofibroblastes impliqués dans le processus de fibrose cardiaque dans la maladie rénale chronique.

Dans la troisième étude, nous avons observé une discrète altération cardiaque après trois mois d'évolution de l'insuffisance rénale chronique chez des rats rendus

insuffisants rénaux à 12 semaines de vie. En revanche, les anomalies de la structure cardiaque sont plus clairement présentes lorsque l'insuffisance rénale est initiée à un âge plus précoce (6 semaines de vie), donc que l'atteinte cardiaque consécutive à une insuffisance rénale chronique est plus marquée lorsque qu'elle survient chez un sujet jeune.

L'ensemble de ces études apporte certaines réponses à la caractérisation de la fibrose cardiaque et l'atteinte fonctionnelle observée au cours de l'insuffisance rénale chronique.

Summary

Despite medical advances achieved recently, cardiovascular diseases are the main cause of morbidity and mortality in chronic kidney disease in the industrialized countries. About half of deaths in these patients are due to a major cardiac event. While traditional risk factors are well identified, non-traditional risk factors have been highlighted. New pathophysiological pathways such as fibrosis and cardiac remodeling are being studied. Fibrosis and cardiac remodeling are particularly involved in heart failure with preserved ejection fraction.

The main objective of this work is to observe early modifications of cardiac biomarkers during chronic kidney disease before dialysis. This work includes several studies allowing to answer to the main objective.

In the first study, we proved the interest of using a clinical and biological tool in the prognostic assessment of major cardiac events and to prevent the complications of the chronic kidney disease. In the second work, we showed that a model of rat insulin-resistant and obese exacerbates cardiac remodeling observed with chronic renal failure. We were also able to propose that endothelio to mesenchymal transition phenomena at the origin of myofibroblasts could be involved in the process of cardiac fibrosis subsequent to chronic kidney disease. In the third experiment, we observed a discrete cardiac alteration after three months of renal insufficiency in rats made with an altered renal function induced at 12 weeks of life. In contrast, structural abnormalities of the heart are clearer when the renal insufficiency occurs at an earlier age (6 weeks of life), suggesting that cardiac alterations subsequent to a chronic kidney disease are more marked when the renal injury occurs in a young subject.

Finally, all of these studies contribute to the characterization of cardiac fibrosis and the functional impairment achieved during chronic renal failure.

Table des matières

INTRODUCTION 1

Maladies cardio-vasculaires et insuffisance rénale chronique 1

Contexte général 1

Maladies cardio-vasculaires et insuffisance rénale chronique 3

L'insuffisance rénale chronique 3

Maladie rénale chronique et altérations cardiaques 4

Le syndrome cardio-rénal de type 4 6

Prise en charge du syndrome cardio-rénal de type 4 8

Conséquences 8

Hypothèse 12

Objectif 13

État de l'art 15

Les marqueurs biologiques de fibrose cardiaque 15

La forme soluble de ST2 (sST2) 15

La galectine-3 17

Les marqueurs du turnover collagénique 18

Les marqueurs biologiques d'inflammation cardiaque 29

TGF-β 1 29

Le growth differentiation factor 15 (GDF-15) 34

D'où provient la fibrose cardiaque ? 36

Les myofibroblastes à l'origine de la fibrose cardiaque 36

Quelles sont les cellules à l'origine de la transdifférenciation des myofibroblastes ? 40

Régulation de la transdifférenciation des myofibroblastes cardiaques. 45

Conclusion 46

Présentation des travaux 47

Étude des marqueurs de fibrose sur le plan diagnostic et pronostic de la dysfonction diastolique dans l'insuffisance rénale chronique. 49

Contexte 49

Justification de l'étude 50

Article 50

Discussion 60

Conclusion 61

Place de la transition endothélio-mésenchymateuse dans la fibrose cardiaque au cours de l'IRC et de l'obésité. 63

Contexte 63

Justification de l'étude 63

Article 64

Discussion 91

Conclusion 92

Chronologie de l'installation de la fibrose cardiaque à partir d'un modèle animal ayant développé une insuffisance rénale chronique. 93

Contexte 93

Justification de l'étude 93

Matériel et méthodes 94

Résultats et discussion 98

Conclusion 121
SYNTHESE DES TRAVAUX, PERSPECTIVES 123
Rappels des principaux résultats 123
Limites du travail 125
Perspectives 126
Conclusion 129
Références 131
Annexe 1 159
Publications et communications affichées en lien avec ce travail de thèse 164

INTRODUCTION

Maladies cardio-vasculaires et insuffisance rénale chronique

Contexte général

Les maladies cardio-vasculaires sont les premières causes de mortalité dans le monde, et on estime à 17,7 millions le nombre de décès leur étant imputables, soit 31% de la mortalité mondiale totale (1). En France, pour l'année 2015, la CNAM estime à 4,5 millions le nombre de patients atteints d'une maladie cardio-vasculaire diagnostiquée et traitée, et plus de 90% d'entre eux sont concernés par une pathologie chronique. Le coût de ces prises en charge était évalué à 1,6 milliards d'euros en 2016. Il continue de s'accroître avec une incidence en augmentation dans les populations jusqu'à présent relativement épargnées (femmes et moins de 65 ans) et avec une estimation du nombre de patients atteints à 5,1 millions en 2020. Au-delà du coût important en termes de dépenses de santé publique, la gravité de la situation sanitaire liée aux maladies cardio-vasculaires appelle à la mise en œuvre d'actions convergentes, notamment concernant la prévention, afin d'améliorer les chances de survie et de ralentir l'évolution de ces pathologies (2).

Les maladies cardio-vasculaires représentent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Elles regroupent les cardiopathies coronariennes (infarctus), les maladies cérébro-vasculaires (accidents vasculaires cérébraux),

l'hypertension artérielle, les artériopathies périphériques, les thromboses veineuses profondes, les embolies pulmonaires, les cardiopathies rhumatismales, les malformations cardiaques congénitales et l'insuffisance cardiaque. Les principaux facteurs de risque sont une mauvaise alimentation, un manque d'activité physique, le tabagisme et l'usage nocif de l'alcool. Ces causes s'expriment à travers les facteurs de risque intermédiaires que sont l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, l'hyperglycémie, le surpoids et l'obésité. Les principaux facteurs de risque modifiables, associés aux facteurs de risque non modifiables tels que l'âge, l'hérédité, peuvent expliquer la survenue des maladies cardio-vasculaires. Il existe aussi un certain nombre de déterminants sous-jacents des maladies cardio-vasculaires, provenant des principales évolutions sociales, économiques et culturelle (3).

Les préventions primaire et secondaire de ce type de pathologies consistent en l'arrêt du tabac, une modification du comportement alimentaire (réduction des calories, des lipides totaux et des lipides saturés, de sel, augmentation de l'apport en fruits, légumes et céréales), la pratique régulière d'une activité physique (activité modérée d'au moins 30 minutes quotidienne), la diminution de la consommation d'alcool et une maîtrise du poids. Un recours aux thérapeutiques médicamenteuses peut être envisagé en cas d'hypertension artérielle, d'hypercholestérolémie ≥ 8 mmol/L, d'hyperglycémie ≥ 6 mmol/L à jeun malgré un contrôle de l'alimentation. Les thérapeutiques envisagées peuvent être la prise d'un médicament anti-hypertenseur, d'hypolipémiants, d'hypoglycémiants, ou d'anti-agrégants plaquettaires (4).

Maladies cardio-vasculaires et insuffisance rénale chronique

Les pathologies cardio-vasculaires représentent les principales causes de morbidité et de mortalité chez le patient atteint de maladie rénale chronique, et représentent un poids important en termes de dépenses de santé. Les données épidémiologiques disponibles sont peu nombreuses concernant les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC) au stade de la pré-dialyse. Il s'agit pourtant d'une population non seulement plus importante que celle des patients en dialyse, mais aussi qui s'accroît régulièrement. Selon le rapport américain sur la prévalence de l'IRC publié par le CDC en 2007, la maladie rénale chronique concernerait au moins 17% de la population américaine (5).

En France, on estime à environ 5,7 millions le nombre d'adultes souffrant de maladie rénale pouvant évoluer en insuffisance rénale terminale, voire au décès (6). En 2018, 89692 personnes étaient traitées pour une insuffisance rénale chronique terminale et 8682 personnes sont décédées (taux de mortalité de 10%). Les données collectées depuis 2012 par l'agence de la biomédecine (rapport REIN annuel) montrent une augmentation du nombre de patients concernés d'environ 2% chaque année. Les causes de décès sont principalement dues à des causes cardio-vasculaires (23%), devant les causes infectieuses (13%) et cancéreuses (11%) (7).

L'insuffisance rénale chronique

La maladie rénale chronique est définie par une diminution du débit de filtration glomérulaire inférieure à 60 ml/min/1.73m², ou par la présence d'une atteinte rénale

cliniquement significative (albuminurie > 30 mg/24h, présence de sédiments urinaires, anomalies électrolytiques dues à un désordre tubulaire, anomalies histologiques, anomalies de structures détectées par imagerie, transplantation rénale). Ces anomalies de structure ou de fonction étant présentes depuis plus de 3 mois (8).

L'insuffisance rénale chronique *per se* est considérée comme un facteur de risque cardio-vasculaire, au même titre que les facteurs de risque traditionnels identifiés dans la population générale (tels que l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, le tabagisme, le diabète) (9). Près d'un quart des patients hospitalisés pour une décompensation cardiaque présente une insuffisance rénale. En 2006, Smith *et al.* (10) ont rapporté sur une cohorte de plus de 80 000 patients porteurs d'insuffisance cardiaque et suivis en ambulatoire ou à l'hôpital des proportions de 60 % de patients ayant un débit de filtration glomérulaire (DFG) anormal inférieur à 90 ml/min et de 30 % de patients avec un DFG inférieur à 53 ml/min. La reconnaissance de l'insuffisance rénale est donc essentielle chez ces patients et des mesures de prévention devront être mises en place pour prévenir l'évolution ou l'apparition des maladies cardio-vasculaires.

Maladie rénale chronique et altérations cardiaques

Environ 50% des décès chez les patients présentant une insuffisance rénale chronique sont dus à un évènement cardiaque, tels que le syndrome coronarien aigu, l'insuffisance cardiaque à fonction ventriculaire gauche préservée ou altérée, les arythmies, et la mort subite (11). Les atteintes cardiaques ne sont pas seulement observées chez les patients insuffisants rénaux au stade de la prise en charge en

épuration extra-rénale, mais également associées à des degrés variables d'insuffisance cardiaque chez des patients présentant une insuffisance rénale débutante, comme souligné par l'étude ARIC (12). Dans le Kidney Early Evaluation program (étude KEEP), 100 000 sujets avec une atteinte rénale associée à des comorbidités incluant les insuffisances cardiaques ont été enrôlés. Les données de cette étude montrent une augmentation de 15% du risque cardio-vasculaire à chaque changement de stade d'insuffisance rénale chronique (13). Les liens sont étroits entre physiopathologies rénale et cardiaque, et impliquent des facteurs de risque cardio-vasculaires traditionnels, mais également des facteurs de risque non traditionnels liés à l'insuffisance rénale chronique identifiés par l'étude Framingham (14). Parmi ces facteurs spécifiques, on retrouve les facteurs directement liés à l'urémie tels que la surcharge hydrosodée, l'anémie et l'hyperparathyroïdie. La rétention hydrosodée contribue à l'hypertension artérielle, l'hypertrophie du ventricule gauche et l'augmentation de l'épaisseur de paroi artérielle, ces éléments concourants à l'augmentation du risque cardio-vasculaire. L'anémie est un facteur de risque d'insuffisance cardiaque et de mortalité cardio-vasculaire chez le patient dialysé. Les anomalies du métabolisme phospho-calcique jouent un rôle primordial dans l'apparition des calcifications vasculaires et cardiaques et sont également associées à une élévation du risque de mortalité cardiaque chez le patient dialysé (15). D'autres facteurs n'étant pas directement associés à l'urémie sont également liés à l'augmentation du risque cardio-vasculaire, les plus influents étant l'inflammation et le stress oxydant. L'hyperhomocystéinémie et l'élévation de la lipoprotéine (a) sont également proposés comme facteurs de risque contribuant à l'atteinte cardiaque

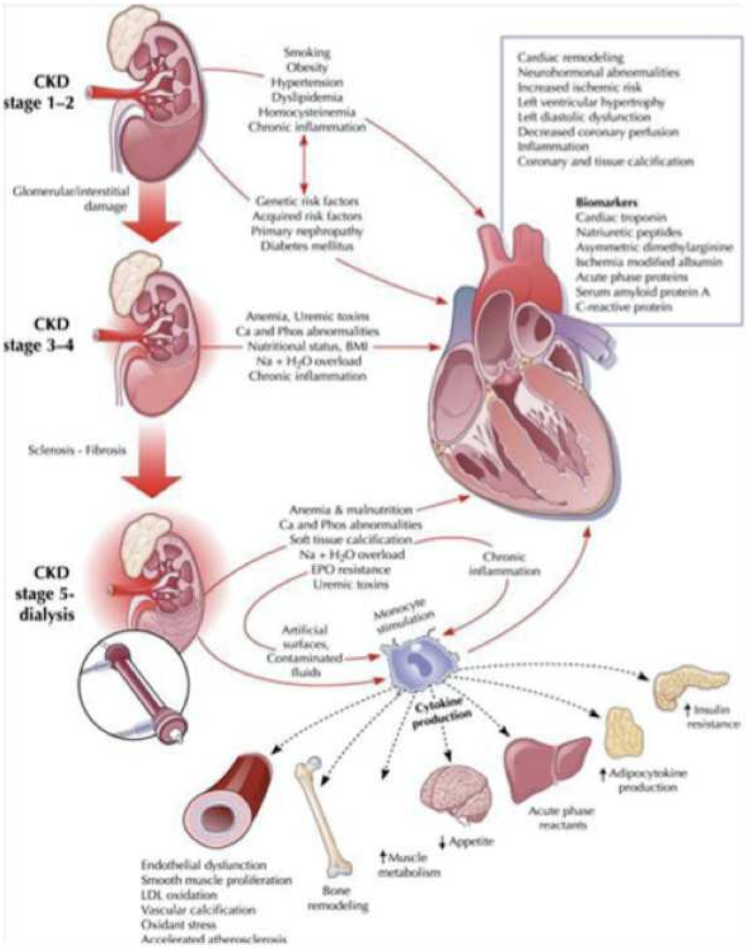
chronique dans la maladie rénale évolutive (atteinte réno-cardiaque chronique) (16–21).

Le syndrome cardio-rénal de type 4

La conférence de consensus Acute Dialysis Quality Initiative Group a proposé le terme de syndrome cardio-rénal pour définir un chevauchement entre dysfonctions rénale et cardiaque. La classification du syndrome cardio-rénal décrit essentiellement deux principaux groupes, cardio-rénal ou réno-cardiaque, sur la base du « primum movens » de la pathologie (cardiaque ou rénale). Ces groupes sont ensuite subdivisés selon une atteinte aiguë ou chronique (22). Les liens entre maladie rénale chronique et atteinte cardiaque sont étroits. L'insuffisance rénale chronique peut intervenir de manière indirecte en exacerbant l'ischémie cardiaque et directe par surcharge volémique et des pressions conduisant à une hypertrophie du ventricule gauche. L'hypertrophie du ventricule gauche représente l'élément majeur impliqué dans le syndrome cardio-rénal de type 4 (atteinte réno-cardiaque chronique). La prévalence de l'hypertrophie du ventricule gauche est estimée entre 16 à 31% chez les individus avec un DFG > 30 ml/min, qui augmente pour atteindre 60 à 75% avant dialyse, puis 90% après initiation de la dialyse (23). Les facteurs physiopathologiques impliqués dans l'hypertrophie du ventricule gauche de l'insuffisance rénale chronique sont représentés par une augmentation de la résistance artérielle systémique, une élévation de la pression artérielle, et une réduction de la compliance des vaisseaux larges signe d'une rigidification de la paroi vasculaire et de calcifications vasculaires, typiques chez le patient insuffisant rénal chronique (24–26). Ces facteurs contribuent

à une adaptation compensatrice, caractérisé par un épaississement myocardique et un remodelage concentrique du ventricule gauche avec activation du système rénine - angiotensine - aldostérone (SRAA) (24,26,27). L'hypertrophie myocardique induit l'activation de signaux cellulaires d'apoptose et active des voies métaboliques capables d'augmenter la production de la matrice extracellulaire, conduisant à la fibrose (25,26). La fibrose mène à un défaut de relaxation progressif avec élévation de la rigidité de la paroi du myocarde, une dysfonction majoritairement diastolique, et une insuffisance cardiaque congestive (28).

Figure 1 : mécanismes physiopathologiques du syndrome cardio-rénal de type 4 (29).



La dysfonction cardiaque diastolique est définie comme une incapacité du ventricule gauche à se relaxer, à se laisser distendre et à se remplir pendant la diastole. Cette anomalie cardiaque fonctionnelle apparaît dès les stades précoces de l'insuffisance rénale chronique, et émerge désormais comme un facteur indépendant prédictif de mortalité et de survenue d'évènements cardio-vasculaires chez le patient atteint de maladie rénale chronique. Le diagnostic clinique de la dysfonction diastolique repose en pratique sur des mesures effectuées par écho-doppler cardiaque.

Prise en charge du syndrome cardio-rénal de type 4

Actuellement, les données de la littérature ne permettent pas d'établir des recommandations claires sur la prise en charge des patients présentant un syndrome cardio-rénal de type 4. Des mesures cardioprotectrices peuvent être envisagées mais sont rarement prescrites. Le rapport de la conférence de consensus sur le syndrome cardio-rénal menée par l'équipe de Ronco *et al.* (30) préconise, au-delà des mesures préventives liées à la modification des facteurs de risque cardio-vasculaires, qu'une réduction de la progression de l'insuffisance rénale chronique peut limiter la survenue du syndrome cardio-rénal de type 4. L'essentiel des mesures thérapeutiques reposent sur la prévention de l'hypervolémie, l'autre point important étant la correction de l'anémie ainsi que la limitation des calcifications vasculaires (30).

Conséquences

Parmi les facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires tels que l'hypertension artérielle et le diabète, l'insulino-résistance et l'obésité sont également connus pour

être des déterminants majeurs du risque cardio-vasculaire dans l'insuffisance rénale chronique (31). L'insulino-résistance associée à une insuffisance rénale chronique contribue non seulement à la progression de l'atteinte rénale incluant la fibrose mais aussi à une hypertrophie cardiaque et une augmentation du risque d'apparition d'un évènement cardio-vasculaire dans cette situation (32). Par ailleurs, l'augmentation de la prévalence de l'obésité pourrait favoriser la survenue d'évènement cardio-vasculaire chez les patients présentant un syndrome cardio-rénal de type 4. En effet, l'obésité en exacerbant les atteintes cardiaques et en induisant une insulino-résistance semble pouvoir aggraver l'atteinte cardiaque chez les patients présentant une insuffisance rénale chronique (33).

Le syndrome cardio-rénal de type 4 résulte d'interactions complexes entre le cœur et le rein. Les critères diagnostiques sont limités et se concentrent sur un seul organe, de même que les mesures préventives et thérapeutiques. L'absence de marqueurs spécifiques semble renforcer l'hypothèse d'une approche multiplexée incluant plusieurs paramètres biologiques. Certains biomarqueurs d'atteinte fonctionnelle cardiaque peuvent être de possibles candidats à l'évaluation diagnostique et pronostique de l'atteinte réno-cardiaque chronique. Les peptides natriurétiques ont montré un intérêt pronostic chez les patients à différents stades de l'insuffisance rénale chronique. Toutefois, les liens entre peptides natriurétiques, insuffisance cardiaque et fonction rénale ne sont pas établis. Les marqueurs d'atteinte rénale lésionnelle, comme KIM-1, NGAL ou la cystatine C urinaire semblent indiqués dans l'atteinte rénale aiguë et certaines études menées sur modèle animal ou *in-vitro* rapportent une expression de NGAL dans les cardiomyocytes (30,34).

Les atteintes cardiaques fonctionnelle et structurelle développées en réponse à la maladie rénale chronique restent peu documentées. La fibrose et la dysfonction diastolique pourraient être observées à des stades précoces de l'atteinte rénale. Cette dernière décennie, les études se sont multipliées afin d'identifier des marqueurs d'intérêt impliqués dans la pathogénèse du remodelage et de la fibrose cardiaque. Ces marqueurs émergents pourraient être des candidats potentiels dans le diagnostic et/ou la stratification du risque de l'atteinte cardiaque lors de la maladie rénale chronique, et permettre d'adapter les thérapeutiques. Parmi ces candidats, le sST2 (récepteur soluble de l'interleukine 33), et la galectine-3 sont des marqueurs cardiaques précoces émergents connus pour leur intérêt prédictif de la fibrose et du remodelage cardiaque chez le patient à fonction rénale normale. D'autres marqueurs de fibrose, incluant notamment les marqueurs du turnover collagénique, ont désormais leur place pour la stratification des patients à risque ainsi que dans la réponse thérapeutique des patients présentant une insuffisance cardiaque, avec une recommandation de grade IIb (35–38).

Le remodelage et la synthèse excessive de la matrice extracellulaire sont essentiellement causés par des fibroblastes activés, appelés myofibroblastes (39). Ces fibroblastes spécialisés sont des cellules mésenchymateuses au phénotype hybride, entre fibroblaste et cellule musculaire lisse et présentent des caractéristiques phénotypiques particulières. D'autre part, ces cellules présentent des myofilaments périphériques de type α-SMA (smooth muscle actin) leur conférant des propriétés contractiles (40,41), des jonctions de type super-adhésion leur permettant de communiquer et de synchroniser leur contraction, et de former des liaisons avec la matrice extracellulaire (MEC) de type « fibronexus ». Ces caractéristiques aboutissent

à la création d'un micro-organe contractile, qui en se contractant permet d'initier la phase de remodelage tissulaire (42).

A ce niveau, plusieurs questions peuvent être posées :

Pourrions-nous disposer d'un panel de marqueurs biologiques permettant d'identifier de manière précoce les patients insuffisants rénaux chroniques présentant une dysfonction diastolique ?

Certains marqueurs biologiques permettraient-ils de prédire la survenue d'évènements cardiaques majeurs ou de décès dans la population d'insuffisants rénaux chroniques ?

Est-ce que les modifications cardiaques consécutives à une insuffisance rénale chronique sont majorées chez un sujet présentant une autre pathologie chronique préexistante ?

Quels processus sont mis en jeu dans la fibrose cardiaque observée chez l'insuffisant rénal chronique ?

La chronologie d'installation de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée peut-elle s'établir chez l'insuffisant rénal chronique ?

In fine, l'objectif de ce travail est une meilleure compréhension des altérations cardiaques observées dans les pathologies chroniques tels que l'IRC. La détermination des mécanismes impliqués dans le développement, le maintien ou l'exacerbation de la fibrose tissulaire permettra d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles pour enrayer ou faire régresser ce phénomène délétère. Des agents

ciblant particulièrement les processus à l'origine de la fibrose cardiaque pourraient être d'un grand intérêt dans cette pathologie. A plus long terme, l'administration d'inhibiteurs des voies de la transition mésenchymateuse (inhibiteur de Gal3, microARN inhibant TGF-β, TGFBR) ou d'agents permettant la dégradation du collagène (inhibiteurs de TIMP-1) pourra être réalisée. Des manœuvres non-pharmacologiques comme la réhabilitation musculaire sont une alternative à proposer en expérimental et en clinique. Actuellement nous savons qu'une réhabilitation musculaire personnalisée permet une amélioration des paramètres musculaires des patients obèses. En supposant qu'il existe effectivement une aggravation de l'atteinte cardiaque par l'insuffisance rénale chronique chez les sujets présentant un profil métabolique altéré, une réhabilitation musculaire pourrait permettre également une amélioration de la dysfonction cardiaque chez ces patients.

Hypothèse

Notre hypothèse de travail est qu'au stade de l'insuffisance rénale chronique n'ayant pas recours à la dialyse, il est possible d'observer des modifications cardiaques précoces permettant d'identifier une dysfonction diastolique. Les marqueurs sanguins ou tissulaires mis en évidence pourraient permettre d'adopter des mesures préventives ou curatives chez ces patients à haut risque d'évènements cardiaques majeurs.

Objectif

Nous aurons donc un objectif principal : Identifier et évaluer l'intérêt des marqueurs d'altération cardiaque chez l'insuffisant rénal chronique au stade de la pré-dialyse.

Nos travaux, menés chez l'homme ou chez l'animal, viennent illustrer plusieurs éléments liés à notre objectif :

- Évaluer si l'atteinte cardiaque est déjà présente et associée à des anomalies structurelle ou fonctionnelle cardiaques chez les sujets asymptomatiques présentant une insuffisance rénale chronique au stade de la pré-dialyse.
- Identifier des marqueurs biologiques de fibrose et d'inflammation cardiaque pouvant apporter une information complémentaire dans l'identification de patients atteints d'insuffisance rénale chronique et à haut risque d'évènements cardiaques majeurs ou de décès.
- Évaluer si les modifications tissulaires et cellulaires du muscle cardiaque consécutives au développement d'une pathologie chronique sont majorées chez les rats présentant une insuffisance rénale chronique subséquente. Plus particulièrement, les processus d'inflammation et de transitions endothélio-mésenchymateuses conduisant à la formation de la fibrose cardiaque seront étudiés.
- Établir la chronologie de l'installation des altérations cardiaques au cours de l'insuffisance rénale chronique chez le rat.

Avant de présenter les travaux constituant cette thèse, nous allons faire un rappel de l'état des connaissances sur les marqueurs biologiques actuellement utilisés pour

évaluer la dysfonction ventriculaire gauche, ainsi que sur les myofibroblastes à l'origine de la fibrose cardiaque.

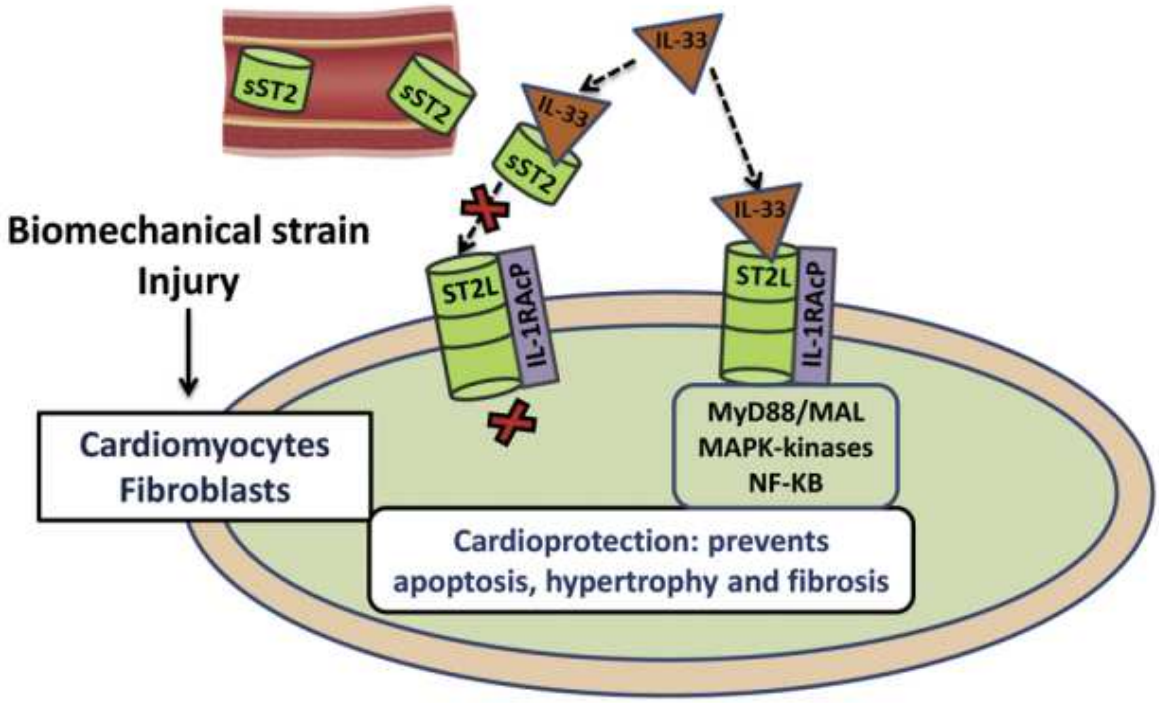
État de l'art

Les marqueurs biologiques de fibrose cardiaque

La forme soluble de ST2 (sST2)

ST2 appartient à la famille des récepteurs de l'interleukine de type-1 (IL-1), et existe sous forme de ligand membranaire ou soluble. Par sa liaison à l'interleukine-33 (IL-33), ST2 ligand (ST2L) est à l'origine d'effets anti-hypertrophique, anti-fibrotique et anti-apoptotique. Alors que ST2L est principalement exprimée au niveau des cellules hématopoïétiques, sST2 est largement inductible et son expression semble initialement limitée à la matrice extracellulaire des tissus tégumentaires (incluant les fibroblastes), rétiniens, mammaires et ostéogéniques dans les modèles animaux. Ces résultats suggèrent que sST2 pourrait jouer un rôle dans le remodelage ventriculaire. Les preuves que sST2 est un biomarqueur cardiaque suggèrent que le système IL-33/ST2 pourrait être un médiateur physiopathologique potentiel de cette fibrose. La forme ST2 soluble (sST2) joue le rôle de récepteur leurre, séquestrant IL-33 et inhibant sa fixation à ST2L, ce qui neutralise les effets bénéfiques de la voie de signalisation ST2L/IL-33 (43).

Figure 2 : voie de signalisation ST2/IL-33 (44).



Des études expérimentales montrent que l'administration de protéine sST2 purifiée provoque des effets antagonistes sur la voie de signalisation IL-33/ST2L, à l'origine d'un phénotype cardiaque délétère marqué par une hypertrophie myocardique, une dilatation du ventricule gauche et une diminution de la contractilité du myocarde. Les taux de ST2 circulants sont plus élevés lors d'états inflammatoires, infectieux, de cancers ou d'atteinte cardiaque (45–50). Quelques études ont étudié sST2 dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (IC-FEP) (51–53), les seules études ayant utilisé le kit sST2 Presage® approuvé par la Food and Drug Administration et ayant obtenu le marquage CE étant les études PARAMOUNT et RELAX décrivant des taux de sST2 élevés (respectivement 33 ng/ml et 34 ng/ml) dans l'IC-FEP (54,55). Les concentrations plasmatiques de sST2 sont prédictives de la

mortalité sur le suivi à long-terme lors d'épisodes d'insuffisance cardiaque aiguë (51,56–60). De plus, des concentrations élevées de sST2 associées au NT-proBNP ainsi qu'aux facteurs de risque identifiés améliorent les performances du pronostic, et ce indépendamment de la fraction d'éjection et de la fonction rénale dans l'insuffisance cardiaque (61). Dans ce contexte, le dosage de sST2 permet d'identifier des patients avec un remodelage du ventricule gauche et un profil hémodynamique décompensé (60).

La galectine-3

La galectine-3 (Gal-3) est un galactoside qui se lie aux protéines de la matrice extracellulaire, comme la laminine, la synexine, et les intégrines. Une récente étude montre que des taux élevés de Gal-3 sont observés dans un modèle de rat hypertensif. Cette même étude montre une surexpression de galectine-3 dans les biopsies myocardiques de patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique, tout comme des concentrations de galectine-3 élevées sont associées à un risque cardio-vasculaire important (62). La valeur pronostique de la Gal-3 a été testée chez des patients hospitalisés pour dyspnée aiguë. Dans cette étude, la concentration de Gal-3 est plus élevée dans le plasma de patients avec insuffisance cardiaque aiguë et est un meilleur facteur prédictif du risque de mortalité (60 jours) que le NT-proBNP. Les analyses multivariées confirment que la valeur pronostique de la Gal-3 est supérieure au NT-proBNP (63). Dans une seconde étude menée chez des patients présentant une décompensation cardiaque, les taux élevés de Gal-3 sont un meilleur marqueur prédictif de la mortalité (4 ans) que les données observées à l'écho-doppler cardiaque

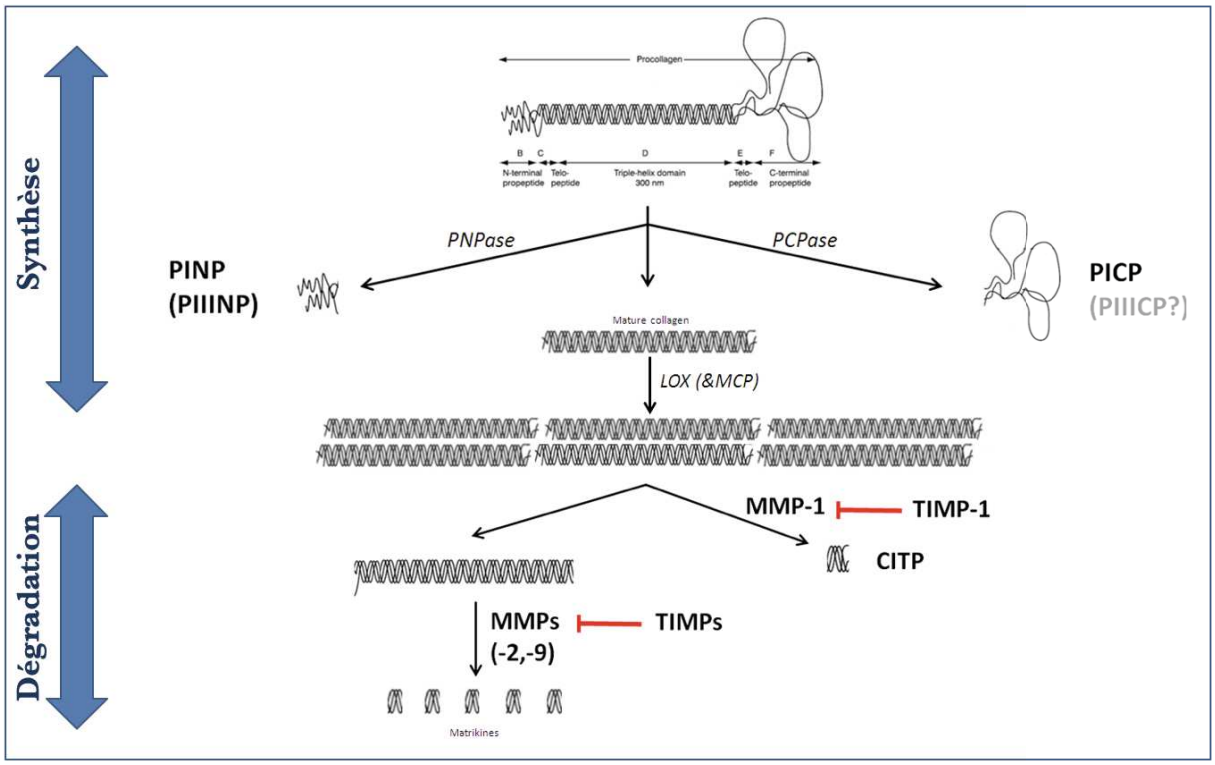
(64). En revanche, les concentrations de Gal-3 ne semblent pas varier en fonction du traitement, contrairement à d'autres marqueurs, comme les peptides natriurétiques (65). La concentration de Gal-3 est inversement corrélée à la fonction rénale et associée à la mortalité cardio-vasculaire chez les patients présentant une insuffisance rénale chronique (66). L'élimination rénale de la Gal-3 rend son dosage difficilement exploitable pour évaluer le degré de fibrose cardiaque chez l'insuffisant rénal chronique.

Les marqueurs du turnover collagénique

Les myocytes et fibroblastes cardiaques sont maintenus par la matrice extra cellulaire. Cette dernière correspond à un réseau de fibres protéiques, principalement d'origine collagénique. Chez l'adulte sain, le collagène représente environ 2 à 4% du myocarde (67). Ce réseau est actif, et son turnover s'évalue entre 80 et 120 jours (68). Dans le myocarde, on retrouve principalement les fibres de type 1 et 3, non spécifiques de l'organe. Les fibres de type 1 représentent environ 85% du collagène cardiaque, et confèrent un rôle de résistance et de rigidité à l'organe. Les fibres de type 3 (15%), sont légèrement plus spécifiques et possèdent des propriétés élastiques dans le myocarde (67). Les précurseurs des fibres de collagène sont synthétisés par les fibroblastes sous forme de molécules de procollagène de type I et III. Ces précurseurs sont ensuite clivés par deux enzymes, la procollagène N-terminal protéinase et la procollagène C-terminal protéinase (PNPase et PCPase), en quantité équimolaire, avec formation du collagène mature, qui sera par la suite réticulé par une lysine oxydase (LOX) pour former les fibres de collagène. Les produits issus du clivage du

procollagène de type I, c'est à dire le propeptide N-terminal du procollagène de type I (PINP) et le propeptide C-terminal du procollagène de type I (PICP) circulent dans le sang et permettent l'estimation de la synthèse des fibres de collagène. Il en est de même pour la synthèse de collagène de type III, avec libération sanguine de propeptide N-terminal du procollagène de type III (PIIINP) et de propeptide C-terminal de procollagène de type III (PIIICP), mais il est à souligner qu'à ce jour, il n'y a aucune preuve directe d'un PIIICP circulant. Ces produits de clivage seront par la suite éliminés par la voie hépatique. Concernant la dégradation des fibres de collagènes, celles-ci seront clivées par des métalloprotéinases. MMP-1 est la première métalloprotéinase intervenant dans ce processus de dégradation, en étant responsable du clivage de la partie C-terminale du collagène dont le fragment télopeptide C-terminal de type I (CITP) est libéré en quantité équimolaire dans la circulation. Puis, les fragments restants de collagènes seront dégradés en matrikines par différentes MMPs, majoritairement MMP-2 et MMP-9. L'activité des MMPs est inhibée par les « tissue inhibitors of metalloproteinases » (TIMPs). Il existe donc un équilibre entre les MMPs et les TIMPs permettant ainsi de conserver l'architecture de la matrice extracellulaire (Figure 3).

Figure 3 : Synthèse, dégradation et régulation du collagène (adapté de Heyman S *et al. (69)*).



A notre connaissance, seuls les marqueurs PICP et PIIINP, témoins directs et respectifs de la synthèse de collagène de type I et de type III, sont directement corrélés à la fibrose cardiaque, quantifiée par la fraction du volume collagénique (CVF) (70–73).

Chez les sujets hypertendus avec insuffisance cardiaque, la quantité de PICP est corrélée au C_1VF (71). Lors de l'administration d'un diurétique de l'anse chez ces patients, la quantité de PICP diminue parallèlement au C_1VF (74). Des taux élevés de PICP sont observés chez les patients hypertendus ou atteints d'insuffisance cardiaque d'origine hypertensive (71,72), et également chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (75). De plus, on observe des taux supérieurs

de PICP dans le sang issu du sinus coronaire comparé au sang périphérique de patients atteints d'IC d'origine hypertensive, confirmant l'origine cardiaque de la fibrose (71). Concernant le pronostic, des taux élevés de PICP sont prédictifs de la survenue d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée dans l'hypertension (76). Concernant le PINP, il n'existe aucune étude de corrélation directe de ce marqueur au CVF. On n'observe pas d'élévation de PINP chez les sujets présentant une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée ou une hypertrophie myocardique (75,77–79), et des taux élevés de PINP ne sont pas associés à une augmentation de la mortalité (80). Ces résultats discordants sont dus au fait que le dosage de PINP peut être mis en défaut par un retard de clivage de la partie N-terminale comparé à PICP, ou par un défaut de clivage conduisant à une sous-estimation de la quantité de collagène de type I. De plus, des réactions croisées peuvent s'observer suite à la dégradation des formes non clivées en monomères. Ce n'est donc pas un marqueur de choix pour évaluer la synthèse de collagène de type I.

Chez les sujets insuffisants cardiaques avec cardiomyopathie dilatée idiopathique, la concentration de PIIINP est directement corrélée au C_3VF ($r=0,78$; $p=0,001$) (73). A l'inverse, l'administration d'un diurétique chez ces patients s'accompagne d'une diminution de PIIINP parallèlement au CVF (81). Des taux élevés de PIIINP sont observés chez des patients atteints d'hypertrophie myocardique (78) et d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (75,77,82). Concernant le pronostic, des taux élevés de PIIINP (> 7 µg/L) sont associés à une mortalité plus importante des patients atteints d'IC (73,80). En revanche, l'étude I-preserved ne montre pas de mortalité plus importante associée à des taux élevés de PIIINP chez l'insuffisant cardiaque à fraction d'éjection préservée (80).

CITP est le produit direct issu de la dégradation du collagène de type 1 et semble être corrélé au C1VF dans la cardiomyopathie dilatée idiopathique ou d'origine ischémique (r=0,60 ; p=0,05) (73). Des taux élevés de CITP ont été décrits dans l'hypertrophie cardiaque et l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (75,77,78,82). Concernant le suivi de patients atteints de cardiomyopathie dilatée idiopathique ou d'origine ischémique, des taux supérieurs à 7,6 µg/L sont associés à une mortalité plus élevée (73). Une réduction de la fibrose par spironolactone chez les patients présentant une fibrose sévère est accompagnée d'une élévation de CITP (81) et est corrélée à l'hypertrophie du ventricule gauche et à l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (75,82). Des index du turnover collagénique incluant un produit issu du clivage de la synthèse de collagène et un produit issu de sa dégradation comme témoins du remaniement de la matrice extracellulaire au cours de la fibrose ont été étudiés. Le ratio PICP:CITP est corrélé au CVF (81), et est observé dans l'hypertrophie cardiaque (83). Ce ratio diminue parallèlement au CVF après l'administration d'antagonistes de récepteur de l'angiotensine II (84). Plus récemment, plusieurs équipes se sont intéressées aux enzymes de dégradation du collagène. MMP-1 est la métalloprotéinase pour laquelle le plus d'études sont référencées, du fait de son initiation de la dégradation des fibres de collagène. En revanche, les taux de MMP-1 ne sont pas corrélés au CVF (67). On observe des taux de MMP-1 plus élevés dans l'IC d'origine hypertensive et en particulier dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite, avec des taux supérieurs dans les prélèvements issus du sinus coronaire comparé aux prélèvements veineux témoignant de l'origine cardiaque de la fibrose (85). Ces résultats restent controversés, car les taux de MMP-1 ne sont pas plus élevés dans l'hypertrophie myocardique et l'insuffisance cardiaque à fraction

d'éjection préservée dans d'autres études (76–78,83). Des taux diminués sont observés chez les patients avec hypertrophie myocardique (86). Dans ces différentes études, nous pouvons constater que la méthode de dosage diffère. L'utilisation d'un test ELISA mesurant la fraction totale ou libre pourrait expliquer en partie ces résultats discordants. Concernant les autres enzymes intervenant dans la dégradation du collagène, des taux élevés de MMP-2 et de MMP-9 sont observés dans l'hypertrophie myocardique (78) et dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (76,77,82).

Concernant l'étude des inhibiteurs de métalloprotéinases, TIMP-1 ne semble pas corrélé au CVF (87). Des taux élevés sont observés dans l'hypertrophie myocardique, l'hypertension avec dysfonction diastolique, l'insuffisance cardiaque avec origine hypertensive et l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (77,78,86,88). En revanche, on n'observe pas de taux de TIMP-1 plus élevés dans une population de patients avec hypertrophie cardiaque ou présentant une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (76,82,83). A ce jour, nous ne pouvons pas dégager de consensus quant à l'intérêt de ce marqueur dans l'évaluation de la fibrose. Concernant TIMP-2 et TIMP-4, des taux élevés sont observés dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (77). TIMP-2 pourrait être impliqué dans le processus d'hypertrophie cardiaque impactant la relaxation, et TIMP-3 pourrait être impliqué plus directement dans la fibrose qui impacte la compliance cardiaque (89).

D'autres index de dégradation ont été développés, avec l'étude d'une enzyme de dégradation du collagène et son inhibiteur. On observe un ratio MMP-1:TIMP-1 plus élevé dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite, et non pas dans

l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. L'élévation du ratio est directement corrélé à la fraction d'éjection ($r = 0,51$, $p < 0,001$) et donc dans la dysfonction systolique (67).

