



HAL
open science

La Galectine-3, médiateur des effets de l'aldostérone sur le remodelage cardiovasculaire

Laurent Calvier

► **To cite this version:**

Laurent Calvier. La Galectine-3, médiateur des effets de l'aldostérone sur le remodelage cardiovasculaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0122 . tel-01749321

HAL Id: tel-01749321

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749321>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Laurent CALVIER

**LA GALECTINE-3 EST UN MEDIATEUR DES EFFETS
DE L'ALDOSTERONE SUR LE REMODELAGE
CARDIOVASCULAIRE**

Soutenance : 9 novembre 2012

Membres du jury :

Examineurs :

- **Pr Faiez ZANNAD**,
CHU Nancy, Inserm clinical investigation center, CIC 9501, Vandoeuvre-Lès-Nancy, F-54500.
- **Dr Marie-Paule JACOB**,
Inserm UMR 698, Paris 7 University, Bichat-Claude Bernard Hospital, Paris, F-75000.
- **Pr Patrick ROSSIGNOL** (directeur de thèse),
CHU Nancy, Inserm clinical investigation center, CIC 9501, Vandoeuvre-Lès-Nancy, F-54500.
- **Dr Natalia LOPEZ-ANDRES** (co-directrice de thèse),
Inserm, Université de Lorraine UMR 961, Vandoeuvre-Lès-Nancy, F-54500.

Rapporteurs :

- **Pr Frederic JAISSER**,
Inserm UMR 872, Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie, Paris, F-75000.
- **Dr Florence PINET**,
Inserm U744, Institut Pasteur de Lille, Lille, F-59000.

**UMR_S U961, Risque cardiovasculaire, rigidité-fibrose et hypercoagulabilité (RCV)
Vandoeuvre-Lès-Nancy, F-54500**

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
ABRÉVIATIONS.....	12
I. INTRODUCTION.....	14
1. LE SYSTEME VASCULAIRE.....	15
1.1. <i>Structure de la paroi vasculaire</i>	15
1.2. <i>Fonction des gros troncs artériels et des artères musculaires</i>	16
1.3. <i>Le remodelage vasculaire</i>	18
1.4. <i>La fibrose, principale altération du remodelage vasculaire</i>	19
1.5. <i>La rigidité artérielle</i>	22
2. L'ALDOSTERONE.....	24
2.1. <i>Physiologie de l'aldostérone</i>	24
2.1.1. Régulation de la synthèse et de la sécrétion.....	24
2.1.2. Actions physiologiques de l'aldostérone.....	26
2.2. <i>L'aldostérone dans le système vasculaire</i>	29
2.3. <i>Aspects cliniques et thérapeutiques</i>	30
3. LA GALECTINE-3.....	32
3.1. <i>La famille des lectines et des galectines</i>	32
3.1.1. Définition.....	32
3.1.2. Expression et rôle des galectines.....	32
3.2. <i>La galectine-3</i>	34
3.2.1. Relation structure / fonction.....	34
3.2.2. Expression de la galectine-3.....	36
3.2.3. Rôles de la galectine-3.....	38
3.2.4. Voies de régulation de la galectine-3.....	40
3.2.5. Inhibition.....	40
3.2.6. Modèles animaux.....	42
3.2.7. Applications cliniques.....	43
II. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	46
III. MATERIELS ET METHODES.....	48
1. CULTURE CELLULAIRE.....	49
1.1. <i>Isolement des CMLV de rats Wistar</i>	49
1.2. <i>Stimulation des CMLV</i>	49
1.3. <i>Technique de transfection plasmidique</i>	51
1.3.1. Construction des plasmides.....	51
1.3.2. Transfection par le système X-tremGENE9.....	53
1.4. <i>Technique de siRNA</i>	53
1.5. <i>Détection des radicaux libres par dihydroéthidium</i>	55
2. MODELES ANIMAUX.....	55
2.1. <i>Modèle expérimental de rat aldostérone + sel</i>	55
2.2. <i>Modèle expérimental de traitement aigu à l'aldostérone de souris KO Gal-3</i>	58
3. ANALYSES BIOCHIMIQUES ET MOLECULAIRES.....	60
3.1. <i>Analyse des protéines par Western blot</i>	60
3.1.1. Extraction protéique.....	60
3.1.2. Mesure de la concentration de protéines.....	60
3.1.3. Western blot.....	61
3.2. <i>Analyse de l'activité des MMP par Zymographie</i>	62
3.3. <i>Histologie</i>	63
3.3.1. Fixation, inclusion, coupe.....	63
3.3.2. Coloration.....	63
3.3.3. Immunohistochimie.....	63
3.3.4. Immunocytochimie.....	64
3.3.5. Quantification des colorations et des marquages.....	64
3.4. <i>Analyse biochimique des aortes</i>	64
3.5. <i>Technique d'analyse de l'expression des gènes</i>	65