A ce jour, une étude montre que le ratio CITP:MMP-1 est le reflet du niveau de réticulation du collagène de type I de patients présentant une insuffisance cardiaque d'origine hypertensive, et prédit leur risque d'hospitalisation (90). Les marqueurs biologiques collagéniques associés aux atteintes cardiaques répertoriées sont référencés dans les tableaux suivants.

Tableau 1 : synthèse des marqueurs associés au diagnostic d'altération cardiaques.

Peptides collagéniques	**Conditions étudiées**	**Effet**	Références
PICP	IC-FEP	↑	(75)
	IC d'origine hypertensive	↑	(71)
	CMH	↑	(71) (86) (83)
PIIINP	ICFEP	↑	(75) (77) (82)
	CMH	↑	(78)
CITP	ICFEP	↑	(75) (77) (78)
	CMH	↑	(78)
PICP/CITP	CMH	↑	(83)
MMP-1	IC hypertensive (IC-FER > IC-FEP)	↑	(87)
	IC-FEP	NS	(75) (77)
TIMP-1	IC-FEP	↑	(77) (88)
	HTA avec dysfonction diastolique	↑	(91)
	IC d'origine hypertensive IC-FER < IC-FEP	↑	(87)
	CMH	↑	(86) (88)
	IC-FEP	NS	(75) (82)
	CMH	NS	(83)

HCM : cardiomyopathie hypertrophique, HTA : hypertension artérielle, IC : insuffisance cardiaque, IC-FEP : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée, NS : non significatif.

Tableau 2 : Caractéristiques des études référencées citées dans le tableau 1.

(réf)	**Référence**	**End point**	**N, patients**	**N, contrôles**
(75)	Martos R, Circ, 2007	Taux biomarqueurs Dysfonction diastolique	32	54
(71)	Querejeta R, Circ, 2004	Taux biomarqueurs Dysfonction diastolique	31	34 CMH 12 sains
(91)	Lindsay MM, Hypert, 2002	Taux biomarqueurs Dysfonction diastolique	60	40 HTA 50 sains
(86)	Fassbach M, Z Kard, 2005	Taux biomarqueurs Dysfonction diastolique	26	38
(83)	Ho CY, N Engl J, 2010	Taux biomarqueurs IRM	38	30
(77)	Zile MR, Circ, 2011	Taux biomarqueurs	61	144 CMH 241 sains
(82)	Collier P, Eur J Heart Fail,2011	Taux biomarqueurs	181	94 HTA
(78)	Lombardi R, Circ, 2003	Taux biomarqueurs Dysfonction diastolique	36	14
(87)	Lopez B, JACC, 2006	Taux biomarqueurs Histologie Dysfonction diastolique	23	16 IC-FER 20 sains
(88)	Ahmed S, Circ, 2006	Taux biomarqueurs Dysfonction diastolique	23 CMH 26 IC-FEP	39 sains 14 HTA

CMH : cardiomyopathie hypertrophique, HTA : hypertension artérielle, IC-FEP : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

Tableau 3 : synthèse des marqueurs biologiques répertoriés associés aux évènements dans l'insuffisance cardiaque.

Peptides collagéniques	**Pathologies**	**Évènements associés**	**Nombre de sujets**	Références
PINP (NS) PIIINP (↑)	IC-FEP	Décès cardio-vasculaire et aggravation de l'IC	334	(80)
PINP (NS) PIIINP (NS)	IC-FEP	Taux plasmatiques après 6 mois Ibesartan (vs. placebo)	334	(80)
CITP/MMP-1 (🡻)	IC d'origine hypertensive	Hospitalisation	203	(90)

IC : insuffisance cardiaque, IC-FEP : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

En résumé, PICP et PIIINP sont les biomarqueurs pour lesquels la preuve directe de fibrose est établie. Les données issues la littérature suggèrent qu'il existe une désorganisation de l'architecture de la matrice collagénique dans l'insuffisance cardiaque du fait de niveaux de réticulations du collagène élevé, s'accompagnant d'un excès de synthèse principalement de collagène de type I, et dans une moindre mesure du collagène de type III, au détriment de leur dégradation.

Ces observations semblent être confirmées par l'élévation de la plupart des enzymes de dégradation du collagène, les MMPs, chez les patients présentant une hypertrophie du ventricule gauche et une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (75,77,82,88).

Les marqueurs biologiques d'inflammation cardiaque

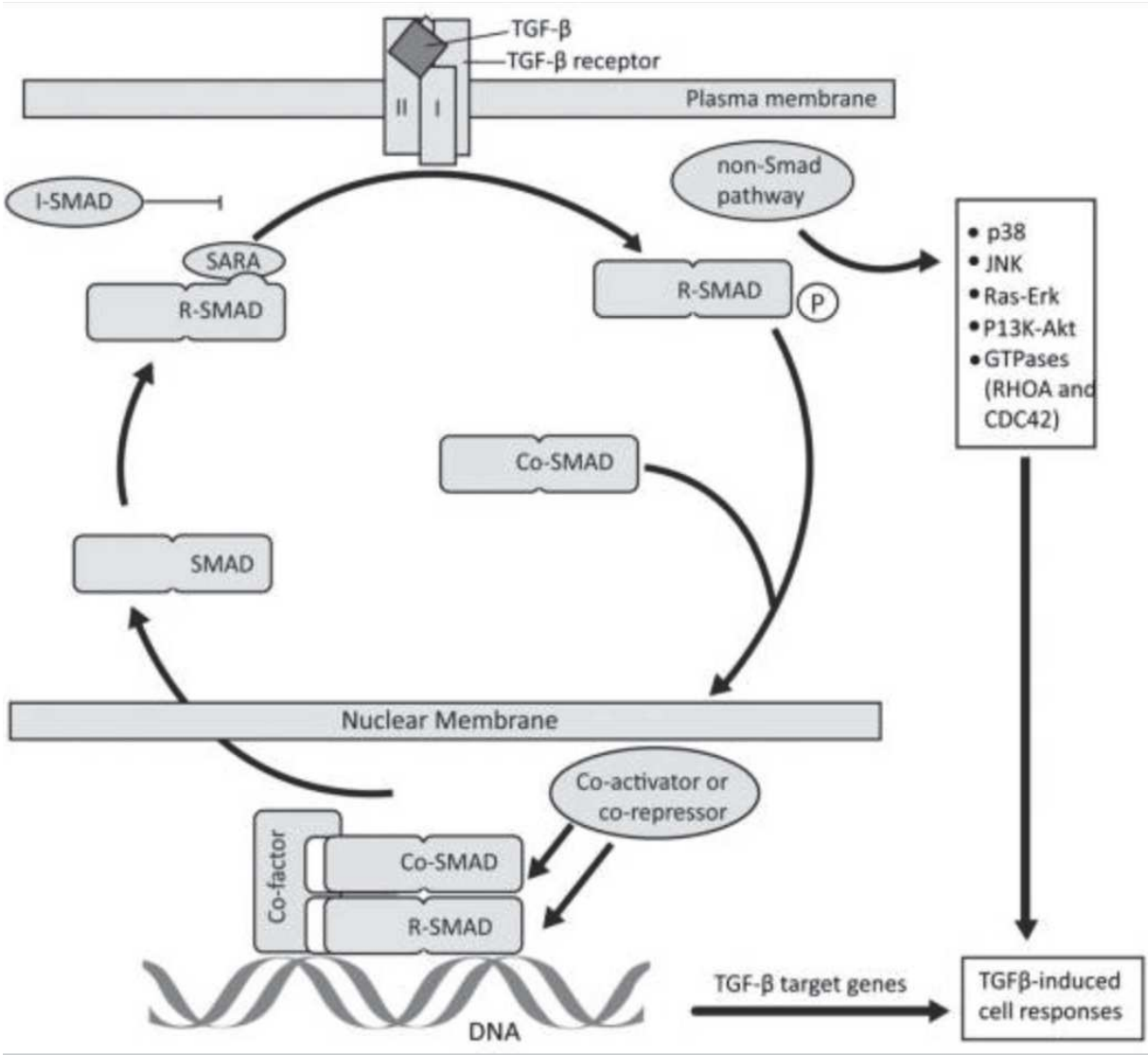
TGF-β 1

La famille cytokinique des TGF-β est ubiquitaire, multifonctionnelle et nécessaire à la survie. Elle joue un rôle important dans le développement, l'inflammation et l'immunité (92). TGF-β1 est l'isoforme majoritairement rencontré dans le tissu cardiaque (93) et localisé au sein des cardiomyocytes ou lié à la matrice extracellulaire (94). Parallèlement à une expression médiée par les cardiomyocytes, son expression par les myofibroblastes, les cellules musculaires lisses d'origine vasculaire, les cellules endothéliales et les macrophages sont également mises en évidence (95). TGF-β1 est présente de manière latente et incapable de se lier à son récepteur chez un individu sain. En réponse à une agression cardiaque, les concentrations extracellulaires de TGF-β1 sont régulées par sa conversion de la phase latente à la phase active. L'activation de TGF-β1 en faible quantité est suffisante pour induire un maximum de réponse cellulaire (96). De nombreux médiateurs sont décrits comme des activateurs de TGF-β et interviennent à différents stades du processus d'activation. Les protéases comme MMP-2 et MMP-9 sont capables d'activer TGF-β1, ces MMPs intervenant dans la dégradation de la matrice collagénique tout en activant des molécules préservant l'intégrité et la stabilité de la matrice (96–98).

TGF-β1 se lie au récepteur de type 2 (TβRII) présent à la surface de différents types cellulaires. Le complexe formé transphosphoryle le récepteur de type I (TβRI) aussi connu sous le nom d'ALK5 (99). L'activation de TβRI génère les cascades de signalisation dépendante (voie canonique) et indépendante (voie non canonique) de Smad2/3 (100). Les cellules endothéliales expriment un autre type de TβRI nommé

ALK1 dont l'activation génère les voies de signalisation intracellulaires dépendantes des Smad1, 5 et 8 ainsi que les récepteurs des bone morphogenic proteins (BMPs) (101). Ces différents récepteurs se complexent au Smad 4 et sont responsables de divers effets d'activation ou de répression de transcription dépendant de paramètres coactivateurs ou corépresseurs du complexe transcriptionnel (102). Smad6 et 7 possèdent une activité inhibitrice en interférant avec l'activation des Smad-R (Smad 1, 2, 3, 5) et sont dépendantes d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif par ces derniers. TGF-β1 est également à l'origine d'autres voies indépendantes des Smads. Ces signaux incluent JNK, ErkMAPK, p38MAPK et les GTPases (103).

Figure 4 : Voie de signalisation TGF-β Smad et non Smad (104).

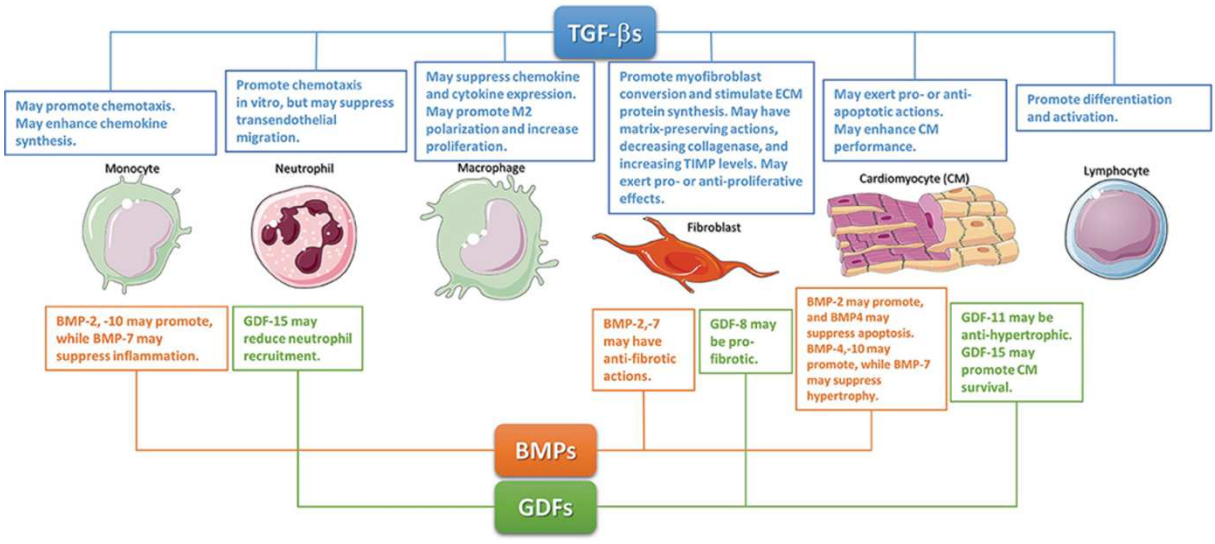


La nature pléiotropique des TGF-β leur confère un rôle d'homéostasie mais également de régulation cellulaire lors de processus lésionnels, de réparation et de remodelage. Les effets de TGF-β peuvent stimuler ou inhiber les leucocytes et dépendent du milieu cytokinique et de leur état de différenciation (105). L'action de TGF-β sur les fibroblastes cardiaques est également observée au cours de la phase réparatrice consécutive à l'infarctus du myocarde (106). Son action favorise l'activation des fibroblastes cardiaques et stimule l'expansion de la matrice extracellulaire (107). De

plus, TGF-β préserve l'intégrité de la matrice extracellulaire par la suppression de l'activité des MMPs et par l'augmentation de synthèse des TIMPs et du plasminogène activator inhibitor 1 (108).

De faibles concentrations (de l'ordre des picomoles) suffisent à attirer les monocytes et à les activer, à stimuler la synthèse de cytokines, chémokines et facteurs de croissance (109). Contrairement aux effets activateurs de TGF-β sur les monocytes sanguins, nous observons des effets inhibiteurs sur les macrophages tissulaires en réduisant de manière significative la synthèse de cytokines et chémokines (110).

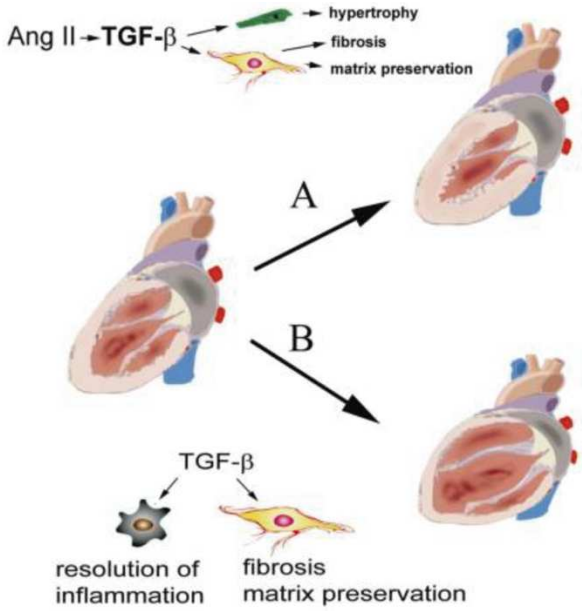
Figure 5 : Actions cellulaires des TGF-β observées au cours de l'infarctus du myocarde (111).



Les études menées sur modèles animaux montrent une activation précoce de TGF-β1 et TGF-β2 alors que TGF-β3 montre une induction retardée et prolongée (112). Dans un modèle animal de surcharge de pression, les niveaux de TGF-β1 augmentent avec

l'hypertrophie cardiaque (113). L'angiotensine II joue un rôle dans l'hyper régulation de TGF-β dans l'infarctus du myocarde et le remodelage cardiaque (114). Les niveaux de phosphorylation Smad 2/3 élevés dans les modèles de surcharge de pression myocardique suggèrent que l'élévation de TGF-β dans le remodelage cardiaque sont associés à l'activation de la voie de signalisation TGF-β (115,116). Les effets fonctionnels de la voie de signalisation TGF-β sur modèle de surcharge de pression myocardique sont dépendants de la concentration de TGF-β activé. Des taux élevés de TGF-β sont délétères, en exacerbant les dépôts de collagène, en augmentant la rigidité myocardique et la dysfonction diastolique. Toutefois, des niveaux basals de TGF-β sont nécessaires afin de maintenir la structure cardiaque et pour protéger la dégradation incontrôlée de la matrice extracellulaire lors de surcharge de pression conduisant à l'hypertrophie cardiaque (117).

Figure 6 : Rôle de TGF-β dans l'hypertrophie, la fibrose et le remodelage post-infarctus du myocarde (117).



A : TGF-β transduit des signaux hypertrophiques et de transdifférenciation de myofibroblastes.

B : Dans le cœur infarci, TGF-β joue le rôle de switch entre inflammation et phase réparatrice.

Le growth differentiation factor 15 (GDF-15)

GDF-15 est une protéine appartenant à la famille des cytokines TGF-β. Chez un sujet sain, l'expression de GDF-15 est faible et des concentrations élevées sont observées lors de processus lésionnels, inflammatoires, ou des états de stress oxydants touchant divers organes tels que le cœur, le foie, les poumons et le rein (118–120). Sa production est issue de diverses origines, notamment des cardiomyocytes ainsi que

des macrophages, des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire, des adipocytes et des cellules endothéliales (121–125). Une majorité de GDF-15 est donc produite par des tissus d'origine non cardiaque, bien que l'origine de sa production ne soit pas complètement élucidée chez les patients présentant une insuffisance cardiaque (126). Des taux élevés de GDF-15 sont associé à l'hypertrophie du ventricule gauche chez les patients hypertendus. De plus, les concentrations de GDF-15 sont positivement corrélées à l'IL-6 et MMP-9, suggérant un lien entre expression de GDF-15, inflammation et fibrose (127). Les taux élevés de GDF-15 sont également associés à une mortalité et à des évènements cardio-vasculaires élevés (128) et des études montrent une élévation de GDF-15 concomitante à la sévérité de l'insuffisance cardiaque et des comorbidités associées (129–131). A notre connaissance, la seule étude s'intéressant au rôle de GDF-15 chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque et d'insuffisance rénale chronique est l'étude menée par Benes J. *et al.* (132). Dans cette étude, GDF-15 n'est pas corrélé à certains paramètres d'évaluation cardiaque, notamment au diamètre du ventricule gauche ou à sa fraction d'éjection, mais il est fortement corrélé au eDFG, à la différence du BNP. La corrélation de GDF-15 à la régurgitation de la valve tricuspide, à la dysfonction du ventricule droit, et au diamètre de la veine cave inférieure semble plus lié à une atteinte congestive due à l'insuffisance rénale chronique. En analyse multivariée, l'association de GDF-15 à des évènements défavorables est supérieure chez les patients présentant une insuffisance cardiaque accompagnée d'une insuffisance rénale chronique (132). En conclusion, GDF-15 est fortement associé à des évènements défavorables chez les patients présentant une insuffisance cardiaque, et son taux élevé permet un reclassement des

patients à risque présentant une insuffisance cardiaque ainsi qu'une insuffisance rénale chronique, et de faibles taux de BNP.

L'état de l'art mené en première partie nous montre qu'un très grand nombre de composés pro-fibrotiques et pro-inflammatoires conduisant à l'expansion de la matrice extra-collagénique sont décrits dans la littérature. Mais quels sont les effecteurs de la fibrose cardiaque ?

D'où provient la fibrose cardiaque ?

Les myofibroblastes à l'origine de la fibrose cardiaque

Le fonctionnement cardiaque d'un adulte sain se caractérise par un équilibre entre les cardiomyocytes et les composants de la matrice extracellulaire. Les fibroblastes cardiaques, intriqués dans l'endomysium et le périmysium, ont un rôle de support des structures et joueraient un rôle important dans la régulation et la synthèse et du turnover des composants de la matrice extracellulaire afin de préserver l'intégrité structurale ventriculaire (133–135). La fibrose correspond à un dépôt de composants de la matrice extracellulaire, collagène et fibronectine. Les fibroblastes, après transformation en myofibroblastes, sont les principaux effecteurs de la fibrose myocardique qui survient en réponse à des altérations cardiaque de diverses origines (ischémiques, diabétiques, génétiques, liées à l'âge avancé). La particularité du myofibroblaste réside dans sa capacité à synthétiser et remodeler les composants de la matrice extracellulaire, ces cellules apparaissant en abondance après une lésion cardiaque (41,136). Le maintien de la matrice extracellulaire dans la zone infarcie est

essentiel afin de limiter la dilatation de la zone d'infarctus conduisant à une insuffisance cardiaque, mais le dépôt de matrice extracellulaire sur des sites éloignés de la zone d'infarctus peut entraîner une raideur cardiaque ainsi qu'un processus inévitable de remodelage myocardique constituant la base du développement de l'insuffisance cardiaque (137).

La première étude relatant l'existence de myofibroblastes fait état de fibroblastes présentant des modifications ultrastructurelles particulières se rapprochant de cellules musculaires lisses, au sein d'un tissu lésé. Ces modifications se caractérisent par la présence d'un système fibrillaire développé dans le cytoplasme et présentant des sites d'attachement au muscle lisse, des déformations nucléaires caractérisées par des noyaux irréguliers, des repliements profonds ou des entailles superficielles rappelant la forme d'un accordéon, ou encore des différentiations en surface avec des sites d'attachement périphériques en lien avec une couche extracellulaire de membrane basale parallèle à la paroi cellulaire (138).

Bien que les caractéristiques phénotypiques des myofibroblastes, tels que leur morphologie, leur propriété contractile, leur capacité à sécréter des quantités abondantes de collagène soient relativement compris, la principale difficulté réside dans la mise en évidence de marqueurs moléculaires de ces cellules. Morphologiquement, les myofibroblastes cardiaques ont des noyaux allongés et dentelés, des zones étendues de réticulum endoplasmique rugueux et des structures myofibrillaires non sarcomériques irrégulières (139). Ils se caractérisent par la sécrétion abondante de composants de la matrice extracellulaire, tels que la periostine, les collagènes I et III, la fibronectine (140). Les myofibroblastes expriment

des protéines spécifiques du muscle lisse à des degrés variables, comme la transgeline (SM22), la caldesmone ou l'alpha-actine spécifique du muscle lisse (α-SMA). La transgeline est une protéine gélifiante formant des liens avec l'actine, issue de la famille des calponines, et régulatrice des MMP-9 (141). Cette protéine pourrait être considérée comme un marqueur précoce et sensible de la différenciation des muscles lisses (142). La caldesmone interagit avec la calmoduline et le calcium, l'actine, la myosine et la tropomyosine en inhibant l'activité ATPase de la myosine dans le muscle lisse et intervient dans l'inhibition du calcium dépendant du muscle lisse et la contraction non musculaire. Cette protéine est également un marqueur de différenciation des muscles lisses et serait plus spécifique que la desmine et l'α-SMA (143,144). L'α-SMA est une protéine isoforme de l'actine, spécifique des cellules musculaires lisses d'origine vasculaire. Une élévation de l'expression d'α-SMA permet d'initier une activité contractile du fibroblaste, mais ces derniers étant très hétérogènes, le degré d'expression de l'α-SMA varie en fonction de l'origine des organes de différenciation (145–148).

Le type de myosine exprimé par les fibroblastes n'est pas encore bien établi, des myosines issues du muscle lisse et du muscle squelettique ayant été mises en évidence respectivement au sein des myofibroblastes d'origine stromale (cellules souches mésenchymateuses) et interstitielle (149–152).

La transformation des fibroblastes en myofibroblastes intervient en plusieurs étapes. Tout d'abord, un premier stade appelé proto-myofibroblaste se caractérise par la formation (au cours des premières 24 heures) de fibres d'actine cytoplasmique et de complexes d'adhésion permettant à la cellule de migrer au niveau de la zone tissulaire

lésée (42). La migration des myofibroblastes en bordure de la zone infarcie peut-être médiée par des facteurs de croissance tels que le TGF-β et les fibroblasts growth factors (FGFs) et par des cytokines proinflammatoires telles que IL-1β, TNF-α et la cardiotrophine 1 (153–156). Les proto-myofibroblastes sécrètent des quantités abondantes de collagènes et fibronectine au sein du tissu lésé. Secondairement, ces cellules évoluent en myofibroblastes matures sous l'action de niveaux élevés de cytokines et du stress mécanique, lui conférant des propriétés contractiles nouvelles (140). Ces nouvelles fonctions contractiles sont augmentées dans les myofibroblastes matures par le développement des « super-jonctions » d'adhésion constituées d'α-SMA et de cadhérine 2 et 11, l'isoforme 11 de la cadhérine étant prédominant (157).

Les myofibroblastes cardiaques pourraient persister des années en réponse à une lésion aiguë, contrairement aux myofibroblastes d'origine hépatique, la moitié évitant le décès cellulaire et retournant à un état de dédifférenciation en cellules stellaires hépatiques (anciennement cellules de *Ito*), ces cellules étant la première source de myofibroblastes hépatiques (158). La persistance des myofibroblastes d'origine cardiaque pourrait s'expliquer par des tensions pariétales anormalement élevées et la dérégulation neuroendocrine, ces phénomènes étant à l'origine d'un environnement propice à l'installation d'une dysfonction segmentaire puis à la fibrose cardiaque chronique par l'activation des fibroblastes interstitiels (41,159,160). L'activation du système rénine-angiotensine dans le tissu infarci stimule la conversion et la prolifération des myofibroblastes, et la synthèse abondante de protéines issues de la matrice extracellulaire par stimulation de TGF-β (161,162). Plusieurs modèles animaux suggèrent une contribution de l'aldostérone à la fibrose myocardique (163). Une inhibition des récepteurs minéralocorticoïdes atténue la fibrose cardiaque dans

certains modèles animaux d'infarctus du myocarde et la diminution des marqueurs de synthèse collagénique chez les patients présentant un infarctus du myocarde (164,165). La signalisation médiée par l'aldostérone pourrait moduler le phénotype cellulaire impliqué dans la réparation cardiaque, orientant les macrophages vers un phénotype fibrogénique, jouant un rôle dans l'activation des lymphocytes T, l'induction de signaux fibrogéniques dérivés des cardiomyocytes et en stimulant directement la prolifération de fibroblastes et la synthèse de collagène (166–170).

Quelles sont les cellules à l'origine de la transdifférenciation des myofibroblastes ?

Durant le développement embryonnaire, les fibroblastes dérivent d'un tissu mésenchymateux local par un processus de transition endothélio- ou épithélio-mésenchymateuse, ou par une transdifférenciation des cellules souches hématopoïétiques (171–175). Les myofibroblastes étant des cellules de soutien relativement hétérogènes dans leur signature génétique, il est difficile d'établir avec certitude leur origine lors d'atteinte lésionnelle cardiaque. Lors de l'embryogénèse cardiaque, les fibroblastes cardiaques dérivent du proépicarde entourant le cœur. Plusieurs études ont mis en évidence que les cellules épicardiques embryonnaires sont à l'origine des fibroblastes cardiaques matures. Une autre étude menée chez des souris ne possédant pas le facteur de transcription TCF21 impliqué dans l'adhésion de l'épicarde à la surface du myocarde et dans son expansion ne développent pas de fibroblastes cardiaques (176). L'origine des myofibroblastes semble provenir d'une majorité de fibroblastes résidents se transdifférenciant localement (177,178). Des

sources alternatives de myofibroblastes peuvent également être évoquées, principalement les péricytes vasculaires ou les cellules musculaires lisses, les cellules souches hématopoïétiques et les fibrocytes (178–180).

La « famille » des fibroblastes présentant un phénotype hétérogène de par leur localisation et leur origine, il est difficile d'identifier des marqueurs mésenchymateux suffisamment sensibles et spécifiques relatifs à la population de fibroblastes activés. Tout d'abord, la vimentine permet d'identifier la population fibroblastique. En revanche sa spécificité reste médiocre car ce marqueur est également associé aux cellules endothéliales et aux cellules musculaires lisses (181,182). L'α-SMA est un marqueur exprimé par les fibroblastes activés et n'est pas spécifique des fibroblastes quiescents. En revanche, il est aussi exprimé par les vaisseaux (41,106,183,184). Le collagène 1α1 est exprimé par les fibroblastes mais non spécifique de cette population. Il est également exprimé, dans une moindre mesure, par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les péricytes (185,186). La périostine n'est pas exprimée dans les fibroblastes cardiaques adultes, mais est fortement exprimé par les fibroblastes cardiaques activés en cas de lésion. Ce marqueur est également exprimé par une faible proportion de la population de cellules musculaires lisses (187–189). La fibronectine ED-A est fortement exprimée par les fibroblastes activés, mais elle est également exprimée par les macrophages et les cellules endothéliales (190–192). Le platelet derived growth factor α (PDGFR-α) est fortement exprimée par les fibroblastes cardiaques, mais est également exprimée par les cellules musculaires lisses en cas de stress (184,193). Le discoidin domain receptor 2 (DDR-2) est fortement exprimé dans les fibroblastes cardiaques, et montre des colocalisations avec la vimentine et le col1α1. Ce marqueur est également exprimée dans des sous-populations de

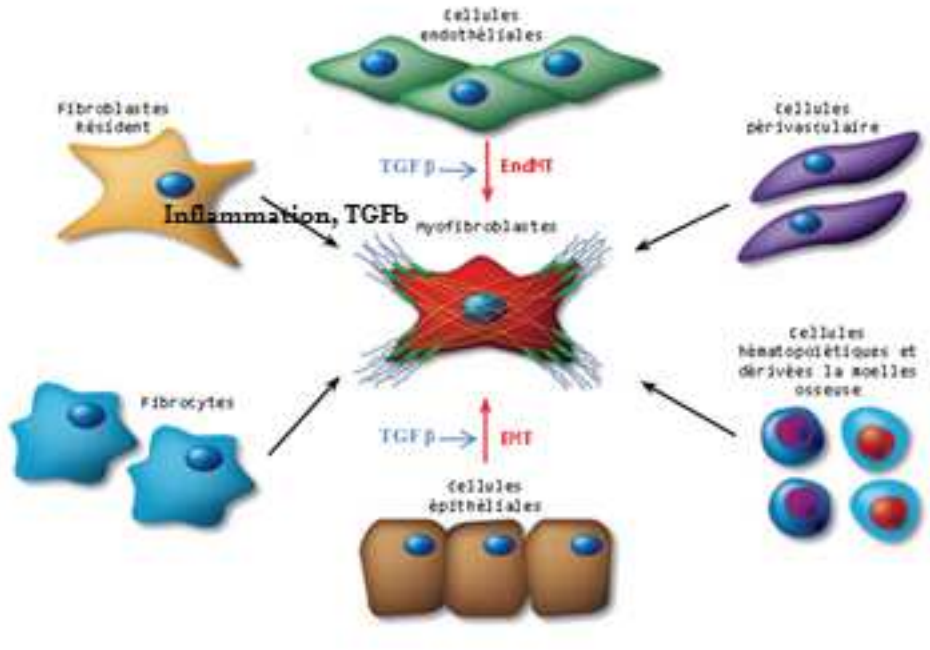
myofibroblastes (190,194) mais aussi par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (195,196). Thy1 (CD90) est exprimé par une sous-population de fibroblastes dans le tissu cardiaque normal et en cas de remodelage (197,198), mais il est également exprimé par les cellules immunitaires les cellules endothéliales lymphatiques et les péricytes (199). Le stem cell antigen 1 (Sca1) permet l'identification d'une sous-population de fibroblastes dans le cœur de souris PGDFRα+ Col1α1+ (200), mais son manque de spécificité n'en fait pas un bon candidat dans l'identification des fibroblastes cardiaques du fait de sa colocalisation mise en évidence avec les marqueurs des péricytes et des cellules endothéliales. Le transcription factor 21 (Tcf21) est exprimé dans la plupart des fibroblastes cardiaques mais n'est pas exprimé dans les myofibroblastes exprimant α-SMA (176). Ce marqueur est relativement spécifique des fibroblastes cardiaques, et n'est pas exprimé par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules immunitaires (201). Le fibroblast-specific protein 1 (FSP1) n'est pas exprimé dans les fibroblastes myocardiques, son expression est associée à la présence de myofibroblastes. Cette protéine manque de spécificité car on retrouve une population FSP+/α-SMA- correspondant à des cellules endothéliales, des macrophages et des cellules musculaires lisses (202,203). Le fibroblast activator protein (FAP) n'est pas exprimé dans les fibroblastes cardiaques (204) mais est exprimé par la plupart des fibroblastes de patients ayant présenté une insuffisance cardiaque aiguë. Toutefois, sa spécificité reste controversée car les cellules endothéliales et inflammatoires peuvent également exprimer ce marqueur (205). La nestine est également exprimé par une sous-population de myofibroblastes exprimant α-SMA dans le cœur et dans le rein, mais ce

marqueur reste toutefois fortement exprimé par les cellules endothéliales et représente un marqueur de revascularisation lors du processus de cicatrisation (206,207).

Etant donné l'absence de marqueur spécifique des myofibroblastes cardiaques, l'usage de plusieurs marqueurs permettant leur identification ainsi que l'origine de leur transdifférenciation sont rapportés dans la littérature. L'étude menée par Kanisicak *et al.* (184) montre que les fibroblastes activés suite à une lésion cardiaque sont issus de lignées cellulaire de fibroblastes résidents identifiés par les expressions conjointes de la vimentine, FSP-1, PGDFRa et α-SMA (184). Une étude similaire montre que l'expression d'α-SMA est précoce et interviendrait dans le 2 à 4 jours suivant la lésion cardiaque (208). D'autres études montrent que les myofibroblastes activés proviendraient de sous-populations cellulaires épicardiques lors de phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse et identifiées par l'expression de procollagène I, collagène I, III, FSP-1DDR2, CD90, fibronectine, α-SMA (185,209,210). Les myofibroblastes cardiaques proviendraient également de cellules souches hématopoïétiques et seraient caractérisés par une expression des marqueurs α-SMA, vimentine et une activité beta galactosidase (185,211,212). Une étude identifie une population de myofibroblastes par l'expression de PGDFRα, collagène I et α-SMA issue de lignées cellulaires périvasculaires lors de lésions cardiaques aiguës (213). Une dernière étude met en évidence une population de myofibroblastes exprimant α-SMA, Snail, FSP-1, vimentine et collagène I dérivée de cellules endothéliales à l'issue d'un processus de transition endothélio-mésenchymateuse (214). Une autre étude suggère la participation de phénomènes de transition endothélio-mésenchymateuse à l'origine d'une augmentation de la population de fibroblastes cardiaque lors d'une lésion aiguë myocardique, et contribue à la fibrose cardiaque (215). A ce jour, aucune

étude n'a pu mettre en évidence la contribution précise de chaque source à l'origine des myofibroblastes cardiaques. De plus, les sources à l'origine des myofibroblastes cardiaques peuvent être différentes entre atteinte aiguë ou chronique, et actuellement, la majorité des études menées concernent une atteinte lésionnelle aiguë du cœur. La figure suivante rapporte les sources pouvant être à l'origine des myofibroblastes cardiaques.

Figure 7 : Possibles sources de myofibroblastes cardiaques (adapté de Travers *et al.* (216))



La reconnaissance d'un phénomène de transition endothélio-mésenchymateuse se caractérise par l'identification de cellules présentant à la fois les marqueurs d'une cellule endothéliale ainsi que les marqueurs d'une cellule mésenchymateuse. La nécessité d'étudier une co-expression de ces deux phénotypes cellulaires dans la

bonne fenêtre observationnelle reste difficile. En effet, l'expression de marqueurs endothéliaux diminue pour disparaître dans les stades tardifs de la transdifférenciation cellulaire (217).

Régulation de la transdifférenciation des myofibroblastes cardiaques.

Les phénomènes de transition endothélio- ou épithélio-mésenchymateuse à l'origine des myofibroblastes sont soumis à un certain nombre de régulations moléculaires.

TGF-β est aussi un puissant médiateur de la transition endothélio- et épithélio-mésenchymateuse et du remodelage cardiaque (116,218,219). Durant le processus lésionnel, l'expression génétique des 3 isoformes de TFG-β est stimulée et la protéine sécrétée dans la matrice extracellulaire encadre les cellules mésenchymateuses, les macrophages, les monocytes et les fibroblastes résidents (220). TGF-β se lie à ses récepteurs de types I et II, ces derniers activant les voies de signalisation canoniques par la phosphorylation des protéines Smad, ainsi que les voies de signalisation indépendantes de Smad (103). La surexpression des gènes impliqués dans les constituants de la matrice extracellulaire tels que *Col1α, Col6α,* MMPs et leurs inhibiteurs par la voie canonique TGF-β-SMAD2/3 a été mise en évidence dans les fibroblastes du derme (221). La voie non canonique induite par TGF-b semble également impliquée dans la différenciation des myofibroblastes, l'inhibition de p38 réduisant l'expression de marqueurs liés aux myofibroblastes (α-SMA, Col-Iα, fibronectine) et la contraction de la matrice collagénique dans les fibroblastes (222,223) Ces 2 voies de TGF-β sont donc impliquées dans l'augmentation de

l'expression d'α-SMA, la synthèse des marqueurs collagéniques, et la transdifférenciation des myofibroblastes (224).

Conclusion

De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes de transition de l'hypertension artérielle ou du diabète vers l'insuffisance cardiaque. Beaucoup moins concernant l'insuffisance rénale chronique. Enfin, très peu d'études ont recherché l'intérêt prédictif de marqueurs de fibrose sur le remodelage ventriculaire et les évènements cardiaques majeurs chez des patients présentant une maladie rénale chronique au stade de la pré-dialyse, pourtant les risques d'évènements cardio-vasculaires sont la principale cause de mortalité dans cette population. Une approche intégrant un panel de marqueurs biologiques semble être la piste à privilégier pour évaluer la fibrose et le remodelage cardiaque au cours de l'insuffisance rénale chronique. Les processus physiopathologiques conduisant à la fibrose cardiaque restent partiellement résolus, en particulier lors de l'installation d'une fibrose cardiaque chronique secondaire à des pathologies chroniques tels que l'insuffisance rénale chronique et l'insulino-résistance.

Présentation des travaux

Pour aborder notre objectif principal, qui était d'étudier et d'identifier des marqueurs d'atteinte cardiaque au cours de l'insuffisance rénale chronique, nous avons développé notre travail à partir d'une cohorte de patients atteints d'insuffisance rénale chronique au stade de pré-dialyse pour la recherche de marqueurs circulants, et autour de modèles animaux développant une atteinte rénale chronique pour la recherche de marqueurs tissulaires.

Ces travaux, réalisés au sein de l'équipe 2 de l'unité PHYMEDEXP et du laboratoire de Biochimie (CHU Montpellier), reprennent les éléments cités précédemment :

- A l'évaluation des marqueurs de fibrose et d'inflammation dans le diagnostic de l'atteinte cardiaque et pronostic d'évènements cardiaques majeurs chez les patients asymptomatiques atteints de maladie rénale chronique, se situe le premier travail intitulé ***sST2 as a new biomarker of chronic kidney disease-induced cardiac remodeling : impact on risk prediction*** publié dans Mediators of Inflammation, IF 3,55.
- A l'étude de la fibrose cardiaque à partir de modèles animaux ayant développés une insuffisance rénale chronique, se situe le travail intitulé ***Obesity and insulin resistance on cardiac fibrosis in a rat model of chronic kidney disease. Participation of mesenchymal transition***, en cours de nouvelle soumission.
- Enfin, la chronologie d'installation de l'altération cardiaque à partir d'un modèle animal ayant développé une insuffisance rénale chronique est en cours de

rédaction et s'intitule ***Temporal relashionship between cardiac and renal alterations in a rat model of CKD***.

Les chapitres suivants présentent successivement chacune de ces études en les situant dans leur contexte, en les discutant, et en montrant leur intrication.

Étude des marqueurs de fibrose sur le plan diagnostic et pronostic de la dysfonction diastolique dans l'insuffisance rénale chronique.

Contexte

L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée représente l'une des plus fréquentes complications cardiaques chez l'insuffisant rénal chronique. Les peptides natriurétiques sont les biomarqueurs couramment utilisés en pratique clinique mais sont largement dépendants de la fonction rénale. Certains marqueurs de fibrose sont identifiés pour stratifier le risque d'évènements cardio-vasculaires dans l'insuffisance cardiaque. Dans ce contexte, une approche incluant plusieurs paramètres biologiques semble être plus informative sur la prédiction du risque cardiaque. L'étude complémentaire au projet et présentée en *annexe 1 dé*montre qu'une approche multimarqueurs incluant certains paramètres du turnover collagénique, en particulier le ratio CTx/PIIINP, apportent une valeur prédictive supérieure au sST2 et aux données cliniques quant au pronostic d'évènements cardio-vasculaires dans une population de patients présentant une insuffisance cardiaque chronique. Actuellement, aucune étude n'a montré la supériorité d'un marqueur spécifique de la dysfonction cardiaque et qui soit indépendant de la fonction rénale, tant sur le plan diagnostique que pronostique. Une approche clinico-biologique semble donc plus informative en termes de pronostic de l'insuffisance cardiaque.

Justification de l'étude

Dans ce contexte, l'hypothèse de travail est d'évaluer les marqueurs de fibrose et d'inflammation cardiaque dans la dysfonction cardiaque, et leur intérêt pronostique des évènements cardiaques majeurs développés au cours de l'insuffisance rénale chronique. Dans un second temps, l'inclusion de sST2 dans une approche clinico-biologique permettra d'évaluer la survenue d'évènements cardiaques majeurs (MACE) et de décès chez l'insuffisant rénal chronique.

Article

Hindawi
Mediators of Inflammation
Volume 2018, Article ID 3952526, 9 pages
https://doi.org/10.1155/2018/3952526

Research Article

sST2 as a New Biomarker of Chronic Kidney Disease-Induced Cardiac Remodeling: Impact on Risk Prediction

Maëlle Plawecki,[1,2] Marion Morena,[1,2] Nils Kuster,[1,2] Leila Chenine,[3] Hélène Leray-Moragues,[3] Bernard Jover,[2] Pierre Fesler,[2,4] Manuela Lotierzo,[1,2] Anne-Marie Dupuy,[1] Kada Klouche,[2,5] and Jean-Paul Cristol[1,2]

[1]*Département de Biochimie-Hormonologie, CHU Montpellier, Université de Montpellier, Montpellier, France*
[2]*PhyMedExp, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France*
[3]*Département de Néphrologie, CHU Montpellier, Université de Montpellier, Montpellier, France*
[4]*Département de Médecine Interne et Hypertension, CHU Montpellier, Université de Montpellier, Montpellier, France*
[5]*Département de Réanimation, CHU Montpellier, Université de Montpellier, Montpellier, France*

Correspondence should be addressed to Jean-Paul Cristol; jp-cristol@chu-montpellier.fr

Received 18 May 2018; Accepted 5 September 2018; Published 8 October 2018

Guest Editor: Marta Ruiz-Ortega

Copyright © 2018 Maëlle Plawecki et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Heart failure is the most frequent cardiac complication of chronic kidney disease (CKD). Biomarkers help identify high-risk patients. Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP) are largely used for monitoring patients with cardiac failure but are highly dependent on glomerular filtration rate (GFR). Soluble suppression of tumorigenicity 2 (sST2) biomarker is well identified in risk stratification of cardiovascular (CV) events in heart failure. Furthermore, sST2 is included in a bioclinical score to stratify mortality risk. The aims of this study were to evaluate (i) the interest of circulating sST2 level in heart dysfunction and (ii) the bioclinical score (Barcelona Bio-Heart Failure risk calculator) to predict the risk of composite outcome (major adverse coronary events) and mortality in the CKD population. A retrospective study was carried out on 218 CKD patients enrolled from 2004 to 2015 at Montpellier University Hospital. sST2 was measured by ELISA (Presage ST2® kit). GFR was estimated by the CKD-EPI equation (eGFR). Indices of cardiac parameters were performed by cardiac echography. No patient had reduced ejection fraction. 112 patients had left ventricular hypertrophy, and 184 presented cardiac dysfunction, with structural, functional abnormalities or both. sST2 was independent of age and eGFR ($\rho = 0.05$, $p = 0.44$, and $\rho = -0.07$, $p = 0.3$, respectively). Regarding echocardiogram data, sST2 was correlated with left ventricular mass index ($\rho = 0.16$, $p = 0.02$), left atrial diameter ($\rho = 0.14$, $p = 0.04$), and volume index ($\rho = 0.13$, $p = 0.05$). sST2 alone did not change risk prediction of death and/or CV events compared to natriuretic peptides. Included in the Barcelona Bio-Heart Failure (BCN Bio-HF) score, sST2 added value and better stratified the risk of CV events and/or death in CKD patients ($p < 0.0001$). To conclude, sST2 was associated with cardiac remodeling independently of eGFR, unlike other cardiac biomarkers. Added to the BCN Bio-HF score, the risk stratification of death and/or CV events in nondialyzed CKD patients was highly improved.

1. Introduction

CV events and death are associated with reduced eGFR [1]. The prevalence of most comorbid conditions, including heart failure (HF), increases with decreasing eGFR [2]. Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) constitutes the main feature of uremic cardiopathy and is often referred to as type 4 cardiorenal syndrome [3, 4]. In May 2016, the European Society of Cardiology developed guidelines to help diagnosis of chronic HFpEF, including cardiac structural or functional alterations underlying HF [5]. Left ventricular hypertrophy (LVH) represents the major event in type 4 cardiorenal syndrome (chronic renocardiac damage). The prevalence of LVH is estimated between 16% and 31% in CKD patients with eGFR > 30 mL/min to reach 60 to 75% before dialysis and 90% after dialysis [6]. Diastolic dysfunction, defined by pseudonormal or restrictive pattern through tissue Doppler imaging (E/e' ≥ 10) which appears in the early

stages of CKD, now emerges as an independent predictor of mortality and development of HF in a CKD patient [7].

Recent studies have identified new biomarkers involved in the pathogenesis of remodeling and cardiac fibrosis. Among them is sST2, an emerging biomarker predictive of fibrosis and cardiac remodeling in HF patients without CKD. This is a marker of interest in the stratification of patients at risk as well as in the therapeutic response of HF patients [8–11]. ST2 belongs to the family of interleukin receptors of type-1 (IL-1) and exists as membrane-bound (ST2L) and soluble (sST2) isoforms. By binding interleukin-33 (IL-33), ST2L is responsible for antihypertrophic, antifibrotic, and antiapoptotic effects [12]. sST2 is the soluble circulating form which acts as a decoy receptor, sequesters IL-33, and prevents its binding to ST2L, thereby neutralizing the beneficial effects of the ST2L/IL-33 signaling pathway [13]. sST2 is mainly secreted by cardiomyocytes when the cells are subjected to biomechanical overload. Nevertheless, the main source of sST2 secretion is still controversial, and in human cardiac disease, the vascular endothelial cells were shown to be the predominant source of sST2, rather than the human myocardium [14].

In patients with chronic HF episodes, sST2 acts as a predictor of both all-cause and cardiovascular death [15]. sST2 was included in a novel bioclinical algorithm (Barcelona Bio-Heart Failure (BCN Bio-HF) risk calculator) in association with NT-proBNP and high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT), which allowed accurate prediction of death at 1, 2, and 3 years in HF patients [16]. High levels of sST2 associated with NT-proBNP and identified risk factors improve prognosis performance independently of left ventricular ejection fraction and renal function in HF [17]. In this context, sST2 measurement can identify patients with left ventricular remodeling and decompensated hemodynamic profile [18].

To our knowledge, only few data are available regarding the prognosis value of fibrosis and myocardial remodeling biomarker in CKD patients for which the risk of a CV event constitutes the main cause of mortality. Therefore, objectives of this study were to evaluate sST2 in cardiac remodeling and to assess its role alone or in combination with other common biological parameters of HF for risk stratification of CV events or/and mortality in a nondialyzed CKD population (BCN Bio-HF score).

2. Population and Methods

2.1. Patients and Study Design. 218 patients were enrolled in the Montpellier University Hospital between 2004 and 2015. Main inclusion criteria were the ability to give informed consent, age > 18 years, cardiac echography at inclusion, and a confirmed diagnosis of CKD according to the National Kidney Foundation and KDIGO Guidelines [19, 20]. Stages of CKD were determined using eGFR calculated using the CKD-EPI equation [21]. None of the patients in stage 5 were on hemodialysis or on peritoneal dialysis. Regarding antihypertensive treatment, 16 patients had no treatment, 39 were on mono-, 71 on bi-, 70 on tri-, and 22 on quadritherapy.

At the time of enrollment, all patients had an echocardiogram performed by a trained physician. Dry and heparinized blood samples were drawn, and serum/plasma stored at −80°C for further analyses.

The follow-up of all included patients was approximatively 3 years with time-to-event analysis until the occurrence of fatal or nonfatal CV events, defined as major adverse coronary events (MACE).

Written informed consent was obtained for all patients. The protocol was approved by local authorities (Ethics Committee of Montpellier) according to standards currently applied in France (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés, CNIL, N°MR001). A biological collection was also registered by the French government (research ministry, # DC 2008-417 and # DC 2013-2027). The study was done in accordance with the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice guidelines.

2.2. Cardiac Echography. Cardiac echocardiography was performed by a trained physician at inclusion. No patients presented signs of heart failure at inclusion. Subclinical cardiac dysfunction was defined as left ventricular ejection fraction (LVEF) > 40% with structural abnormality (left ventricular mass index (LVMI) ≥ 115 g/m^2 for men and ≥95 g/m^2 for women or left atrial volume index (LAVI) > 34 mL/m^2) or functional abnormality with impaired relaxation (E/A < 1) [5].

2.3. Laboratory Analyses. Biochemical parameters, including classical cardiac variables (NT-proBNP and high-sensitivity troponin T (hs-cTnT)), were performed on a Cobas 8000/e602 immunochemistry system (Roche Diagnostics, Meylan, France). C-reactive protein (CRP), urea, and IDMS traceable enzymatic creatinine were determined on a Cobas 8000/c701 (Roche Diagnostics, Meylan, France). Intact aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP) as a biomarker of collagen synthesis was determined by chemiluminescence technology using the IDS-iSYS Multi-Discipline automated analyser (IDS, Boldon, England).

2.4. sST2 Measurement. sST2 was measured using a sandwich ELISA kit (Presage© ST2 assay, Critical Diagnostics, San Diego, California, distributed in France by Eurobio Laboratories). In chronic HF patients, the upper reference limit for sST2 was 35 ng/mL [22]. A recombinant human sST2 standard calibrator was provided for this assay. sST2 concentrations were measured according to sST2 assay procedures and adapted on Evolis (France). Briefly, 100 μl of standard, diluted samples (1 : 20 in sample diluent) was added to the well of a ready-to-use microtiter plate coated with mouse monoclonal anti-human sST2 antibody. The standard curve was in the concentration range 2.8–100 ng/mL. Then, the plate was incubated for 60 min at room temperature. After washing, 100 μl of biotinylated antibody reagent was added into each well and incubated for 60 min at room temperature. After washing, 100 μl of streptavidin-HRP conjugated was added into each well and incubated for 30 min at room temperature. After washing, the TMB substrate was added to each well and incubated for 20 min at room temperature in the dark. Then, stop solution was added and absorbance was read at 450 nm.

2.5. Barcelona Bio-Heart Failure Score. The Barcelona Bio-Heart Failure risk calculator (BCN Bio-HF calculator) estimates the risk of death in patients with HF described by Lupón et al. [16]. The BCN Bio-HF calculator is an algorithm based on eight independent models, depending on available data. It is derived from a real-life cohort and includes, in addition to classical prediction factors, serum NT-proBNP, hs-cTnT, and sST2 reflecting different pathophysiological pathways. The models account for clinical and biological characteristics and treatments to predict the risk of mortality at 1, 2, and 3 years. Pharmacological treatments include beta-blockers, ARBs/ACEI, statins, and furosemide. In our study, all clinical and biomarker variable models were taken into account (hs-cTnT, NT-proBNP, and sST2). Using this model, prognostic indices were computed for each patient in our population.

2.6. Statistical Analysis. Descriptive statistics are presented as numbers (percentages) for categorical data and as medians (interquartile range (IQR)) for continuous variables. χ^2 test was performed to investigate the presence of differences between proportions. The Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis test were used to compare groups, as appropriate. Since their distributions were skewed, logarithmic transformations of sST2, troponin, NT-proBNP, and PINP biomarkers were used. For correlation analyses, Spearman's rank correlation coefficients were computed. Composite outcome was defined as any of the following events (MACE) during follow-up: death, myocardial infarction, ischemic cardiomyopathy, angioplasty, valvular cardiomyopathy, stroke, vascular angioplasty, or cardiac arrhythmias. The Kaplan-Meier estimator of event-free survival was used to assess the ability of biomarkers to predict adverse outcome in the population. Potential predictors of composite outcome were further evaluated using the Cox proportional hazard regression. The net reclassification improvement (NRI) was used to assess the incremental value by adding a biomarker over the BCN Bio-HF score. No treatment adjustment in relation to cardiac biomarkers and kidney dysfunction was assessed in the BCN Bio-HF score analysis since they were already included in the initial score calculation.

3. Results

3.1. Population Characteristics. This study included a total of 218 patients at different stages of CKD (i.e., 36 patients at stages 1–2, 42 patients at stage 3A, 57 patients at stage 3B, 62 patients at stage 4, and 21 patients at stage 5). Median eGFR level was 37 mL/min/1.73 m^2 (IQR 23–52). During the follow-up period, 85 out of 218 patients presented composite outcome. Demographic data, laboratory findings, and echocardiogram parameters in the global population presenting or not presenting composite outcome are shown in Table 1. Among the population, the median LVEF was 62%, and none of the patients had reduced LVEF. 112 (51%) patients presented LVH and 184 (84%) a cardiac dysfunction. Cardiac dysfunction was as follows: 45 patients with structure abnormality only, 72 with function abnormality only, and 67 with both. Median follow-up was 3.0 years (IQR 1.3–6.4) after initial evaluation. Compared to patients free of major adverse coronary events (MACE), eGFR and LVEF were lower in patients with MACE, whereas age, LAVI, left atrial diameter (LAD), LVMI, levels of CRP, NT-proBNP, and hs-cTnT were higher. No significant difference in PINP levels was observed between groups. Median sST2 was 29.5 ng/mL (IQR 22.6–35.1), and 55 out of 218 patients (25%) had an elevated level of sST2 (upper reference limit is 35 ng/mL in chronic HF).

3.2. sST2 Is Associated with Cardiac Remodeling Feature. Correlation between sST2 and inflammatory and cardiac biomarkers (CRP, NT-proBNP, and hs-cTnT) was significant ($\rho = 0.17$, $p = 0.01$; $\rho = 0.14$, $p = 0.03$; and $\rho = 0.15$, $p = 0.03$, respectively).

Regarding echocardiogram data, sST2 was correlated with LVEF ($\rho = -0.14$, $p = 0.04$) and cardiac remodeling (i.e., LAD ($\rho = 0.14$, $p = 0.04$), LAVI ($\rho = 0.13$, $p = 0.05$), and LVMI ($\rho = 0.16$, $p = 0.02$)). No association with functional abnormality was observed (E/A ($\rho = 0.08$, $p = 0.26$)). PINP was not correlated with any echocardiographic data (Figure 1). Other cardiac biomarkers (hs-cTnt and NT-proBNP) were correlated with structural abnormality parameters. Concerning patient treatments, no correlation was observed between sST2 and beta-blockers, ARBs/ACEI, statins, or furosemide (data not shown).

3.3. sST2 Is Independent of GFR and Age. No correlation between sST2 and both age ($\rho = 0.05$, $p = 0.44$) or eGFR ($\rho = -0.07$, $p = 0.3$) was observed, in contrast to classical cardiac biomarkers such as hs-cTnT ($\rho = 0.55$, $p < 0.001$, and $\rho = -0.59$, $p < 0.001$, respectively) and NT-proBNP ($\rho = 0.51$, $p < 0.001$, and $\rho = -0.56$, $p < 0.001$, respectively). Moreover, no relationship was observed between sST2 and CKD stages ($p = 0.9$) whereas NT-proBNP and hs-cTnT values increased from stages 1 to 5 ($p < 0.001$ for both parameters) (Figure 2).

3.4. Predictors of Outcome. During the 3 years of median follow-up (IQR 1.3–6.4), 85 (39%) patients experienced the composite outcome of death and/or CV events.

In univariate Cox analysis, older age (HR 1.052 (1.031–1.072)), male gender (female HR 0.420 (0.251–0.704)), increased LAVI (HR 1.050 (1.015–1.086)) and LAD (HR 1.074 (1.030–1.119)), elevated hs-cTnT (HR 5.152 (2.659–9.983)), NT-proBNP (HR = 1.650 (1.116–2.439)), and CRP (HR 2.155 (1.388–3.346)) were related to composite outcome (Table 2).

3.5. Multimarker Strategy Based on Barcelona Bio-HF Score. The Barcelona Bio-HF score was applied to assess the predictive composite outcome in our cohort. Taken together, NT-proBNP, hs-cTnT, and sST2 were highly predictive of the composite outcome of cardiovascular events and/or death ($p < 0.0001$) (Figure 3). A combination of CRP with the Barcelona Bio-HF score was performed in order to identify a high-risk subgroup and to improve the risk of CV events or death composite outcome. The risk classification analysis including the CRP level did not allow

Table 1: Baseline characteristics of all patients, with and without MACE.

Variable	Study population ($n = 218$)	No MACE ($n = 133$)	MACE ($n = 85$)	p
Age (years)	68.31 [57.62–75.47]	63.35 [49.18–71.69]	71.75 [67.44–79.37]	<0.001
Gender				0.005
Male	139 (64%)	75 (56%)	64 (75%)	
Female	79 (36%)	58 (44%)	21 (25%)	
Follow-up (years)	3.0 [1.3–6.4]	3.0 [1.3–6.5]	2.8 [1.4-5.8]	0.869
eGFR (mL/min/1.73 m^2)	37 [23–52]	40 [26–57]	35 [22–44]	0.014
SBP (mmHg)	134 [120–146]	135 [122–146]	130 [120–146]	0.214
DBP (mmHg)	73 [69–80]	75 [70–80]	70 [65–80]	0.051
Echocardiography				
LVEF (%)	62 [58–65]	65 [60–67]	60 [54–64]	<0.001
E/A	0.85 [0.70–1.11]	0.87 [0.73–1.12]	0.8 [0.69–1.11]	0.204
LAVI (mL/m^2)	11.4 [7.6–14.9]	10.4 [7.0–14.1]	13.3 [9.1–16.3]	0.001
LAD (mm)	34 [30–37]	33 [29–36]	36 [32–39]	<0.001
LVMI (g/m^2)	109.9 [85.3–130.5]	106.8 [79.0–125.0]	118.0 [97.2–139.3]	0.004
Biomarkers				
NT-proBNP (ng/L)	182.5 [75.0–445.3]	129.0 [61.0–379.0]	287.0 [121.2–623.5]	<0.001
sST2 (ng/mL)	29.5 [22.6–35.1]	28.2 [21.7–34.3]	30.5 [24.3–36.7]	0.100
PINP (ng/mL)	52.2 [38.2–77.5]	51.95 [38.2–77.2]	55.3 [38.4–77.5]	0.522
hs-cTnT (ng/L)	14.3 [7.7–24.9]	11.7 [6.2–19.5]	19.1 [12.4–34.3]	<0.001
CRP (mg/L)	2.2 [1.1–4.7]	1.8 [0.8–3.6]	3.2 [1.6–6.9]	<0.001
Na (mmol/L)	141 [139–142]	141 [139–142]	140 [139–142]	0.829
Hb (g/dL)	13.2 [12.3–14.2]	13.4 [12.2–14.4]	13.0 [12.4–14.0]	0.702
Treatments				
Beta-blockers				0.054
No	118 (54.1%)	79 (59.4%)	39 (45.9%)	
Yes	100 (45.9%)	54 (40.6%)	46 (54.1%)	
ARBs/ACEI				0.274
No	55 (25.2%)	30 (22.6%)	25 (29.4%)	
Yes	163 (74.8%)	103 (77.4%)	60 (70.6%)	
Statins				0.061
No	120 (55.0%)	80 (60.2%)	40 (47.1%)	
Yes	98 (45.0%)	53 (39.8%)	45 (52.9%)	
Furosemide				0.001
No	100 (45.9%)	73 (54.9%)	27 (31.8%)	
Yes	118 (54.1%)	60 (45.1%)	58 (68.2%)	

Data presented as median [1st quartile–3rd quartile] for quantitative variables and proportions for categorical variables. ACEI: angiotensin converting enzyme inhibitors, ARBs: angiotensin receptor blockers, DBP: diastolic blood pressure, eGFR: estimated glomerular filtration rate, LAD: left atrial diameter, LAVI: left atrial volume index, LVEF: left ventricular ejection fraction, LVMI: left ventricular mass index, MACE: major adverse coronary events, SBP: systolic blood pressure. p value was determined by χ^2 and Mann-Whitney U tests.

better patient classification (continuous NRI = 16% (−11.7–32.8%), $p = 0.27$).

4. Discussion

This study shows that the sST2 level is associated with cardiac remodeling features, and unlike common cardiac biomarkers, this biomarker is independent of eGFR and age. A multimarker approach including sST2 is thus reported as an appealing tool in CV risk stratification of nondialyzed CKD patients.

4.1. sST2 and Heart Dysfunction in CKD Patients. HFpEF is associated with increased cardiac remodeling, abnormal cardiac mechanics, and poor outcomes in CKD patients [1, 23]. Brain natriuretic peptides and hs-cTnT can facilitate the diagnosis of HF among patients with CKD. Elevation of these biomarkers is related to cardiac modifications contributing to HF [24]. Vickery et al. reported that eGFR and cardiac dysfunction have independent effects on brain natriuretic peptide concentrations in CKD patients [25]. A reduced renal excretion provokes elevated levels of cardiac troponins, NT-proBNP, and in a lesser extent BNP limiting the utility

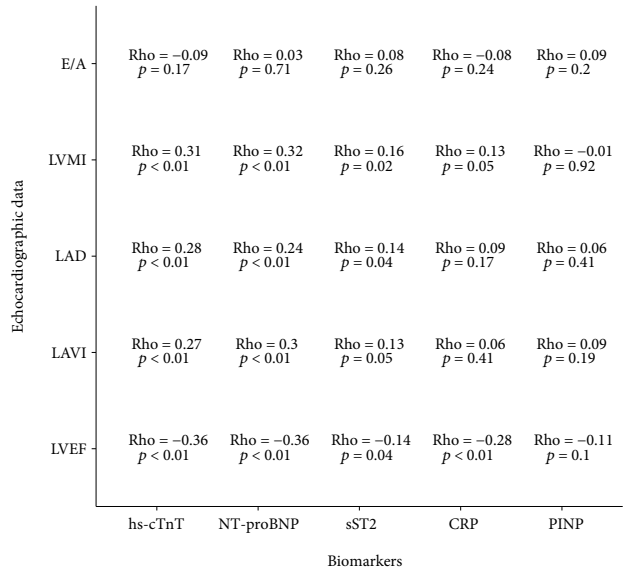


Figure 1: Correlation analysis between echocardiogram data, variables, and biomarkers.

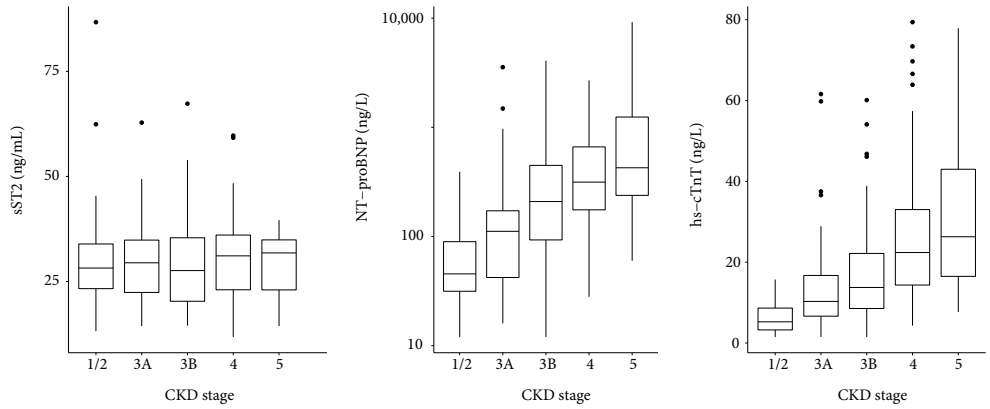


Figure 2: sST2, NT-proBNP, and hs-cTnT levels according to CKD stages (Kruskal-Wallis test: $p = 0.9$, $p < 0.001$, and $p < 0.001$, respectively).

of these markers although higher brain natriuretic peptide levels remain predictive of increased mortality in CKD [26–28]. sST2 is an interesting biomarker, and most studies have described sST2 as an independent marker of renal function and hemodialysis [29–31]. We confirmed here that sST2 is not correlated with eGFR, unlike NT-proBNP, and no difference was observed among CKD stages. Therefore, the weak correlation observed between NT-proBNP and sST2 ($\rho = 0.14$, $p = 0.03$) can be explained by renal dysfunction as a confusing factor (Figure 2). In a study conducted by Bao et al., sST2 levels were higher in CKD patients compared to healthy controls and were correlated with disease severity [32]. More recently, Gungor et al. observed that sST2 levels increased with CKD stages [33]. Indeed, these investigations did not evaluate cardiac function, and sST2 elevation was reported to be involved in the inflammatory state. Moreover, sST2 measurements are not directly comparable because ELISA kits with different standards or antibodies were used.

Table 2: Univariate Cox analysis predictive of cardiovascular events and/or death composite outcome.

Variable	HR [95% CI]	p
Age (years)	1.052 [1.031–1.072]	<0.001
Female	0.420 [0.251–0.704]	0.001
SBP (mmHg)	0.992 [0.981–1.004]	0.209
DBP (mmHg)	0.986 [0.966–1.006]	0.167
LAVI (mL/m^2)	1.050 [1.015–1.086]	0.005
LAD (mm)	1.074 [1.030–1.119]	0.001
LVMI (g/m^2)	1.004 [0.998–1.009]	0.183
E/A	1.010 [0.607–1.681]	0.969
Log hs-cTnT (ng/L)	5.152 [2.659–9.983]	<0.001
Log NT-proBNP (ng/L)	1.650 [1.116–2.439]	0.012
Log CRP (mg/L)	2.155 [1.388–3.346]	0.001
Log sST2 (ng/mL)	2.836 [0.532–15.134]	0.222
Log PINP (ng/mL)	0.836 [0.340–2.057]	0.696
eGFR (mL/min/1.73 m^2)	0.992 [0.981–1.003]	0.172
Na (mmol/L)	0.985 [0.908–1.069]	0.720
Hb (g/dL)	0.991 [0.852–1.153]	0.909

DBP: diastolic blood pressure, eGFR: estimated glomerular filtration rate, Hb: hemoglobin, LAD: left atrial diameter, LAVI: left atrial volume index, LVMI: left ventricular mass index, SBP: systolic blood pressure.

Lastly, in both studies, GFR was estimated through the Modification of Diet in Renal Disease Equation, and this could lead to different GFR values depending on the estimation method used.

sST2 is involved in pathophysiology of cardiac fibrosis, and its increase is considered as an indirect circulating marker of cumulative fibrotic processes [34]. Regarding echocardiogram results, sST2 correlates significantly with variables that describe structural alterations, and no correlation with functional abnormalities was observed. We can thus speculate that in CKD patients, sST2 by decreasing the availability of IL-33 may be involved in cardiac remodeling features typically observed in HFpEF. Although other cardiac biomarkers showed better correlation with cardiac dysfunction, sST2 is quite relevant because it does not depend on age and renal function. These results represent an important step in early detection of cardiac performance alteration in CKD. Finally, no correlation between PINP and echocardiographic data was observed. This could be explained by the lack of specificity of this marker in cardiac fibrosis [35].

4.2. sST2 and Prognosis Value. To our knowledge, this is the first time we observe that a multimarker strategy including combined sST2, NT-proBNP, and hs-cTnT biomarkers is highly associated with cardiovascular events and/or mortality and suitable in nondialyzed CKD patient risk stratification.

sST2 represents a promising biomarker in prognosis mortality and CV events in chronic HF [36, 37]. Recently, an update of ACC/AHA guidelines stated that the use of myocardial fibrosis biomarkers such as sST2 might be considered for predicting risk of hospitalization and death in patients with chronic HF and potentially added to natriuretic peptide biomarker levels in their prognostic value [34]. Our study confirms that hs-cTnT, CRP, and to a lesser extent NT-proBNP alone are predictive of poor outcome, as described in a hemodialysis population [38]. Yet, sST2 alone does not allow CV events or death composite outcome prognosis in nondialyzed CKD patients. Our findings are in line with Keddis et al., who found that sST2 level did not change CV risk prediction compared to cardiac troponin T in patients considered for kidney transplant [39].

A multimarker strategy approach was developed and proven to be more informative than a single biomarker in HF prognosis. To date, only few clinical scores evaluating risk stratification of HF have been developed. The BCN Bio-HF score is a unique tool combining a panel of biomarkers and clinical variables [40]. Taken together, biomarkers provide information about myocyte necrosis (hs-cTnT), fibrosis and inflammation (sST2), and chamber strain (NT-proBNP). In our study, NT-proBNP, hs-cTnT, and sST2 in combination with clinical variables and treatments were highly predictive of composite outcome. We showed that the BCN Bio-HF score can also be applied to the CKD population and is highly predictive of CV events and mortality. Beside, adding CRP to the BCN Bio-HF score did not provide better reclassification of CKD patients, as observed for HF [41]. Although CRP is considered as a marker of early inflammation and a low level of hs-CRP may be associated with a more favorable prognosis in patients with coronary heart disease [42], its level remains stable in CKD before dialysis and unlikely plays a major role in subacute inflammation [43]. Our results suggest that CRP does not improve the prognosis of patients at nondialyzed CKD stages, presenting mainly a subclinical cardiac dysfunction. In this population, a multimarker strategy such as the BCN Bio-HF score is definitely helpful to better stratify risk of death and CV events. Further longitudinal studies in CKD patients are needed to better characterize the interest of these combined markers involved in HF pathophysiology.

5. Limitations

This study presents several limitations. First of all, tissue Doppler imaging was not taken into account at the time of inclusion; consequently, the e' wave was not available. Then, a relatively small cohort of patients from a single medical center was enrolled. We only measured biomarkers at time of recruitment and did not evaluate the long-term trends of biomarkers, which could be useful for patient follow-up. Moreover, sST2 assay is not available in all laboratories, which reduces the use of the multimarker strategy.

6. Conclusion

To our knowledge, this is the first study showing that sST2 is a good biomarker to evaluate the cardiac remodeling feature in nondialyzed CKD patients. Although sST2 alone is not predictive of CV events and death in this population, it plays an important role to stratify risk of

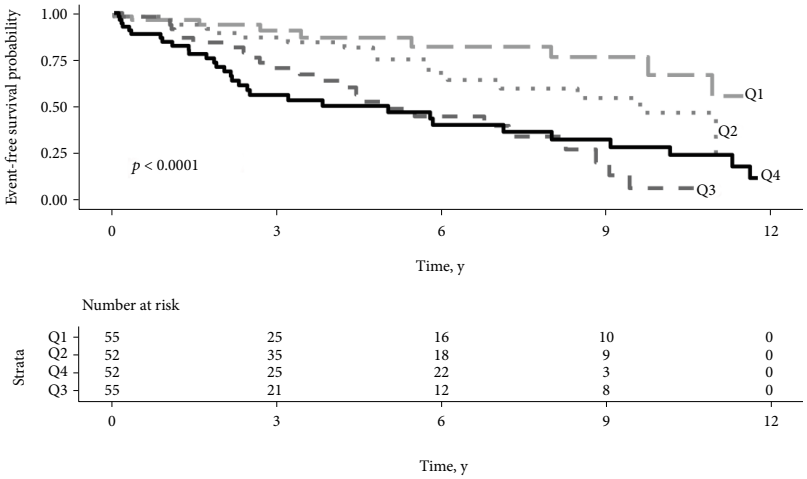


Figure 3: Barcelona Bio-HF score and composite outcome prediction. Event-free survival probability according to mortality risk predicted by the Barcelona Bio-Heart Failure score. Study population was stratified by quartiles of 1-year mortality risk (Q1: risk < 1.56%, Q2: 1.56 ≤ risk < 3.45%, Q3: 3.45 ≤ risk < 6.68%, and Q4: risk > 6.68%). p value refers to the log-rank test.

all-cause mortality and CV events in a multimarker strategy combined with clinical variables.

Data Availability

The datasets generated and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Disclosure

Part of the study was presented at the meeting "Printemps de la Cardiologie 2018" and published as an abstract in the Archives of Cardiovascular Diseases Supplements 2018, 10-2:202.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Ministère de la Santé (PHRC-UF 9763).

References

[1] A. S. Go, G. M. Chertow, D. Fan, C. E. McCulloch, and C. Hsu, "Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization," *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, no. 13, pp. 1296–1305, 2004.

[2] L. A. Stevens, S. Li, C. Wang et al., "Prevalence of CKD and comorbid illness in elderly patients in the United States: results from the Kidney Early Evaluation Program (KEEP)," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 55, no. 3, pp. S23–S33, 2010.

[3] I. Löfman, K. Szummer, U. Dahlström, T. Jernberg, and L. H. Lund, "Associations with and prognostic impact of chronic kidney disease in heart failure with preserved, mid-range, and reduced ejection fraction," *European Journal of Heart Failure*, vol. 19, no. 12, pp. 1606–1614, 2017.

[4] C. Ronco, M. Haapio, A. A. House, N. Anavekar, and R. Bellomo, "Cardiorenal syndrome," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 52, no. 19, pp. 1527–1539, 2008.

[5] P. Ponikowski, A. A. Voors, S. D. Anker et al., "2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC," *European Heart Journal*, vol. 37, no. 27, pp. 2129–2200, 2016.

[6] L. Di Lullo, A. Gorini, D. Russo, A. Santoboni, and C. Ronco, "Left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease patients: from pathophysiology to treatment," *Cardiorenal Medicine*, vol. 5, no. 4, pp. 254–266, 2015.

[7] A. Jain, C. Scott, and H. H. Chen, "The renal-cardiac connection in subjects with preserved ejection fraction: a population based study," *ESC Heart Failure*, vol. 4, no. 3, pp. 266–273, 2017.

[8] R. A. P. Weir, A. M. Miller, G. E. J. Murphy et al., "Serum soluble ST2: a potential novel mediator in left ventricular and infarct remodeling after acute myocardial infarction," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 55, no. 3, pp. 243–250, 2010.

[9] A. Bayes-Genis, Y. Zhang, and B. Ky, "ST2 and patient prognosis in chronic heart failure," *The American Journal of Cardiology*, vol. 115, no. 7, pp. 64B–69B, 2015.

[10] S. E. Piper, R. A. Sherwood, G. F. Amin-Youssef, A. M. Shah, and T. A. McDonagh, "Serial soluble ST2 for the monitoring of pharmacologically optimised chronic stable heart failure," *International Journal of Cardiology*, vol. 178, pp. 284–291, 2015.

[11] H. K. Gaggin, S. Motiwala, A. Bhardwaj, K. A. Parks, and J. L. Januzzi, "Soluble concentrations of the interleukin receptor family member ST2 and β-blocker therapy in chronic heart failure," *Circulation Heart Failure*, vol. 6, no. 6, pp. 1206–1213, 2013.

[12] R. Kakkar and R. T. Lee, "The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 7, no. 10, pp. 827–840, 2008.

[13] S. Sanada, D. Hakuno, L. J. Higgins, E. R. Schreiter, A. N. J. McKenzie, and R. T. Lee, "IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 6, pp. 1538–1549, 2007.

[14] J. Bartunek, L. Delrue, F. van Durme et al., "Nonmyocardial production of ST2 protein in human hypertrophy and failure is related to diastolic load," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 52, no. 25, pp. 2166–2174, 2008.

[15] A. Aimo, G. Vergaro, A. Ripoli et al., "Meta-analysis of soluble suppression of tumorigenicity-2 and prognosis in acute heart failure," *JACC: Heart Failure*, vol. 5, no. 4, pp. 287–296, 2017.

[16] J. Lupón, M. de Antonio, J. Vila et al., "Development of a novel heart failure risk tool: the Barcelona Bio-Heart Failure risk calculator (BCN Bio-HF calculator)," *PLoS One*, vol. 9, no. 1, article e85466, 2014.

[17] A. Bayes-Genis, M. de Antonio, A. Galán et al., "Combined use of high-sensitivity ST2 and NTproBNP to improve the prediction of death in heart failure," *European Journal of Heart Failure*, vol. 14, no. 1, pp. 32–38, 2012.

[18] R. V. Shah, A. A. Chen-Tournoux, M. H. Picard, R. R. J. van Kimmenade, and J. L. Januzzi, "Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acute dyspnea," *Circulation Heart Failure*, vol. 2, no. 4, pp. 311–319, 2009.

[19] M. J. Goolsby, "National Kidney Foundation guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification," *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, vol. 14, no. 6, pp. 238–242, 2002.

[20] KDIGO, "KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease," December 2017, https://www.theisn.org/education/education-topics/chronic-kidney-disease/item/839-kdigo-clinical-practice-guideline-for-the-evaluation-and-management-of-chronic-kidney-disease.

[21] A. S. Levey, L. A. Stevens, C. H. Schmid et al., "A new equation to estimate glomerular filtration rate," *Annals of Internal Medicine*, vol. 150, no. 9, pp. 604–612, 2009.

[22] J. L. Januzzi, D. Pascual-Figal, and L. B. Daniels, "ST2 testing for chronic heart failure therapy monitoring: the International ST2 Consensus Panel," *The American Journal of Cardiology*, vol. 115, no. 7, pp. 70B–75B, 2015.

[23] E. D. Unger, R. F. Dubin, R. Deo et al., "Association of chronic kidney disease with abnormal cardiac mechanics and adverse outcomes in patients with heart failure and preserved ejection fraction," *European Journal of Heart Failure*, vol. 18, no. 1, pp. 103–112, 2016.

[24] N. Bansal, A. Hyre Anderson, W. Yang et al., "High-sensitivity troponin T and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) and risk of incident heart failure in patients with CKD: the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 26, no. 4, pp. 946–956, 2015.

[25] S. Vickery, C. P. Price, R. I. John et al., "B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with CKD: relationship to renal function and left ventricular hypertrophy," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 46, no. 4, pp. 610–620, 2005.

[26] T. Tsutamoto, C. Kawahara, M. Yamaji et al., "Relationship between renal function and serum cardiac troponin T in patients with chronic heart failure," *European Journal of Heart Failure*, vol. 11, no. 7, pp. 653–658, 2009.

[27] R. Tagore, L. H. Ling, H. Yang, H.-Y. Daw, Y.-H. Chan, and S. K. Sethi, "Natriuretic peptides in chronic kidney disease," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 3, no. 6, pp. 1644–1651, 2008.

[28] C. R. deFilippi, S. L. Seliger, S. Maynard, and R. H. Christenson, "Impact of renal disease on natriuretic peptide testing for diagnosing decompensated heart failure and predicting mortality," *Clinical Chemistry*, vol. 53, no. 8, pp. 1511–1519, 2007.

[29] A. Bayes-Genis, E. Zamora, M. de Antonio et al., "Soluble ST2 serum concentration and renal function in heart failure," *Journal of Cardiac Failure*, vol. 19, no. 11, pp. 768–775, 2013.

[30] T. Mueller, A. Gegenhuber, G. Kronabethleitner, I. Leitner, M. Haltmayer, and B. Dieplinger, "Plasma concentrations of novel cardiac biomarkers before and after hemodialysis session," *Clinical Biochemistry*, vol. 48, no. 16-17, pp. 1163–1166, 2015.

[31] J. E. Ho, S.-J. Hwang, K. C. Wollert et al., "Biomarkers of cardiovascular stress and incident chronic kidney disease," *Clinical Chemistry*, vol. 59, no. 11, pp. 1613–1620, 2013.

[32] Y.-S. Bao, S.-P. Na, P. Zhang et al., "Characterization of interleukin-33 and soluble ST2 in serum and their association with disease severity in patients with chronic kidney disease," *Journal of Clinical Immunology*, vol. 32, no. 3, pp. 587–594, 2012.

[33] O. Gungor, H. U. Unal, A. Guclu et al., "IL-33 and ST2 levels in chronic kidney disease: associations with inflammation, vascular abnormalities, cardiovascular events, and survival," *PLoS One*, vol. 12, no. 6, article e0178939, 2017.

[34] C. W. Yancy, M. Jessup, B. Bozkurt et al., "2017 ACC/AHA/HFSA focused update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 70, no. 6, pp. 776–803, 2017.

[35] M.-K. Koivula, L. Risteli, and J. Risteli, "Measurement of aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP) in serum," *Clinical Biochemistry*, vol. 45, no. 12, pp. 920–927, 2012.

[36] B. Dieplinger and T. Mueller, "Soluble ST2 in heart failure," *Clinica Chimica Acta*, vol. 443, pp. 57–70, 2015.

[37] A. Bayes-Genis, M. de Antonio, J. Vila et al., "Head-to-head comparison of 2 myocardial fibrosis biomarkers for long-term heart failure risk stratification: ST2 versus galectin-3," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 63, no. 2, pp. 158–166, 2014.

[38] A.-S. Bargnoux, M. Morena, I. Jaussent et al., "A combined index of cardiac biomarkers as a risk factor for early cardiovascular mortality in hemodialysis patients," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 51, no. 9, pp. 1865–1874, 2013.

[39] M. T. Keddis, Z. el-Zoghby, B. Kaplan et al., "Soluble ST2 does not change cardiovascular risk prediction compared to cardiac troponin T in kidney transplant candidates," *PLoS One*, vol. 12, no. 7, article e0181123, 2017.

[40] A. Bayes-Genis, A. M. Richards, A. S. Maisel, C. Mueller, and B. Ky, "Multimarker testing with ST2 in chronic heart failure," *The American Journal of Cardiology*, vol. 115, no. 7, pp. 76B–80B, 2015.

[41] A. M. Dupuy, C. Curinier, N. Kuster et al., "Multi-marker strategy in heart failure: combination of ST2 and CRP predicts poor outcome," *PLoS One*, vol. 11, no. 6, article e0157159, 2016.

[42] A. M. Pello, C. Cristóbal, N. Tarín et al., "Differential profile in inflammatory and mineral metabolism biomarkers in patients with ischemic heart disease without classical coronary risk factors," *Journal of Cardiology*, vol. 66, no. 1, pp. 22–27, 2015.

[43] M. Morena, L. Patrier, I. Jaussent et al., "Reduced glomerular filtration rate, inflammation and HDL cholesterol as main determinants of superoxide production in non-dialysis chronic kidney disease patients," *Free Radical Research*, vol. 45, no. 6, pp. 735–745, 2011.

Discussion

La première conclusion de notre étude montre que sST2 est un marqueur indépendant de la fonction rénale pouvant être utilisé pour évaluer une atteinte cardiaque structurelle chez l'insuffisant rénal chronique. La dépendance de sST2 à la fonction rénale reste assez controversée, appuyée par de nombreuses études contradictoires dans la littérature. Récemment, l'étude menée par Tuegel *et al.* (225) montre une corrélation inverse entre sST2 et la fonction rénale à partir de 2 cohortes de patients atteints d'insuffisance rénale chronique (études C-PROBE et Seattle Kidney Study SKS). Cette corrélation reste toutefois modeste et plus faible que d'autres marqueurs de fibrose tels que GDF-15 et Galectine-3 (225). Une autre étude issue de ces mêmes cohortes révèle une absence d'association entre sST2 et dégradation de la fonction rénale contrairement à Gal-3, et une absence d'interaction entre sST2 et DFG à l'inclusion, comme Gal-3 (226). Actuellement, il existe très peu de données sur la valeur diagnostique de sST2 dans la dysfonction diastolique. L'équipe de Keddis *et al.* (227) montre une corrélation entre sST2 et l'hypertrophie du ventricule gauche, que nous confirmons dans notre étude. En revanche, pour une approche pronostique des évènements cardiaques majeurs chez ces patients, l'utilisation de ce marqueur seul ne permet pas de prédire le risque composite (décès et MACE) dans notre étude. Ces résultats sont confirmés par Keddis *et al.* (227), qui montre l'absence de prédiction de sST2 dans le risque composite chez l'IRC, comparé à la troponine T hautement sensible dans une population de patients ayant bénéficié d'une transplantation rénale. En revanche, l'addition de sST2 dans un score tel que le score de Barcelone, incluant d'autres paramètres biologiques (NT-proBNP et troponine T hautement sensible) ainsi

que des paramètres cliniques et la prise en compte d'un traitement antihypertenseur, permet de prédire le risque composite (MACE et décès) jusqu'à 3 ans dans notre étude. A notre connaissance, aucune donnée dans la littérature n'avait évalué l'intérêt pronostic de sST2 inclus dans un score clinico-biologique chez l'insuffisant rénal chronique sur le risque composite, ce score pouvant être utilisé dans la prédiction des événements cardiaques majeurs chez des patients connus pour être à risque élevé d'événements cardio-vasculaires.

Toutefois, ce travail pose des limites par son caractère monocentrique, et par l'absence de doppler tissulaire réalisé lors de l'inclusion des patients dans l'étude. Par conséquent, nous n'avons pas pu évaluer l'atteinte fonctionnelle cardiaque sur le ratio E/e'. Néanmoins, le caractère fonctionnel cardiaque a été évalué par le ratio E/A issu des données échocardiographiques.

Conclusion

Pour conclure, l'utilisation d'un score clinico-biologique dans l'évaluation pronostique des évènements cardiaques majeurs permettrait d'améliorer la prise en charge de la maladie rénale chronique et de prévenir ses complications.

Cette étude pose la question des mécanismes impliqués dans le processus de fibrose cardiaque au cours de l'insuffisance rénale chronique.

L'ensemble de ces remarques va permettre de poursuivre les investigations :

- sur les phénomènes impliqués dans le processus de fibrose cardiaque au cours de l'insuffisance rénale chronique observés chez le rat (présenté en objectif).

- sur la chronologie d'installation de l'atteinte cardiaque à partir de modèles animaux ayant développé une IRC (présenté en objectif).

Place de la transition endothélio-mésenchymateuse dans la fibrose cardiaque au cours de l'IRC et de l'obésité.

Contexte

La fibrose cardiaque (non cicatricielle) se définit par une expansion de l'interstitium causé par des dépôts protéiques de la matrice extracellulaire. Chez les patients présentant une insuffisance cardiaque, on observe un remodelage cardiaque avec une réduction de la compliance par expansion de la matrice extracellulaire dont les constituants sont essentiellement produits par les fibroblastes cardiaques à l'état activé et nommés myofibroblastes. Ces changements phénotypiques sont dus à des origines multiples. Parmi ces mécanismes, la transition endothélio-mésenchymateuse pourrait être une des voies impliquées dans le processus de fibrose. TGF-β est un médiateur central participant au processus de transition endothélio-mésenchymateuse et son implication maintiendrait ces phénomènes profibrosants.

Justification de l'étude

Les mécanismes de fibrose cardiaque impliqués dans la maladie rénale chronique restent non élucidés. En plus des facteurs de risque cardio-vasculaire traditionnels et de l'insuffisance rénale chronique associée à une forte incidence des complications cardio-vasculaires, d'autres facteurs de risque dont la relation causale directe est moindre ou aggravant le risque cardio-vasculaire sont identifiés. Il s'agit de la sédentarité, de l'obésité (IMC élevé avec obésité androïde), et du syndrome

métabolique. La relation entre diabète et néphropathie est très nette avec une progression vers l'insuffisance rénale terminale nécessitant une prise en charge fréquente par dialyse (plus de 20% des dialysés en Europe sont diabétiques, plus de 30% aux Etats-Unis) (228). Le processus de fibrose observé au cours de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée est associé à une mortalité plus élevée, une augmentation du taux d'hospitalisation et une élévation des évènements cardiaques (229–232). De plus, chez les diabétiques, l'expansion de l'espace interstitiel myocardique est associée à une mortalité élevée et des hospitalisations pour insuffisance cardiaque (233).