3.5.1.	Extraction des ARN	65
3.5.2.	Transcription inverse (RT)	65
3.5.3.	Réaction de PCR quantitative en temps réel	66
4.	TRAITEMENT STATISTIQUE.....	66
IV.	RESULTATS	67
1.	CULTURE CELLULAIRE DE CMLV	68
1.1.	<i>Expression basale de la Gal-3</i>	68
1.2.	<i>Effets de la Gal-3 sur la matrice extracellulaire</i>	70
1.3.	<i>Régulation de la Gal-3 par l'Aldo</i>	71
1.4.	<i>Rôle de la Gal-3 comme médiateur des effets de l'Aldo sur le remodelage matriciel</i>	73
1.4.1.	Effets de l'Aldo	73
1.4.2.	Rôle médiateur de la Gal-3.....	74
2.	MODELE CHRONIQUE DE RATS TRAITES A L'ALDO-SEL	76
2.1.	<i>Régulation de la Gal-3 par l'Aldo</i>	76
2.2.	<i>Régulation de la Gal-3 par l'Aldo</i>	76
2.3.	<i>Rôles de la Gal-3 comme médiateur des effets de l'Aldo sur le remodelage matriciel</i>	77
3.	MODELE AIGU DE SOURIS TRAITES A L'ALDO.....	82
3.1.	<i>Régulation de la Gal-3 par l'Aldo</i>	82
3.2.	<i>Rôles de la Gal-3 comme médiateur des effets de l'Aldo sur le remodelage matriciel</i>	83
V.	DISCUSSION	85
1.	RAPPEL DES PRINCIPAUX RESULTATS	86
2.	LES APPORTS DU MODELE DE CULTURE PRIMAIRE DE CMLV	86
2.1.	<i>Expression de la Gal-3 dans les CMLV</i>	86
2.2.	<i>Effets de l'Aldo dans les CMLV</i>	87
2.3.	<i>Effets de la Gal-3 dans les CMLV</i>	90
2.4.	<i>La Gal-3 médiateur de l'Aldo dans la synthèse de collagène de type I</i>	92
2.5.	<i>Conclusions sur le modèle in vitro</i>	95
3.	LES APPORTS DES MODELES ANIMAUX –RAT.....	96
3.1.	<i>Aldostérone et altérations hémodynamiques</i>	96
3.2.	<i>Aldostérone et réponse fibrotique</i>	97
3.3.	<i>L'aldostérone stimule la galectine-3</i>	98
3.4.	<i>Effets de l'inhibiteur de la galectine-3</i>	98
4.	SOURIS KO	99
4.1.	<i>Phénotype basal des souris KO galectine-3</i>	99
4.2.	<i>Aldostérone et pression</i>	100
4.3.	<i>Traitement aigu à l'aldostérone</i>	100
5.	LIMITES	101
5.1.	<i>Etat, cibles et mode d'action de la galectine-3</i>	101
5.2.	<i>Voie de signalisation de l'Aldo</i>	102
5.3.	<i>MCP et pression artérielle</i>	102
6.	PERSPECTIVES A COURT TERME.....	103
6.1.	<i>Traitement chronique à l'aldostérone</i>	103
6.2.	<i>Relation aldostérone / galectin-3 dans le système cardio-rénal</i>	104
7.	CONCLUSIONS	105
VI.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	106
VII.	ARTICLE ASSOCIÉ	124

REMERCIEMENTS

A mes juges,

Monsieur le Professeur Faiez Zannad,

Que je remercie pour m'avoir accueilli et guidé. Ses grandes qualités scientifiques et son expérience clinique valorisent nos travaux de recherche fondamentale et ouvrent une très jolie voie vers des applications thérapeutiques. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Frédéric Jaisser,

Qui m'a fait le très grand honneur de prendre part à ce jury et d'avoir accepté d'examiner mes travaux en étant rapporteur. Ses recherches sur l'aldostérone et son récepteur dans le système cardiovasculaire ont été une source importante d'inspiration et de réflexion. Qu'il soit assuré de ma respectueuse reconnaissance et de ma profonde admiration.

Madame le Docteur Florence Pinet,

A qui j'adresse mes plus sincères remerciements pour avoir pris part à ce jury et accepté également d'examiner mes travaux en tant que rapporteur. Qu'elle trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

Madame le Docteur Marie-Paule Jacob,

Envers qui je suis reconnaissant d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger ce travail. Qu'elle soit assurée de mes sincères remerciements.

A mes directeurs de thèse,

Monsieur le Professeur Patrick Rossignol,

Qui m'a accueilli et recruté dès mon stage de fin d'étude, bien que je ne connaissais que très peu le domaine cardiovasculaire et les techniques de laboratoire et que je remercie pour sa confiance. J'ai toujours eu un grand plaisir à travailler avec lui... même les quelques fois qui m'ont conduit à renoncer au sommeil. Je lui suis extrêmement reconnaissant d'avoir pu m'offrir des conditions de travail excellentes... comme la possibilité de partir travailler 1 mois à Madrid ou encore des souris à plusieurs milliers d'euros ! Il a toujours su me guider et me conseiller, pour tout cela et plus encore, qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance, de mes plus sincères remerciements ainsi que de mon amitié.

"Si tu te lances dans une thèse... c'est énormément de travail qui t'attend"

Septembre 2009, P.R.