Dans ce contexte, nous avons évalué les altérations cardiaques dans un modèle animal présentant un syndrome métabolique sur lequel on induit secondairement une insuffisance rénale chronique. L'implication des marqueurs de fibrose étudiés dans notre cohorte de patients prédialysés, et la transition endothélio-mésenchymateuse dans le processus de fibrose cardiaque au cours de l'insuffisance rénale chronique, seront évalués.

Article

CARDIAC REMODELING ASSOCIATED WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE IS ENHANCED IN A RAT MODEL OF METABOLIC SYNDROME. PARTICIPATION OF MESENCHYMAL TRANSITION.

Maëlle PLAWECKI[1], Nathalie GAYRARD[2], Laura JEANSON[3], Anthony CHAUVIN[1], Anne-Dominique LAJOIX[3], Jean-Paul CRISTOL[1], Bernard JOVER[1]

[1]PHYMEDEXP, Université de Montpellier, INSERM, CNRS, Montpellier, France,

[2]RD Néphrologie, Montpellier, France

[3]BC2M, Université de Montpellier, Montpellier, France

Corresponding author:

Bernard Jover,

PhyMedExp,

IURC, 691 avenue doyen Giraud

34090 Montpellier, France

Tel: 33 4 11 75 98 92; Fax: 33 4 67 33 59 23

Email: bernard.jover@inserm.fr

Running title: Metabolic disease exacerbates CKD induced-cardiac remodeling.

Keywords: Chronic kidney disease, insulin resistance, obesity, cardiac fibrosis, mesenchymal transition.

Acronyms: CKD: chronic kidney disease; EndMT: endothelial to mesenchymal transition.

Competing Interests: The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Abstract

Background and Aims: Cardiac alteration due to chronic kidney disease is described by tissue fibrosis. This remodeling involves myofibroblasts of various origins, including epithelial or endothelial to mesenchymal transitions. The expansion of macrophages leads to a production of TGF-β1 who would maintain the profibrotic transition mechanisms. In addition, obesity and insulin resistance together or separately seem to exacerbate cardiovascular risk in chronic kidney disease (CKD).

The main objective of this study was to assess if pre-existing metabolic disease exacerbates CKD-induced cardiac alterations. In addition, we hypothesised that endothelial to mesenchymal transition participates in this enhancement of cardiac fibrosis.

Methods and Results: Rats fed cafeteria type diet for 6 months underwent a subtotal nephrectomy at 4 months. Cardiac fibrosis was evaluated by histology and qRT-PCR. Collagens and macrophages were quantified by immunohistochemistry. Endothelial to mesenchymal transitions were assessed by qRT-PCR (PECAM-1, VE-cadherin, α-SMA, nestin) and also TGF-β1. Rats fed with cafeteria type regimen were obese, hypertensive and insulin resistant. Cardiac fibrosis was predominant in CKD rats and was highly majored by cafeteria regimen. Collagen-1 and nestin expressions were higher in CKD rats, independently of regimen. In contrast, no difference in TGF-β1 expression was observed between groups.

Conclusion: We showed that rats already obese and insulin resistant had an enhanced cardiac alteration to a subsequent renal injury. Cardiac fibrosis process could be supported by a higher involvement of the endothelial to mesenchymal transition phenomenon.

Introduction

Diabetes and hypertension are the most common etiologies of chronic kidney diseases [1]. Cardiovascular disease is the leading cause of morbidity and mortality in CKD patient [2] and their prevalence increases with decreasing glomerular filtration rate [3]. Heart failure secondary to CKD define the type 4 cardiorenal syndrome [4]. Cardiomyocytes hypertrophy is a hallmark of cardiac remodeling in the early stages of cardiac alteration. This process, which is a major element involved in type 4 cardiorenal syndrome, induces the activation of cellular signals of metabolic pathways capable of increasing the production of extracellular matrix leading to fibrosis [5,6]. Interstitial or perivascular cardiac fibrosis is a deleterious phenomenon resulting from the predominance of collagen synthesis compared to its degradation. Accumulation of this fibrosis progressively leads to a loss of compliance of the myocardial wall and a lack of contraction. These phenomena conduce to the appearance of dysfunction and thus promote heart failure progression.

Excessive synthesis of extracellular matrix (ECM) is essentially caused by activated fibroblasts, named myofibroblasts [7]. These specialized fibroblasts are mesenchymal cell presenting a hybrid phenotype, between fibroblast and smooth muscle cell. There are characterized by a granular endoplasmic reticulum and a highly developed golgi apparatus related to a collagen turnover deregulation. Indeed, collagen precursors excess as well as signaling molecules that regulate interaction of the ECM with the parenchyma are observed [8]. On the other hand, these cells exhibit peripheral α-SMA myofilaments conferring them contractile properties [9], super adhesion type junctions allowing them to communicate, to synchronize their contraction and to form bonds with ECM. These characteristics lead to the tissue remodeling initiation [10]. Myofibroblasts origins are various and among them is the endothelio-mesenchymal transition (EndMT) [11]. Mainly induced by TGF-β, this transition process is associated with a phenotypic change of endothelial or epithelial cells and a cytoskeleton restructuration. Increased expression of mesenchymal markers such as α-SMA,

COLL1, fibronectin, vimentin and FSP-1 (fibroblast specific protein-1) is observed. At the same time, these cells lose their specific markers like PECAM-1 or VE-cadherin. These variations allow detecting the presence of endothelial or epithelial to mesenchymal transitions. Moreover, an immune and inflammatory response accompanied with macrophage infiltration is observed in the cardiac tissue [12]. This may lead to sustained production of various growth factors, including TGF-β [13], thus maintaining the profibrotic mechanisms.

Among the risk factors for cardiovascular diseases such as hypertension and diabetes, insulin resistance and obesity are also known to be major determinants of cardiovascular risk in CKD [14]. The incidence of cardiovascular risk factors and cardiovascular diseases also are higher in diabetic patients [15]. Obesity or occidental rich diet model increase cardiovascular risk factors and progression of CKD [16,17]. CKD is associated with a significant burden of cardiovascular disease, and several studies evaluated the association between metabolic disease, renal impairment and cardiovascular events. These results do not allow to establish or not if cardiovascular risk is enhanced with an insulin resistance phenotype in the CKD population [18]. Heart failure is one of the cardiovascular risk factors consecutive to CKD and involves several mechanisms such as left ventricular hypertrophy, cardiac fibrosis and inflammation [19]. Only few studies reported that insulin-resistance is positively correlated to cardiac hypertrophy in a population of CKD patients [18]. To date, no study evaluated if cardiac remodeling is enhanced in patients presenting several chronic diseases whose prevalence is high in Western countries.

To the best of our knowledge, there is no study evaluating if cardiac fibrosis associated to CKD is worsened in a pre-existing insulin-resistant profile. Therefore, the main objective of the present study was to assess tissue and cell damages in the cardiac muscle resulting from the development of CKD in rats with established obesity and insulin resistance. In addition, we hypothesized that endothelial to mesenchymal transitions (EndMT) processes contribute to cardiac fibrosis formation.

Methods

Ethics

The present experiment complied with the European and French laws (Agreement D34-172-25 and 1562-18348) and conform to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institute of health (National academies Press US, 8th edition, 2011). Rats were housed in a climate controlled conditions with a 12h light/dark cycle in a room temperature.

Animal model

Two groups of 34 male Wistar rats (Charles River France) were fed standard diet (SAFE A04) or a so-called "cafeteria" diet for 6 months. The cafeteria diet consists of a range of appetizing foods intended for human consumption, selected for their high energy, fat, sugar and salt content (e.g. soda, lard, cake, potato crisps, sweets, cheese). It is very representative of the food excesses observed in the western diet. After 4 months, half of the animals in each diet group (standard or cafeteria) were subjected to a reduction in renal mass by right nephrectomy and ligation of two left renal artery branches, the inferior and superior branches leaving only the posterior branch intact (subtotal nephrectomy, SNx or 5/6 nephrectomy).

At the end of the experiment (6 months), rats were anaesthetized (isoflurane 2%) and a catheter was inserted into the right carotid artery for arterial pressure measurement and blood sampling. Then, the heart, left kidney and epididymal adipose tissue were removed, weighed, rinsed and stored at -80°C. The left ventricle (LV) including septum was weighted separately and cut into several pieces. Arterial blood was collected in heparinized sample, centrifuged at 4°C and plasma was stored at -80°C.

Biochemicals analysis

Three days before the end of the protocol, rats were fasted for 5 hours and blood was taken from the tail artery for glucose and insulin measurement. Glucose concentration was measured by blood glucose meter (Freestyle Optium). Insulin concentration was determined by ELISA

(ultrasensitive rat insulin, Mercodia). The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated using the formula: HOMA-IR = (fasting blood glucose in mg/dl*fasting plasma insulin in mU/ml)/2 430 [20].

Plasma creatinine level was determined by colorimetric assay (Cobas 8000 analyser, Roche).

Histochemical and immunohistochemical staining

For cardiac collagen staining, one piece of the LV was formalin-fixed, paraffin-embedded, and 3-5 µm slices were cut for histological analysis. After haematoxylin-eosin coloration, the collagen volume fraction was determined by Sirius red staining, as previously described [21]. CD68 immunohistochemical staining was used as a marker of rat macrophages and determined in LV tissues, as previously described [22]. At least ten fields per slice were quantified (Image J, NIH) to give one value per rat.

Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR

Immediately after removal and weighing, another piece of the left ventricle was frozen in « RNA later » solution (Life Technologies). Tissues were then dissociated in RLT buffer using a FastPrep Homogeneizer (MP Biomedicals). Reverse transcription reactions were performed on 500 ng total RNA using a reverse transcription Takara Kit (Takara Bio Europe) and real-time quantitative PCR was done with the use of the Lightcycler 480 II real time PCR instrument (Roche). Primer pairs were generated using NCBI primer design application and were designed to span an exon-exon junction (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium). Forward and reverse primers sequences (Table 1) were used at a 60°C annealing temperature. Data on gene expression were normalized according to RPLP0 housekeeping gene expression.

Statistics

Quantitative data were expressed as mean +/-SEM. Statistical analysis were performed using two factor analysis of variance (ANOVA) and post hoc comparisons were performed by means

of Fisher's Protected Least Significant Differences (PLSD) test using STATVIEW software. A *p* value of < 0.05 was considered significant

Results

Influence of cafeteria regimen and renal mass reduction on metabolic parameters.

The increase in body weight was more marked in the cafeteria group from week 6. The difference was maintained after renal mass reduction despite the loss of weight induced by the surgery (Fig 1A). Compared to their respective standard group, final body weight was significantly higher in rats fed cafeteria diet, irrespective of the renal mass reduction (Figure 1B). This increase in body mass was associated with elevated adiposity, also independently of the renal mass reduction (Fig 1C).

As reported in Table 2, elevated creatinine levels were observed in rats with renal mass reduction. As expected, insulin level and HOMA-IR increased in rats fed cafeteria diet, indicating a diet-related insulin resistance phenomenon. Subtotal nephrectomy tended to lower, and to the same extent, plasma insulin and the HOMA-IR, whatever the diet. No modification of blood calcium and phosphorus levels following renal mass reduction was observed. Cafeteria diet was associated with an increase in left kidney weight and more clearly when indexed to tibia length in rats which have not undergone surgery (intact rats). The usual compensatory hypertrophy of the remaining left kidney was observed after the 5/6th nephrectomy, and as observed in intact rats, it was more marked in cafeteria fed rats.

Cardiac morphological and histological alterations following cafeteria regimen and renal mass reduction

Regarding cardiac parameters, we observe that heart weight indexed to tibia length was higher in cafeteria rats with or without subtotal nephrectomy (Table 2). The cardiac hypertrophy was

mainly due to left ventricular hypertrophy. Interestingly, the rise in heart weight index in nephrectomised rats was significantly enhanced in rats fed cafeteria diet when compared to those fed standard rat chow. Mean arterial pressure and pulsed pressure were not affected by the cafeteria diet in intact rats. Both pressures were elevated in nephrectomised groups and the rise was lower in rats fed the cafeteria diet (Table 2).

As illustrated in Figure 2 (A-B), Sirius red staining of the left ventricle was significantly higher in cafeteria fed rats without renal mass reduction (intact rats). Subtotal nephrectomy increased the area of Sirius red staining in cafeteria fed rats whereas it devoid of significant effect in standard chow fed rats. Of note, Sirius red staining area was also significantly larger in SNx fed cafeteria diet compared to SNx rats on the standard chow.

Concerning markers of inflammation, we observed an elevation of CD68 staining only in rats fed cafeteria diet that have undergone renal mass reduction (Fig 2 C-D).

mRNA Expression of markers of cardiac fibrosis

Markers of cardiac fibrosis expression were shown in Fig 3A-B. We observed a tendency to elevation of Gal-3 and GDF-15 following high fat diet, and also after nephrectomy (Fig 3A-3B). As reported in Figure 3C, a slight decrease of IL-33 was observed following nephrectomy, independently of regimen (no significant). Contrastingly, we did not observed elevation of ST2L or sST2 (Fig 3D-3E).

mRNA Expression of EndMT markers

We observed an increase of collagen 1 and nestin mRNA expression levels in rats which underwent renal mass reduction, independently of regimen (Fig 4B-C). Otherwise, we did not observe variations of mRNA expression levels influenced by cafeteria diet or renal mass reduction for the other markers of EndMT (Table 3) and TGF-β1 (Fig 4A).

Discussion

In this study we evaluated if cardiac remodeling associated with CKD is worsened when metabolic alterations are already present in rat model of metabolic syndrome. We show that cardiac fibrosis and inflammation associated with CKD are enhanced in our model of metabolic dysfunction profile. We also suggest that EndMT phenomenon is implied in cardiac fibrosis process.

In the present model, the cafeteria type diet administered was rich in fat (lard), sugar (soda) and also in salt (cheese). This type of diet closely reproduces western diet type and obviously led to obesity and insulin resistance in the present rats as reported in Wistar rats [23]. To obtain a chronic kidney disease, subtotal nephrectomy was realized and as expected, creatinine level was elevated. Although significance level was not achieved, the rise of plasma creatinine induced by SNx was two-fold higher in rats fed cafeteria diet compared to those on regular rat chow. In patients who had undergone unilateral nephrectomy, proteinuria and renal insufficiency were mostly observed in obese patients [24]. Collectively, these observations confirm that pre-existing obesity and insulin resistance may worsen the deterioration of renal function in chronic kidney disease.

Besides its impact of renal function, metabolic disturbance per se may also affect cardiac structure. Associated with metabolic changes, the cafeteria diet resulted in cardiac hypertrophy even in absence of renal mass reduction, thus suggesting a direct effect of the diet. This is in accordance with the increase of LV mass reported in mice fed high fat diet [25] and in Wistar rats fed hypercaloric western-type diet, a regime similar to that used in the present study [26]. On the other hand, heart weight was increased in rats with subtotal nephrectomy as already reported in children [27] and in rats [28]. Yet, the influence of a pre-existing metabolic syndrome on the cardiac alterations consecutively observed in CKD has not been investigated and it represents the main objective of the present study. Rats fed cafeteria diet with higher

body weight and HOMA-IR exhibited a more marked increase in heart weight index when submitted to a subsequent impairment of renal function. Taken together, our results confirm that Western-type diet, i.e. insulin resistance and obesity, induces per se a cardiac remodeling and demonstrate that it aggravates the impact of CKD on heart structure.

Similarly, cardiac fibrosis evidenced by Sirius red staining was enhanced by subtotal nephrectomy (non-significant) or the cafeteria diet (significantly) by themselves and further increased when renal failure occurred in presence of metabolic disturbances. Fibrosis contributes significantly to cardiac remodeling, but promoters involved in these phenomena are still unclear. The ST2L/IL-33 axis showed anti-inflammatory and cardioprotective effects by reducing cardiac hypertrophy and myocardial injury [29], whereas the circulating soluble form of ST2 (sST2) acts as a decoy receptor and has emerged as a prognostic biomarker in patients with heart failure and chronic kidney disease [30,31]. Furthermore, sST2 is increased in severe obesity and plays an important role in the vascular remodeling associated with obesity [32]. In the present study, ST2L and sST2 expressions were not affected by the regime or renal mass reduction, thus suggesting that they are not involved at this stage. In contrast, the expression of IL-33 appears to be diminished after subtotal nephrectomy and the reduction seems to be more pronounced in rats previously fed a rich diet. In contrast, Galectin-3 (Gal-3), a member of the lectin family with profibrotic properties [33,34] seems to be slightly higher after a rich diet and after subtotal nephrectomy. Therefore, the more marked fibrosis in CKD rats previously fed a Western type diet may also result from imbalance between pro- and anti-fibrotic cardiokines

In the present model of obesity and insulin resistance, an elevation of arterial pressure does not appear to be a major determinant of cardiac hypertrophy and fibrosis. Conversely, a rise in arterial pressure accompanied cardiac hypertrophy and fibrosis in CKD rats on regular chow. Yet, enhancement of cardiac alterations observed in cafeteria fed rats submitted to later subtotal nephrectomy were not related to an additional rise in arterial pressure. It can be therefore concluded that the worsening of cardiac alterations seen when both pathologies are

present is not predominantly due to an increase of arterial hypertension. Inflammation is another factor that could promote cardiac fibrosis. Indeed, we observe a high CD68 staining, indicator of macrophages infiltrates in CKD rats fed cafeteria type diet. In addition, expression of GDF-15, an inflammatory factor of the TGF-β1 superfamily [35], had a tendency to increase after combined rich diet feeding and subtotal nephrectomy.

TGF-β1 [36] is one of the factors with aldosterone [37] implicated in cardiac fibrosis. Expressions of the aldosterone synthase and mineralocorticoid receptor were not investigated in the present experiment. In contrast, TGF-β1 expression was determined since hyperinsulinemia stimulates its overexpression by cardiac fibroblasts, thus leading to fibrosis [38]. In our study, no increase of TGF-β1 expression was observed in CKD rats, independently of the diet, a finding that does not favour its role in cardiac fibrosis in this situation. The absence of implication of TGF-β 1 pathway remains to be confirmed and regulatory phenomena that may interfere after its expression should be investigated. Of note, BMP-7 may oppose TGF-beta-induced fibrogenesis [39], and administration of exogenous BMP-7 inhibits cardiac fibrosis progression [40]. Since our results were collected at the end of 6 months of cafeteria diet and 2 months of renal mass reduction, an earlier stimulation of TGF-β1 cannot be excluded and may have participated in cardiac alterations. Taken together, our results suggest that cardiac inflammation associated with a chronic kidney disease is aggravated in presence of obesity and insulin resistance phenotype.

The predominant cellular mediators of cardiac fibrosis are thought to be myofibroblasts. The origin of these myofibroblasts may result from fibroblastic cells transdifferentiated from cells of endothelial origin. In our study, we reported an elevation of expression of collagen 1 and nestin in CKD rats, independently of the diet. EndMT is a complex process and results a reduction in cell junctions objectified by a down regulation of endothelial markers, such as VE-cadherin and PECAM-1, and an increase in cell motility and expression of mesenchyme markers, such as

α-SMA and FSP-1 [41]. EndMT plays an important role in development, regeneration and pathological processes, such as fibrosis and tumour stroma formation. Previous studies reported that myofibroblasts involved in reparative and reactive fibrosis are characterized by nestin expression [42,43]. Nestin is an intermediate filament protein that could form heterodimers with other intermediate filament proteins including vimentin and desmin [44]. Several studies reported that nestin was highly expressed during embryogenesis and downregulated or absent in the adult rat [45,46]. Other studies reported that heart may contain nestin resident progenitor cell population implicated in cardiac remodeling and/or regeneration [47]. Nestin rather α-SMA expression may represent a more appropriated marker of activated fibroblast during reactive fibrosis [48]. Indeed, the preponderance of collagen type $1^{(+)}$ cells coexpressing nestin rather than α-SMA suggests that α-SMA expression was not required to initiate the reactive fibrotic response [42]. TGF-β1 is also known to stimulate the myofibroblast transdifferentiation [49]. Despite the lack of increase at the end of our protocol, its participation to EndMT in the initial phase cannot be excluded. According to the results obtained and to the best of our knowledge, we can suggest for the first time that EndMT phenomenon is implied in cardiac fibrosis process in CKD; however, these results have to be confirmed, especially in a kinetic study. To resume, our study shows that a pre-existing metabolic disease amplifies CKD induced-cardiac remodeling and suggests that endothelial to mesenchymal transition phenomena is implied in the cardiac fibrosis process.

Competing Interests: The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

1. Jha, V.; Garcia-Garcia, G.; Iseki, K.; Li, Z.; Naicker, S.; Plattner, B.; Saran, R.; Wang, A.Y.-M.; Yang, C.-W. Chronic Kidney Disease: Global Dimension and Perspectives. *Lancet* 2013, *382*, 260–272, doi:10.1016/S0140-6736(13)60687-X.
2. Go, A.S.; Chertow, G.M.; Fan, D.; McCulloch, C.E.; Hsu, C. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *N Engl J Med* 2004, *351*, 1296–1305, doi:10.1056/NEJMoa041031.
3. Stevens, L.A.; Li, S.; Wang, C.; Huang, C.; Becker, B.N.; Bomback, A.S.; Brown, W.W.; Burrows, N.R.; Jurkovitz, C.T.; McFarlane, S.I.; et al. Prevalence of CKD and Comorbid Illness in Elderly Patients in the United States: Results from the Kidney Early Evaluation Program (KEEP). *Am. J. Kidney Dis.* 2010, *55*, S23-33, doi:10.1053/j.ajkd.2009.09.035.
4. Ronco, C.; Haapio, M.; House, A.A.; Anavekar, N.; Bellomo, R. Cardiorenal Syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2008, *52*, 1527–1539, doi:10.1016/j.jacc.2008.07.051.
5. Nishida, K.; Kyoi, S.; Yamaguchi, O.; Sadoshima, J.; Otsu, K. The Role of Autophagy in the Heart. *Cell Death Differ.* 2009, *16*, 31–38, doi:10.1038/cdd.2008.163.
6. Dorn, G.W. Apoptotic and Non-Apoptotic Programmed Cardiomyocyte Death in Ventricular Remodelling. *Cardiovasc. Res.* 2009, *81*, 465–473, doi:10.1093/cvr/cvn243.
7. Krenning, G.; Zeisberg, E.M.; Kalluri, R. The Origin of Fibroblasts and Mechanism of Cardiac Fibrosis. *Journal of Cellular Physiology* 2010, *225*, 631–637, doi:10.1002/jcp.22322.
8. López, B.; González, A.; Díez, J. Circulating Biomarkers of Collagen Metabolism in Cardiac Diseases. *Circulation* 2010, *121*, 1645–1654, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.912774.
9. Sun, Y.; Kiani, M.F.; Postlethwaite, A.E.; Weber, K.T. Infarct Scar as Living Tissue. *Basic Research in Cardiology* 2002, *97*, 343–347, doi:10.1007/s00395-002-0365-8.
10. Hinz, B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *The Journal of Investigative Dermatology* 2007, *127*, 526–537, doi:10.1038/sj.jid.5700613.
11. Piera-Velazquez, S.; Jimenez, S.A. Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases. *Physiol Rev* 2019, *99*, 1281–1324, doi:10.1152/physrev.00021.2018.
12. Jover, B.; Reynes, C.; Rugale, C.; Reboul, C.; Jeanson, L.; Tournier, M.; Lajoix, A.D.; Desmetz, C. Sodium Restriction Modulates Innate Immunity and Prevents Cardiac Remodeling in a Rat Model of Metabolic Syndrome. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017, *1863*, 1568–1574, doi:10.1016/j.bbadis.2017.02.026.
13. Leask, A. Getting to the Heart of the Matter: New Insights into Cardiac Fibrosis. *Circ Res* 2015, *116*, 1269–1276, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305381.

14. Parikh, N.I.; Hwang, S.-J.; Larson, M.G.; Meigs, J.B.; Levy, D.; Fox, C.S. Cardiovascular Disease Risk Factors in Chronic Kidney Disease: Overall Burden and Rates of Treatment and Control. *Archives of Internal Medicine* 2006, *166*, 1884–1891, doi:10.1001/archinte.166.17.1884.
15. Kannel, W.B.; McGee, D.L. Diabetes and Cardiovascular Disease. The Framingham Study. *JAMA* 1979, *241*, 2035–2038, doi:10.1001/jama.241.19.2035.
16. Muga, M.A.; Owili, P.O.; Hsu, C.-Y.; Rau, H.-H.; Chao, J.C.-J. Association between Dietary Patterns and Cardiovascular Risk Factors among Middle-Aged and Elderly Adults in Taiwan: A Population-Based Study from 2003 to 2012. *PLoS One* 2016, *11*, e0157745, doi:10.1371/journal.pone.0157745.
17. Kurniawan, A.L.; Hsu, C.-Y.; Rau, H.-H.; Lin, L.-Y.; Chao, J.C.-J. Association of Kidney Function-Related Dietary Pattern, Weight Status, and Cardiovascular Risk Factors with Severity of Impaired Kidney Function in Middle-Aged and Older Adults with Chronic Kidney Disease: A Cross-Sectional Population Study. *Nutrition Journal* 2019, *18*, 27, doi:10.1186/s12937-019-0452-4.
18. Spoto, B.; Pisano, A.; Zoccali, C. Insulin Resistance in Chronic Kidney Disease: A Systematic Review. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 2016, *311*, F1087–F1108, doi:10.1152/ajprenal.00340.2016.
19. Kaesler, N.; Babler, A.; Floege, J.; Kramann, R. Cardiac Remodeling in Chronic Kidney Disease. *Toxins (Basel)* 2020, *12*, doi:10.3390/toxins12030161.
20. Cacho, J.; Sevillano, J.; de Castro, J.; Herrera, E.; Ramos, M.P. Validation of Simple Indexes to Assess Insulin Sensitivity during Pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley Rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008, *295*, E1269-1276, doi:10.1152/ajpendo.90207.2008.
21. Cordaillat, M.; Rugale, C.; Casellas, D.; Mimran, A.; Jover, B. Cardiorenal Abnormalities Associated with High Sodium Intake: Correction by Spironolactone in Rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, *289*, R1137-1143, doi:10.1152/ajpregu.00154.2005.
22. Oudot, C.; Lajoix, A.D.; Jover, B.; Rugale, C. Dietary Sodium Restriction Prevents Kidney Damage in High Fructose-Fed Rats. *Kidney Int* 2013, *83*, 674–683, doi:10.1038/ki.2012.478.
23. Johnson, A.R.; Wilkerson, M.D.; Sampey, B.P.; Troester, M.A.; Hayes, D.N.; Makowski, L. Cafeteria Diet-Induced Obesity Causes Oxidative Damage in White Adipose. *Biochem Biophys Res Commun* 2016, *473*, 545–550, doi:10.1016/j.bbrc.2016.03.113.
24. Praga, M.; Hernández, E.; Herrero, J.C.; Morales, E.; Revilla, Y.; Díaz-González, R.; Rodicio, J.L. Influence of Obesity on the Appearance of Proteinuria and Renal Insufficiency after Unilateral Nephrectomy. *Kidney Int* 2000, *58*, 2111–2118, doi:10.1111/j.1523-1755.2000.00384.x.

25. Ceylan-Isik, A.F.; Kandadi, M.R.; Xu, X.; Hua, Y.; Chicco, A.J.; Ren, J.; Nair, S. Apelin Administration Ameliorates High Fat Diet-Induced Cardiac Hypertrophy and Contractile Dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 2013, *63*, 4–13, doi:10.1016/j.yjmcc.2013.07.002.
26. Gonçalves, N.; Silva, A.F.; Rodrigues, P.G.; Correia, E.; Moura, C.; Eloy, C.; Roncon-Albuquerque, R.; Falcão-Pires, I.; Leite-Moreira, A.F. Early Cardiac Changes Induced by a Hypercaloric Western-Type Diet in "Subclinical" Obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016, *310*, H655-666, doi:10.1152/ajpheart.00684.2015.
27. Mitsnefes, M.M.; Betoko, A.; Schneider, M.F.; Salusky, I.B.; Wolf, M.S.; Jüppner, H.; Warady, B.A.; Furth, S.L.; Portale, A.A. FGF23 and Left Ventricular Hypertrophy in Children with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018, *13*, 45–52, doi:10.2215/CJN.02110217.
28. Lin, Y.-P.; Yu, W.-C.; Hsu, M.-E.; Tsai, H.-C.; Liao, C.-C.; Lin, C.-H. Comparative Proteomic Analysis of Rat Left Ventricle in a Subtotal Nephrectomy Model. *J Chin Med Assoc* 2015, *78*, 218–228, doi:10.1016/j.jcma.2014.08.016.
29. Kakkar, R.; Lee, R.T. The IL-33/ST2 Pathway: Therapeutic Target and Novel Biomarker. *Nat Rev Drug Discov* 2008, *7*, 827–840, doi:10.1038/nrd2660.
30. Bayes-Genis, A.; de Antonio, M.; Galán, A.; Sanz, H.; Urrutia, A.; Cabanes, R.; Cano, L.; González, B.; Díez, C.; Pascual, T.; et al. Combined Use of High-Sensitivity ST2 and NTproBNP to Improve the Prediction of Death in Heart Failure. *Eur J Heart Fail* 2012, *14*, 32–38, doi:10.1093/eurjhf/hfr156.
31. Plawecki, M.; Morena, M.; Kuster, N.; Chenine, L.; Leray-Moragues, H.; Jover, B.; Fesler, P.; Lotierzo, M.; Dupuy, A.-M.; Klouche, K.; et al. SST2 as a New Biomarker of Chronic Kidney Disease-Induced Cardiac Remodeling: Impact on Risk Prediction. *Mediators Inflamm* 2018, *2018*, 3952526, doi:10.1155/2018/3952526.
32. Martínez-Martínez, E.; Miana, M.; Jurado-López, R.; Rousseau, E.; Rossignol, P.; Zannad, F.; Cachofeiro, V.; López-Andrés, N. A Role for Soluble ST2 in Vascular Remodeling Associated with Obesity in Rats. *PLoS One* 2013, *8*, e79176, doi:10.1371/journal.pone.0079176.
33. Ochieng, J.; Furtak, V.; Lukyanov, P. Extracellular Functions of Galectin-3. *Glycoconj J* 2002, *19*, 527–535, doi:10.1023/B:GLYC.0000014082.99675.2f.
34. Sharma, U.C.; Pokharel, S.; van Brakel, T.J.; van Berlo, J.H.; Cleutjens, J.P.M.; Schroen, B.; André, S.; Crijns, H.J.G.M.; Gabius, H.-J.; Maessen, J.; et al. Galectin-3 Marks Activated Macrophages in Failure-Prone Hypertrophied Hearts and Contributes to Cardiac Dysfunction. *Circulation* 2004, *110*, 3121–3128, doi:10.1161/01.CIR.0000147181.65298.4D.
35. Stahrenberg, R.; Edelmann, F.; Mende, M.; Kockskämper, A.; Düngen, H.-D.; Lüers, C.; Binder, L.; Herrmann-Lingen, C.; Gelbrich, G.; Hasenfuss, G.; et al. The Novel Biomarker

Growth Differentiation Factor 15 in Heart Failure with Normal Ejection Fraction. *Eur J Heart Fail* 2010, *12*, 1309–1316, doi:10.1093/eurjhf/hfq151.

36. Khalil, H.; Kanisicak, O.; Prasad, V.; Correll, R.N.; Fu, X.; Schips, T.; Vagnozzi, R.J.; Liu, R.; Huynh, T.; Lee, S.-J.; et al. Fibroblast-Specific TGF-β-Smad2/3 Signaling Underlies Cardiac Fibrosis. *J Clin Invest* 2017, *127*, 3770–3783, doi:10.1172/JCI94753.
37. Azibani, F.; Fazal, L.; Chatziantoniou, C.; Samuel, J.-L.; Delcayre, C. Aldosterone Mediates Cardiac Fibrosis in the Setting of Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2013, *15*, 395–400, doi:10.1007/s11906-013-0354-3.
38. Mizushige, K.; Yao, L.; Noma, T.; Kiyomoto, H.; Yu, Y.; Hosomi, N.; Ohmori, K.; Matsuo, H. Alteration in Left Ventricular Diastolic Filling and Accumulation of Myocardial Collagen at Insulin-Resistant Prediabetic Stage of a Type II Diabetic Rat Model. *Circulation* 2000, *101*, 899–907, doi:10.1161/01.cir.101.8.899.
39. Weiskirchen, R.; Meurer, S.K. BMP-7 Counteracting TGF-Beta1 Activities in Organ Fibrosis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2013, *18*, 1407–1434, doi:10.2741/4189.
40. Zeisberg, E.M.; Tarnavski, O.; Zeisberg, M.; Dorfman, A.L.; McMullen, J.R.; Gustafsson, E.; Chandraker, A.; Yuan, X.; Pu, W.T.; Roberts, A.B.; et al. Endothelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to Cardiac Fibrosis. *Nature Medicine* 2007, *13*, 952–961, doi:10.1038/nm1613.
41. van Meeteren, L.A.; ten Dijke, P. Regulation of Endothelial Cell Plasticity by TGF-β. *Cell Tissue Res* 2012, *347*, 177–186, doi:10.1007/s00441-011-1222-6.
42. Chabot, A.; Hertig, V.; Boscher, E.; Nguyen, Q.T.; Boivin, B.; Chebli, J.; Bissonnette, L.; Villeneuve, L.; Brochiero, E.; Dupuis, J.; et al. Endothelial and Epithelial Cell Transition to a Mesenchymal Phenotype Was Delineated by Nestin Expression. *J Cell Physiol* 2016, *231*, 1601–1610, doi:10.1002/jcp.25257.
43. Béguin, P.C.; Gosselin, H.; Mamarbachi, M.; Calderone, A. Nestin Expression Is Lost in Ventricular Fibroblasts during Postnatal Development of the Rat Heart and Re-Expressed in Scar Myofibroblasts. *J Cell Physiol* 2012, *227*, 813–820, doi:10.1002/jcp.22794.
44. Wiese, C.; Rolletschek, A.; Kania, G.; Blyszczuk, P.; Tarasov, K.V.; Tarasova, Y.; Wersto, R.P.; Boheler, K.R.; Wobus, A.M. Nestin Expression--a Property of Multi-Lineage Progenitor Cells? *Cell Mol Life Sci* 2004, *61*, 2510–2522, doi:10.1007/s00018-004-4144-6.
45. Sejersen, T.; Lendahl, U. Transient Expression of the Intermediate Filament Nestin during Skeletal Muscle Development. *J Cell Sci* 1993, *106 (Pt 4)*, 1291–1300.
46. Oikawa, H.; Hayashi, K.; Maesawa, C.; Masuda, T.; Sobue, K. Expression Profiles of Nestin in Vascular Smooth Muscle Cells in Vivo and in Vitro. *Exp Cell Res* 2010, *316*, 940–950, doi:10.1016/j.yexcr.2009.10.025.

47. Quaini, F.; Urbanek, K.; Beltrami, A.P.; Finato, N.; Beltrami, C.A.; Nadal-Ginard, B.; Kajstura, J.; Leri, A.; Anversa, P. Chimerism of the Transplanted Heart. *N Engl J Med* 2002, *346*, 5–15, doi:10.1056/NEJMoa012081.
48. Hertig, V.; Tardif, K.; Meus, M.A.; Duquette, N.; Villeneuve, L.; Toussaint, F.; Ledoux, J.; Calderone, A. Nestin Expression Is Upregulated in the Fibrotic Rat Heart and Is Localized in Collagen-Expressing Mesenchymal Cells and Interstitial CD31(+)- Cells. *PLoS One* 2017, *12*, e0176147, doi:10.1371/journal.pone.0176147.
49. Sappino, A.P.; Schürch, W.; Gabbiani, G. Differentiation Repertoire of Fibroblastic Cells: Expression of Cytoskeletal Proteins as Marker of Phenotypic Modulations. *Lab Invest* 1990, *63*, 144–161.

Table 1: primer pairs used for qPCR

Name	Forward primer	Reverse primer
CD31 (PECAM)	5'- CCTTCTGCTCTGTTCAAGCCT-3'	5'- GAGAGGTGGTGCTGACATCC-3'
COLL1A1	5'- GACTGTCCCAACCCCCAAAA-3'	5'- TGGGTCCCTCGACTCCTATG-3'
Elastin	5'- GGAAAGTTCCTGGTGTCGGT-3'	5'- AACCTTGGCCTTGACTCCTG-3'
FSP1	5'- TCAGCACTTCCTCTCTCTTGG-3'	5'- TCTGTCCTTCTCCCCAGGAA-3'
Gal3	5'- AGCCCAACGCAAACAGTATC-3'	5'- GGCTTCAACCAGGACCTGTA-3'
GDF-15	5'- TGTTCCTGCTGCTCTTGCTG-3'	5'-TCGCACCTCTGGACTGAGTATC-3'
IL33	5'- CCCTGAGCACATACAACGACC-3'	5'- CACCATCAGCTTCTTCCCATC-3'
Nestin	5'- TTGGCTTTCTGGACCCCAAG-3'	5'- GGGCTCTGACCTCTGCATTT-3'
RPLPO	5'- CACTGGCTGAAAAGGTCAAGG-3'	5'- GACTTGGTGTGAGGGGCTTA-3'
sST2	5'- CGTTACCTTCCTGTGCCATT-3'	5'- CTCCATTTGCCAATCATGTG-3'
ST2L	5'- ATGATTGGCAAATGGAGAAT-3'	5'- TTCTAGACCCCAGGATGTTT-3'
TGF-β1	5'- GACCGCAACAACGCAATCT-3'	5'- GACAGCCACTCAGGCGTATC-3'
VE-Cadherin (CADH5)	5'- TAGGCAAGATCAAGTCAAGCGT-3'	5'- AGTCTCCAGGTTTTCGCCAG-3'
Vimentin	5'- TGCGGCTGCGAGAAAAATTG-3'	5'- GGTCAAGACGTGCCAGAGAA-3'
α-SMA	5'- CCGGGACTAAGACGGGAATC-3'	5'- TTGTCACACACCAAGGCAGT-3'

Table 2. Metabolic parameters, organs weight and blood pressure after 6 months of Standard or Cafeteria feeding without (Intact) or with later (at 4 months) subtotal nephrectomy (SNx).

Diet Surgery	**Standard** **Intact**	**Standard** **SNx**	**Cafeteria** **Intact**	**Cafeteria** **SNx**
Plasma creatinine µmol/L	34.2 ± 5.1	54.0 ± 7.0*	31.7 ± 1.2	70.5 ± 10.3*
Plasma calcium	2.40 ± 0.05	2.57 ± 0.04	2.38 ± 0.05	2.56 ± 0.10
Plasma phosphorus	1.60 ± 0.06	1.58 ± 0.09	1.57 ± 0.04	1.80 ± 0.25
Glycaemia mg/dL	90 ± 2	94 ± 2	95 ± 2	91 ± 3
Insulin mU/L	92 ± 17	66 ± 22	177 ± 13†	112 ± 19*†
HOMA-IR	3.3 ± 0.8	2.6 ± 1.0	6.9 ± 0.6†	4.4 ± 0.7*†
Final Body Weight g	527 ± 17	500 ± 35	610 ± 13*	539 ± 23*†
Left kidney Wt mg	1250 ± 34	1477 ± 82	1332 ± 34	1833 ± 160*†
Left kidney Wt index $mg.cm^{-1}$	290 ± 7	341 ± 20	321 ± 10 †	444 ± 43*†
Heart Wt mg	1093 ± 45	1285 ± 49	1188 ± 30	1450 ± 61*
Heart Wt index $mg.cm^{-1}$	254 ± 10	297 ± 12	286 ± 8†	353 ± 17*†
Left ventricular Wt mg	793 ± 37	972 ± 34*	868 ± 22	1067 ± 48*
LV Wt Index $mg.cm^{-1}$	184 ± 9	224 ± 8*	209 ± 6	260 ± 13*
RV Wt index $mg.cm^{-1}$	43 ± 1	47 ± 2	49 ± 2	54 ± 2*
Tibia length cm	4.30 ± 0.04	4.33 ± 0.03	4.16 ± 0.04	4.12 ± 0.04†
Mean Arterial Pressure mmHg	106 ± 10	139 ± 24*	105 ± 6	114 ± 9†
Pulse Pressure mmHg	33 ± 2	54 ± 4*	37 ± 3	42 ± 3†

HOMA-IR: homeostatic model assessment for insulin resistance. Wt: weight. LV: left ventricle. RV:right ventricle. MAP: Mean arterial pressure. * indicates P<0.05 vs intact group in the same

diet (SNx effect); † indicates P<0.05 vs Standard group with the same renal surgery (diet effect).

Table 3. mRNA expression levels of various markers of EndMT after 6 months of Standard or Cafeteria feeding without (Intact) or with later (at 4 months) subtotal nephrectomy (SNx).

Diet Surgery	**Standard** **Intact**	**Standard** **SNx**	**Cafeteria** **Intact**	**Cafeteria** **SNx**
Vimentin	0.05978 ± 0.00585325	0.04881 ± 0.00172646	0.05204 ± 0.00673197	0.05637 ± 0.060558286
Elastin	0.00266 ± 0.00028775	0.00291 ± 0.00022756	0.00336 ± 0.00059862	0.00406 ± 0.00040284
S100A	0.00218 ± 0.0002141	0.00228 ± 0.0000963	0.00230 ± 0.00012959	0.00333 ± 0.00061206
α-SMA	0.06399 ± 0.00573091	0.04868 ± 0.00210651	0.05095 ± 0.00438947	0.05596 ± 0.00569581
Cadherin	0.03825 ± 0.00107763	0.03732 ± 0.00098593	0.03385 ± 0.00725532	0.03833 ± 0.0029136
PECAM-1	0.01580 ± 0.0070668	0.01635 ± 0.0049294	0.01579 ± 0.0070617	0.01699 ± 0.0053729

Figure legends:

Figure 1: A. Body weight evolution of rats during the diet. B. Final body weight. C. Final epidydimal adipose tissue weight.

SNx: subtotal nephrectomy; Caf: cafeteria diet. * indicates P<0.05 vs intact group in the same diet (SNx effect); † indicates P<0.05 vs Standard group with the same renal surgery (diet effect).

Figure 2: A. Sirius red staining area. B. Histological observation of fibrosis using Sirius red staining (X400). C. CD68 staining area. D. Histological observation of macrophages infiltration using CD68 staining (X400).

SNx: subtotal nephrectomy. * indicates P<0.05 vs intact group in the same diet (SNx effect); † indicates P<0.05 vs Standard group with the same renal surgery (diet effect).

Figure 3: Expression levels of mRNA (relative to RPLP0) for (A) Gal3, (B) GDF15, (C) IL33, (D) ST2L, and (E) sST2.

SNx: subtotal nephrectomy. No significant change was detected between groups.

Figure 4: Expression levels of mRNA (relative to RPLP0) for (A) TGF-β1, (B) collagen 1 and (C) nestin.

SNx: subtotal nephrectomy. * indicates P<0.05 vs intact group in the same diet (SNx effect); † indicates P<0.05 vs Standard group with the same renal surgery (diet effect).