Madame le Docteur Natalia Lopez-Andrés,

Que je tiens à remercier tout particulièrement pour m'avoir pris par la main et fait découvrir ce monde de la recherche... au sens large du terme. De la réflexion sur un sujet à la présentation des résultats en congrès en passant bien sûr par les manip, de la compréhension fine de mon sujet à l'ouverture d'esprit face à d'autres travaux, elle a su habilement à la fois nourrir et aiguïser ma curiosité scientifique. Toujours disponible, que ce soit pour m'apprendre une technique, discuter des résultats, répondre à mes nombreuses questions ou encore me donner un conseil, elle m'a permis de me forger une solide expérience technique ainsi que scientifique et je lui suis profondément reconnaissant pour cela. Qu'elle trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude pour m'avoir fait partager ses connaissances, son savoir et m'avoir permis de mener à bien cette thèse. Qu'elle soit également assurée de ma plus respectueuse admiration. En plus de ses grandes qualités professionnelles, j'ai eu énormément de plaisir à partager son bureau (même si j'ai dû de temps à autre remplir "à merveille" le rôle de secrétaire) et à tisser un lien d'amitié, rendant le travail encore plus agréable... et à l'origine de très bons souvenirs et plusieurs fous rires !

"Le plus important, c'est la passion"

Août 2012, N.L-A.

Aux co-auteurs de mes travaux,

Monsieur le Docteur Patrick Lacolley,

A qui j'adresse mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueilli et guidé au sein de son laboratoire. Ses recherches et son expertise sur la rigidité artérielle ont éclairé ces travaux et affiné leur compréhension.

Madame le Professeur Victoria Cachofeiro, Madame le Docteur Maria Miana et Monsieur Ernesto Martinez-Martinez,

Muchas gracias por la bienvenida en su equipo y por ayudarme con los últimos experimentos! Estoy muy feliz de haberos conocido. Os deseo mucho éxito en al futuro!

Monsieur le Docteur Pascal Reboul,

Avec qui ce fut un plaisir de découvrir l'intimité de la Gal-3 et les manipulations génétiques. Je lui suis extrêmement reconnaissant du temps et de l'énergie consacrés à ces travaux ainsi qu'à mes diverses présentations.

Madame le Docteur Françoise Poirier et Monsieur le Docteur de Boer,

Thank you for your fruitful collaboration and your input, this work opens new perspectives and exciting collaborations.

Madame Elodie Rousseau,

Que je remercie grandement pour son aide technique précieuse. Grâce à son efficacité, ces travaux ont pu être complétés avant ma soutenance, complétant ainsi notre compréhension du rôle de la Gal-3. Qu'elle trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude et de mon amitié.

A mes collègues,

Je remercie également toutes ces personnes, qui, par leur présence au sein ou en-dehors du laboratoire, ont rendu ces 3 années si agréables à la paillasse comme en soirée. Que cette thèse soit aussi l'occasion de remercier très vivement tous ceux et celles avec qui j'ai partagé de beaux moments.

Huguette, si Nat est ma "maman" au labo, tu es sans aucun doute ma "tata" ! Au-delà des manips, tu m'as beaucoup appris sur la (sur)vie au labo et c'est toujours un plaisir de déguster ton rhum après de longues journées de manips. Tu n'auras pas réussi à me tirer une larme... mais soit rassurée, tu as largement réussi à me tirer de bons fous rires ;-).

"Ce qui coûte le plus cher, c'est les manips que tu rates !!!"

Octobre 2011, H.L.

Amélie, mémé... ma petite "sœur", tu n'es restée qu'un an, mais cela a suffi pour gagner plusieurs paris contre toi (entre autres, merci pour mes 6 gels gagnés)... je te souhaite beaucoup de réussite dans la suite de ton parcours. Bien que tu aies quitté la paillasse, cela a été un grand plaisir de la partager avec toi.

"Tu fais vraiment la sieste dans un placard du labo ?"

Juillet 2011, A.R.

Audrey, il n'y a pas que des problèmes scientifiques dans la vie du labo, tu m'as aidé à en démêler certains... Merci pour tout. Je te souhaite beaucoup de courage pour la nouvelle année 2013 qui se profile, avec son lot de changements et de questions que cela soulève. Au fait, la caissière de la boutique rue Saint Dizier me demande ce que tu deviens, ca fait longtemps qu'elle n'a pas vu sa meilleure cliente... ;-)

"Ernestoooooooooooooooo... elle est où ma tablette de chocolat"

Octobre 2012, A.I.

Jean-Pierre, au-delà de tes qualités scientifiques et de ta grande expérience, que serait la pause du midi sans ta blague du jour ! Je te remercie pour tous ces bons moments. Je te

remercie également pour avoir très souvent pris la défense des étudiants au laboratoire et pour avoir mis le doigt sur de nombreux points sensibles (sans mauvais jeu de mot!).

Cécile, je te jure que je nettoie toujours la balance après m'en être servi ! Tu es indispensable au labo... sinon qui finirait la tirette à M&N's !!!??? Je te remontre des Western Blot quand tu veux.

Nacira, Fathia (je garde un très bon souvenir de Londres !!!), Simon (mon nouveau et super coloc de bureau... J'ai attendu 3 ans pour avoir quelqu'un qui ne parle pas sac à main et maquillage... et enfin tu es arrivé ^^), Rose, Mao (attention à l'autoclave), les Nat3 (Natacha, bon courage pour tes études et Nathalie, à quand le mariage... biz à Seb), bon courage à tous les futurs Dr. ("Yes we can", Jérémy, Karima, Gina et Anna qui a fait de super progrès en Français... maintenant tu vas pouvoir lire ma thèse ^^), Zhor (toujours prête à défendre les "Africains du nord"), Mustapha, Véronique, Ketsia, Anne (Super bon les cannelés), Simon (merci pour les films ! ca occupe les soirées quand on ne sait pas quoi faire car on est pas au labo en manip jusqu'à minuit), Carlos (désolé, j'aime toujours pas les grèves), Ginny (je me sentais moins nul en géo quand tu étais là), Cynthia.

Un grand merci aux collègues du CIC également : Céline (j'ai plein d'excellents souvenirs avec toi... et j'espère en avoir encore plein d'autre), Josette (une personne d'une très grande gentillesse... toujours à la recherche d'une source d'eau distillée), Erwan (le petit nouveau), Renaud (avec qui les stats semblent tellement faciles), Nadia et Catherine (que j'ai énormément embêtées... mais qui m'ont toujours aidé... et ce n'est pas fini...).

A mes amis,

Je voulais également remercier ces personnes qui, bien que très peu impliquées dans ce travail, ont été et sont essentielles à mon épanouissement personnel et à ma joie de vivre. Par votre amitié vous m'avez permis, non seulement de mener cette thèse à son terme, mais surtout de ne jamais perdre de vue l'essentiel... (je vous laisse compléter les "..."). Soyez aujourd'hui assurés de mon indéfectible amitié.

A tous les caennais, amis de longue date, on se retrouve à chaque fois comme on s'est quittés, comme si une seule journée avait passée ! Vivement nos prochaines vacances (vacances qui sont bien trop rares en thèse...), un grand merci à vous tous : Nico et Pauline, Julien et Sabrina, Amandine et Choup, Ludo et Morgane, François et Katy...

A tous les habitants, même d'une nuit, du 20 rue Gambetta également connu sous 6 autres noms que je ne détaillerai pas ici mais connus de tous. Vous m'avez supporté / nourri / amusé / fait râlé (très peu) / couché (valable uniquement pour Tof) / stimulé (comprenez ce que vous voulez... le sens est large) / battu aux sports favoris de la coloc (dont un valable uniquement pour Bastien) / sorti au ciné (mais pas que) / déguisé / etc... Mon seul regret est la peur de ne pas me souvenir de tous ces bons moments, peur qui est complètement chassée quand je pense à tous les nouveaux souvenirs qui arriveront encore... Un gros merci pour tout ça et bien plus encore à Nico (GROS MERCI pour toute l'organisation de ma thèse, c'était juste parfait !!!), Dothy et Alex (vos vidéos dans les bois me donnent presque envie d'aller dans le Tarn... presque !), Riris et Quentis (je vous donne une leçon à Mario Kart quand voul'voul'... et au fait lachez pas le rap, vous tenez quelque chose !), Cathrin et Meulin (inutile de vous dire que je vous aime... vous le savez déjà ;-;-) !!!), Estouf (j'ai toujours ton petit haut léopard que tu m'as passé à la soirée...), Jeanne (j'ai toujours pas été invité à ta pendance de crémaillère !!!), Clémence (c'est dommage que tu n'ai pas pu venir... mais ta prestance cinématographique compense largement), Frédo (avec Laetitia, on a quelque chose à t'annoncer ;-) !), Tof (c'est trop loin Montpellier...), Typhoun (je suis super content d'avoir rencontré ton Bernard, il est super sympa!), Victoire (pour le peuple... dsl... c'est comme ça que tu es enregistrée dans mon portable...), Berti (fait gaffe... paraît que c'est dangereux l'Afghanistan... il y a un truc avec les moustiques je crois...), Caro et Romain (pas trop dur les canapés / le pommeau ?), Anne et Tristan (je le savais !!!!), Guillaume (ca fait trop loooooooooooooongtemps, tu fais quoi le week-end prochain ?), PPP team (et j'ai pas fini

de vous embêter !), Henri, Margo, Carrie, Conchi... Et à tous les autres absents mais qui comptent beaucoup pour moi (je ne peux pas tous les citer... il faut que le nombre de page de remerciements ne dépasse pas le nombre de pages de ma thèse...).

A ma famille,

Merci à toute ma petite famille pour avoir toujours cru en moi, pour avoir toujours fait tout votre possible pour que je puisse mener à bien mes projets personnels et développer mes aptitudes dans certains domaines, merci pour votre amour incommensurable et votre présence de tous les jours.

A Madame Françoise Fromentin,

Je tenais à la remercier, car si je suis ici aujourd'hui et épanoui dans un domaine qui me passionne vraiment, c'est à l'origine, en partie grâce à elle. Elle m'a donné le goût de la biologie qui ne s'est jamais altéré depuis. On dit que si l'élève est mauvais, c'est de la faute du prof et si il réussit c'est parce qu'il est doué... moi si j'ai réussi c'est surtout parce que j'ai eu des bons profs comme elle. Bon par contre... il y a juste en français... où je n'ai toujours pas réussi à accrocher, d'où les quelques fautes qui restent ici et là malgré les nombreuses relectures...

Enfin, une petite pensée pour les principaux acteurs de mes travaux, les animaux (rats et souris) sans qui rien n'aurait été possible !