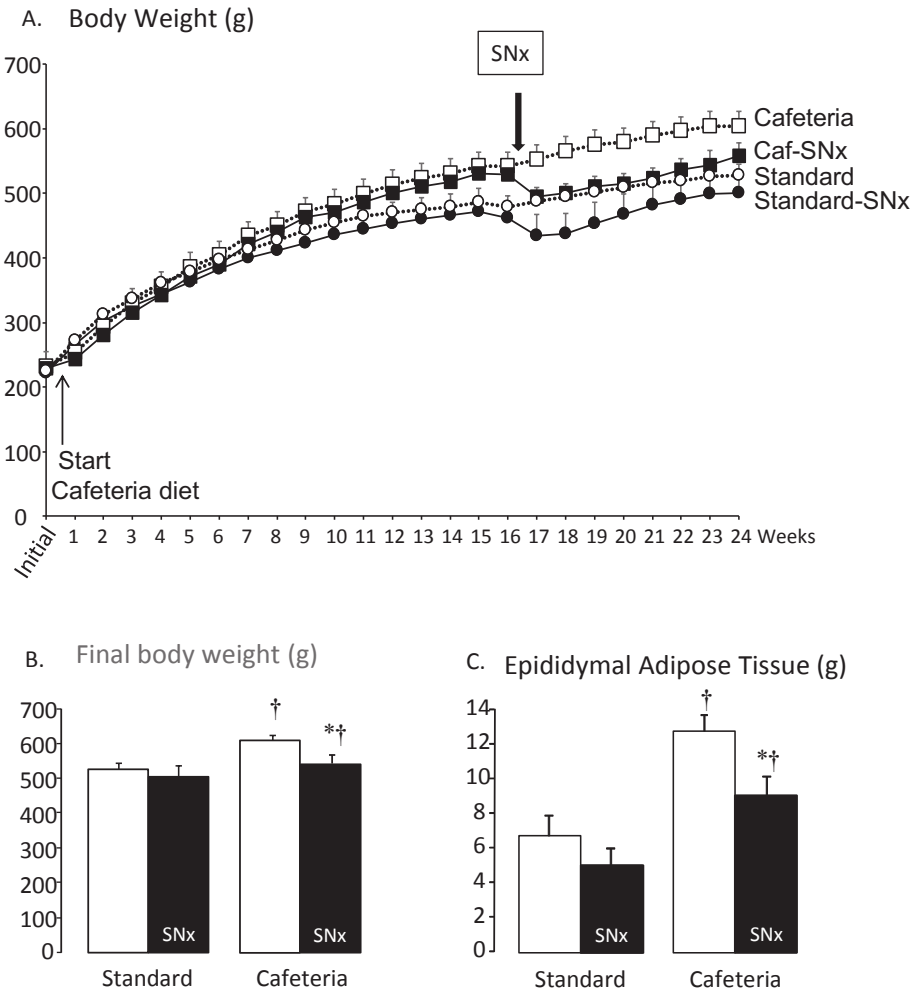

A. Body Weight (g)
SNx
Cafeteria
Caf-SNx
Standard
Standard-SNx
Start
Cafeteria diet
Initial
Weeks
B. Final body weight (g)
SNx
Standard
Cafeteria
C. Epididymal Adipose Tissue (g)
SNx
Standard
Cafeteria

Figure 1

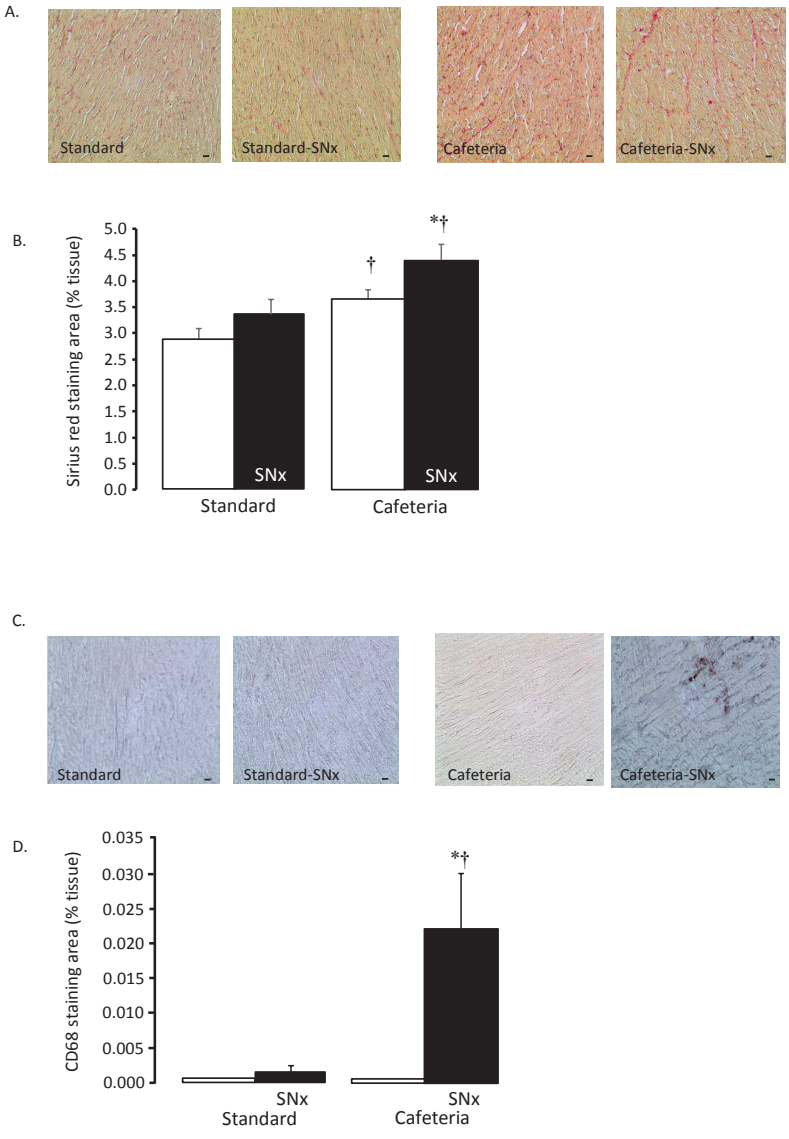

A.
Standard
Standard-SNx
Cafeteria
Cafeteria-SNx
B.
Sirius red staining area (% tissue)
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*†
†
SNx
SNx
Standard
Cafeteria
C.
Standard
Standard-SNx
Cafeteria
Cafeteria-SNx
D.
CD68 staining area (% tissue)
0.035
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
*†
SNx
SNx
Standard
Cafeteria

Figure 2

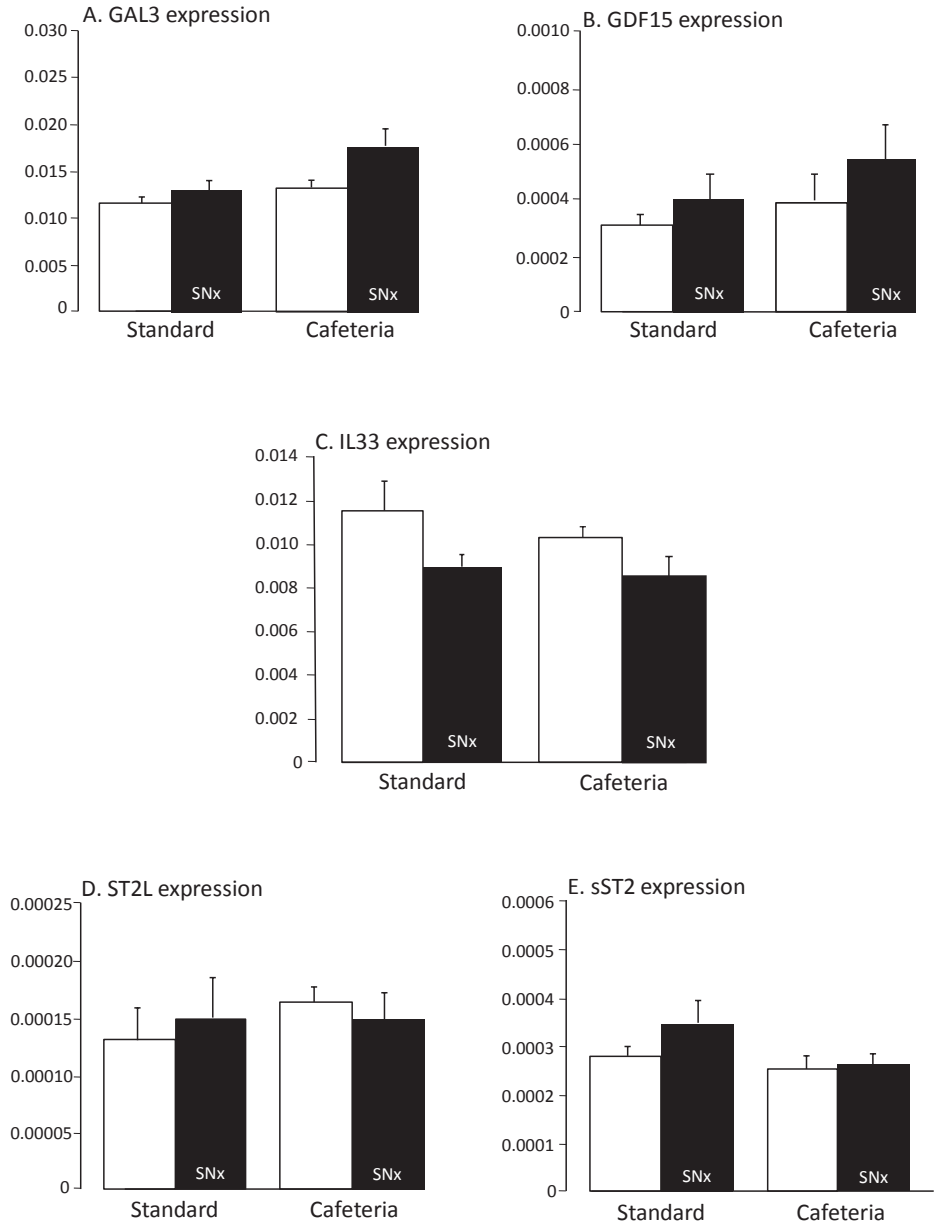

A. GAL3 expression
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0
SNx
SNx
Standard
Cafeteria
B. GDF15 expression
0.0010
0.0008
0.0006
0.0004
0.0002
0
SNx
SNx
Standard
Cafeteria
C. IL33 expression
0.014
0.012
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0
SNx
SNx
Standard
Cafeteria
D. ST2L expression
0.00025
0.00020
0.00015
0.00010
0.00005
0
SNx
SNx
Standard
Cafeteria
E. sST2 expression
0.0006
0.0005
0.0004
0.0003
0.0002
0.0001
0
SNx
SNx
Standard
Cafeteria

Figure 3

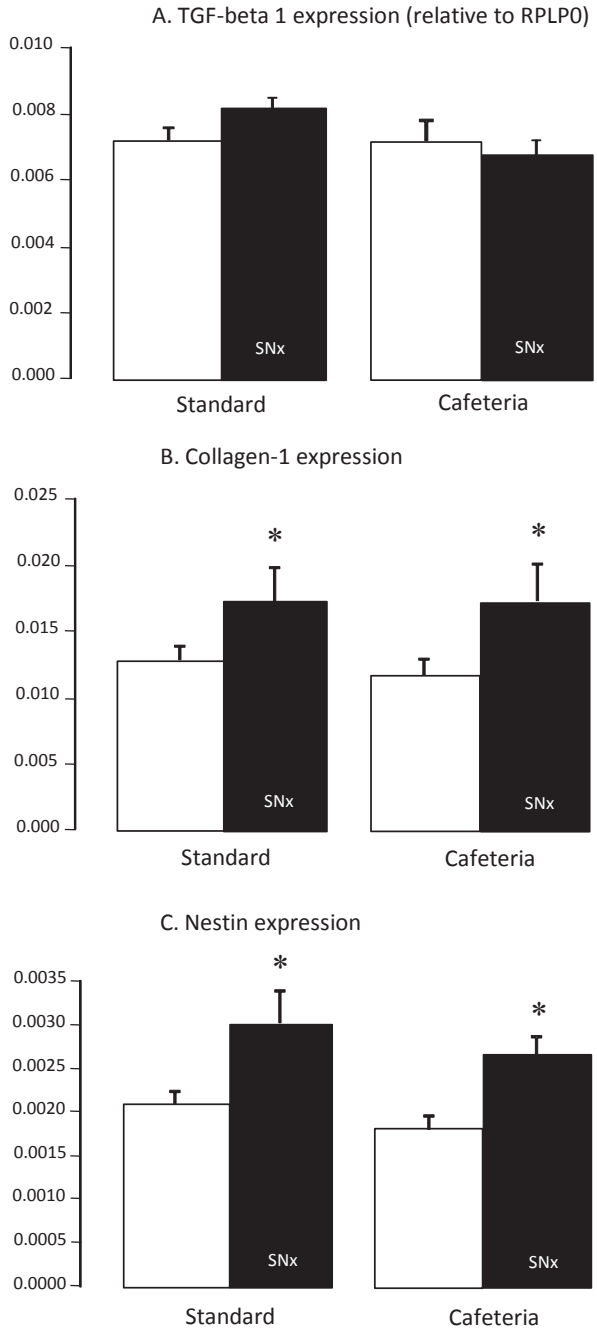

A. TGF-beta 1 expression (relative to RPLP0)
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
SNx
SNx
Standard
Cafeteria
B. Collagen-1 expression
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
*
*
SNx
SNx
Standard
Cafeteria
C. Nestin expression
0.0035
0.0030
0.0025
0.0020
0.0015
0.0010
0.0005
0.0000
*
*
SNx
SNx
Standard
Cafeteria

Figure 4

Discussion

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer si un syndrome métabolique pré-existant exacerbe une pathologie cardiaque associée à l'insuffisance rénale chronique.

Cette étude menée chez le rat présente le caractère original d'administrer un régime superposable à une nourriture occidentale riche en gras, en sel et en sucre proche d'une alimentation humaine déséquilibrée. L'administration d'un régime type occidental, et l'obésité et l'insulino-résistance qui en découlent, induisent une hypertrophie cardiaque. Un état de syndrome métabolique pré-existant à l'insuffisance rénale chronique aggrave les altérations cardiaques observées.

Parmi les atteintes observées, le processus inflammatoire mis en jeu suggère un état pré-inflammatoire chez les rats présentant un phénotype d'insulino-résistance. Toutefois, ces résultats ne sont pas confirmés par la surexpression de TGF-β. Nous pouvons supposer que le temps observationnel de 6 mois est trop tardif pour observer une stimulation de TGF-β, supposée plus précoce. Des phénomènes de régulation qui pourraient interférer après leur expression sont également à prendre en considération.

Les marqueurs de fibrose cardiaque étudiés n'ont pas montré de surexpression de ST2L et sST2. En revanche, nous observons une diminution (non significative) de l'IL-33, connue comme étant une interleukine cardio-protectrice, avec l'insuffisance rénale chronique, sans effet du régime. Ces résultats sont à mettre en lien avec ceux de Martinez *et al.* (234) qui observent une dérégulation de la voie sST2/ IL33 au sein des adipocytes chez des rats nourris avec un régime riche en graisses. Nous observons également une tendance à la surexpression de GDF-15 et de Gal-3 avec l'IRC, quel

que soit le régime administré. Nous pouvons conclure à une augmentation des signaux de fibrose cardiaque avec le syndrome métabolique, majorant la fibrose observée induite par l'insuffisance rénale chronique.

Concernant l'origine de la fibrose cardiaque, pour la première fois, nous pouvons évoquer des phénomènes de transition endothélio-mésenchymateuse impliqués dans le processus de fibrose cardiaque au cours de l'insuffisance rénale chronique. Toutefois, ces résultats observés par PCR présentent des limites et seront confirmés par étude histologique par immunofluorescence directe, dans la perspective d'observer une co-expression de marqueurs endothéliaux et mésenchymateux sur une cellule cardiaque.

Conclusion

En conclusion, cette étude montre que l'insulino-résistance et l'obésité (se rapprochant du syndrome métabolique) exacerbe le remodelage cardiaque chez les rats présentant une insuffisance rénale chronique.

D'autre part, des phénomènes de transition endothélio-mésenchymateuse pourraient être impliqués dans le processus de fibrose cardiaque dans la maladie rénale chronique.

Chronologie de l'installation de la fibrose cardiaque à partir d'un modèle animal ayant développé une insuffisance rénale chronique.

Contexte

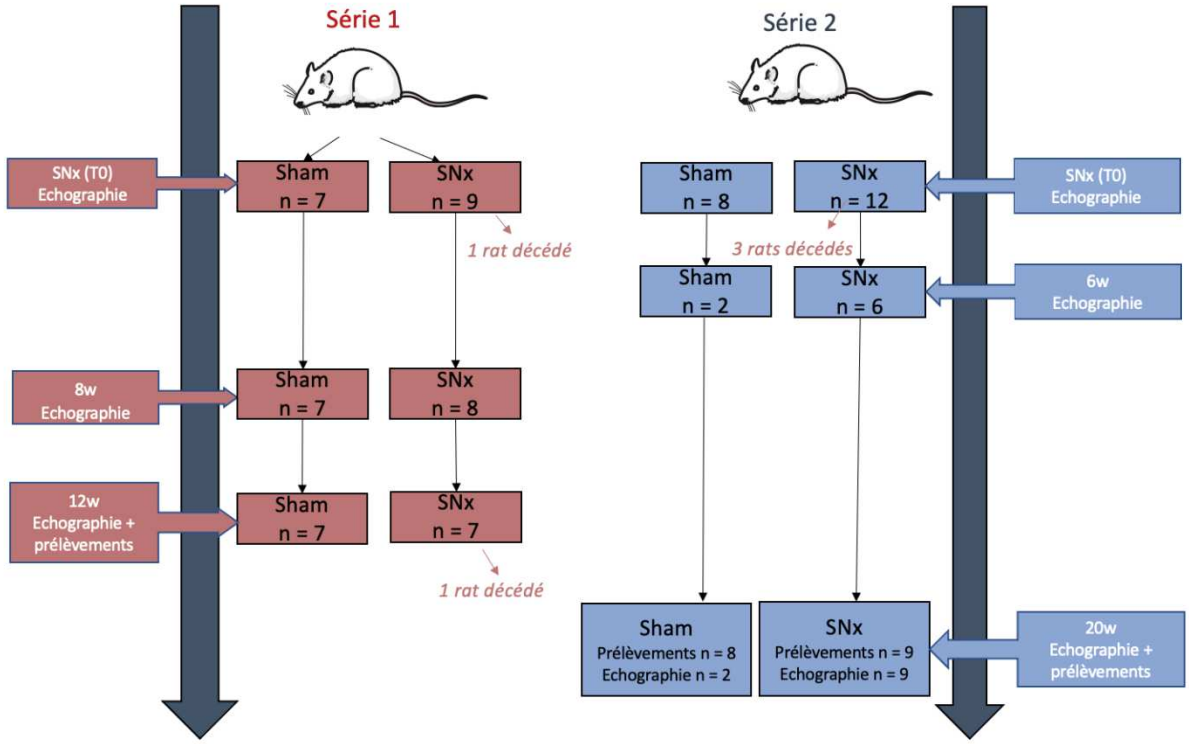
Les mécanismes liés à l'installation de la dysfonction diastolique chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique ne sont pas entièrement compris, mais des changements structurels tels que l'hypertrophie ventriculaire gauche et la fibrose contribuent à ce processus. Nos travaux préliminaires ainsi que d'autres études ont montré qu'une insuffisance rénale chronique chez le rat entraîne une fibrose cardiaque précoce et un dysfonctionnement diastolique, qui évolue vers un remodelage et un dysfonctionnement plus global du ventricule gauche. En revanche, et selon l'état actuel des connaissances, la cinétique d'installation de l'atteinte cardiaque n'est pas étudiée dans l'insuffisance rénale chronique.

Justification de l'étude

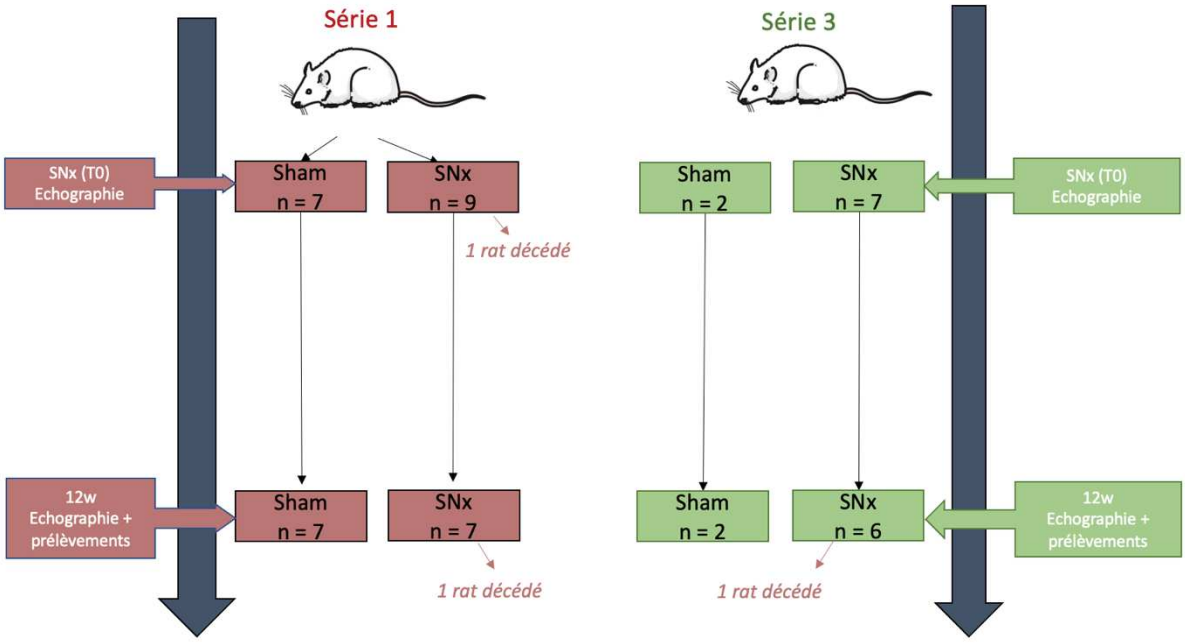
Les altérations cardiaques observées aux niveaux structurel et fonctionnel seront étudiées dans le modèle animal de rat néphrectomisé au 5/6 (5/6 SNx). Cette étude est en cours de rédaction, dans l'attente d'être complétée par l'étude de marqueurs potentiellement impliqués dans l'atteinte cardiaque comme les cardiokines.

Matériel et méthodes

La première partie de cette étude a été menée sur 36 rats Wistar mâles (Charles River) âgés de 12 semaines au moment de la réduction de la masse rénale (SNx, n=21) ou de l'opération blanche (Sham, n=15). Les rats sont observés pendant 12 semaines (série 1) ou 20 semaines (série 2) selon le flowchart suivant. Deux rats SNx de la série 1 ainsi que 3 rats de la série 2 sont décédés avant la fin du protocole.



Le second volet de cette étude compare les atteintes cardiaques après 12 semaines d'insuffisance rénale chronique initiée soit à l'âge de 6 semaines (série 3) soit à l'âge de 12 semaines (série 1 précédente). Dans cette série 3, 9 rats Wistar mâles ont subi une néphrectomie subtotale (n=7) ou non (n=2) selon le flowchart suivant :



A T0, une échographie cardiaque a été réalisée à l'aide du Vevo 3100 (Visual sonics/Fujifilm) sous anesthésie générale à l'isoflurane 2%. Trois à cinq jours plus tard, la néphrectomie des 5/6 (SNx) a été réalisée sous anesthésie gazeuse (isoflurane) et analgésique (buprénorphine), par ligature de 2 des 3 artères rénales du rein restant après exérèse du rein droit. Les rats témoins (sham) ont subi une opération sans réduction de la masse rénale. A 6 semaines, 8 semaines, 12 semaines ou 20 semaines post-néphrectomie subtotale (selon les séries 1, 2 ou 3), les rats ont été anesthésiés (isoflurane 2%) et une nouvelle échographie cardiaque a été réalisée à l'aide du Vevo 3100 (Visual sonics/Fujifilm). En parallèle, l'ECG a été monitoré.

A la fin du protocole (12 semaines pour les séries 1 et 3, 20 semaines pour la série 2), les rats ont été placés 3 jours en cage à diurèse afin d'évaluer la balance hydrique et de collecter les urines. Après anesthésie des rats (isoflurane et xylocaïne), un cathéter est placé dans la carotide droite afin de mesurer les pressions artérielles et d'effectuer

les prélèvements sanguins. Le sang artériel a été collecté dans des tubes héparinés, centrifugé, échantillonné et stocké à -80°C. Puis, après injection létale (Pentobarbital sodium), le cœur et le rein ont été prélevés, pesés, lavés, découpés et stockés à -80°C.

Les dosages biochimiques urinaires issus des cages métaboliques (créatinine, albumine, protéines) ainsi que les prélèvements sanguins (créatinine, urée) ont été réalisés à l'aide d'un Cobas 8000 (Roche, France).

L'analyse des images échocardiographiques a été réalisée à l'aide du logiciel VisualSonics Vevolab 3.1.0 et Vevostrain dédié. Les épaisseurs des parois antérieures et postérieures ainsi que les distances intraventriculaires du VG en diastole et systole ont été mesurées, ainsi que la masse du ventricule gauche (LVMIcor) estimée par la formule des cubes corrigée. L'épaisseur relative de la paroi en diastole (RWTd) a été calculée selon la formule :

((LVAWd + LVPWd)/LVEDd)X100

LVAWd : épaisseur de la paroi antérieure en diastole

LVPWd : épaisseur de la paroi postérieure en diastole

LVEDd : diamètre interne du ventricule gauche en diastole

Les ondes E (vitesse de remplissage rapide en diastole) et A (vitesse de remplissage tardif due à la contraction de l'oreillette gauche en diastole) mesurées permettent d'établir l'index E/A relatif aux dynamiques de pressions de remplissage du ventricule gauche (VG). Le Doppler tissulaire de l'anneau mitral a permis de mesurer l'onde e'

(vitesse de déplacement de l'anneau mitral) et de calculer l'index E/e'. Ces 2 ratios ont été utilisés pour évaluer la dysfonction diastolique. D'autres paramètres en relation avec la fonction ventriculaire ont été mesurés, comme le temps de contraction isovolumétrique (IVCT), le temps de relaxation isovolumétrique (IVRT), le temps d'éjection (ET) et nous ont permis de calculer l'index de performance myocardique, nommé MPI et calculé par le TEI. Le TEI évalue la fonction myocardique globale, incluant les fonctions diastolique et systolique.

TEI = (IVCT + IVRT)/ET

L'imagerie de déformation 2D a été utilisée afin de mesurer le strain longitudinal global (GLS) ainsi que le strain rate (Sre).

Les données obtenues ont été exprimées en moyenne ± erreur standard à la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été réalisées par l'analyse des variances ANOVA (1 facteur ou 2 facteurs), et les comparaisons post-hoc ont été réalisées par la méthode de Tukey à l'aide du logiciel Graphpad. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

Les résultats seront discutés au fur et à mesure puis une conclusion générale sera apportée à ce travail.

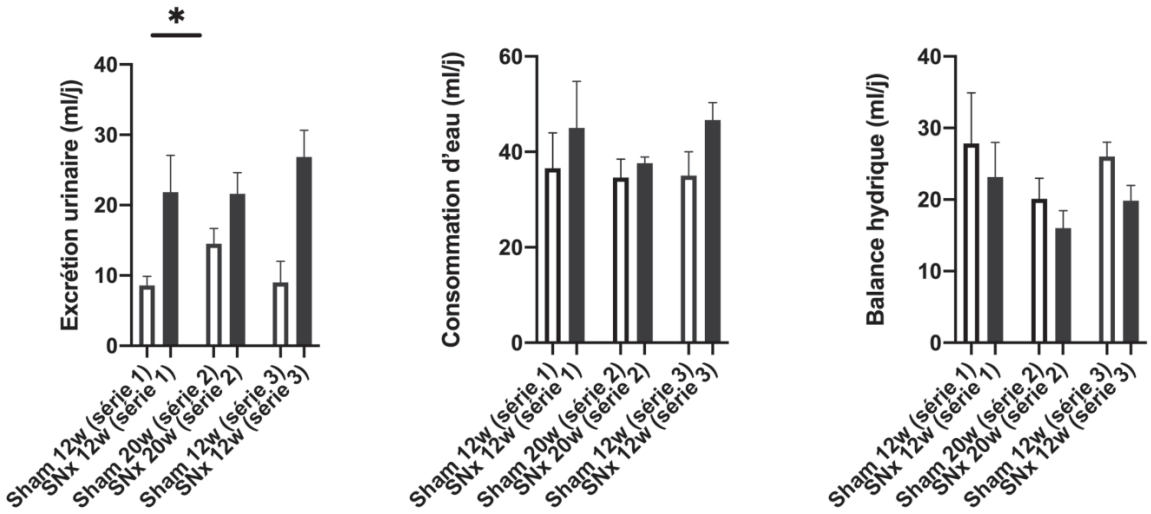
Résultats et discussion

Évaluation des flux hydriques chez les rats 5/6 SNx

Comme présenté sur la figure 8, nous observons une nette augmentation de l'excrétion urinaire chez les rats 5/6 SNx consécutive à la néphrectomie subtotale. L'excrétion urinaire a tendance à s'élever chez les rats Sham 20w du fait de l'IRC. Afin de compenser l'augmentation de l'excrétion urinaire chez les rats 5/6 SNx, une élévation de la consommation hydrique s'observe, en particulier chez les rats âgés de 12 semaines et s'atténue sur le groupe 20 semaines. Cette observation est probablement liée à une évolution défavorable de l'IRC.

Quels que soient les groupes, nous observons une balance hydrique positive, avec une tendance à la diminution de la balance dans les groupes dont la masse rénale a été réduite.

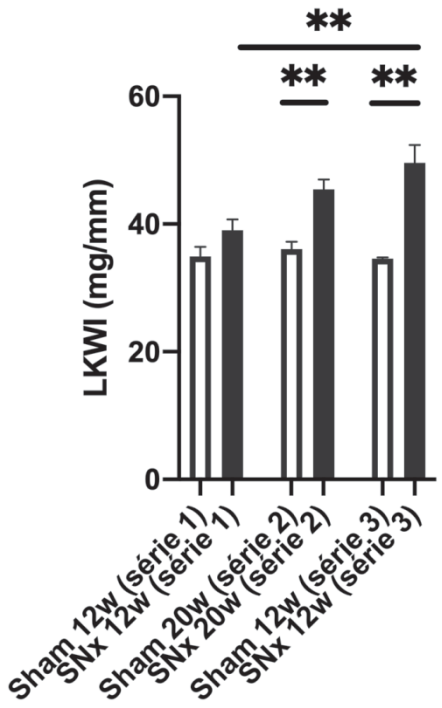
Figure 8 : Consommation d'eau, excrétion d'urines quotidienne et balance hydrique observées chez les rats témoins et SNx.



Évaluation de l'atteinte rénale chez les rats 5/6 SNx

La figure 9 met en évidence l'installation d'une hypertrophie rénale compensatrice après la néphrectomie subtotale.

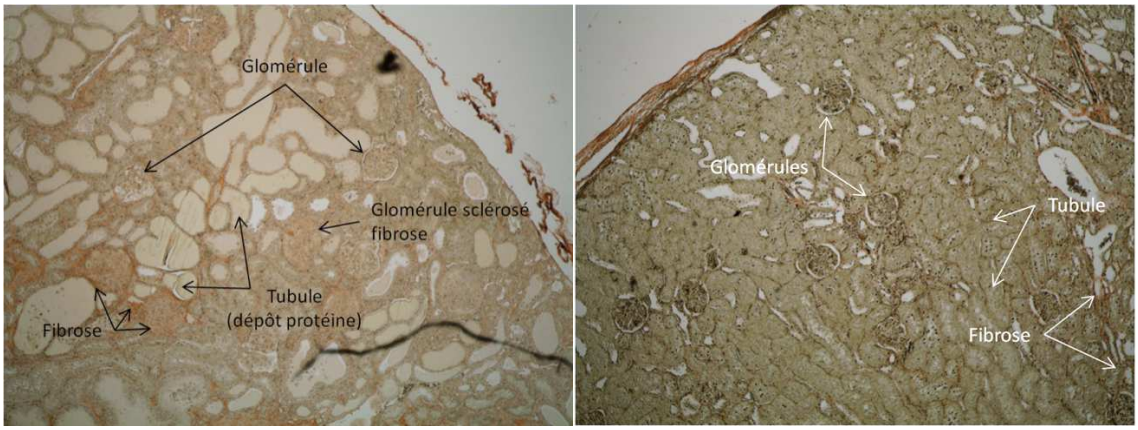
Figure 9 : Poids du rein gauche indexé sur la longueur du tibia.



Le rein gauche restant a été pesé et indexé à la longueur du tibia des rats. Nous observons l'installation d'une hypertrophie rénale compensatrice après la néphrectomie subtotale. Toutefois, l'hypertrophie rénale semble majorée lorsque les rats sont néphrectomisés à 6 semaines de vie.

Cette hypertrophie rénale se caractérise par une augmentation de taille des glomérules (observés en figure 10), sclérosés et fibreux. Nous observons également une hypertrophie des tubules avec de nombreux dépôts protéiques tubulaires.

Figure 10 : Lésions rénales observées chez un rat néphrectomisé au 5/6 à 12 semaines.



A gauche, rein gauche restant suite à la néphrectomie des 5/6 (rouge picrosirius, X200).

A droite, rein droit contrôle (rouge picrosirius, X200).

L'insuffisance rénale chronique observée chez les rats 5/6 SNx a été évaluée par les mesures plasmatiques de créatinine, urée, débit de filtration glomérulaire (UV/P) et ratio protéine/créatine urinaires (figures 11 et 12).

Figure 11 : Créatininémie et urémie mesurées chez les rats 5/6 SNx 12 et 20 semaines post-néphrectomie subtotale et leurs contrôles.

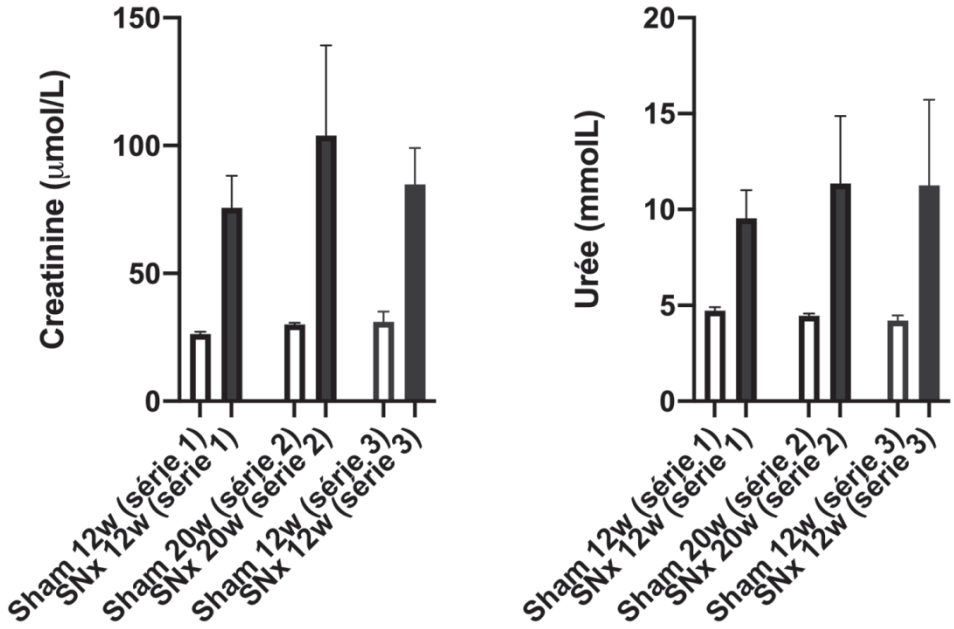


Figure 12 : Clairance de la créatinine (ml/min/kg) estimée selon UV/P.

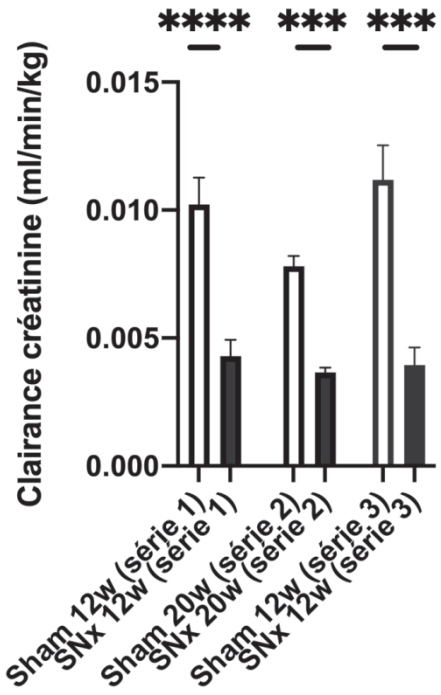
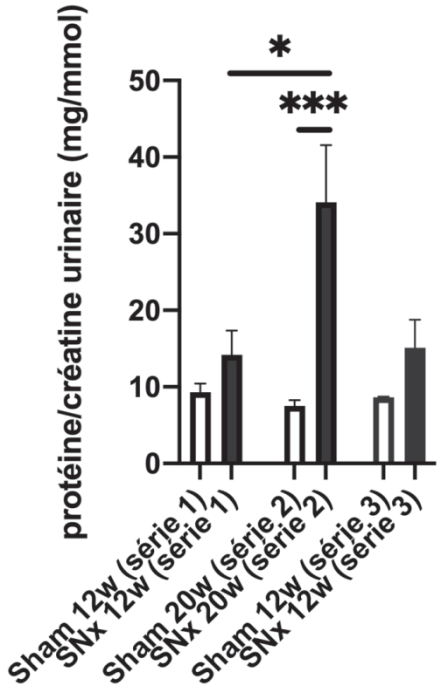


Figure 13 : ratios protéine / créatine urinaire observés chez les rats 5/6 SNx et leurs contrôles.



Comme attendu, nous observons des valeurs de créatinine et d'urée sanguines plus élevées dans les groupes néphrectomisés au 5/6, que ce soit à 6 ou 12 semaines de vie. La significativité n'est pas atteinte du fait d'un faible effectif de rats témoins. La clairance de la créatinine est altérée dans tous les groupes 5/6 SNx observés et confirme la présence d'une insuffisance rénale chronique stable. Toutefois, l'élévation du rapport protéine/créatinine urinaire dans le groupe 5/6 SNx 20 semaines comparé au groupe 5/6 SNx 12 semaines suggère une atteinte rénale progressive et plus sévère au cours du temps.

Altérations cardiaques observées au cours de l'IRC

Étude des paramètres échocardiographiques et indices de fonction ventriculaire gauche chez les rats contrôles et 5/6 SNx.

Le tableau ci-dessous représente les paramètres expérimentaux et échocardiographiques observés dans les séries 1, 2 et 3 à la fin des études.

	Série 1		Série 2		Série 3	
Groupes	Témoins	SNx	Témoins	SNx	Témoins	SNx
Age du 5/6 SNx	12 sem	12 sem	12 sem	12 sem	6 sem	6 sem
Durée de l'IRC	12 sem	12 sem	20 sem	20 sem	12 sem	12 sem
-PAM, mmHg	117 ± 6	134 ± 14	130 ± 5	146 ± 13	131 ± 4	164 ± 24
-FC, bpm	310 ± 12	348 ± 15	334 ± 12	357 ± 10	355 ± 5	388 ± 17
-Poids final, mg	623 ± 9	643 ± 30	748 ± 12	744 ± 21	637 ± 100	627 ± 46
-Poids cardiaque Indexé, mg/mm	3,34 ± 0,09	3,71 ± 0,21	3,81 ± 0,07	3,89 ± 0,25	3,27 ± 0,33	4,50 ± 0,43
Paramètres écho-cardiographiques						
- FE, %	69 ± 3	74 ± 2	66 ± 4	71 ± 3	83 ± 3	68 ± 8
-LVPWd, mm	2,11 ± 0,13	2,20 ± 0,09	1,96 ± 0,41	2,30 ± 0,21	2,32	1,92 ± 0,14
-LVPWs, mm	3,27 ± 0,17	3,59 ± 0,16	3,20 ± 0,27	3,57 ± 0,21	3,58	2,89 ± 0,12
-LVAWd, mm	1,90 ± 0,06	2,10 ± 0,13	2,00 ± 0,23	2,24 ± 0,16	1,68	1,88 ± 0,12
-LVAWs, mm	3,03 ± 0,10	3,50 ± 0,15	3,27 ± 0,18	3,50 ± 0,16	3,00	2,98 ± 0,10
-LVIDd, mm	8,35 ± 0,30	8,76 ± 0,18	9,22 ± 0,08	8,64 ± 0,24	6,66 ± 0,34	6,44 ± 0,10
-LVIDs, mm	4,92 ± 0,25	4,84 ± 0,23	5,65 ± 0,33	4,98 ± 0,30	3,11 ± 0,37	3,83 ± 0,43
-IVCT, ms	23 ± 0,8	26 ± 1,5	22 ± 3,4	25 ± 1,7	19 ± 1,1	21 ± 1,1
-IVRT, ms	23 ± 1	24 ± 1	24 ± 1,6	28 ± 3,8	19 ± 0,6	20 ± 0,2
-ET, ms	64 ± 2,7	53 ± 3,7	70 ± 5,2	58 ± 3,9	55 ± 1,4	57 ± 2,5
-E, mm/s	758 ± 13	756 ± 72	791 ± 71	805 ± 28	909 ± 51	794 ± 51
-A, mm/s	544 ± 44	621 ± 107	452 ± 105	804 ± 38	643 ± 68	747 ± 11
-e', mm/s	34 ± 2	35 ± 5	29 ± 4	27 ± 3	24 ± 3	34 ± 10

A : vitesse de remplissage diastolique tardif, E : vitesse de remplissage diastolique précoce, e' : vitesse de déplacement de l'anneau mitral, ET : temps d'éjection aortique, FC : fréquence cardiaque, FE : fraction d'éjection, IVCT : temps de contraction isovolumétrique, IVRT : temps de relaxation isovolumétrique, LVPW : épaisseur paroi

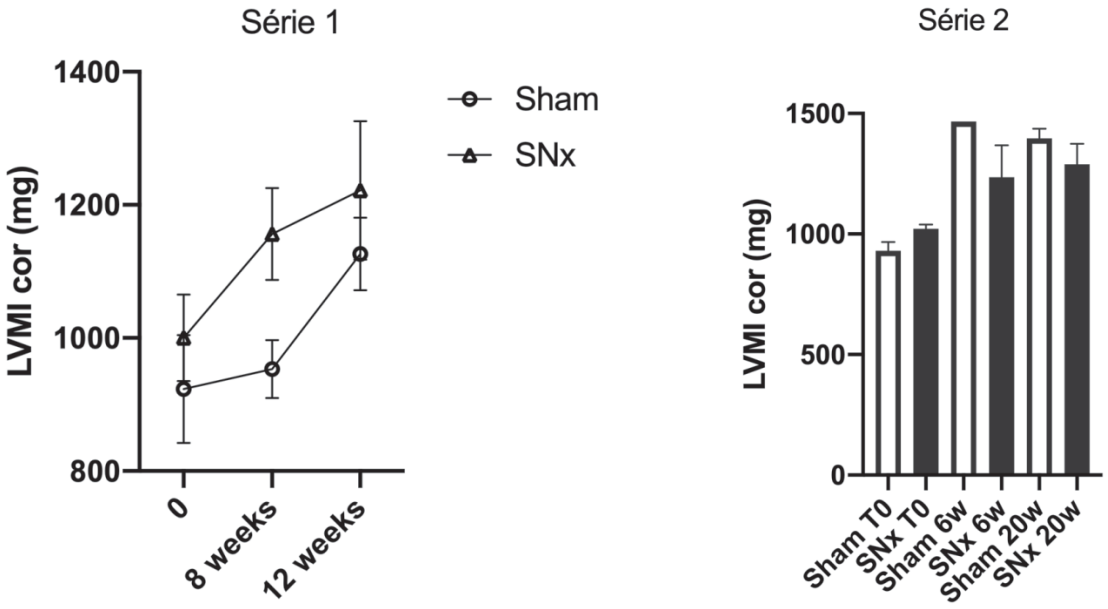
postérieure du ventricule gauche, LVAW : épaisseur paroi antérieure du ventricule gauche, LVID : diamètre interne du ventricule gauche, PAM : pression artérielle moyenne.

<u>Premier volet de l'étude : chronologie de l'atteinte cardiaque chez les rats néphrectomisés au 5/6 à 12 semaines de vie (séries 1 et 2).</u>

<u>Hypertrophie ventriculaire</u>

Nous observons une élévation de la masse du ventricule gauche liée au temps (p=0,03), sans effet lié à la néphrectomie subtotale (figure 14). Cet effet est expliqué par une croissance continue de l'animal étudié.