Abréviations

- AGE : "Age Glycation End-products"
- Akt : "Protein Kinase B"
- Aldo : aldostérone
- Ang II : angiotensine II
- Bcl-2 : "B-cell lymphoma 2"
- BNP : "Brain Natriuretic Peptide"
- CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire
- CRD : "Carbohydrate Recognition Domain"
- CRP : "C reactive protein"
- C-src : "membrane-anchored tyrosine kinase protein"
- FC : fréquence cardiaque
- FRET : transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
- Gal-3 : galectine-3
- GPCR : "G Protein-Coupled Receptor"
- HSP : "Heat Shock Protein"
- IC : insuffisance cardiaque
- ICTP : "carboxyterminal telopeptide of type I collagen"
- IGF-IR : "Type 1 insulin-like growth factor receptor"
- IRS-1 : "insulin receptor substrate-1"
- KO : souche mutée, n'exprimant pas la protéine d'intérêt (Knock-Out)
- LacNac : N-acétyl-D-lactosamine
- LBD : "Ligand Binding Domain"
- LGALS3 : gène codant pour la galectine-3
- MAPK : "Mitogen-Activated Protein Kinase"
- MCP : "Modified Citrus Pectin"
- MCSA : "Media Cross Sectional Area"
- MEC : matrice extracellulaire
- MMP : "Matrix Metalloproteinase"
- MR : "Mineralocorticoid Receptor"
- NF- κ B : "Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells"
- NTproBNP : "aminoterminal pro-brain natriuretic peptide"
- PAD : pression artérielle diastolique

- PAM : pression artérielle moyenne
- PAS : pression artérielle systolique
- PCP : procollagène C-protéinase
- PCR : "Polymerase Chain Reaction"
- PI3 : Phosphatidylinositol 3
- PNP : procollagène N-protéinase
- PP : pression pulsée
- PTK : "Protein Tyrosine Kinase"
- PICP : "carboxyterminal propeptide of type I procollagen"
- PINP : "aminoterminal propeptide of type I procollagen"
- PIIINP : "aminoterminal propeptide of type III procollagen"
- rhCRD : CRD recombinant humain
- rhGal-3 : galectine-3 recombinante humaine
- RISK : "RNA-Induced Silencing Complex"
- ROS : "Reactive Oxygen Species"
- RT : "Reverse Transcription"
- Spiro : spironolactone
- Sp-1 : "Specificity Protein 1"
- ST2 : "interleukin 1 receptor-like 1"
- TIMP : "Tissue Inhibitor of Metalloproteinases"
- TGF- β : "Transforming Growth Factor- β "
- TNF- α : "Tumor Necrosis Factor- α "
- VEGF : "Vascular Endothelial Growth Factor"
- WT : "Wild Type"

I. INTRODUCTION

1. Le système vasculaire

1.1. Structure de la paroi vasculaire

Les artères répondent toutes à un modèle commun d'organisation. Leur paroi est constituée de trois tuniques qui, de l'intérieur vers l'extérieur, sont : l'intima, la media et l'adventice (**Figure 1**).