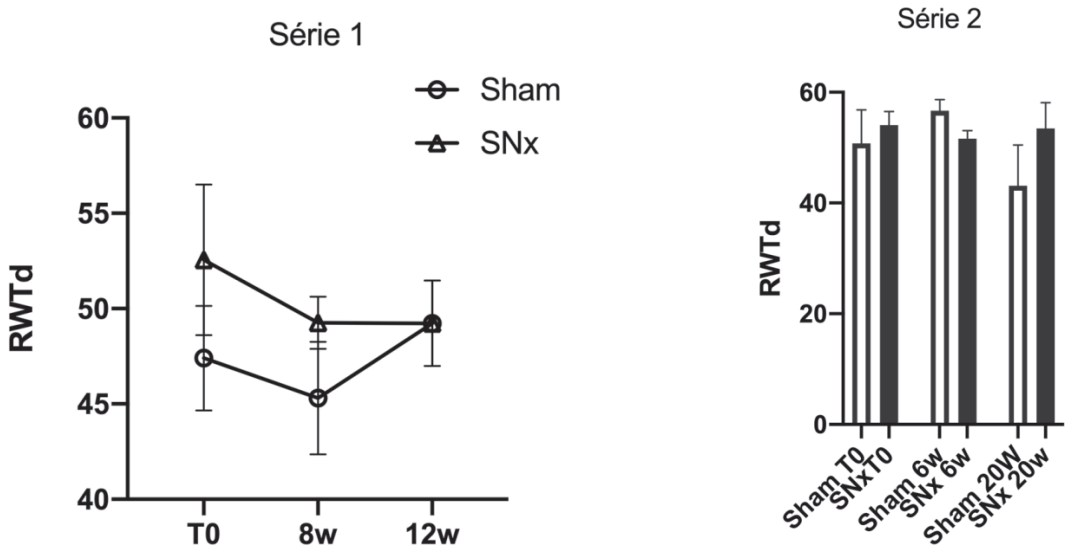
Figure 14 : Effet de la néphrectomie subtotale après 6, 8, 12 et 20 semaines sur la masse du ventricule gauche.



Lorsque nous indexons la masse du VG à la longueur du tibia des rats, nous n'observons pas d'hypertrophie du VG quel que soit le temps observationnel (12 ou 20 semaines).

Le remodelage concentrique du VG a été évalué selon le RWT (relative wall thickness). Ce remodelage se traduit par une cavité cardiaque de petite taille comparé aux épaisseurs des parois pariétales normales. Nous n'observons pas de remodelage concentrique quels que soient les groupes et le temps observationnel (figure 15).

Figure 15 : Evolution des épaisseurs de paroi myocardique du VG post-néphrectomie subtotale au cours du temps.



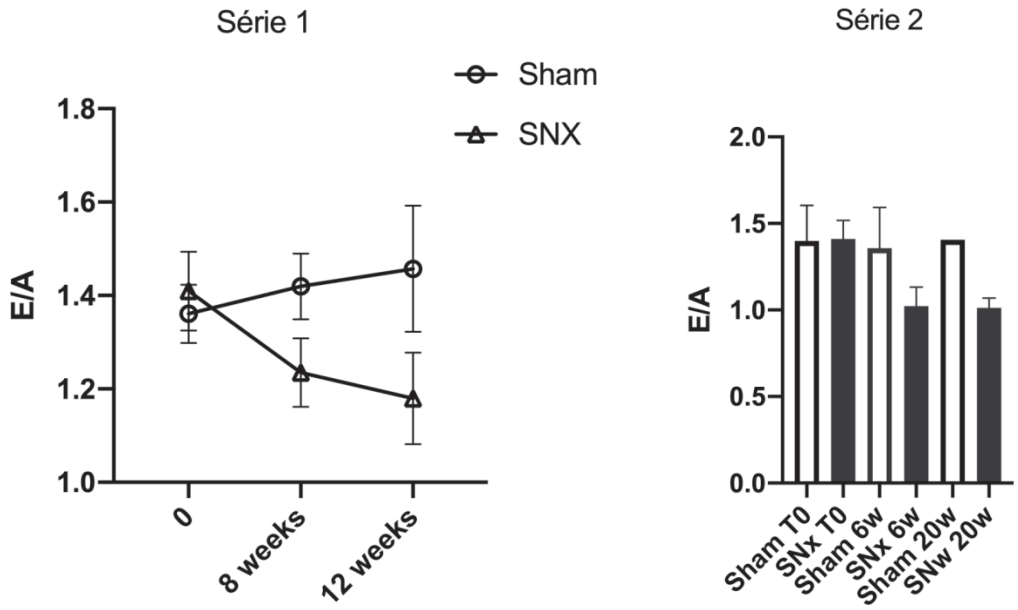
A ce stade de la maladie rénale chronique, nous n'observons pas d'hypertrophie ni de remodelage concentrique du VG. Ces observations sont à mettre en lien avec la faible élévation de la pression artérielle moyenne quels que soient les groupes 5/6 SNx observés.

Etude de la dysfonction diastolique du ventricule gauche.

Les échographies cardiaques ainsi que le Doppler tissulaire à l'anneau mitral nous ont permis d'évaluer les pressions de remplissage estimées par les ratios E/A (figure 16) et E/e' (figure 17).

Comme présenté sur la figure 16, nous n'observons pas d'altération du ratio E/A significative après 6, 8, 12 et 20 semaines post-néphrectomie. Les ratio E/A observés dans les groupes de rats contrôles sont dans les valeurs attendues dans la littérature (1,44 ± 0,22) (235). Toutefois, nous observons une tendance à la baisse de ce ratio traduisant une diminution de la qualité de la relaxation avec une contribution de la systole atriale plus marquée dès les 6 semaines post-néphrectomie subtotale.

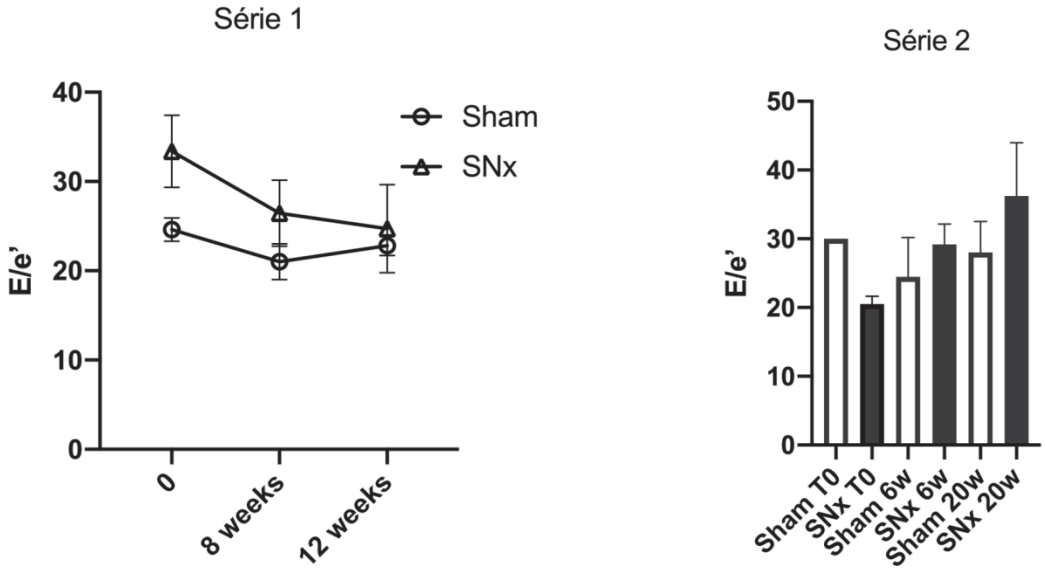
Figures 16 : Effet de la néphrectomie subtotale au cours du temps sur le ratio E/A.



Dans les séries 1 et 2, nous n'observons pas d'altération du ratio E/e' entre les groupes 5/6 SNx et contrôles quel que soit le temps observationnel (figure 17). L'écart par

rapport à la moyenne est assez élevé dans le groupe 5/6 SNx 20w (série 2) du fait d'un rat présentant un profil mitral très altéré avec un ratio E/e' = 81. Les rats témoins présentent un ratio plus élevé à T0 et ces résultats peuvent être expliqués par la difficulté de visualisation de l'onde e' lors de l'analyse des données. Nous pouvons noter que les valeurs de l'onde e' observées dans notre étude sont plus basses que les valeurs habituellement établies chez le rat Wistar (ratio E/e' = 13,4 ± 0,22) (235).

Figures 17 : Effet de la néphrectomie subtotale au cours du temps sur le ratio E/e'.

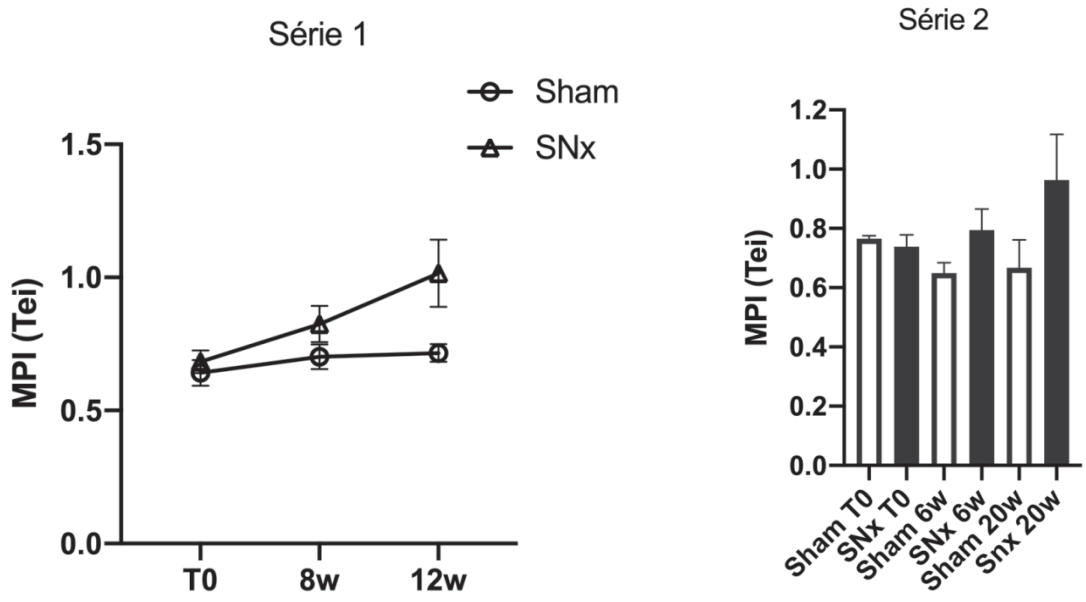


Globalement, le profil mitral n'est pas altéré à 6, 8, 12 et 20 semaines post-néphrectomie subtotale, ce qui suggère que les conditions de pré-charge sont normales malgré le défaut de relaxation précoce suspecté. L'absence d'élévation des pressions de remplissages est confirmée par l'absence d'élévation du ratio E/A observé dans les 2 séries.

Fonction myocardique globale

La figure 18 illustre la fonction myocardique globale par la mesure de l'index de performance myocardiaque (Tei) prenant en considération les fonctions diastoliques et systoliques.

Figures 18 : Index de performance myocardique.



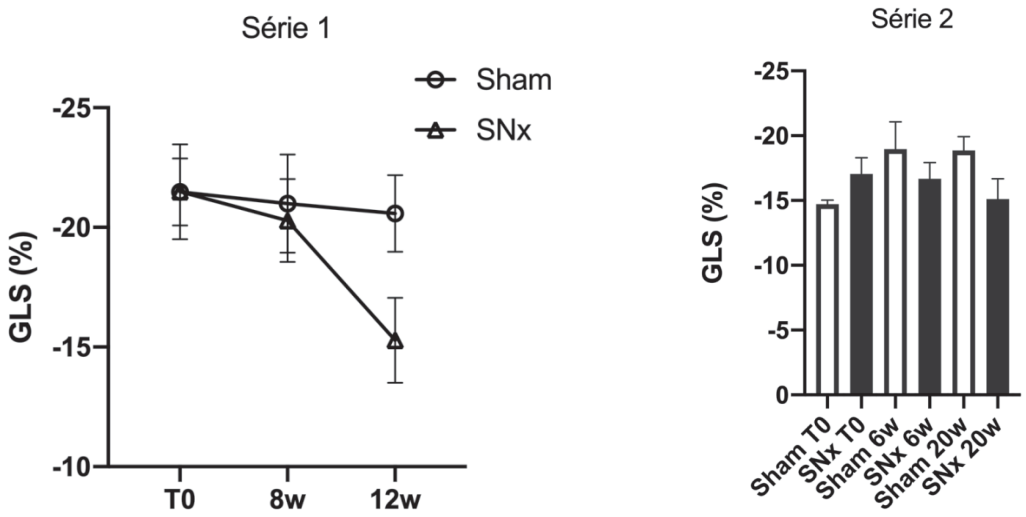
Nous observons un effet lié à la néphrectomie subtotale, avec une différence entre les rats 5/6 SNx T0 vs 12w significative (p=0,02). Dans la série 2, une tendance à l'élévation du MPI est également observée même s'il n'atteint pas la significativité (faible effectif).

Déformation du ventricule gauche

Le Strain longitudinal global (GLS) est calculé par la mesure du raccourcissement myocardique (systole) du VG en plan longitudinal. Nous observons une tendance à la

diminution du GLS dans la série 1 à 12 semaines post-néphrectomie subtotale (p=0,08), comme présenté en figure 19.

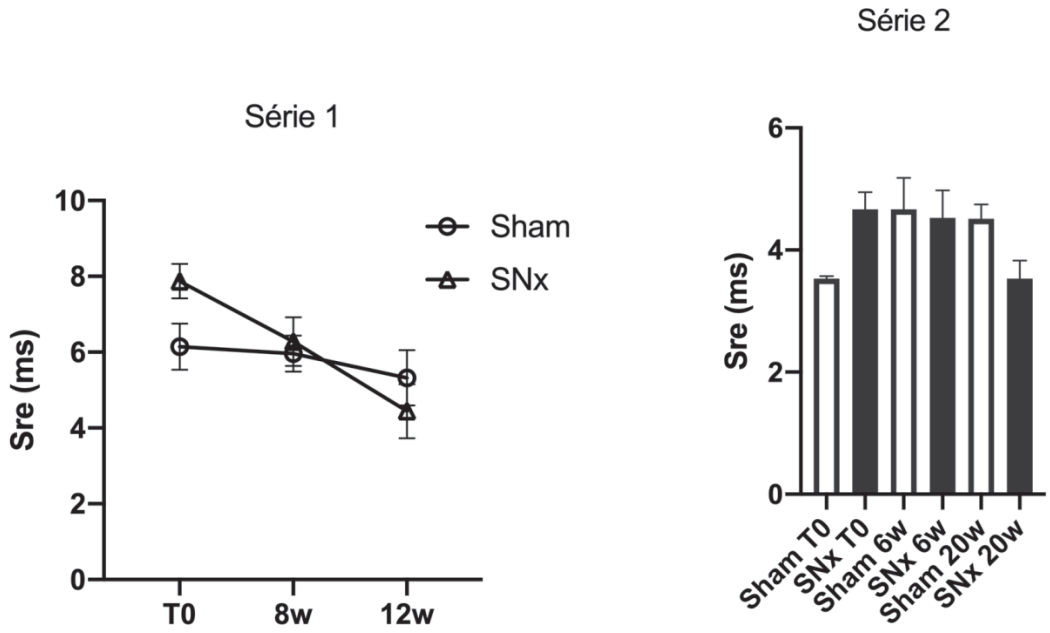
Figure 19 : Strain longitudinal global observé chez les rats contrôles et SNx.



Cette tendance est également retrouvée dans la série 2 à 20 semaines après la chirurgie, bien que les rats témoins à T0 présentent des valeurs légèrement basses du fait du faible effectif. Nous pouvons donc supposer une altération précoce de la contractilité myocardique malgré une FEVG conservée à partir de 12 semaines suivant la réduction de la masse rénale.

Nous n'observons pas de modifications du Sre dans les groupes témoins et contrôles (figure 20). Toutefois, nous observons à T0 des valeurs anormalement élevées des 5/6 SNx de la série 1, et des valeurs anormalement basses des témoins dans la série 2 (faible effectif).

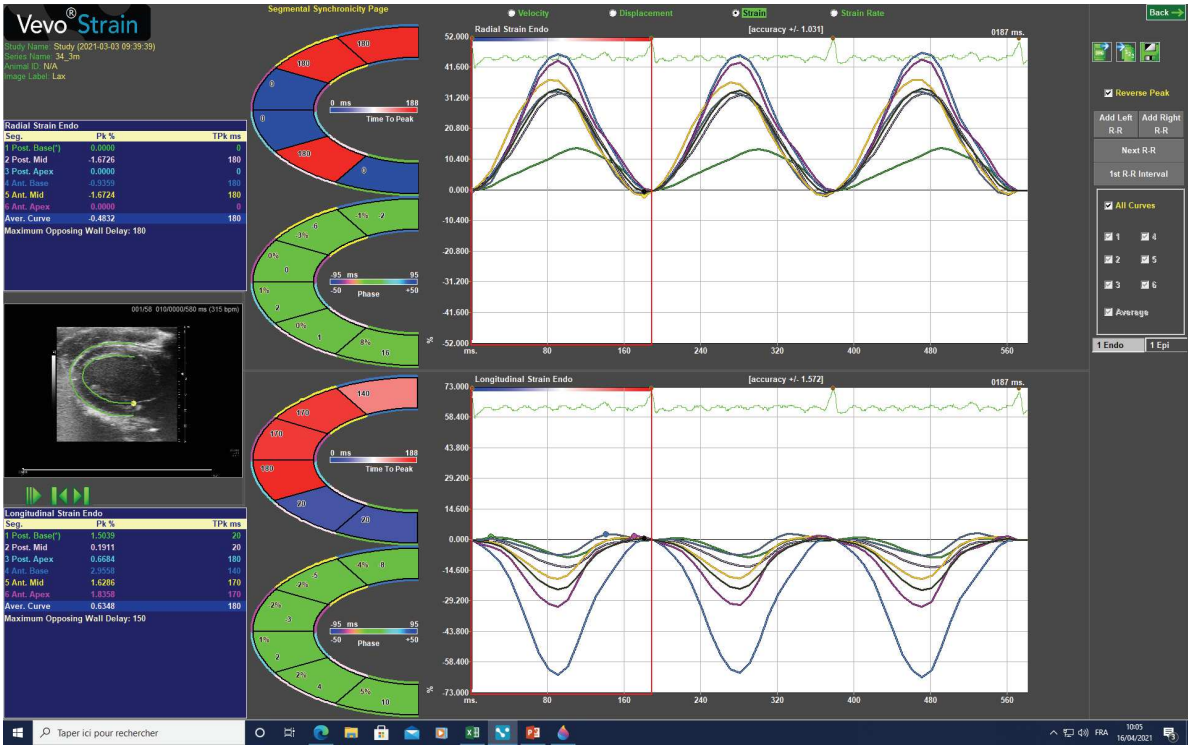
Figure 20 : Vitesse de déformation diastolique (Sre) observée chez les rats contrôles et SNx.



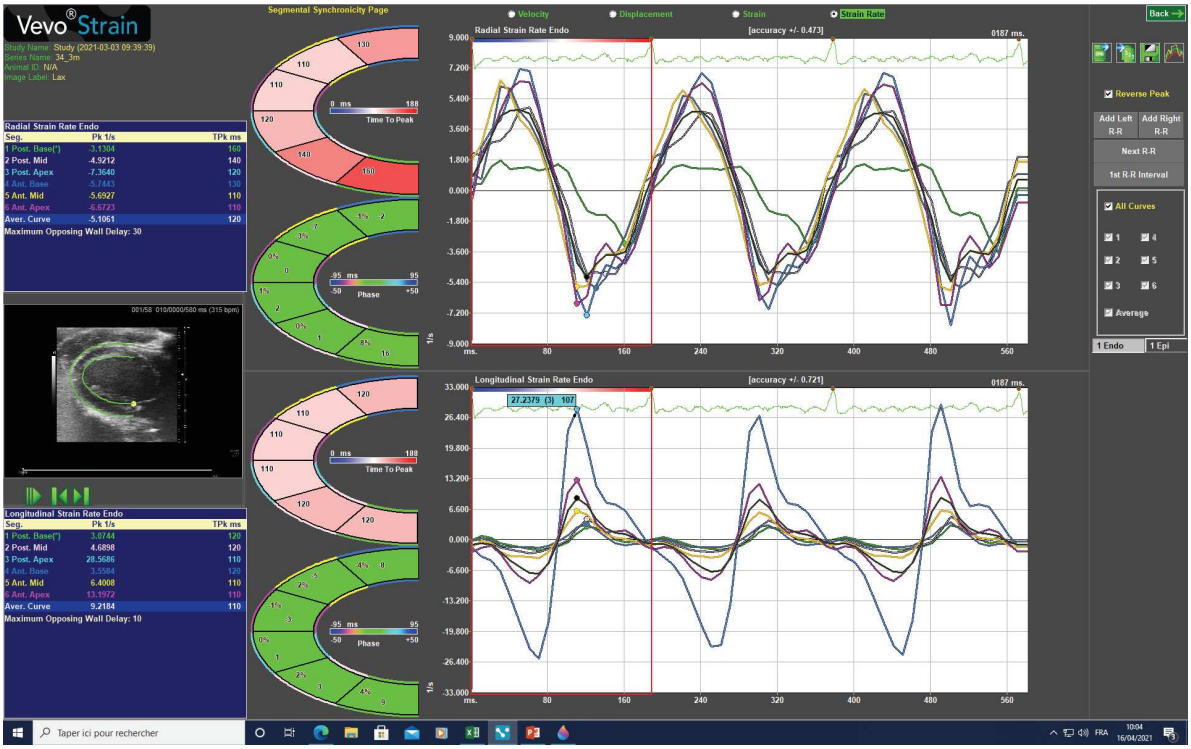
Les images 1 et 2 présentées sur la figure 21 illustrent l'analyse de la déformation (raccourcissement) myocardique (GLS) ainsi que la vitesse de relaxation myocardique (Sre) en coupes radiale et longitudinale. Nous observons un GLS moyen de -23,67% et un Sre moyen de 9,22 ms à 12 semaines post-néphrectomie des 5/6 pour un rat témoin. Sur les images 3 et 4, nous observons un GLS moyen altéré (-9,03%) ainsi qu'une diminution du Sre (1,39 ms) chez un rat 5/6 SNx à 12 semaines post-néphrectomie.

Figure 21 : Images de déformation 2D chez un rat témoin et un rat 5/6 SNx 12 semaines post-néphrectomie.

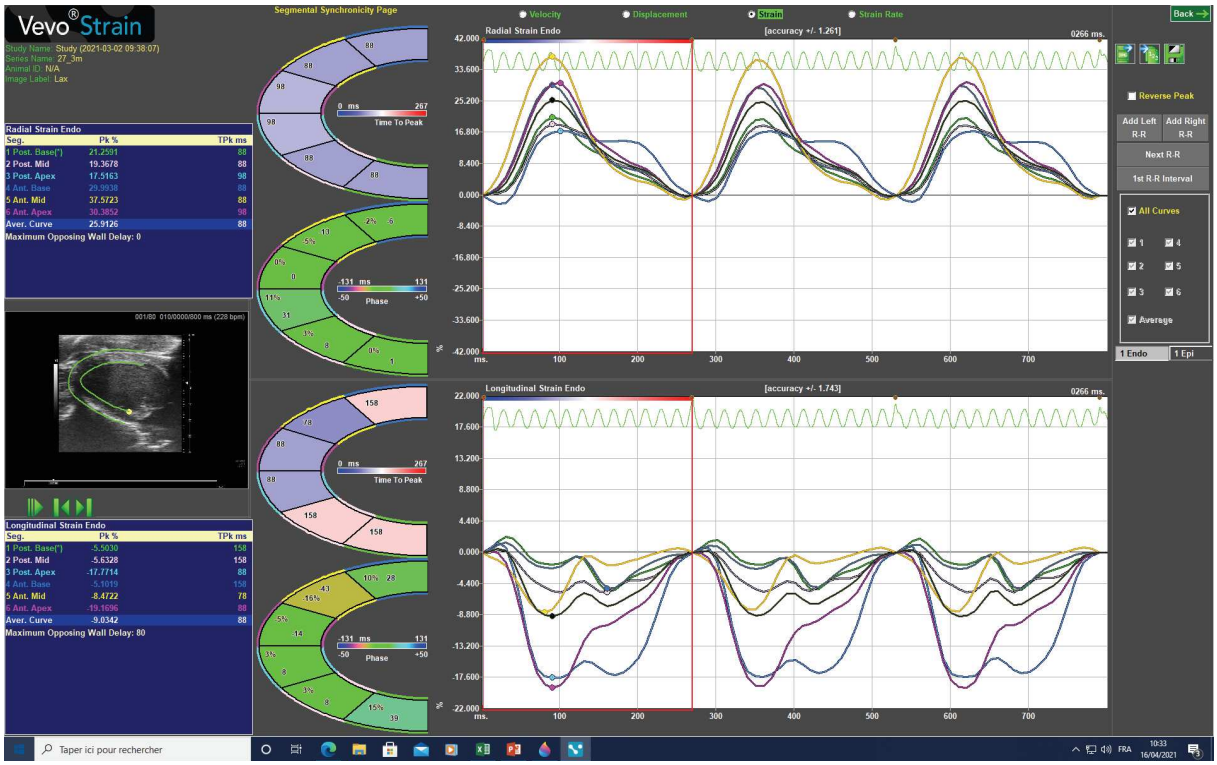
1.



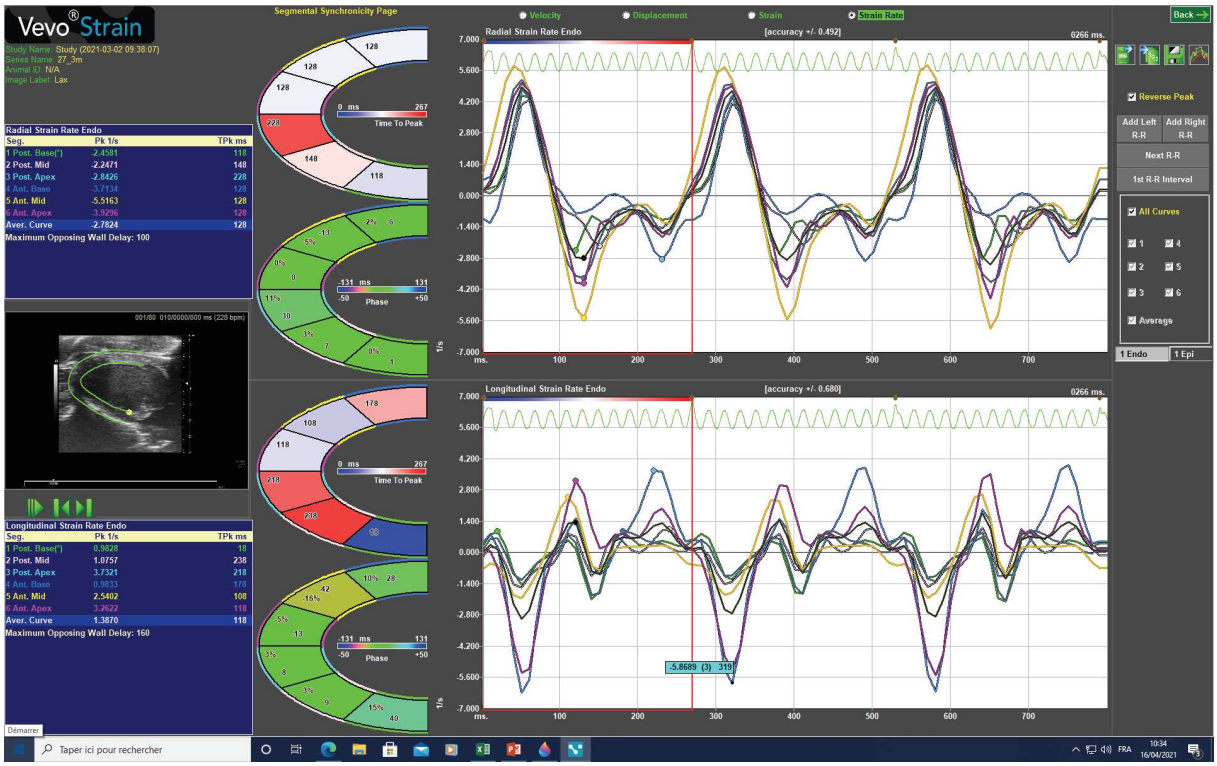
2.



3.


Vevo® Strain
Segmental Synchronicity Page
Velocity
Displacement
Strain
Strain Rate
Back
Radial Strain Endo
[accuracy +/- 1.261]
0266 ms.
Reverse Peak
Add Left R-R
Add Right R-R
Next R-R
1st R-R Interval
All Curves
Average
1 Endo
1 Epi
Time To Peak
Phase
Longitudinal Strain Endo
[accuracy +/- 1.743]
Taper ici pour rechercher

4.


Vevo® Strain
Segmental Synchronicity Page
Velocity
Displacement
Strain
Strain Rate
Back
Radial Strain Rate Endo
[accuracy +/- 0.492]
0266 ms.
Reverse Peak
Add Left R-R
Add Right R-R
Next R-R
1st R-R Interval
All Curves
Average
1 Endo
1 Epi
Time To Peak
Phase
Longitudinal Strain Rate Endo
[accuracy +/- 0.680]
Taper ici pour rechercher

Ces exemples montrent que les résultats obtenus sont assez hétérogènes, avec une diminution du GLS et du Sre au cours du temps sur quelques rats dont la masse rénale a été réduite, alors que d'autres rats 5/6 SNx ne présentent pas d'altérations de la contractilité myocardique, que ce soit à 12 semaines ou 20 semaines post-néphrectomie subtotale.

D'une manière plus générale, nous pouvons souligner que tous les résultats observés sur les rats témoins à T0 (n = 2) sont légèrement altérés par rapport aux autres témoins (PAM, E/e' et MPI plus élevé, GLS et Sre diminués) et pourraient expliquer en partie l'absence de significativité des paramètres cardiaques étudiés sur la série 2.

Seconde partie : Altérations cardiaques observées chez les rats néphrectomisés au 5/6 à 6 ou 12 semaines de vie (séries 1 et 3).

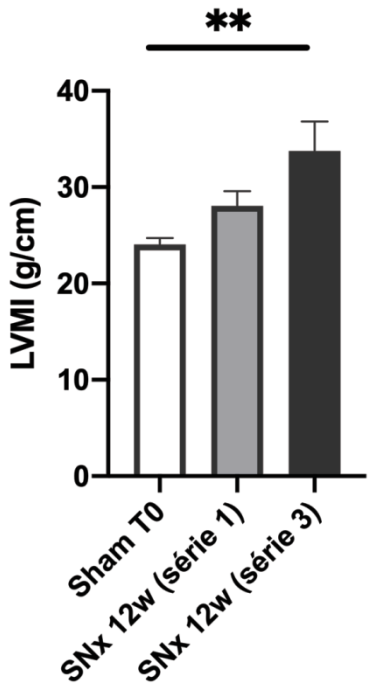
Dans le second volet de cette étude, nous avons comparé les atteintes cardiaques après 12 semaines d'insuffisance rénale chronique initiée soit à l'âge de 6 semaines (série 3) soit à l'âge de 12 semaines (série 1 précédente).

Hypertrophie ventriculaire

Comme signalé en premier volet de cette étude, nous n'avons pas constaté de différence significative quant à la masse du VG indexé à la longueur du tibia chez les rats 5/6 SNx à 12 semaines de vie. A 12 semaines d'une néphrectomie subtotale plus

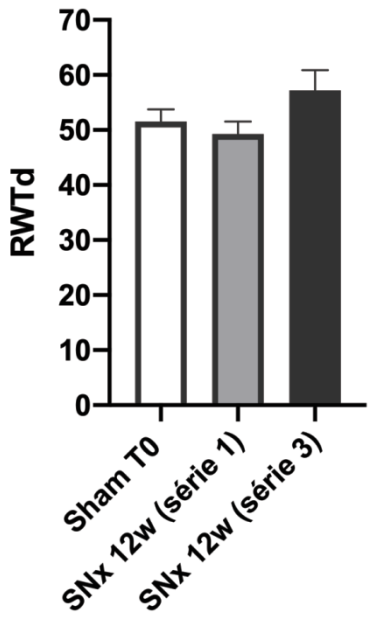
précoce (6 semaines), nous observons une hypertrophie du VG (p = 0,002), indiquant une altération cardiaque plus marquée (figure 22). Ces résultats pourraient être complétés par la mesure de la taille des cardiomyocytes.

Figure 22 : Effet de la néphrectomie subtotale à 6 et 12 semaines de vie sur la masse du ventricule gauche indexée sur la longueur du tibia des rats.



Malgré une hypertrophie du VG plus précoce observée chez les rats dont la masse rénale a été réduite à 6 semaines de vie, nous n'observons pas de remodelage concentrique, malgré une tendance à l'élévation du RWTd (figure 23). Nous pouvons signaler que les valeurs observées dans la série de rats témoins est plus élevée que les valeurs décrites dans la littérature (236). Cette surestimation du RWTd chez les rats témoins peut expliquer l'absence de remaniement concentrique observé chez les rats 5/6 SNx.

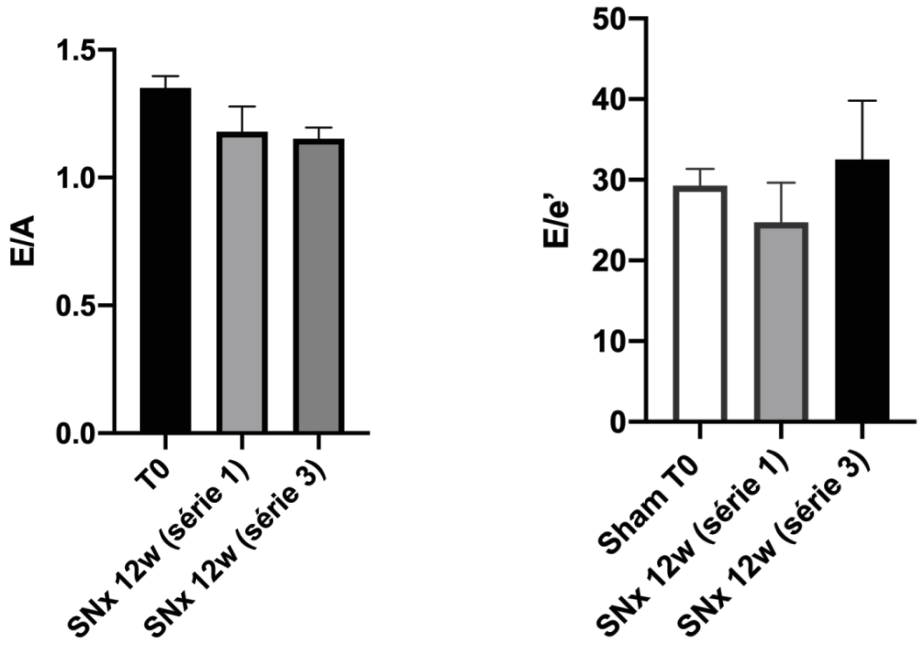
Figure 23 : Evaluation des épaisseurs de paroi myocardique du VG selon l'âge au moment de la néphrectomie subtotale.



Etude de la dysfonction diastolique

Les paramètres de dysfonction diastolique observés lorsque la néphrectomie subtotale est plus précoce ne semblent pas altérés (figure 24). De même que pour le groupe néphrectomisé au 5/6 à 12 semaines de vie (série 1), nous observons une diminution du ratio E/A pouvant suggérer un défaut de relaxation du VG sans modification des conditions de pré-charge de ce dernier (E/e' normal).

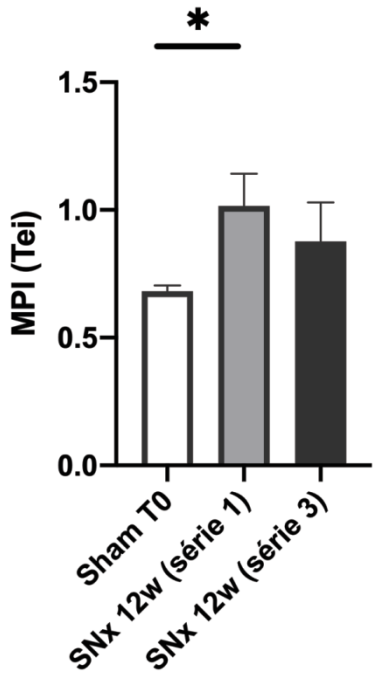
Figures 24 : Ratios E/A et E/e' selon l'âge au moment de la réduction de la masse rénale.



Fonction myocardique globale

Comme observé lors de la première partie de cette étude, nous observons une altération des performances myocardiques 12 semaines après néphrectomie subtotale chez les rats dont la masse rénale a été réduite à 12 semaines de vie. Comme présenté sur la figure 25, nous n'observons pas de performances myocardiques plus altérées lors d'une néphrectomie subtotale plus précoce.

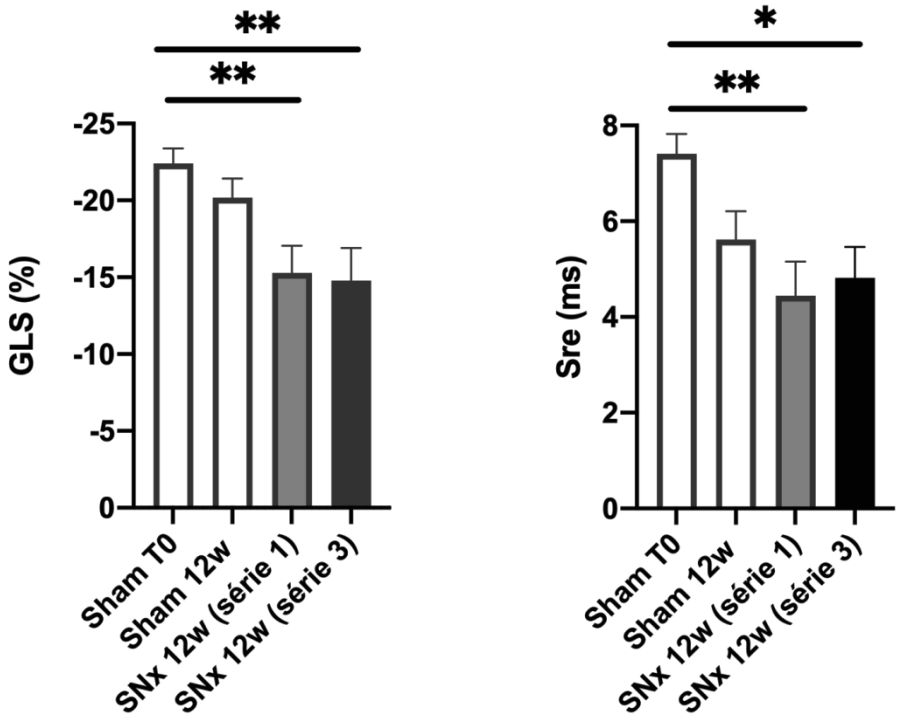
Figure 25 : Mesure des performances myocardiques selon l'âge des rats au moment de la néphrectomie subtotale.



Déformation du ventricule gauche

La figure 26 met en évidence la diminution du GLS observé quel que soit le temps de la chirurgie (6 semaines ou 12 semaines).

Figure 26 : Strain longitudinal global (GLS) et strain rate (Sre) observés selon l'âge des rats au moment de la réduction de la masse rénale.



Cet effet est moins marqué lorsque les groupes 5/6 SNx sont comparés aux témoins à 12 semaines. Le Sre est également diminué dans les 2 groupes 5/6 SNx avec un effet moins marqué comparés aux témoins à 12 semaines. Nous observons les mêmes tendances relevées dans la première partie de l'étude concernant la série dont la masse rénale a été réduite à 12 semaine de vie, sans altérations plus marquées du groupe opéré à 6 semaines de vie.

Conclusion

En conclusion, tous les groupes de rats néphrectomisés au 5/6 étudiés présentent une insuffisance rénale chronique claire et s'accompagnent d'une hypertrophie compensatrice rénale par augmentation du volume des néphrons.

L'hypertrophie du VG a été évaluée par sa masse (indexée à la longueur du tibia) et par l'épaisseur des parois relative (RWT). Nous n'avons pas observé d'hypertrophie ni de remaniement concentrique du VG, ces résultats étant concomitants d'une faible élévation de la pression artérielle moyenne. Nous n'observons pas de défaut de relaxation bien qu'une tendance se dessine à partir de 12 semaines post-néphrectomie subtotale, avec une diminution du ratio E/A et un ratio E/e' conservé. Ces résultats sont en faveur d'une absence (ou de prémices) d'une baisse de la compliance du VG.

Parallèlement, les performances myocardiques globales sont altérées de manière significative dès les 12 semaines post-néphrectomie subtotale. Des signes de dysfonction systolique pourraient être présents avant la chute de la FEVG et pourraient être mis en évidence par l'altération de la déformation myocardique longitudinale (GLS).

Ces 2 séries de rats ont été néphrectomisés au 5/6 à 12 semaines de vie, et laissent supposer qu'une néphrectomie subtotale tardive pourrait être moins délétère sur le plan cardiaque. Une troisième série de rats ont été néphrectomisés au 5/6 plus précocement (6 semaines de vie) et montrent une hypertrophie du VG présente à 12 semaines (fin du protocole). Toutefois, nous n'avons pas observé de remaniement concentrique du VG avec une absence de diminution des distances intra-ventriculaires

et d'épaississement les parois lors de la diastole. La pression artérielle moyenne semble plus élevée dans ce dernier groupe étudié (164 ± 24 mmHg) comparé à leurs témoins (131 ± 4 mmHg). Les toxines urémiques ainsi que les mécanismes inflammatoires mis en jeu sont à évaluer et pourraient également expliquer l'hypertrophie myocardique observée.

Globalement, ces résultats suggèrent qu'une insuffisance rénale chronique précoce induit des altérations cardiaques plus délétères, avec une hypertrophie myocardique concomitante d'une élévation de la pression artérielle propice à une dysfonction diastolique. En revanche, la similitude des rapports E/A et E/e' dans les deux groupes suggère que la fonction diastolique n'est pas plus altérée quand l'insuffisance rénale est initiée à un âge plus précoce.

SYNTHESE DES TRAVAUX, PERSPECTIVES

Rappels des principaux résultats

Notre objectif principal était d'identifier et d'évaluer des marqueurs d'atteinte cardiaque dans l'insuffisance rénale chronique au stade de la pré-dialyse.

Chez le patient insuffisant rénal chronique, l'identification et la caractérisation de la fibrose cardiaque sont essentiels. D'une part, il est important d'identifier les patients susceptibles de bénéficier de mesures préventives avant la survenue de complications potentiellement graves. D'autre part, caractériser la fibrose cardiaque permettrait une meilleure compréhension du processus physiopathologique du syndrome cardio-rénal pour se diriger vers des manœuvres thérapeutiques ou mécaniques de réduction de la fibrose cardiaque.

Chez les patients atteints de maladie rénale chronique, aucun des biomarqueurs étudiés ne peut prétendre à lui seul établir un diagnostic précoce, ou évaluer la gravité du syndrome cardio-rénal.

Dans le premier travail, nous avons démontré que l'utilisation d'un score clinico-biologique incluant des marqueurs de fibrose, lésionnels et d'étirement cardiaques permet de prédire le risque d'évènements cardiaques majeurs au sein d'une population de patients atteints de maladie rénale chronique à différents stades. Ce score est facilement utilisable à condition de s'être assuré d'avoir toutes les données requises. Ce score pourrait permettre d'identifier des patients à risque d'évènements

cardiaques majeurs au sein de la population d'insuffisants rénaux chroniques dont la prévalence est considérable et présentant une morbi-mortalité importante.

Dans le second travail, nous avons montré que la participation de l'insuffisance rénale chronique à l'insulino-résistance aggrave les processus d'inflammation et de remodelage contribuant à la fibrose cardiaque. De plus, nous avons montré une implication possible de la transition endothélio-mésenchymateuse dans le processus de fibrose cardiaque dans un modèle de rat présentant des pathologies chroniques universelles que sont l'insuffisance rénale chronique et l'insulino-résistance.

Le troisième travail contribue à la description du syndrome cardio-rénal de type 4. Nous observons une altération des performances myocardiques globales dès les 12 semaines post-néphrectomie subtotale. Des signes de dysfonction diastolique sans modification des conditions de pré-charge sont suspectés et une atteinte systolique discrète et précoce pourrait être présente. Une néphrectomie subtotale plus précoce des rats induit des altérations cardiaques plus marquées, avec une hypertrophie myocardique présente et s'accompagnant d'une élévation des pressions artérielles moyennes propices à l'altération structurale et fonctionnelle du ventricule gauche.

L'ensemble de ces travaux apportent des réponses quant à la caractérisation de la fibrose cardiaque et de l'atteinte fonctionnelle observées au cours de l'insuffisance rénale chronique.

Limites du travail

Au-delà des limites propres à chaque étude, discutées au fur et à mesure, ce travail de thèse présente certains écueils.

Le troisième travail présente des temps observationnels différents entre les séries de rats et rend l'interprétation des données plus délicate. Malheureusement, les restrictions liées à la crise sanitaire (Covid-19) ne nous ont pas permis d'échographier tous les rats témoins et de réaliser le temps observationnel prévisionnel de 12 semaines dans la série 2. La multiplicité des groupes de rats témoins de faible effectif en découle et ne permet pas d'atteindre la significativité dans les séries 2 et 3. C'est pour cette raison qu'une nouvelle étude a été menée plus tardivement (série 1) afin d'obtenir le temps observationnel manquant (12 semaines) et où chaque rat est son propre témoin. En revanche, la multiplication des séries nous permettra de quantifier la fibrose et l'inflammation cardiaque aux temps observationnels 12 et 20 semaines.

L'autre écueil que nous pouvons évoquer est l'absence d'évaluation du système rénine-angiotensine-aldostérone dans le modèle animal étudié. Cet axe neuro-hormonal majeur favorise l'hypertrophie et le remodelage cardiaque. Au cours de l'insuffisance rénale chronique et l'insuffisance cardiaque, la rétention hydrosodée entraine une élévation de la pré-charge du VG et élève également la post-charge induite par l'activation du système rénine - angiotensine - aldostérone, majorant le travail cardiaque et favorisant le cercle vicieux du syndrome cardio-rénal.

De manière générale, aucun de ces travaux ne permet de répondre à lui seul au problème étudié. Cependant, chacun des travaux permet de répondre en partie aux objectifs initiaux posés et permet d'ouvrir de nouvelles pistes de recherches ou de réflexions : la première étude par le développement d'un score clinico-biologique prédictif de l'atteinte cardiaque utilisable en routine chez l'insuffisant rénal chronique, les seconde et troisième études par la caractérisation du syndrome cardio-rénal de type 4. Enfin, au-delà de la cinétique d'installation de l'altération cardiaque consécutive à l'insuffisance rénale chronique réalisée dans le troisième travail, cette dernière étude nous permettra d'identifier d'autres marqueurs potentiellement impliqués dans l'atteinte cardiaque.

Perspectives

Plusieurs perspectives sont à discuter. Nous allons les décrire brièvement.

L'étude clinique menée dans le premier travail pourrait être complétée par d'autres marqueurs de fibrose et d'inflammation plus ou moins spécifiques du cœur (CTX et GDF-15), et pourraient apporter des informations complémentaires concernant le pronostic des évènements cardiaques au sein de la population présentant une insuffisance rénale chronique. L'ajout de ces marqueurs permettrait peut-être une meilleure classification des patients à risque d'évènements cardiaques.

Les mécanismes sous-jacents aux altérations cardiaques restent au centre des investigations. L'étude chronologique de l'installation de l'altération cardiaque réalisée sera complétée par l'étude de nouveaux marqueurs potentiellement impliqués dans le

syndrome réno-cardiaque que sont les myokines. Les myokines sont des protéines produites par le muscle squelettique lors de la contraction qui peuvent agir localement ou à une certaine distance, sur les muscles et également sur les cellules et tissus non musculaires (237,238). Au cours de la dernière décennie, un rôle potentiel des myokines d'origine musculaire dans le processus d'hypertrophie musculaire a été identifié (237,239). Ce concept a également été étendu aux facteurs sécrétés par le muscle cardiaque et sont appelés cardiokines (240,241). Il est intéressant de noter que plusieurs cardiokines jouent un rôle clé dans les effets protecteurs des fonctions cardiaques par le biais de la régulation du métabolisme, comme l'irisine (242) et la protéine 1 de type follistatine (243). Ces études soulèvent la question d'une diaphonie entre le rein et le cœur par l'intervention des myokines dans le contrôle de la structure et de la fonction du myocarde. Dans la poursuite de notre étude, les altérations cardiaques et l'expression des myokines à différents temps observationnels pourront être comparés dans un modèle de rat génétique d'insuffisance rénale chronique ainsi que dans le modèle conventionnel de rat néphrectomisé au 5/6. Les marqueurs de fibrose et les cardiokines étudiées, les altérations cardiaques observées ainsi que leur chronologie d'installation nous permettront de confronter ces deux modèles animaux et de mieux caractériser l'atteinte cardiaque observée dans les atteintes réno-cardiaques chroniques.

Conclusion

Le syndrome cardio-rénal de type 4 résulte d'un dialogue complexe entre le cœur et le rein. La présence de comorbidités, comme l'insulino-résistance et l'obésité, peuvent être associées à l'insuffisance rénale chronique et contribuer au phénotype cardiaque délétère observé chez ces patients. L'hypertrophie du ventricule gauche ainsi que des altérations structurelles et/ou fonctionnelles du ventricule gauche semblent précoces et fréquemment observées chez les patients à différents stades de l'insuffisance rénale chronique. La survenue d'évènements cardiaques majeurs au cours de l'insuffisance rénale chronique pourrait être prédite par l'usage courante de scores clinico-biologiques impliquant des marqueurs de fibrose cardiaque.

L'installation de l'hypertrophie et de la fibrose cardiaque résulte de différents processus à l'origine d'une expansion de la matrice extracellulaire et de ses composants. La compréhension des mécanismes à l'origine de ce phénotype profibrotique reste un enjeu majeur afin de considérer une thérapeutique anti-fibrotique dans le but de réduire le pronostic cardiaque sombre associé à l'insuffisance rénale chronique.

Des manœuvres non-pharmacologiques comme la réhabilitation musculaire sont des alternatives à proposer. Actuellement, nous savons qu'une réhabilitation musculaire personnalisée permet une amélioration des paramètres musculaires des patients obèses. S'il existe effectivement une aggravation par l'obésité et l'insulino-résistance de l'atteinte cardiaque secondaire à l'insuffisance rénale chronique, une réhabilitation musculaire pourrait permettre une amélioration de la dysfonction cardiaque chez ces patients.

Ce travail de thèse contribue à ouvrir des pistes de réflexion et d'action qui s'enrichissent des collaborations étroites menées entre les services cliniques et la recherche expérimentale.

Références

1. OMS | À propos des maladies cardiovasculaires [Internet]. WHO. World Health Organization; [cité 7 oct 2020]. Disponible sur: http://www.who.int/entity/cardiovascular_diseases/about_cvd/fr/index.html

2. RALFSS-2018-06-lutte-contre-maladies-cardioneurovasculaires.pdf [Internet]. [cité 28 sept 2020]. Disponible sur: https://www.ccomptes.fr/system/files/2018-10/RALFSS-2018-06-lutte-contre-maladies-cardioneurovasculaires.pdf

3. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. [cité 30 sept 2020]. Disponible sur: https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)

4. cardio-pocket-guide-fr.pdf [Internet]. [cité 5 oct 2020]. Disponible sur: https://www.who.int/publications/list/cardio-pocket-guide-fr.pdf?ua=1)

5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of chronic kidney disease and associated risk factors--United States, 1999-2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2 mars 2007;56(8):161-5.

6. Mills KT, Xu Y, Zhang W, Bundy JD, Chen C-S, Kelly TN, et al. A systematic analysis of worldwide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010. Kidney Int. nov 2015;88(5):950-7.

7. rapport_rein_2018_v2.pdf [Internet]. [cité 28 sept 2020]. Disponible sur: https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/rapport_rein_2018_v2.pdf

8. KDIGO_2012_CKD_GL.pdf [Internet]. [cité 27 sept 2020]. Disponible sur: https://kdigo.org/wp-content/uploads/2017/02/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf

9. Jungers P, Massy ZA, Nguyen Khoa T, Fumeron C, Labrunie M, Lacour B, et al. Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: a prospective study. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl

Assoc - Eur Ren Assoc. déc 1997;12(12):2597-602.

10. Smith GL, Lichtman JH, Bracken MB, Shlipak MG, Phillips CO, DiCapua P, et al. Renal impairment and outcomes in heart failure: systematic review and meta-analysis. J Am Coll Cardiol. 16 mai 2006;47(10):1987-96.

11. Heywood JT, Fonarow GC, Costanzo MR, Mathur VS, Wigneswaran JR, Wynne J, et al. High prevalence of renal dysfunction and its impact on outcome in 118,465 patients hospitalized with acute decompensated heart failure: a report from the ADHERE database. J Card Fail. août 2007;13(6):422-30.

12. Kottgen A, Russell SD, Loehr LR, Crainiceanu CM, Rosamond WD, Chang PP, et al. Reduced kidney function as a risk factor for incident heart failure: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. J Am Soc Nephrol JASN. avr 2007;18(4):1307-15.

13. Stevens LA, Li S, Wang C, Huang C, Becker BN, Bomback AS, et al. Prevalence of CKD and comorbid illness in elderly patients in the United States: results from the Kidney Early Evaluation Program (KEEP). Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found. mars 2010;55(3 Suppl 2):S23-33.

14. Culleton BF, Larson MG, Wilson PW, Evans JC, Parfrey PS, Levy D. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. Kidney Int. déc 1999;56(6):2214-9.

15. Madore F. [Vascular risk factors and renal failure]. Med Sci MS. déc 2004;20(12):1100-3.

16. Block GA. Prevalence and clinical consequences of elevated Ca x P product in hemodialysis patients. Clin Nephrol. oct 2000;54(4):318-24.

17. Schmitz A, Vaeth M. Microalbuminuria: a major risk factor in non-insulin-dependent diabetes. A 10-year follow-up study of 503 patients. Diabet Med J Br Diabet Assoc. mars 1988;5(2):126-34.

18. Grimm RH, Svendsen KH, Kasiske B, Keane WF, Wahi MM. Proteinuria is a risk factor for mortality over 10 years of follow-up. MRFIT Research Group. Multiple Risk Factor Intervention Trial. Kidney Int Suppl. déc 1997;63:S10-14.

19. Kasiske BL. Hyperlipidemia in patients with chronic renal disease. Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found. nov 1998;32(5 Suppl 3):S142-156.

20. Dennis VW, Nurko S, Robinson K. Hyperhomocysteinemia: detection, risk assessment, and treatment. Curr Opin Nephrol Hypertens. sept 1997;6(5):483-8.

21. Bergström J, Lindholm B, Lacson E, Owen W, Lowrie EG, Glassock RJ, et al. What are the causes and consequences of the chronic inflammatory state in chronic dialysis patients? Semin Dial. juin 2000;13(3):163-75.

22. Ronco C. The Cardiorenal Syndrome: Basis and Common Ground for a Multidisciplinary Patient-Oriented Therapy. Cardiorenal Med. 2011;1(1):3-4.

23. Di Lullo L, Floccari F, Polito P. Right ventricular diastolic function in dialysis patients could be affected by vascular access. Nephron Clin Pract. 2011;118(3):c257-261.

24. Ritz E. Left ventricular hypertrophy in renal disease: beyond preload and afterload. Kidney Int. avr 2009;75(8):771-3.

25. Gross M-L, Ritz E. Hypertrophy and fibrosis in the cardiomyopathy of uremia--beyond coronary heart disease. Semin Dial. août 2008;21(4):308-18.

26. Mominadam S, Ozkahya M, Kayikcioglu M, Toz H, Asci G, Duman S, et al. Interdialytic blood pressure obtained by ambulatory blood pressure measurement and left ventricular structure in hypertensive hemodialysis patients. Hemodial Int Int Symp Home Hemodial. juill 2008;12(3):322-7.

27. Steigerwalt S, Zafar A, Mesiha N, Gardin J, Provenzano R. Role of aldosterone in left ventricular hypertrophy among African-American patients with end-stage renal disease on hemodialysis. Am J Nephrol. 2007;27(2):159-63.

28. Zoccali C, Benedetto FA, Tripepi G, Mallamaci F. Cardiac consequences of hypertension in hemodialysis patients. Semin Dial. août 2004;17(4):299-303.

29. Di Lullo L, House A, Gorini A, Santoboni A, Russo D, Ronco C. Chronic kidney disease and cardiovascular complications. Heart Fail Rev. mai 2015;20(3):259-72.

30. Ronco C, McCullough P, Anker SD, Anand I, Aspromonte N, Bagshaw SM, et al. Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative. Eur Heart J. 1 mars 2010;31(6):703-11.

31. Parikh NI, Hwang S-J, Larson MG, Meigs JB, Levy D, Fox CS. Cardiovascular disease risk factors in chronic kidney disease: overall burden and rates of treatment and control. Arch Intern Med. 25 sept 2006;166(17):1884-91.

32. Spoto B, Pisano A, Zoccali C. Insulin resistance in chronic kidney disease: a systematic review. Am J Physiol Renal Physiol. 1 déc 2016;311(6):F1087-108.

33. Kurniawan AL, Hsu C-Y, Rau H-H, Lin L-Y, Chao JC-J. Association of kidney function-related dietary pattern, weight status, and cardiovascular risk factors with severity of impaired kidney function in middle-aged and older adults with chronic kidney disease: a cross-sectional population study. Nutr J. 22 avr 2019;18(1):27.

34. Kuster N, Moréna M, Bargnoux A-S, Leray H, Chenine L, Dupuy A-M, et al. [Biomarkers of cardiorenal syndrome]. Ann Biol Clin (Paris). août 2013;71(4):409-18.

35. Bayes-Genis A, Zhang Y, Ky B. ST2 and patient prognosis in chronic heart failure. Am J Cardiol. 2 avr 2015;115(7 Suppl):64B-9B.

36. Breidthardt T, Balmelli C, Twerenbold R, Mosimann T, Espinola J, Haaf P, et al. Heart failure therapy-induced early ST2 changes may offer long-term therapy guidance. J Card Fail. déc 2013;19(12):821-8.

37. Weir RAP, Miller AM, Murphy GEJ, Clements S, Steedman T, Connell JMC, et al. Serum soluble ST2: a potential novel mediator in left ventricular and infarct remodeling after

acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 19 janv 2010;55(3):243-50.

38. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Colvin MM, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA Focused Update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. Circulation. 08 2017;136(6):e137-61.

39. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. J Cell Physiol. nov 2010;225(3):631-7.

40. Sun Y, Kiani MF, Postlethwaite AE, Weber KT. Infarct scar as living tissue. Basic Res Cardiol. sept 2002;97(5):343-7.

41. Willems IE, Havenith MG, De Mey JG, Daemen MJ. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. Am J Pathol. oct 1994;145(4):868-75.

42. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. J Invest Dermatol. mars 2007;127(3):526-37.

43. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. Nat Rev Drug Discov. oct 2008;7(10):827-40.

44. Pascual-Figal DA, Januzzi JL. The biology of ST2: the International ST2 Consensus Panel. Am J Cardiol. 2 avr 2015;115(7 Suppl):3B-7B.

45. Gaggin HK, Januzzi JL. Biomarkers and diagnostics in heart failure. Biochim Biophys Acta. déc 2013;1832(12):2442-50.

46. Schmitter D, Cotter G, Voors AA. Clinical use of novel biomarkers in heart failure: towards personalized medicine. Heart Fail Rev. mai 2014;19(3):369-81.

47. Pouleur A-C. Which biomarkers do clinicians need for diagnosis and management of heart failure with reduced ejection fraction? Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 30 mars 2015;443:9-16.

48. Mueller T, Jaffe AS. Soluble ST2--analytical considerations. Am J Cardiol. 2 avr 2015;115(7 Suppl):8B-21B.

49. Dieplinger B, Mueller T. Soluble ST2 in heart failure. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 30 mars 2015;443:57-70.

50. Mueller T, Leitner I, Egger M, Haltmayer M, Dieplinger B. Association of the biomarkers soluble ST2, galectin-3 and growth-differentiation factor-15 with heart failure and other non-cardiac diseases. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 20 mai 2015;445:155-60.

51. Manzano-Fernández S, Mueller T, Pascual-Figal D, Truong QA, Januzzi JL. Usefulness of soluble concentrations of interleukin family member ST2 as predictor of mortality in patients with acutely decompensated heart failure relative to left ventricular ejection fraction. Am J Cardiol. 15 janv 2011;107(2):259-67.

52. Bartunek J, Delrue L, Van Durme F, Muller O, Casselman F, De Wiest B, et al. Nonmyocardial production of ST2 protein in human hypertrophy and failure is related to diastolic load. J Am Coll Cardiol. 16 déc 2008;52(25):2166-74.

53. Zile MR, Jhund PS, Baicu CF, Claggett BL, Pieske B, Voors AA, et al. Plasma Biomarkers Reflecting Profibrotic Processes in Heart Failure With a Preserved Ejection Fraction: Data From the Prospective Comparison of ARNI With ARB on Management of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Study. Circ Heart Fail. janv 2016;9(1).

54. AbouEzzeddine OF, McKie PM, Dunlay SM, Stevens SR, Felker GM, Borlaug BA, et al. Suppression of Tumorigenicity 2 in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. J Am Heart Assoc. 18 2017;6(2).

55. Zile MR, Jhund PS, Baicu CF, Claggett BL, Pieske B, Voors AA, et al. Plasma Biomarkers Reflecting Profibrotic Processes in Heart Failure With a Preserved Ejection Fraction: Data From the Prospective Comparison of ARNI With ARB on Management of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Study. Circ Heart Fail. janv 2016;9(1).

56. Pascual-Figal DA, Manzano-Fernández S, Boronat M, Casas T, Garrido IP, Bonaque JC, et al. Soluble ST2, high-sensitivity troponin T- and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide: complementary role for risk stratification in acutely decompensated heart failure. Eur J Heart Fail. juill 2011;13(7):718-25.

57. Dieplinger B, Egger M, Koehler W, Firlinger F, Poelz W, Lenz K, et al. Prognostic value of soluble ST2 in an unselected cohort of patients admitted to an intensive care unit - The Linz Intensive Care Unit (LICU) study. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 22 mars 2012;413(5-6):587-93.

58. Januzzi JL, Peacock WF, Maisel AS, Chae CU, Jesse RL, Baggish AL, et al. Measurement of the interleukin family member ST2 in patients with acute dyspnea: results from the PRIDE (Pro-Brain Natriuretic Peptide Investigation of Dyspnea in the Emergency Department) study. J Am Coll Cardiol. 14 août 2007;50(7):607-13.

59. Rehman SU, Mueller T, Januzzi JL. Characteristics of the novel interleukin family biomarker ST2 in patients with acute heart failure. J Am Coll Cardiol. 28 oct 2008;52(18):1458-65.

60. Shah RV, Chen-Tournoux AA, Picard MH, van Kimmenade RRJ, Januzzi JL. Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acute dyspnea. Circ Heart Fail. juill 2009;2(4):311-9.

61. Bayes-Genis A, de Antonio M, Galán A, Sanz H, Urrutia A, Cabanes R, et al. Combined use of high-sensitivity ST2 and NTproBNP to improve the prediction of death in heart failure. Eur J Heart Fail. janv 2012;14(1):32-8.

62. Martínez-Martínez E, Brugnolaro C, Ibarrola J, Ravassa S, Buonafine M, López B, et al. CT-1 (Cardiotrophin-1)-Gal-3 (Galectin-3) Axis in Cardiac Fibrosis and Inflammation. Hypertens Dallas Tex 1979. 2019;73(3):602-11.

63. van Kimmenade RR, Januzzi JL, Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, et al.

Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. J Am Coll Cardiol. 19 sept 2006;48(6):1217-24.

64. Shah RV, Chen-Tournoux AA, Picard MH, van Kimmenade RRJ, Januzzi JL. Galectin-3, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acutely decompensated heart failure. Eur J Heart Fail. août 2010;12(8):826-32.

65. van der Velde AR, Gullestad L, Ueland T, Aukrust P, Guo Y, Adourian A, et al. Prognostic value of changes in galectin-3 levels over time in patients with heart failure: data from CORONA and COACH. Circ Heart Fail. mars 2013;6(2):219-26.

66. Drechsler C, Delgado G, Wanner C, Blouin K, Pilz S, Tomaschitz A, et al. Galectin-3, Renal Function, and Clinical Outcomes: Results from the LURIC and 4D Studies. J Am Soc Nephrol JASN. sept 2015;26(9):2213-21.

67. López B, González A, Ravassa S, Beaumont J, Moreno MU, San José G, et al. Circulating Biomarkers of Myocardial Fibrosis: The Need for a Reappraisal. J Am Coll Cardiol. 9 juin 2015;65(22):2449-56.

68. Les types de collagene hydroxyproline os bone peau skin vieillissement age Texte et corriges travaux diriges Enseignement et recherche Biochimie Emmanuel Jaspard Universite Angers biochimej [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/TexteTD/7ModuleS6BG3/2Exo18/1ExoCollagene.htm

69. Heymans S, González A, Pizard A, Papageorgiou AP, López-Andrés N, Jaisser F, et al. Searching for new mechanisms of myocardial fibrosis with diagnostic and/or therapeutic potential. Eur J Heart Fail. août 2015;17(8):764-71.

70. Díez J, Querejeta R, López B, González A, Larman M, Martínez Ubago JL. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. Circulation. 28 mai 2002;105(21):2512-7.

71. Querejeta R, López B, González A, Sánchez E, Larman M, Martínez Ubago JL, et al.

Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. Circulation. 7 sept 2004;110(10):1263-8.

72. Querejeta R, Varo N, López B, Larman M, Artiñano E, Etayo JC, et al. Serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I is a marker of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. Circulation. 11 avr 2000;101(14):1729-35.

73. Klappacher G, Franzen P, Haab D, Mehrabi M, Binder M, Plesch K, et al. Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. Am J Cardiol. 1 mai 1995;75(14):913-8.

74. López B, Querejeta R, González A, Sánchez E, Larman M, Díez J. Effects of loop diuretics on myocardial fibrosis and collagen type I turnover in chronic heart failure. J Am Coll Cardiol. 2 juin 2004;43(11):2028-35.

75. Martos R, Baugh J, Ledwidge M, O'Loughlin C, Conlon C, Patle A, et al. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. Circulation. 20 févr 2007;115(7):888-95.

76. Martos R, Baugh J, Ledwidge M, O'Loughlin C, Murphy NF, Conlon C, et al. Diagnosis of heart failure with preserved ejection fraction: improved accuracy with the use of markers of collagen turnover. Eur J Heart Fail. févr 2009;11(2):191-7.

77. Zile MR, Desantis SM, Baicu CF, Stroud RE, Thompson SB, McClure CD, et al. Plasma biomarkers that reflect determinants of matrix composition identify the presence of left ventricular hypertrophy and diastolic heart failure. Circ Heart Fail. mai 2011;4(3):246-56.

78. Lombardi R, Betocchi S, Losi MA, Tocchetti CG, Aversa M, Miranda M, et al. Myocardial collagen turnover in hypertrophic cardiomyopathy. Circulation. 23 sept 2003;108(12):1455-60.

79. Ellims AH, Taylor AJ, Mariani JA, Ling L-H, Iles LM, Maeder MT, et al. Evaluating

the utility of circulating biomarkers of collagen synthesis in hypertrophic cardiomyopathy. Circ Heart Fail. 1 mars 2014;7(2):271-8.

80. Krum H, Elsik M, Schneider HG, Ptaszynska A, Black M, Carson PE, et al. Relation of peripheral collagen markers to death and hospitalization in patients with heart failure and preserved ejection fraction: results of the I-PRESERVE collagen substudy. Circ Heart Fail. sept 2011;4(5):561-8.

81. Izawa H, Murohara T, Nagata K, Isobe S, Asano H, Amano T, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism ameliorates left ventricular diastolic dysfunction and myocardial fibrosis in mildly symptomatic patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: a pilot study. Circulation. 8 nov 2005;112(19):2940-5.

82. Collier P, Watson CJ, Voon V, Phelan D, Jan A, Mak G, et al. Can emerging biomarkers of myocardial remodelling identify asymptomatic hypertensive patients at risk for diastolic dysfunction and diastolic heart failure? Eur J Heart Fail. oct 2011;13(10):1087-95.

83. Ho CY, López B, Coelho-Filho OR, Lakdawala NK, Cirino AL, Jarolim P, et al. Myocardial fibrosis as an early manifestation of hypertrophic cardiomyopathy. N Engl J Med. 5 août 2010;363(6):552-63.

84. Díez J, Querejeta R, López B, González A, Larman M, Martínez Ubago JL. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. Circulation. 28 mai 2002;105(21):2512-7.

85. López B, González A, Díez J. Role of matrix metalloproteinases in hypertension-associated cardiac fibrosis. Curr Opin Nephrol Hypertens. mars 2004;13(2):197-204.

86. Fassbach M, Schwartzkopff B. Elevated serum markers for collagen synthesis in patients with hypertrophic cardiomyopathy and diastolic dysfunction. Z Kardiol. mai 2005;94(5):328-35.

87. López B, González A, Querejeta R, Larman M, Díez J. Alterations in the pattern of

collagen deposition may contribute to the deterioration of systolic function in hypertensive patients with heart failure. J Am Coll Cardiol. 4 juill 2006;48(1):89-96.

88. Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, et al. Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. Circulation. 2 mai 2006;113(17):2089-96.

89. Dong F, Song J, Luo J, Zhao P, Ni G, Yu B. [Effects of exercise of different intensity on early repair of full-thickness articular cartilage defects and expressions of MMP-3 and TIMP-1 in rats]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. janv 2014;34(1):103-8.

90. López B, Ravassa S, González A, Zubillaga E, Bonavila C, Bergés M, et al. Myocardial Collagen Cross-Linking Is Associated With Heart Failure Hospitalization in Patients With Hypertensive Heart Failure. J Am Coll Cardiol. 26 janv 2016;67(3):251-60.

91. Lindsay MM, Maxwell P, Dunn FG. TIMP-1: a marker of left ventricular diastolic dysfunction and fibrosis in hypertension. Hypertens Dallas Tex 1979. août 2002;40(2):136-41.

92. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). Int J Biochem Cell Biol. mars 1998;30(3):293-8.

93. Frangogiannis NG. Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. Mol Aspects Med. févr 2019;65:70-99.

94. Thompson NL, Flanders KC, Smith JM, Ellingsworth LR, Roberts AB, Sporn MB. Expression of transforming growth factor-beta 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. J Cell Biol. févr 1989;108(2):661-9.

95. Agrotis A, Kalinina N, Bobik A. Transforming growth factor-beta, cell signaling and cardiovascular disorders. Curr Vasc Pharmacol. janv 2005;3(1):55-61.

96. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. J Cell Sci. 15 janv 2003;116(Pt 2):217-24.

97. Ignotz RA, Massagué J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J Biol Chem. 25 mars 1986;261(9):4337-45.

98. Rifkin DB, Mazzieri R, Munger JS, Noguera I, Sung J. Proteolytic control of growth factor availability. APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. janv 1999;107(1):80-5.

99. Massagué J. How cells read TGF-beta signals. Nat Rev Mol Cell Biol. déc 2000;1(3):169-78.

100. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell. 13 juin 2003;113(6):685-700.

101. ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. Trends Biochem Sci. mai 2004;29(5):265-73.

102. Feng X-H, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21:659-93.

103. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature. 9 oct 2003;425(6958):577-84.

104. Suwanabol PA, Kent KC, Liu B. TGF-β and Restenosis Revisited: A Smad Link. J Surg Res. 15 mai 2011;167(2):287-97.

105. Kai F, Qingyun R, Lyle S, Ben C. Transforming Growth Factor-β1 Bifunctionally Regulates Murine Macrophage Proliferation. Blood. 1 avr 1992;79(7):1679-85.

106. Shinde AV, Humeres C, Frangogiannis NG. The role of α-smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2017;1863(1):298-309.

107. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. J Cell Biol. juill 1993;122(1):103-11.

108. Mauviel A. Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis. Methods Mol Med. 2005;117:69-80.

109. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. Annu Rev Immunol. 1998;16:137-61.

110. Kitamura T, Tanaka N, Watanabe J, Uchida null, Kanegasaki S, Yamada Y, et al. Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med. 20 sept 1999;190(6):875-80.

111. Hanna A, Frangogiannis NG. The Role of the TGF-β Superfamily in Myocardial Infarction. Front Cardiovasc Med [Internet]. 2019 [cité 16 févr 2021];6. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2019.00140/full

112. Deten A, Hölzl A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. J Mol Cell Cardiol. juin 2001;33(6):1191-207.

113. Li JM, Brooks G. Differential protein expression and subcellular distribution of TGFbeta1, beta2 and beta3 in cardiomyocytes during pressure overload-induced hypertrophy. J Mol Cell Cardiol. août 1997;29(8):2213-24.

114. Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Ramires FJ. Angiotensin II, transforming growth factor-beta1 and repair in the infarcted heart. J Mol Cell Cardiol. août 1998;30(8):1559-69.

115. Characterization of the Inflammatory and Fibrotic Response in a Mouse Model of Cardiac Pressure Overload [Internet]. [cité 19 avr 2021]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2782393/

116. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. Cardiovasc Res. 1 mai 2007;74(2):184-95.

117. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming Growth Factor (TGF)-β

signaling in cardiac remodeling. J Mol Cell Cardiol. oct 2011;51(4):600-6.

118. Hsiao EC, Koniaris LG, Zimmers-Koniaris T, Sebald SM, Huynh TV, Lee SJ. Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor beta superfamily member induced following liver injury. Mol Cell Biol. mai 2000;20(10):3742-51.

119. Wollert KC, Kempf T, Lagerqvist B, Lindahl B, Olofsson S, Allhoff T, et al. Growth differentiation factor 15 for risk stratification and selection of an invasive treatment strategy in non ST-elevation acute coronary syndrome. Circulation. 2 oct 2007;116(14):1540-8.

120. Wollert KC, Kempf T. Growth differentiation factor 15 in heart failure: an update. Curr Heart Fail Rep. déc 2012;9(4):337-45.

121. Kempf T, Eden M, Strelau J, Naguib M, Willenbockel C, Tongers J, et al. The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. Circ Res. 17 févr 2006;98(3):351-60.

122. Schlittenhardt D, Schober A, Strelau J, Bonaterra GA, Schmiedt W, Unsicker K, et al. Involvement of growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in oxLDL-induced apoptosis of human macrophages in vitro and in arteriosclerotic lesions. Cell Tissue Res. nov 2004;318(2):325-33.

123. Bermúdez B, López S, Pacheco YM, Villar J, Muriana FJG, Hoheisel JD, et al. Influence of postprandial triglyceride-rich lipoproteins on lipid-mediated gene expression in smooth muscle cells of the human coronary artery. Cardiovasc Res. 15 juill 2008;79(2):294-303.

124. Ding Q, Mracek T, Gonzalez-Muniesa P, Kos K, Wilding J, Trayhurn P, et al. Identification of macrophage inhibitory cytokine-1 in adipose tissue and its secretion as an adipokine by human adipocytes. Endocrinology. avr 2009;150(4):1688-96.

125. Nickel N, Jonigk D, Kempf T, Bockmeyer CL, Maegel L, Rische J, et al. GDF-15 is abundantly expressed in plexiform lesions in patients with pulmonary arterial hypertension and affects proliferation and apoptosis of pulmonary endothelial cells. Respir Res. 6 mai

2011;12:62.

126. Lok SI, Winkens B, Goldschmeding R, van Geffen AJP, Nous FMA, van Kuik J, et al. Circulating growth differentiation factor-15 correlates with myocardial fibrosis in patients with non-ischaemic dilated cardiomyopathy and decreases rapidly after left ventricular assist device support. Eur J Heart Fail. nov 2012;14(11):1249-56.

127. Kou H, Jin X, Gao D, Ma R, Dong X, Wei J, et al. Association between growth differentiation factor 15 and left ventricular hypertrophy in hypertensive patients and healthy adults. Clin Exp Hypertens N Y N 1993. 2018;40(1):8-15.

128. Rohatgi A, Patel P, Das SR, Ayers CR, Khera A, Martinez-Rumayor A, et al. Association of growth differentiation factor-15 with coronary atherosclerosis and mortality in a young, multiethnic population: observations from the Dallas Heart Study. Clin Chem. janv 2012;58(1):172-82.

129. Kempf T, von Haehling S, Peter T, Allhoff T, Cicoira M, Doehner W, et al. Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. J Am Coll Cardiol. 11 sept 2007;50(11):1054-60.

130. Anand IS, Kempf T, Rector TS, Tapken H, Allhoff T, Jantzen F, et al. Serial measurement of growth-differentiation factor-15 in heart failure: relation to disease severity and prognosis in the Valsartan Heart Failure Trial. Circulation. 5 oct 2010;122(14):1387-95.

131. Izumiya Y, Hanatani S, Kimura Y, Takashio S, Yamamoto E, Kusaka H, et al. Growth differentiation factor-15 is a useful prognostic marker in patients with heart failure with preserved ejection fraction. Can J Cardiol. mars 2014;30(3):338-44.

132. Benes J, Kotrc M, Wohlfahrt P, Conrad MJ, Franekova J, Jabor A, et al. The Role of GDF-15 in Heart Failure Patients With Chronic Kidney Disease. Can J Cardiol. 2019;35(4):462-70.

133. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence

on cardiac form and function. Physiol Rev. oct 2007;87(4):1285-342.

134. Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifter S, Buttrick PM, Leinwand LA, Robinson TF, et al. Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. J Mol Cell Cardiol. janv 1989;21(1):103-13.

135. Banerjee I, Yekkala K, Borg TK, Baudino TA. Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. Ann N Y Acad Sci. oct 2006;1080:76-84.

136. Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. Cardiovasc Res. mai 2000;46(2):250-6.

137. van den Borne SWM, Isobe S, Zandbergen HR, Li P, Petrov A, Wong ND, et al. Molecular imaging for efficacy of pharmacologic intervention in myocardial remodeling. JACC Cardiovasc Imaging. févr 2009;2(2):187-98.

138. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. Experientia. 15 mai 1971;27(5):549-50.

139. Shiojima I, Aikawa M, Suzuki J, Yazaki Y, Nagai R. Embryonic smooth muscle myosin heavy chain SMemb is expressed in pressure-overloaded cardiac fibroblasts. Jpn Heart J. nov 1999;40(6):803-18.

140. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. mai 2002;3(5):349-63.

141. Assinder SJ, Stanton J-AL, Prasad PD. Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor. Int J Biochem Cell Biol. mars 2009;41(3):482-6.

142. Robin Y-M, Penel N, Pérot G, Neuville A, Vélasco V, Ranchère-Vince D, et al. Transgelin is a novel marker of smooth muscle differentiation that improves diagnostic accuracy of leiomyosarcomas: a comparative immunohistochemical reappraisal of myogenic markers in 900 soft tissue tumors. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. avr

2013;26(4):502-10.

143. Makuch R, Birukov K, Shirinsky V, Dabrowska R. Functional interrelationship between calponin and caldesmon. Biochem J. 15 nov 1991;280 (Pt 1):33-8.

144. Frid MG, Shekhonin BV, Koteliansky VE, Glukhova MA. Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin. Dev Biol. oct 1992;153(2):185-93.

145. Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. Exp Cell Res. 1 août 1999;250(2):273-83.

146. Xu G, Redard M, Gabbiani G, Neuville P. Cellular retinol-binding protein-1 is transiently expressed in granulation tissue fibroblasts and differentially expressed in fibroblasts cultured from different organs. Am J Pathol. déc 1997;151(6):1741-9.

147. Dugina V, Alexandrova A, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G. Rat fibroblasts cultured from various organs exhibit differences in alpha-smooth muscle actin expression, cytoskeletal pattern, and adhesive structure organization. Exp Cell Res. 1 févr 1998;238(2):481-90.

148. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. Matsudaira PT, éditeur. Mol Biol Cell. sept 2001;12(9):2730-41.

149. Rice NA, Leinwand LA. Skeletal myosin heavy chain function in cultured lung myofibroblasts. J Cell Biol. 13 oct 2003;163(1):119-29.

150. Desmoulière A, Gabbiani G. Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during pathological situations: the role of extracellular matrix and cytokines. Cell Motil Cytoskeleton. 1994;29(3):195-203.

151. Lazard D, Sastre X, Frid MG, Glukhova MA, Thiery JP, Koteliansky VE. Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal

and malignant human breast tissue. Proc Natl Acad Sci U S A. 1 févr 1993;90(3):999-1003.

152. Mulholland DL, Gotlieb AI. Cell biology of valvular interstitial cells. Can J Cardiol. mars 1996;12(3):231-6.

153. Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E, Cattini PA. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. Cardiovasc Res. janv 2003;57(1):8-19.

154. Stawowy P, Margeta C, Kallisch H, Seidah NG, Chrétien M, Fleck E, et al. Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF-beta1 involves furin-convertase. Cardiovasc Res. 1 juill 2004;63(1):87-97.

155. Mitchell MD, Laird RE, Brown RD, Long CS. IL-1β stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways. Am J Physiol-Heart Circ Physiol. 1 févr 2007;292(2):H1139-47.

156. Freed DH, Chilton L, Li Y, Dangerfield AL, Raizman JE, Rattan SG, et al. Role of myosin light chain kinase in cardiotrophin-1-induced cardiac myofibroblast cell migration. Am J Physiol Heart Circ Physiol. août 2011;301(2):H514-522.

157. Hinz B, Pittet P, Smith-Clerc J, Chaponnier C, Meister J-J. Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions. Mol Biol Cell. sept 2004;15(9):4310-20.

158. Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 12 juin 2012;109(24):9448-53.

159. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol. janv 2008;214(2):199-210.

160. Li Y, Huard J. Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. Am J Pathol. sept 2002;161(3):895-907.

161. Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth

factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. J Mol Cell Cardiol. juill 1997;29(7):1947-58.

162. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. J Clin Invest. juin 1994;93(6):2431-7.

163. Lijnen P, Petrov V. Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. J Mol Cell Cardiol. juin 2000;32(6):865-79.

164. van den Borne SWM, Diez J, Blankesteijn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. Nat Rev Cardiol. janv 2010;7(1):30-7.

165. Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, Tsutsui T, Ishii C, Ohno K, et al. Immediate administration of mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents post-infarct left ventricular remodeling associated with suppression of a marker of myocardial collagen synthesis in patients with first anterior acute myocardial infarction. Circulation. 27 mai 2003;107(20):2559-65.

166. Rickard AJ, Morgan J, Tesch G, Funder JW, Fuller PJ, Young MJ. Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against deoxycorticosterone/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure. Hypertens Dallas Tex 1979. sept 2009;54(3):537-43.

167. Neumann S, Huse K, Semrau R, Diegeler A, Gebhardt R, Buniatian GH, et al. Aldosterone and D-glucose stimulate the proliferation of human cardiac myofibroblasts in vitro. Hypertens Dallas Tex 1979. 1 mars 2002;39(3):756-60.

168. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. J Mol Cell Cardiol. juill 1994;26(7):809-20.

169. Rickard AJ, Morgan J, Bienvenu LA, Fletcher EK, Cranston GA, Shen JZ, et al. Cardiomyocyte mineralocorticoid receptors are essential for deoxycorticosterone/salt-mediated inflammation and cardiac fibrosis. Hypertens Dallas Tex 1979. déc 2012;60(6):1443-50.

170. Li C, Sun X-N, Zeng M-R, Zheng X-J, Zhang Y-Y, Wan Q, et al. Mineralocorticoid Receptor Deficiency in T Cells Attenuates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Dysfunction Through Modulating T-Cell Activation. Hypertens Dallas Tex 1979. 2017;70(1):137-47.

171. Brand-Saberi B, Christ B. Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites. Curr Top Dev Biol. 2000;48:1-42.

172. Hay ED, Zuk A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found. oct 1995;26(4):678-90.

173. Lang H, Fekete DM. Lineage analysis in the chicken inner ear shows differences in clonal dispersion for epithelial, neuronal, and mesenchymal cells. Dev Biol. 1 juin 2001;234(1):120-37.

174. Maric M, Chen L, Sherry B, Liu Y. A mechanism for selective recruitment of CD8 T cells into B7-1-transfected plasmacytoma: role of macrophage-inflammatory protein 1alpha. J Immunol Baltim Md 1950. 1 juill 1997;159(1):360-8.

175. Ogawa M, LaRue AC, Drake CJ. Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: its pathophysiologic implications. Blood. 1 nov 2006;108(9):2893-6.

176. Acharya A, Baek ST, Huang G, Eskiocak B, Goetsch S, Sung CY, et al. The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast progenitors. Dev Camb Engl. juin 2012;139(12):2139-49.

177. Turner NA, Porter KE. Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. Fibrogenesis Tissue Repair. 1 mars 2013;6(1):5.

178. Zeisberg EM, Kalluri R. Origins of cardiac fibroblasts. Circ Res. 26 nov 2010;107(11):1304-12.

179. Crawford JR, Haudek SB, Cieslik KA, Trial J, Entman ML. Origin of developmental precursors dictates the pathophysiologic role of cardiac fibroblasts. J Cardiovasc Transl Res. déc 2012;5(6):749-59.

180. Biernacka A, Frangogiannis NG. Aging and Cardiac Fibrosis. Aging Dis. avr 2011;2(2):158-73.

181. Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Ckhastonay C, Vandekerckhove J, et al. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. Proc Natl Acad Sci U S A. janv 1981;78(1):298-302.

182. Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. J Cell Biol. 1 juin 1979;81(3):570-80.

183. Fu X., Khalil H., Kanisicak O. Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. J Clin Invest. 2018; - Recherche Google [Internet]. [cité 6 oct 2020]. Disponible sur: https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=Fu+X.%2C+Khalil+H.%2C+Kanisicak+O.+Specialized+fibroblast+differentiated+states+underlie+scar+formation+in+the+infarcted+mouse+heart.+J+Clin+Invest.+2018%3B

184. Kanisicak O, Khalil H, Ivey MJ, Karch J, Maliken BD, Correll RN, et al. Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart. Nat Commun. 22 2016;7:12260.

185. Moore-Morris T, Cattaneo P, Guimarães-Camboa N, Bogomolovas J, Cedenilla M, Banerjee I, et al. Infarct Fibroblasts Do Not Derive From Bone Marrow Lineages. Circ Res. 16 2018;122(4):583-90.

186. Moore-Morris T, Guimarães-Camboa N, Banerjee I, Zambon AC, Kisseleva T,

Velayoudon A, et al. Resident fibroblast lineages mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis. J Clin Invest. juill 2014;124(7):2921-34.

187. Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, et al. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. J Exp Med. 18 févr 2008;205(2):295-303.

188. Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto S, Nishimura S, et al. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. J Clin Invest. janv 2010;120(1):254-65.

189. Snider P, Hinton RB, Moreno-Rodriguez RA, Wang J, Rogers R, Lindsley A, et al. Periostin is required for maturation and extracellular matrix stabilization of noncardiomyocyte lineages of the heart. Circ Res. 11 avr 2008;102(7):752-60.

190. Chang M-L, Chen J-C, Alonso CR, Kornblihtt AR, Bissell DM. Regulation of fibronectin splicing in sinusoidal endothelial cells from normal or injured liver. Proc Natl Acad Sci U S A. 28 déc 2004;101(52):18093-8.