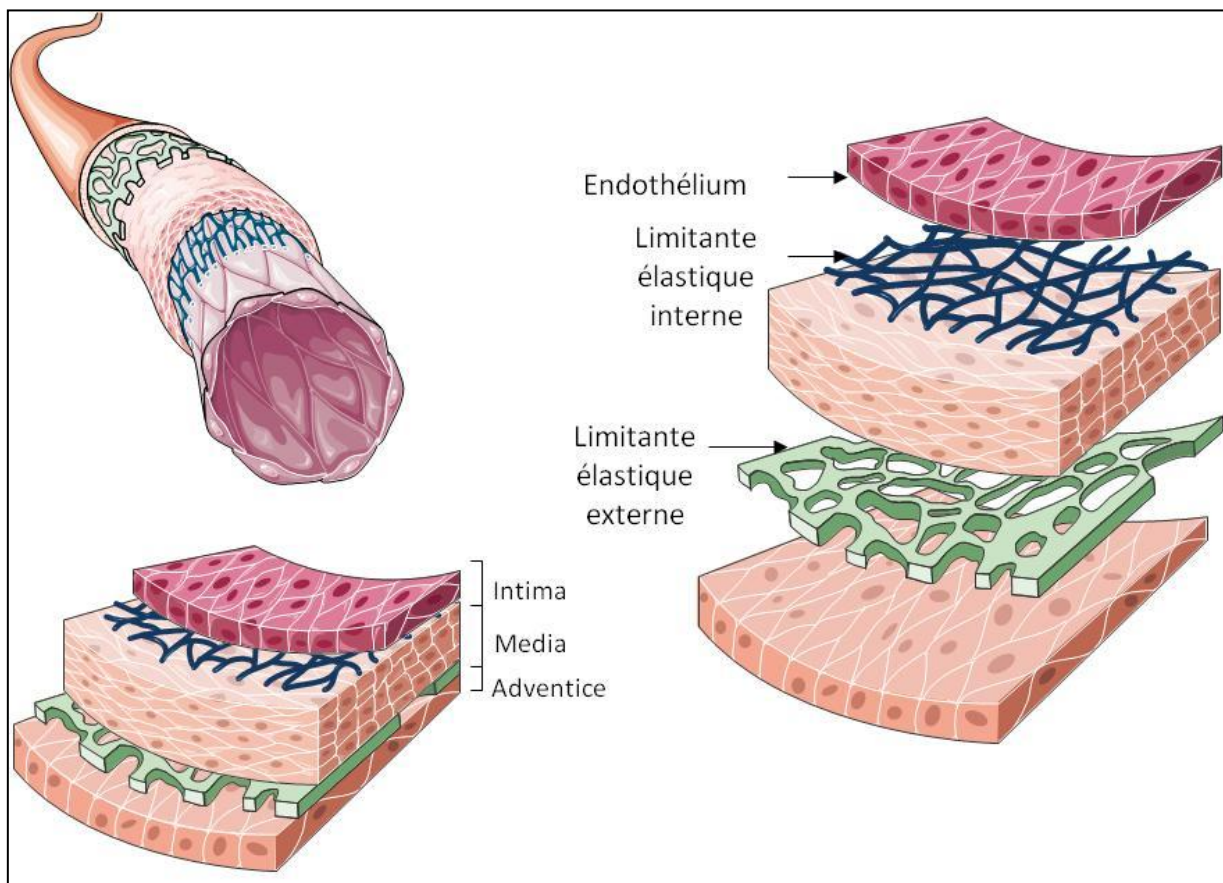


Figure 1 : Structure de la paroi artérielle musculaire. Représentation schématique de la structure de la paroi artérielle en 3 parties, de la lumière vers la périphérie : l'intima, la media et l'adventice.

L'intima est la tunique la plus interne et la plus fine. Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales, accolées les unes aux autres et formant une couverture uniforme. Ces cellules reposent sur une matrice de tissu conjonctif fibro-élastique, délimitée par une lame de fibres élastiques constituée d'élastine correspondant à la limite élastique interne. De par sa position stratégique, l'endothélium vasculaire n'est pas seulement une

simple barrière anatomique entre le sang circulant et les cellules de la média, mais il joue un rôle essentiel dans de multiples régulations physiologiques fondamentales. Dans les conditions physiologiques, les facteurs hémodynamiques (pression artérielle, débit sanguin) sont les déterminants majeurs qui influencent la biologie de l'endothélium soit par action directe (stimuli mécaniques) soit par des facteurs chimiques. Parmi ces stimuli chimiques figurent des hormones (comme les cytokines), des médiateurs locaux (comme le monoxyde d'azote) dont certains sont libérés par la cellule endothéliale elle-même qui a un rôle sécrétoire majeur.

La média, la tunique la plus épaisse, est constituée essentiellement de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV, 30 à 50 % du volume de la média), empilées en couches concentriques appelées unités lamellaires et séparées par des fibres élastiques. Chaque unité lamellaire est composée de CMLV entourées d'une matrice extracellulaire (MEC) constituée de protéines fibreuses et élastiques (environ 35 % de collagènes et 25 % d'élastine par rapport au volume total de la média) et de protéoglycanes. Les liaisons entre les CMLV et la matrice extracellulaire (MEC) impliquent des protéines d'adhésion du type fibronectine, ainsi que leurs récepteurs membranaires : les intégrines. La média est la partie musculaire de l'artère et elle assure l'essentiel des propriétés élastiques de la paroi. La média et l'endothélium permettent donc la vasoconstriction et la vasodilatation.

L'adventice est la tunique externe. Elle est constituée d'un tissu conjonctif peu organisé, riche en collagènes et en fibres élastiques, contenant des fibroblastes et une enveloppe assurant l'ancrage des artères aux structures avoisinantes. Elle est irriguée par des *vasa vasorum* qui ont un rôle nourricier pour l'adventice elle-même et pour la partie externe de la média.

1.2. Fonction des gros troncs artériels et des artères musculaires

Les artères se divisent en 2 types différents : les artères élastiques ou de conductance correspondant aux gros troncs artériels et les artères musculaires ou de résistance.

Les gros troncs artériels ont deux fonctions importantes : conduction / distribution du flux sanguin du cœur vers la périphérie et amortissement des pulsations sanguines (**Figure 2**). Les contractions périodiques du cœur provoquent des changements pulsatiles de la pression artérielle. Les grandes artères répondent passivement à la pression artérielle en raison de leur élasticité intrinsèque. Ces artères, en particulier l'aorte, s'étendent à chaque pic de pression du cœur (systole), puis, quand la pression du cœur baisse (diastole) se dégonflent progressivement, libérant le sang en aval. L'élasticité des gros vaisseaux atténue ainsi les variations périodiques de pression, permettant également la perfusion continue des organes et des tissus au cours du cycle cardiaque. Cet effet est dû aux propriétés viscoélastiques des parois artérielles.

Les propriétés viscoélastiques des parois artérielles sont également un facteur déterminant de la vitesse de propagation de l'onde de pouls et de l'importance des ondes de réflexion. L'augmentation de la rigidité des artères est responsable de l'accélération de la vitesse de l'onde du pouls. De plus, elle est responsable d'un retour plus précoce des ondes de pression réfléchies, qui se superposent à l'onde de pression incidente, et contribuent ainsi à l'augmentation de la pression pulsée et de la pression systolique.

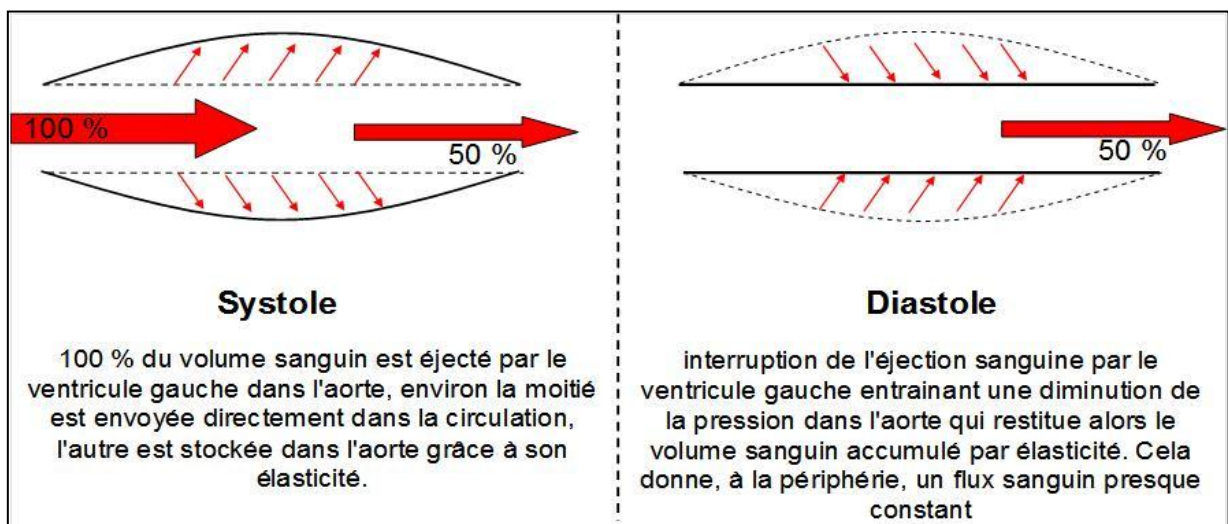


Figure 2 : Amortissement des pulsations sanguines. Représentation de la fonction d'amortissement des gros troncs artériels au cours du cycle cardiaque (adapté de Belz GG et al., 1995¹).

L'autre partie du système artériel, les artères musculaires ou de résistance (artères coronaires, mésentériques...) distribue le sang en adaptant leur débit aux besoins des organes cibles. Dans ces artères, la résistance à l'écoulement est très élevée, ce qui induit une importante chute de pression, mais la vitesse d'écoulement du sang y reste élevée. L'ensemble du réseau artériel systémique assure le transport du sang du ventricule gauche vers les capillaires tissulaires, ainsi que le réglage de la distribution sanguine via l'intervention de phénomènes actifs de vasomotricité. Ainsi, un débit optimal est assuré au niveau des organes.

1.3. Le remodelage vasculaire

L'un des principaux déterminants de la pression artérielle est le diamètre des artères de résistance. Les CMLV dans ces vaisseaux répondent activement à l'évolution aiguë de la pression artérielle par un mécanisme appelé « effet myogénique »². La pression artérielle élevée déclenche la contraction des CMLV, ce qui permet de rétrécir les petites artères résistives pour maintenir le débit sanguin constant dans les capillaires en aval.

Si la pression reste élevée, pour résister à ces forces, il en résulte alors un remodelage artériel entraînant un épaississement de la paroi. En réponse aux altérations hémodynamiques, l'augmentation de la rigidité des gros troncs élastiques artériels s'explique en partie par des modifications de structure³. Ces changements de structure de la paroi peuvent être initialement adaptatifs, mais finissent par devenir dysfonctionnels et compromettent alors la fonction des artères en conduisant à une augmentation pathologique de la rigidité artérielle⁴. Le remodelage vasculaire est donc un mécanisme pathophysiologique qui se produit à la suite de modifications hémodynamiques. Cela implique différents processus :

- Cellulaires : la prolifération ou l'apoptose, l'inflammation et la migration, ou encore les changements de phénotypes. Les CMLV s'hypertrophient et passent d'un phénotype contractile à un phénotype sécrétoire.
- Extracellulaires : la production et/ou la dégradation de la MEC pouvant aboutir au développement de la fibrose.

Ces processus dépendent des interactions entre les facteurs hémodynamiques, les substances vasoactives, des cytokines, des facteurs neuro-humoraux et des facteurs inflammatoires ⁵. Ce type de remodelage peut ainsi s'observer sur tous les sites vasculaires, qu'il s'agisse d'artérioles ou de gros troncs artériels.

1.4. La fibrose, principale altération du remodelage vasculaire

Le remodelage de la MEC conduisant à une fibrose passe par une augmentation de la synthèse de protéines matricielles, notamment les collagènes de types fibrillaires. Ils sont constitués par l'assemblage de trois sous-unités α ⁶ codées par le même gène ou par des gènes différents (**Figure 3**). Les collagènes sont des protéines très rigides (notamment le collagène de type I, plus rigide que celui de type III) dont la fonction est de limiter la distension des vaisseaux ⁷. S'il y a un dépôt excessif de collagènes dans la paroi vasculaire, cela peut conduire à la fibrose et à une rigidité artérielle pathologique. Dans la paroi vasculaire, la structure en triple hélice des collagènes I et III assure la fonction de résistance du tissu artériel ⁸. L'élasticité du tissu est assurée par l'élastine synthétisée et sécrétée dans l'espace extracellulaire d'abord sous forme de tropoélastine. Lors de l'étirement, l'élastine se déroule de manière réversible en exposant ses résidus hydrophobes et après l'étirement, les forces hydrophobes poussent la chaîne polypeptidique à retourner vers sa forme globulaire de départ. Au fur et à mesure de la progression de pathologies cardiovasculaires entraînant un remodelage vasculaire, l'élastine est dégradée diminuant l'élasticité de la paroi ⁹. Enfin, la fibronectine, composée des domaines rigides reliés par des parties flexibles, s'assemblent pour former des fibrilles à la surface de nombreuses cellules et assure la cohésion de la matrice et des cellules. Elle peut simultanément se lier à la cellule via les intégrines et à d'autres molécules de la matrice extracellulaire, y compris à une autre molécule de fibronectine. L'augmentation de sa production est associée à une augmentation de la rigidité du tissu ¹⁰.