191. Doddapattar P, Gandhi C, Prakash P, Dhanesha N, Grumbach IM, Dailey ME, et al. Fibronectin Splicing Variants Containing Extra Domain A Promote Atherosclerosis in Mice Through Toll-Like Receptor 4. Arterioscler Thromb Vasc Biol. nov 2015;35(11):2391-400.

192. Santiago J-J, Dangerfield AL, Rattan SG, Bathe KL, Cunnington RH, Raizman JE, et al. Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat. juin 2010;239(6):1573-84.

193. Chen L, Acciani T, Le Cras T, Lutzko C, Perl A-KT. Dynamic regulation of platelet-derived growth factor receptor α expression in alveolar fibroblasts during realveolarization. Am J Respir Cell Mol Biol. oct 2012;47(4):517-27.

194. Squires CE, Escobar GP, Payne JF, Leonardi RA, Goshorn DK, Sheats NJ, et al. Altered

fibroblast function following myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol. oct 2005;39(4):699-707.

195. Zhang S., Bu X., Zhao H. A host deficiency of discoidin domain receptor 2 (DDR2) inhibits both tumour angiogenesis and metastasis. J Pathol. 2014 - Recherche Google [Internet]. [cité 6 oct 2020]. Disponible sur: https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=Zhang+S.%2C+Bu+X.%2C+Zhao+H.+A+host+deficiency+of+discoidin+domain+receptor+2+%28DDR2%29+inhibits+both+tumour+angiogenesis+and+metastasis.+J+Pathol.+2014

196. Shyu K-G, Chao Y-M, Wang B-W, Kuan P. Regulation of discoidin domain receptor 2 by cyclic mechanical stretch in cultured rat vascular smooth muscle cells. Hypertens Dallas Tex 1979. sept 2005;46(3):614-21.

197. Furtado MB, Costa MW, Pranoto EA, Salimova E, Pinto AR, Lam NT, et al. Cardiogenic genes expressed in cardiac fibroblasts contribute to heart development and repair. Circ Res. 25 avr 2014;114(9):1422-34.

198. Hudon-David F, Bouzeghrane F, Couture P, Thibault G. Thy-1 expression by cardiac fibroblasts: lack of association with myofibroblast contractile markers. J Mol Cell Cardiol. mai 2007;42(5):991-1000.

199. Jurisic G, Iolyeva M, Proulx ST, Halin C, Detmar M. Thymus cell antigen 1 (Thy1, CD90) is expressed by lymphatic vessels and mediates cell adhesion to lymphatic endothelium. Exp Cell Res. 15 oct 2010;316(17):2982-92.

200. Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, et al. Revisiting Cardiac Cellular Composition. Circ Res. 5 févr 2016;118(3):400-9.

201. Braitsch CM, Kanisicak O, van Berlo JH, Molkentin JD, Yutzey KE. Differential expression of embryonic epicardial progenitor markers and localization of cardiac fibrosis in adult ischemic injury and hypertensive heart disease. J Mol Cell Cardiol. déc 2013;65:108-19.

202. Kong P, Christia P, Saxena A, Su Y, Frangogiannis NG. Lack of specificity of fibroblast-specific protein 1 in cardiac remodeling and fibrosis. Am J Physiol - Heart Circ Physiol. 1 nov 2013;305(9):H1363-72.

203. Schneider M, Kostin S, Strøm CC, Aplin M, Lyngbaek S, Theilade J, et al. S100A4 is upregulated in injured myocardium and promotes growth and survival of cardiac myocytes. Cardiovasc Res. 1 juill 2007;75(1):40-50.

204. Alex L, Russo I, Holoborodko V, Frangogiannis NG. Characterization of a mouse model of obesity-related fibrotic cardiomyopathy that recapitulates features of human heart failure with preserved ejection fraction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 01 2018;315(4):H934-49.

205. Tillmanns J, Hoffmann D, Habbaba Y, Schmitto JD, Sedding D, Fraccarollo D, et al. Fibroblast activation protein alpha expression identifies activated fibroblasts after myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol. oct 2015;87:194-203.

206. Sakairi T, Hiromura K, Yamashita S, Takeuchi S, Tomioka M, Ideura H, et al. Nestin expression in the kidney with an obstructed ureter. Kidney Int. août 2007;72(3):307-18.

207. Calderone A. Nestin+ cells and healing the infarcted heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1 janv 2012;302(1):H1-9.

208. Fu X, Khalil H, Kanisicak O, Boyer JG, Vagnozzi RJ, Maliken BD, et al. Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. J Clin Invest. 01 2018;128(5):2127-43.

209. Ruiz-Villalba A, Simón AM, Pogontke C, Castillo MI, Abizanda G, Pelacho B, et al. Interacting resident epicardium-derived fibroblasts and recruited bone marrow cells form myocardial infarction scar. J Am Coll Cardiol. 19 mai 2015;65(19):2057-66.

210. Zhou B, Honor LB, He H, Ma Q, Oh J-H, Butterfield C, et al. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. J Clin Invest. mai 2011;121(5):1894-904.

211. Möllmann H, Nef HM, Kostin S, von Kalle C, Pilz I, Weber M, et al. Bone marrow-derived cells contribute to infarct remodelling. Cardiovasc Res. 1 sept 2006;71(4):661-71.

212. Fujita J, Mori M, Kawada H, Ieda Y, Tsuma M, Matsuzaki Y, et al. Administration of granulocyte colony-stimulating factor after myocardial infarction enhances the recruitment of hematopoietic stem cell-derived myofibroblasts and contributes to cardiac repair. Stem Cells Dayt Ohio. nov 2007;25(11):2750-9.

213. Kramann R, Schneider RK, DiRocco DP, Machado F, Fleig S, Bondzie PA, et al. Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. Cell Stem Cell. 8 janv 2015;16(1):51-66.

214. Aisagbonhi O, Rai M, Ryzhov S, Atria N, Feoktistov I, Hatzopoulos AK. Experimental myocardial infarction triggers canonical Wnt signaling and endothelial-to-mesenchymal transition. Dis Model Mech. juill 2011;4(4):469-83.

215. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. Nat Med. août 2007;13(8):952-61.

216. Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. Circ Res. 18 mars 2016;118(6):1021-40.

217. Dejana E, Hirschi KK, Simons M. The molecular basis of endothelial cell plasticity. Nat Commun [Internet]. 9 févr 2017 [cité 7 oct 2020];8. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5309780/

218. Leask A. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. Cardiovasc Res. 1 mai 2007;74(2):207-12.

219. Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. Circ Res. 6 août 2004;95(3):253-60.

220. Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, et al. Of Mice and Dogs: Species-Specific Differences in the Inflammatory Response Following Myocardial Infarction. Am J Pathol. 1 févr 2004;164(2):665-77.

221. Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. J Biol Chem. 18 mai 2001;276(20):17058-62.

222. Davis J, Burr AR, Davis GF, Birnbaumer L, Molkentin JD. A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing in vivo. Dev Cell. 16 oct 2012;23(4):705-15.

223. Meyer-Ter-Vehn T, Gebhardt S, Sebald W, Buttmann M, Grehn F, Schlunck G, et al. p38 inhibitors prevent TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts. Invest Ophthalmol Vis Sci. avr 2006;47(4):1500-9.

224. Meng X-M, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-β: the master regulator of fibrosis. Nat Rev Nephrol. 2016;12(6):325-38.

225. Tuegel C, Katz R, Alam M, Bhat Z, Bellovich K, de Boer I, et al. GDF-15, Galectin 3, Soluble ST2, and Risk of Mortality and Cardiovascular Events in CKD. Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found. 2018;72(4):519-28.

226. Alam ML, Katz R, Bellovich KA, Bhat ZY, Brosius FC, de Boer IH, et al. Soluble ST2 and Galectin-3 and Progression of CKD. Kidney Int Rep. janv 2019;4(1):103-11.

227. Keddis MT, El-Zoghby Z, Kaplan B, Meeusen JW, Donato LJ, Cosio FG, et al. Soluble ST2 does not change cardiovascular risk prediction compared to cardiac troponin T in kidney transplant candidates. PloS One. 2017;12(7):e0181123.

228. Krzesinski JM SA. La maladie rénale diabétique : prise en charge actuelle et perspectives d'avenir [Internet]. Revue Médicale Suisse. [cité 27 avr 2021]. Disponible sur: https://www.revmed.ch/RMS/2015/RMS-N-483/La-maladie-renale-diabetique-prise-en-

charge-actuelle-et-perspectives-d-avenir

229. Aoki T, Fukumoto Y, Sugimura K, Oikawa M, Satoh K, Nakano M, et al. Prognostic impact of myocardial interstitial fibrosis in non-ischemic heart failure. -Comparison between preserved and reduced ejection fraction heart failure.-. Circ J Off J Jpn Circ Soc. 2011;75(11):2605-13.

230. Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. J Am Coll Cardiol. 23 juill 2013;62(4):263-71.

231. Kato S, Saito N, Kirigaya H, Gyotoku D, Iinuma N, Kusakawa Y, et al. Prognostic significance of quantitative assessment of focal myocardial fibrosis in patients with heart failure with preserved ejection fraction. Int J Cardiol. 15 juill 2015;191:314-9.

232. Roy C, Slimani A, de Meester C, Amzulescu M, Pasquet A, Vancraeynest D, et al. Associations and prognostic significance of diffuse myocardial fibrosis by cardiovascular magnetic resonance in heart failure with preserved ejection fraction. J Cardiovasc Magn Reson Off J Soc Cardiovasc Magn Reson. 08 2018;20(1):55.

233. Wong TC, Piehler KM, Kang IA, Kadakkal A, Kellman P, Schwartzman DS, et al. Myocardial extracellular volume fraction quantified by cardiovascular magnetic resonance is increased in diabetes and associated with mortality and incident heart failure admission. Eur Heart J. mars 2014;35(10):657-64.

234. Martínez-Martínez E, Cachofeiro V, Rousseau E, Álvarez V, Calvier L, Fernández-Celis A, et al. Interleukin-33/ST2 system attenuates aldosterone-induced adipogenesis and inflammation. Mol Cell Endocrinol. 15 août 2015;411:20-7.

235. Zacchigna S. Towards standardization of echocardiography for the evaluation of left ventricular function in adult rodents: a position paper of the ESC Working Group on Myocardial Function - PubMed [Internet]. [cité 19 avr 2021]. Disponible sur:

https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32365197/

236. Cordaillat M, Reboul C, Gaillard V, Lartaud I, Jover B, Rugale C. Plasma volume and arterial stiffness in the cardiac alterations associated with long-term high sodium feeding in rats. Am J Hypertens. avr 2011;24(4):451-7.

237. Pedersen BK. Muscles and their myokines. J Exp Biol. 15 janv 2011;214(Pt 2):337-46.

238. Lee JH, Jun H-S. Role of Myokines in Regulating Skeletal Muscle Mass and Function. Front Physiol. 2019;10:42.

239. Bamman MM, Roberts BM, Adams GR. Molecular Regulation of Exercise-Induced Muscle Fiber Hypertrophy. Cold Spring Harb Perspect Med. 01 2018;8(6).

240. Doroudgar S, Glembotski CC. The cardiokine story unfolds: ischemic stress-induced protein secretion in the heart. Trends Mol Med. avr 2011;17(4):207-14.

241. Shimano M, Ouchi N, Walsh K. Cardiokines: recent progress in elucidating the cardiac secretome. Circulation. 20 nov 2012;126(21):e327-332.

242. Matsuo Y, Gleitsmann K, Mangner N, Werner S, Fischer T, Bowen TS, et al. Fibronectin type III domain containing 5 expression in skeletal muscle in chronic heart failure-relevance of inflammatory cytokines. J Cachexia Sarcopenia Muscle. mars 2015;6(1):62-72.

243. Seki M, Powers JC, Maruyama S, Zuriaga MA, Wu C-L, Kurishima C, et al. Acute and Chronic Increases of Circulating FSTL1 Normalize Energy Substrate Metabolism in Pacing-Induced Heart Failure. Circ Heart Fail. 2018;11(1):e004486.

Annexe 1

Clinica Chimica Acta 490 (2019) 167–171

Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cca

Exploring collagen remodeling and regulation as prognosis biomarkers in stable heart failure

Anne Marie Dupuy[a,1], Nils Kuster[a,c,1], Corentin Curinier[b], Fabien Huet[b], Maelle Plawecki[a], Kamila Solecki[b], François Roubille[b,c], Jean Paul Cristol[a,c,*]

[a] Department of Biochemistry, Centre Ressources Biologiques de Montpellier, University Hospital of Montpellier, Montpellier, France
[b] Cardiology Department, University Hospital of Montpellier, Montpellier, France
[c] PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM U1046, CNRS UMR, 9214 Montpellier, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Fibrosis-related biomarkers
Heart failure
Mediators of cardiac fibrosis
Active remodeling
Predictive value

ABSTRACT

We assessed the predictive ability of circulating biomarkers involved in collagen synthesis (procollagen type I N-terminal propeptide [PINP], and procollagen type III N-terminal propeptide [PIIINP], collagen degradation (c-terminal telopeptide of collagen type I [CTx] and mediators of cardiac fibrosis (Galectin-3 and soluble suppression of tumorigenicity 2 protein or sST2) as prognosis markers in 182 subjects with chronic heart failure (HF). In univariate analysis, all markers predicted mortality (except for PINP). A multivariate baseline model was fitted including variables potentially associated with mortality in HF patients. The baseline regression model included age, clinical data and biomarkers. We created four models from the baseline model augmented with the levels of hs-cTnT, CRP and NT-proBNP (model 1), CTx/PIIINP ratio, sST2 and Galectine-3 (model 2), NT-proBNP and sST2 (model 3) and NT-proBNP, CTx/PIIINP ratio and sST2 (model 4), to test whether these biomarkers have an incremental value for predicting mortality. After the addition of all biomarkers to the baseline model, age, CTx/PIIINP ratio and sST2 remained significant predictors. By contrast, Galectin-3 was not significantly associated with mortality. A multimarker strategy, demonstrated that the greatest prognostic improvement was attained with the combined addition of CTx/PIIINP ratio and sST2 highlighting the potential role of fibrosis pathways in risk stratification.

1. Introduction

Cardiac fibrosis which could be related to turn over of collagen, is a crucial component of cardiac remodeling and contributes to the progression of heart failure (HF). It is a major determinant of myocardial stiffness, left ventricular contractility and risk of cardiac arrhythmias. It is a complex phenomenon linked to collagen metabolism and highly regulated by paracrine mediators such as soluble suppression of tumorigenesis 2 protein (sST2) and galectin-3 (Gal-3). These two biomarkers were identified in macrophages and fibroblasts, and were considered key regulators of collagen synthesis [1], inflammation and immune response. Otherwise, although non-specific to the myocardium, serum markers of collagen turnover have been proposed for identification of myocardial fibrosis [2–4]. The aim of our study was to evaluate circulating biomarkers involved in collagen synthesis (such as PINP, PIIINP), collagen degradation (CTx), and mediators of cardiac fibrosis (Gal-3 and sST2) as prognosis markers in a population with chronic HF.

2. Methods

2.1. Study protocol and samples

The current work was a retrospective study which was based in a previous biologic bank build in 2011 for which we supplemented with specific biomarkers collagen metabolism. This registry of patients with diagnostic of stable HF based on criteria of the European Society of Cardiology, has been described in details in supplementary appendix (see Study population, follow up and outcomes).

At inclusion of patients, routine parameters such as urea, electrolytes, creatinine, NT-proBNP, hs-cTnT and CRP, were performed. In addition, venous blood was collected in dry and EDTA tubes, immediately centrifuged and frozen (−80 °C) on several aliquots until tested four years later before analysis of sST2, PINP, PIIINP, CTx and

* Corresponding author at: Biochemistry Department, University Hospital of Montpellier, Montpellier, France.
E-mail address: jp-cristol@chu-montpellier.fr (J.P. Cristol).
[1] These authors contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.08.042
Received 17 April 2018; Received in revised form 29 August 2018; Accepted 29 August 2018
Available online 01 September 2018
0009-8981/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Gal-3. All assays were performed with the use of commercially available reagents (Principles of the methods are provided in Methods section in supplementary appendix).

2.2. Statistical analysis

Categorical data are expressed as count (percentage). Continuous data are expressed as median [1st quartile; 3rd quartile]. In descriptive statistics, comparisons between two groups were performed using the Mann-Whitney *U* test for continuous variables and the chi-square test for categorical variables. The reported correlation coefficients were derived using a non-parametric method (Spearman's rank correlation). Correction for multiple correlation tests were performed using Holm's method. Survival curves were generated using a Kaplan-Meier non-parametric estimator, and a log-rank test was used to compare multiple survival distributions. Survival analysis was performed using the Cox proportional hazard model. A multivariate baseline model was fitted, including variables potentially associated with mortality in HF patients. This baseline regression model included age, NYHA class, LVEF. Model 1 was baseline model augmented with hs-cTnT, CRP, and NT-proBNP while model 2 included CTx/PIIINP ratio, sST2 and Gal-3. Model 3 was the baseline model adjusted by NT-proBNP and sST2. The last model (model 4) was the baseline model adjusted by NT-proBNP, CTx/PIIINP ratio and sST2. Because of skewed distributions, biomarker concentrations were log-transformed before modelling. Goodness of fit was assessed using Akaike's information criterion. Category-less (net reclassification improvement or NRI) was used to test the added usefulness of new biomarkers in Cox models. Comparison of two nested models was performed using the likelihood ratio test. Statistical analysis was performed using R 3.1.3 (R Development Core Team, Vienna, Austria).

3. Results

Of 182 consecutive patients considered for the study between May 2010 and February 2011, all biochemical measurements (adding the markers included in this study) and vital statuses were available for 164, which were included in our analysis. Over a median follow-up period of 42.3 months (range 12,3 to 47,1 months) there were 63 deaths (35%). The clinical and biochemical variables of survivors versus those of the deceased are reported in Table A given in supplementary appendix. At the start of the project, we included patients independently of their ejection fraction. However, of the 182 patients, a majority had a reduced left ventricular ejection fraction including 100 patients with ejection fraction < 40%, 39 from 40 to 50%, and 43 with ejection fraction > 50%.

The Kaplan-Meier analysis of cumulative rates of survival is shown in Fig. A available in supplementary appendix. Mortality increased in patients presenting sST2, Gal-3, PIIINP, CTx concentrations and CTx/PIIINP ratio concentrations higher than the median value (Fig. A, $p < .001$ for all).

In univariate Cox regression analysis over the 42 months, age, NYHA class and all the biomarkers except PINP (but including Gal-3, PIIINP, CTx and CTx/PIIINP ratio) were associated with all causes of mortality, as well as with cardiovascular mortality in particular (Table 1A).

In the multivariate baseline model, age remained independent predictors of all-cause and cardiovascular mortality (Table 1B and 1C) in all models. In model 1, age and NT-proBNP, were found associated with all cause and cardiovascular mortality, however, CRP was only associated to cardiovascular mortality. By contrast, in model 2, only CTX/PIIINP ratio and sST2 remained significant predictors. After the addition of NT-proBNP and sST2 to the baseline model (model 3), age and sST2 remained significant predictors. In the last model (model 4), age, CTx/PIIINP ratio, and sST2 remained significant predictors of all cause and cardiovascular mortality, while NT-proBNP was not. NT-proBNP and sST2 allow better predictions of the risk of death, as shown by a lower Akaike's Information Criterion and a higher C-statistic (model 3). This was confirmed by reclassification analysis (continuous NRI = 0.272, $p = .016$). Further addition of CTX/PIIINP ratio (model 4) led to even better prediction performances (C-statistic = 0.746, continuous NRI = 32.5%, $p = .049$ as compared to model with NT-proBNP and sST2). If model 4 was adjusted by CRP, only the CTx/PIIINP ratio and the sST2 remain significantly associated with all cause or cardiovascular mortality (data not shown).

A multimarker strategy based on Cox proportional hazard model has also been evaluated, analyzing the incremental value of CTx/PIIINP ratio over clinical parameters (age, NYHA and LVEF) and sST2. This model, including sST2, CTx/PIIINP ratio dichotomized as above (high) or below the median (low), performed better than a model including only sST2 (likelihood ratio test: $p = .003$) and better reflected the risk of mortality (category-less NRI = 35,6%, $p = 0{,}034$). Fig. 1 depicts the predicted *hazard ratio* (HR) (CI 95%) according to biomarkers levels. The additive value of ST2 and CTx/PIIINP ratio was significant for predicting worsened outcomes (HR 5.35, 95%CI 2.31–12.36, for high sST2 and high CTx/PIIINP ratio $p \leq .0001$, as compared to low sST2 and low Ctx/PIIINP ratio after adjustment for NYHA class, age, and LVEF, C-statistic = 0,72) (Fig. 1). Kaplan Meier analyses also showed significant separation of survival curves for patients with low and/or high levels of sST2 and CTx/PIIINP ratio for 3-year survival. Patients with both high ST2 and CTx/PIIINP ratio experienced a mortality rate of around 54.6% at 3 years (vs 8.7% in patients with both low sST2 and CTx/PIIINP ratio), indicating that assessment of both ST2 and fibrosis related markers was more effective at identifying a high risk subgroup that individual assessment of either marker.

4. Discussion

In the present study, we highlighted the risk stratification value of circulating biomarkers involved in collagen metabolism with sST2, Gal-3, PINP, PIIINP and CTx in a population with stable chronic HF. Association with all cause or cardiovascular mortality, after adjustment for clinical parameters and biomarkers, did not persist for Gal-3, whereas it remained significant for sST2 and CTx/PIIINP ratio, suggesting that high turnover of collagen is associated with poor prognosis. Our multimarker approach, demonstrated that collagen metabolism biomarkers particularly the CTx/PIIINP ratio add predictive value to sST2 and clinical data.

4.1. Collagen turnover products

Beyond close correlation between sST2 and CTx/PIIINP ratio (rho = 0.27, $p < .01$), their combination further improves risk stratification allowing discrimination of patients at high risk. High CTx/PIIINP ratio could suggest high levels of collagen turnover. Multivariate Cox regression analysis demonstrated an additive prognostic value of CTx/PIIINP ratio, independent of clinical parameters and other biological markers such as NT-proBNP, CRP, sST2 and Gal-3. Our results were comparable about a recent study of Lofsjorgard et al. on relationship between HF and markers of collagen degradation and synthesis. We found also the significant relationship between CTx/PIIINP ratio and NYHA class I, II, III and IV (Median [Q1:Q3] CTx/PIIINP ratio,-1.78 [−1.85: −1.74]; −1.46, [−1.85:-1.12]; −1.31 [−1.62: −0.884]); −1.1[−1.36:- 0.75; respectively) ($p < .001$). Following these data and ours, there is strong evidence to indicate that excessive degradation would be associated with a poor prognosis. The degradation of collagen fibers in a normal situation involves the action of MMPs. However, of note, the presence of excessive collagen turn over leads to cross linking collagen formation that are resistant to MMPs action. Therefore, the circulating serum CTx is of great interest because it is not formed from MMPs, unlike other markers of collagen

Table 1
(A) Univariate Cox regression analysis over 42 months for prediction of all-cause and cardiovascular mortality; (B) Multivariate Cox regression analysis after adjusting clinical parameters for prediction of (B) all-cause mortality and (C) cardiovascular mortality.

(A)

Variable	All-cause mortality		Cardiovascular mortality	
	HR [95% CI]	p	HR [95% CI]	p
Age	1.04 [1.02; 1.07]	< **0.001**	1.05 [1.01; 1.09]	**0.003**
Gender: Male	1.18 [0.68; 2.04]	0.540	0.99 [0.48; 2.03]	0.986
Dyslipidemia	1.22 [0.74; 2.01]	0.420	1.05 [0.53; 2.07]	0.879
NYHA class	2.15 [1.20; 3.84]	**0.010**	2.19 [0.99; 4.84]	**0.053**
LVEF	0.98 [0.96; 1.00]	0.192	0.98 [0.96; 1.01]	0.316
Hs-cTnT (log 10)	1.26 [1.10; 1.45]	**0.001**	1.33 [1.10; 1.60]	**0.003**
CRP (log 10)	1.39 [1.17; 1.64]	< **0.001**	1.54 [1.22; 1.94]	< **0.001**
NT-proBNP (log 10)	1.61 [1.34; 1.94]	< **0.001**	1.80 [1.38; 2.34]	< **0.001**
sST2 (log 10)	1.81 [1.44; 2.27]	< **0.001**	2.00 [1.48; 2.71]	< **0.001**
Galectin-3 (log 10)	2.13 [1.40; 3.25]	< **0.001**	2.55 [1.45; 4.47]	**0.001**
PINP (log 10)	1.30 [0.83; 2.02]	0.246	1.41 [0.77; 2.57]	0.258
PIIINP (log 10)	2.53 [1.58; 4.05]	< **0.001**	2.79 [1.49; 5.21]	**0.001**
CTx (log 10)	1.77 [1.39; 2.27]	< **0.001**	1.93 [1.39; 2.68]	< **0.001**
CTx/PIIINP. ratio	3.69 [2.17–6.25]	< **0.001**	4.79 [2.32–9.90]	< **0.001**

(B)

	Baseline Model		Model 1		Model 2		Model 3		Model 4	
Variable	HR [95% CI]	p	HR [95% CI]	p	HR [95% CI]	p	HR [95% CI]	p	HR [95% CI]	p
Age	1.04 [1.01–1.07]	0.001	1.03 [1.00–1.06]	0.007	1.04 [1.02–1.07]	< 0.001	1.04 [1.01–1.06]	0.002	1.04 [1.01–1.06]	0.001
NYHA class	1.78 [0.99–3.23]	0.054	1.59 [0.87–2.93]	0.131	1.04 [0.55–1.95]	0.897	1.07 [0.57–2.02]	0.811	1.02 [0.54–1.92]	0.936
LVEF	0.98 [0.96–1.00]	0.103	0.99 [0.97–1.01]	0.683	0.99 [0.97–1.01]	0.388	0.99 [0.97–1.01]	0.484	0.99 [0.97–1.01]	0.651
Hs-cTnT (log 10)			1.46 [1.16–1.84]	0.001						
CRP (log 10)			0.88 [0.72–1.08]	0.25						
NT-proBNP (log 10)			1.25 [1.05–1.49]	0.012			1.22 [0.98–1.52]	0.07	1.18 [0.95–1.48]	0.124
CTx/PIIINP ratio					1.96 [1.19–3.23]	0.008			1.95 [1.21–3.14]	0.006
sST2 (log 10)					1.74 [1.31–2.31]	< 0.001	1.62 [1.18–2.23]	0.003	1.53 [1.11–2.12]	0.009
Galectin-3 (log 10)					1.08 [0.63–1.83]	0.769				

(C)

	Baseline Model		Model 1		Model 2		Model 3		Model 4	
Variable	HR [95% CI]	p	HR [95% CI]	p	HR [95% CI]	p	HR [95% CI]	p	HR [95% CI]	p
Age	1.05 [1.01–1.09]	0.004	1.03 [1.00–1.07]	0.03	1.05 [1.01–1.09]	0.003	1.04 [1.01–1.08]	0.009	1.05 [1.01–1.08]	0.007
NYHA class	1.74 [0.77–3.93]	0.176	1.51 [0.66–3.48]	0.324	0.90 [0.38–2.15]	0.826	0.95 [0.40–2.24]	0.908	0.89 [0.37–2.13]	0.804
LVEF	0.98 [0.95–1.00]	0.192	0.99 [0.96–1.02]	0.83	0.99 [0.96–1.01]	0.5	0.99 [0.96–1.02]	0.596	0.99 [0.96–1.02]	0.742
Hs-cTnT (log 10)			0.89 [0.68–1.16]	0.394						
CRP (log 10)			1.33 [1.04–1.70]	0.021						
NT-proBNP (log 10)			1.56 [1.14–2.14]	0.005			1.28 [0.94–1.74]	0.11	1.22 [0.90–1.67]	0.192
CTx/PIIINP ratio					2.23 [1.14–4.38]	0.019			2.22 [1.17–4.22]	0.014
sST2 (log 10)					1.94 [1.31–2.86]	0.001	1.80 [1.16–2.79]	0.008	1.67 [1.07–2.61]	0.023
Galectin-3 (log 10)					1.11 [0.54–2.28]	0.769				

Model 1: Baseline model adjusted by hs-cTnT, CRP and NT-proBNP.
Model 2: Baseline model adjusted by CTx/PIIINP ratio, sST2 and Galectin-3.
Model 3: Baseline model adjusted by NT-proBNP and sST2.
Model 4: Baseline model adjusted by NT-proBNP, CTx/PIIINP ratio and sST2.
NYHA: New York Heart Association; *LVEF: left ventricular ejection fraction; hs-cTnT: high-sensitivity cardiac troponin T;* CRP: C-reactive protein; sST2: soluble suppression of tumorigenicity 2; PINP: procollagen type I N-terminal propeptide; PIIINP: procollagen type III N-terminal propeptide; CTx: c-terminal telopeptide of collagen type I.

degradation such as CITP, but by the action from Cathepsin K. High levels of CTx could thus indicate action of Cathepsin K rather than MMPs and high collagen turn over [5]. The availability of circulating molecules in blood for use as biomarkers of myocardial fibrosis should not be underestimated. The association of biomarkers of collagen synthesis and degradation provides complementary information on the collagen homeostasis.

4.2. Cardiac fibrosis remodeling

Beyond conventional markers, sST2 has rapidly emerged as promising because of its pluripotent role in inflammation, mechanical strain, remodeling and fibrosis [6]. The role of sST2 for prognosis and risk stratification is well established in view of the numerous clinical studies (summarized in two meta-analyses, [7,8] and recent recommendations [9] on its use in clinical routine settings. Clinical studies on Gal-3 were, until recently, contradictory as to the association of Gal-3 with the severity and prognosis of HF. In addition, the relationship between plasma and myocardial Gal-3 levels in previous studies remains under debate. Our findings demonstrate first, even after adjustment for clinical variables and other well established and powerful biomarkers including NT-proBNP and fibrosis-related markers, sST2

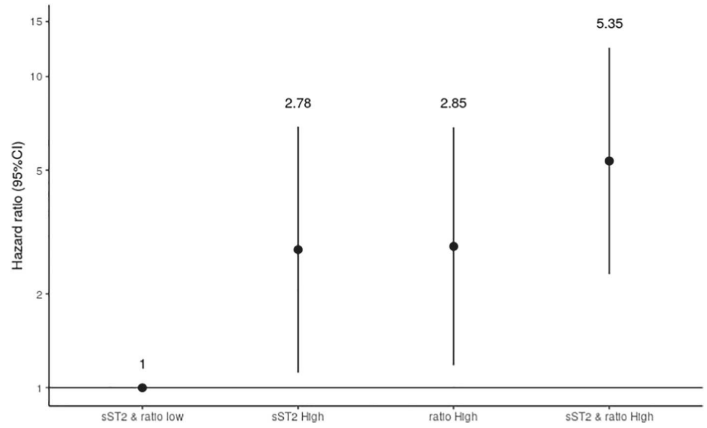


Fig. 1. Adjusted hazard ratio of death according to combined criteria as median of ST2, and CTx/PIIINP ratio.
ST2: suppression of tumorigenicity 2; PIIINP: procollagen type III N-terminal propeptide; CTx: c-terminal telopeptide of collagen type 1.

remains a strong prognosis biomarker in our population. sST2 has been shown to provide incremental prognostic value over NT-proBNP, and Gal-3. Second, in agreement with Besler's study [10], our results did not demonstrate incremental value of Gal-3 over clinical data and classical biomarkers in predicting mortality, nor a significant interaction with other markers, such as fibrosis-related markers or sST2. The current trend would be to consider Gal-3 as marker of HF risk in the general population [11–13] and would have a more important role in the beginning stage of HF, including early fibrosis and ventricular remodeling [14].

4.3. Multimarker strategy

Nevertheless, the greatest prognostic improvement was obtained with the combined addition of CTx/PIIINP ratio and sST2. This is a demonstration of the fact that several pathophysiological pathways of myocardial fibrosis, including synthesis, degradation and regulation processes, play an important role in determining outcomes in HF patients, and no specific pathway or biomarker can reflect all the aspects of HF.

These data could have potential clinical consequences/benefits in patients with chronic stable heart failure. Following guidelines improve outcomes [15], but physicians need in clinical practice tools to better adjudicate times and means. Based on an efficient biomarkers score, various populations could be distinguished, guiding the management: (1)The low-risk patients: This could justify a level 1 follow-up (every 6 months by the cardiologist) with annual assessment of the biomarker score and probably integrating a multiparameter score (including clinical and echography parameters), (2) The intermediate risk patients, (3) The very high risk patients: this could advocate for a strict follow-up with short-term reevaluation including frequent (monthly) consultation with the cardiologists, but also frequent reassessment of the biomarker score.

5. Limitations

The study was limited by its single-centre design and relatively small sample size. We only measured biomarkers at the time of recruitment to the study, and only one blood sample was available. In consequence, we did not evaluate the monitoring of the biomarkers, which can be also useful as monitoring markers. In addition, these biomarkers were not available in many centres, reducing the number of patients that could be included. In addition, the specified biomarkers were performed remotely of recruitment (4 years later) from frozen aliquots. However, the storage at-80 °C was immediately after sampling, an aliquot per marker with one freeze/thaw cycle, a single batch with same lot number of reagent, and the data published by previous studies has kept us safe from all trouble [16–19].

6. Conclusion

We reported that the CTx/PIIINP ratio indicating excessive turn over with high degradation rate may be considered an additional marker of mortality risk in patients with HF, and that a combined multimarker model including sST2 and CTx/PIIINP ratio identifies best risk stratification for all-cause mortality as well as cardiovascular mortality. Our data strengthen those of Lofjogard et al. [20,21]. The interpretation of serum levels of fibrosis-related biomarkers requires further investigation to confirm their association with myocardial fibrosis, in particular by using cardiac magnetic resonance, considered to be a non-invasive method able to evaluate the myocardial interstitial space. In addition, the likely therapeutic benefit from lowering fibrosis-related biomarkers remains to be demonstrated in interventional studies.

Acknowledgments

Reagents used in the current study, such as Galectin-3, PIIINP, PINP and CTx, were provided by Biomérieux, Siemens and IDS Laboratories, respectively. We thank the CHU de Montpellier, Centre des Ressources Biologiques, Collection Liquides biologiques, Hôpital Lapeyronie, F-34295, Montpellier, France."

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.08.042.

References

[1] C.W. Yancy, M. Jessup, B. Bozkurt, et al., American College of Cardiology Foundation; American Heart Association Task Force on Practice guidelines. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice guidelines, J. Am. Coll. Cardiol. 62 (2013) e147–e239.

[2] C. Laviades, N. Varo, J. Fernandez, G. Mayor, M.J. Gil, I. Monreal, J. Diez, Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension, Circulation 98 (1998) 535–540.

[3] H. Izawa, T. Murohara, K. Nagata, S. Isobe, H. Asano, T. Amano, et al., Mineralocorticoid receptor antagonism ameliorates left ventricular diastolic dysfunction and myocardial fibrosis in mildly symptomatic patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: a pilot study, Circulation 112 (2005) 2940–2945.

[4] B. Schwartzkopff, M. Fassbach, B. Pelzer, M. Brehm, B.E. Strauer, Elevated serum markers of collagen degradation in patients with mild to moderate dilated cardiomyopathy, Eur. J. Heart Fail. 4 (2002) 439–444.

[5] B. López, A. González, S. Ravassa, J. Beaumont, M.U. Moreno, G. San José, R. Querejeta, J. Díez, Circulating Biomarkers of Myocardial Fibrosis: The Need for a Reappraisal, J. Am. Coll. Cardiol. 65 (2015) 2449–2456.

[6] B. Dieplinger, T. Mueller, Soluble ST2 in heart failure, Clin. Chim. Acta 443 (2015) 57–70.

[7] A. Aimo, G. Vergaro, A. Ripoli, A. Bayes-Genis, D.A. Pascual Figal, R.A. de Boer, et al., Meta-Analysis of Soluble suppression of Tumorigenicity-2 and Prognosis in Acute Heart failure, JACC Heart Fail. 5 (2017) 287–296.

[8] A. Aimo, G. Vergaro, C. Passino, A. Ripoli, B. Ky, W.L. Miller, et al., Prognostic Value of Soluble suppression of Tumorigenicity-2 in Chronic Heart failure: A Meta-Analysis, JACC Heart Fail. 5 (2017) 280–286.

[9] C.W. Yancy, M. Jessup, B. Bozkurt, J. Butler, D.E. Casey, M.M. Colvin, et al., ACC/AHA/HFSA Focused Update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: a Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice guidelines and the Heart Failure Society of America, J. Card. Fail. 23 (2017) (2017) 628–651.

[10] C. Besler, D. Lang, D. Urban, K.P. Rommel, M. von Roeder, K. Fengler, et al., Plasma and Cardiac Galectin-3 in patients with Heart failure Reflects both Inflammation and Fibrosis: Implications for its use as a Biomarker, Circ. Heart. Fail. 10 (2017) e003804.

[11] T.F. Imran, H.J. Shin, N. Mathenge, F. Wang, B. Kim, J. Joseph, J.M. Gaziano, L. Djoussé, Meta-Analysis of the Usefulness of Plasma Galectin-3 to Predict the risk of Mortality in patients with Heart failure and in the General Population, Am. J. Cardiol. 119 (2017) 57–64.

[12] J.E. Ho, C. Liu, A. Lyass, P. Courchesne, M.J. Pencina, R.S. Vasan, M.G. Larson, D. Levy, Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community, J. Am. Coll. Cardiol. 60 (2012) 1249e1256.

[13] L.B. Daniels, P. Clopton, G.A. Laughlin, A.S. Maisel, E. Barrett-Connor, Galectin-3 is independently associated with cardiovascular mortality in community-dwelling older adults without known cardiovascular disease: the Rancho Bernardo Study, Am. Heart J. 167 (2014) 674e682.

[14] A. Bayes-Genis, M. de Antonio, J. Vila, J. Peñafiel, A. Galán, J. Barallat, et al., Head-to-head comparison of 2 myocardial fibrosis biomarkers for long-term heart failure risk stratification: ST2 versus galectin-3, J. Am. Coll. Cardiol. 63 (2014) 158–166.

[15] ESC Scientific Document Group, P. Ponikowski, A.A. Voors, S.D. Anker, H. Bueno, J.G.F. Cleland, A.J.S. Coats, V. Falk, J.R. González-Juanatey, V.P. Harjola, E.A. Jankowska, M. Jessup, C. Linde, P. Nihoyannopoulos, J.T. Parissis, B. Pieske, J.P. Riley, G.M.C. Rosano, L.M. Ruilope, F. Ruschitzka, F.H. Rutten, P. van der Meer, ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) developed with the special contribution of the Heart failure Association (HFA) of the ESC, Eur. Heart J. 37 (2016) (2016) 2129–2200.

[16] B. Dieplinger, M. Egger, A. Gegenhuber, M. Haltmayer, T. Mueller, Analytical and clinical evaluation of a rapid quantitative lateral flow immunoassay for measurement of soluble ST2 in human plasma, Clin. Chim. Acta 451 ((2015) 310–315.

[17] M. Egger, B. Dieplinger, T. Mueller, One-year in vitro stability of cardiac troponins and galectin-3 in different sample types, Clin. Chim. Acta 476 (2018) 117–122.

[18] P. Szulc, K. Naylor, N.R. Hoyle, R. Eastell, E.T. Leary, National Bone Health Alliance Bone Turnover Marker Project, Use of CTX-I and PINP as bone turnover markers: National Bone Health Alliance recommendations to standardize sample handling and patient preparation to reduce pre-analytical variability, Osteoporos. Int. 28 (2017) 2541–2556.

[19] M. Puigvehí, J. Hernández, T. Broquetas, S. Coll, M. Garcia-Retortillo, N. Cañete, M.D. Giménez, M. Garcia, F. Bory, M. Salvadó, R. Solà, J.A. Carrión, Diagnostic Accuracy of the Enhanced Liver Fibrosis (ELF®) score using HCV-Infected Serum Samples Cryopreserved for up to 25 years, PLoS One 16 (2016) e0164883.

[20] J. Löfsjögård, T. Kahan, J. Díez, B. López, A. González, M. Edner, et al., Biomarkers of collagen type I metabolism are related to B-type natriuretic peptide, left ventricular size, and diastolic function in heart failure, J. Cardiovasc. Med. 15 (2014) 463–469.

[21] J. Löfsjögård, T. Kahan, J. Díez, B. López, A. González, S. Ravassa, et al., Usefulness of Collagen Carboxy-Terminal Propeptide and Telopeptide to Predict Disturbances of Long-Term Mortality in patients ≥60 years with Heart failure and Reduced Ejection Fraction, Am. J. Cardiol. 15 (2017) 2042–2048.

Publications et communications affichées en lien avec ce travail de thèse

Plawecki M, Morena M, Kuster N, Chenine L, Leray-Moragues H, Jover B, Fesler P, Lotierzo M, Dupuy AM, Klouche K, Cristol JP. sST2 as a new biomarker of chronic kidney disease-induced cardiac remodeling: impact on risk prediction. Mediators Inflamm. 2018 Oct 8;2018:3952526.

Dupuy AM, Kuster N, Curinier C, Huet F, Plawecki M, Solecki K, Roubille F, Cristol JP. Exploring collagen remodeling and regulation as prognosis biomarkers in stable heart failure. Clin Chim Acta. 2019 Mar;490:167-171.

2018 : Printemps de la cardiologie : sST2 as a new biomarker of chronic kidney disease-induced cardiac remodeling: impact on risk prediction. April 2018. Plawecki M, Kuster N, Lotierzo M, Dupuy AM, Jover B, Cristol JP.

2018 : Archives of cardiovascular diseases supplements, sST2 as a new biomarker of chronic kidney disease-induced cardiac remodeling: impact on risk prediction.

2019 : Société francophone du diabète : Étude de la fibrose cardiaque dans le syndrome métabolique et impact de l'insuffisance rénale chronique.

2020 : Archives of cardiovascular diseases supplements, development of cardiac alterations in a rat model of polycystic kidney disease. Oct 2020. Plawecki M, Jover B, Fila M, Sicard P, Badia E, Cristol JP, Raynaud F.

Malgré les progrès médicaux réalisés récemment, les pathologies cardio-vasculaires représentent les principales causes de morbidité et de mortalité chez le patient insuffisant rénal chronique. Environ 50% des décès chez ces patients sont dus à un évènement cardiaque majeur. Si des facteurs de risque traditionnels sont bien identifiés, des facteurs de risque non traditionnels ont été mis en évidence. De nouvelles voies physiopathologiques comme la fibrose et le remodelage cardiaque sont actuellement étudiées. La fibrose et le remodelage cardiaque sont notamment impliqués dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

L'hypothèse principale de ce travail est qu'il est possible d'observer des modifications précoces de marqueurs d'atteinte cardiaque au cours de l'insuffisance rénale chronique au stade de la pré-dialyse. Ce travail regroupe plusieurs études permettant de répondre à l'hypothèse principale.

Dans la première étude, nous avons montré l'intérêt d'utiliser un score clinico-biologique dans l'évaluation pronostique des évènements cardiaques majeurs, permettant d'améliorer la prise en charge de la maladie rénale chronique et de prévenir ses complications.

Dans la seconde étude, nous avons montré que l'insulino-résistance et l'obésité exacerbe le remodelage cardiaque en présence d'une insuffisance rénale chronique dans un modèle de rongeur. Nous avons également évoqué des phénomènes de transition endothélio-mésenchymateuse à l'origine des myofibroblastes impliqués dans le processus de fibrose cardiaque dans la maladie rénale chronique.

Dans la troisième étude, nous avons observé une discrète altération cardiaque après trois mois d'évolution de l'insuffisance rénale chronique chez des rats rendus insuffisants rénaux à 12 semaines de vie. En revanche, les anomalies de la structure cardiaque sont plus clairement présentes lorsque l'insuffisance rénale est initiée à un âge plus précoce (6 semaines de vie), donc que l'atteinte cardiaque consécutive à une insuffisance rénale chronique est plus marquée lorsque qu'elle survient chez un sujet jeune.

L'ensemble de ces études apporte certaines réponses à la caractérisation de la fibrose cardiaque et l'atteinte fonctionnelle observée au cours de l'insuffisance rénale chronique.