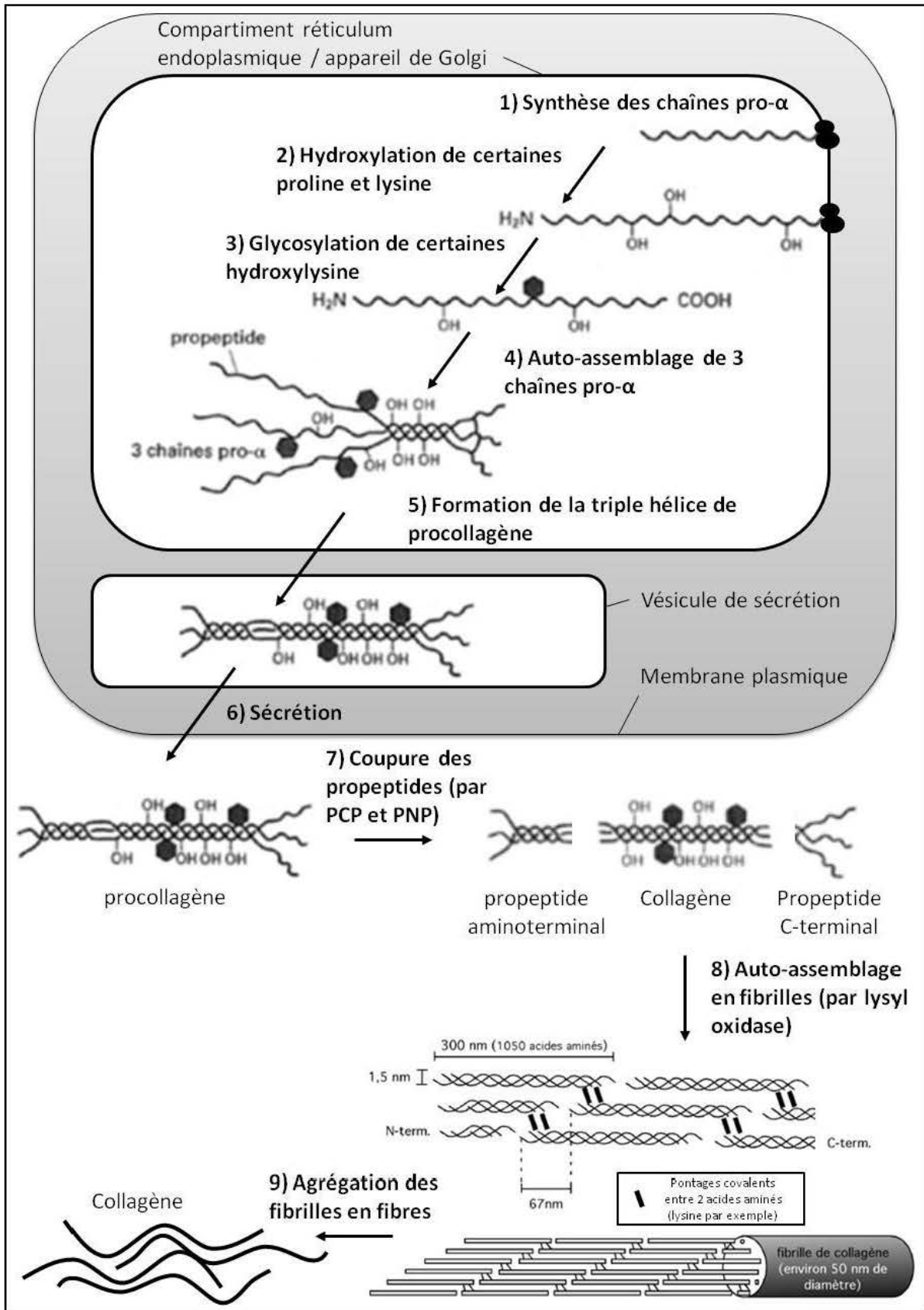


Figure 3 : Synthèse de collagène. Représentation de la voie de biosynthèse des fibres de collagène (adapté de Pariente JL et al., 2005 ⁶). PCP, procollagène C-protéinase ; PNP, procollagène N-protéinase.

Ce remodelage s'accompagne également d'une augmentation de l'activité de dégradation de la MEC conduisant à une désorganisation de son réseau. Ces phénomènes impliquent des protéases spécifiques, par exemple, les collagénases comme la métalloprotéinase-13 (MMP-13, 60 kDa) et les gélatinases possédant des propriétés élastolytiques comme les MMP-2 (72 kDa) et MMP-9 (92 kDa). Ces MMP sont capables de dégrader la MEC et peuvent moduler le remodelage vasculaire ¹¹. L'expression des MMP peut être stimulée par l'étirement mécanique, par des peptides comme l'angiotensine II (Ang II), ou encore par certaines cytokines comme le facteur de croissance de transformation β « transforming growth factor- β » (TGF- β) ^{12,13}. Elles sont sécrétées sous forme de zymogène (proMMP) et activées par d'autres MMP, ou par des sérine-protéases telles que la plasmine. L'activité protéolytique des MMP peut être inhibée par des « tissue inhibitors of metalloproteinases » (TIMP) ¹⁴.

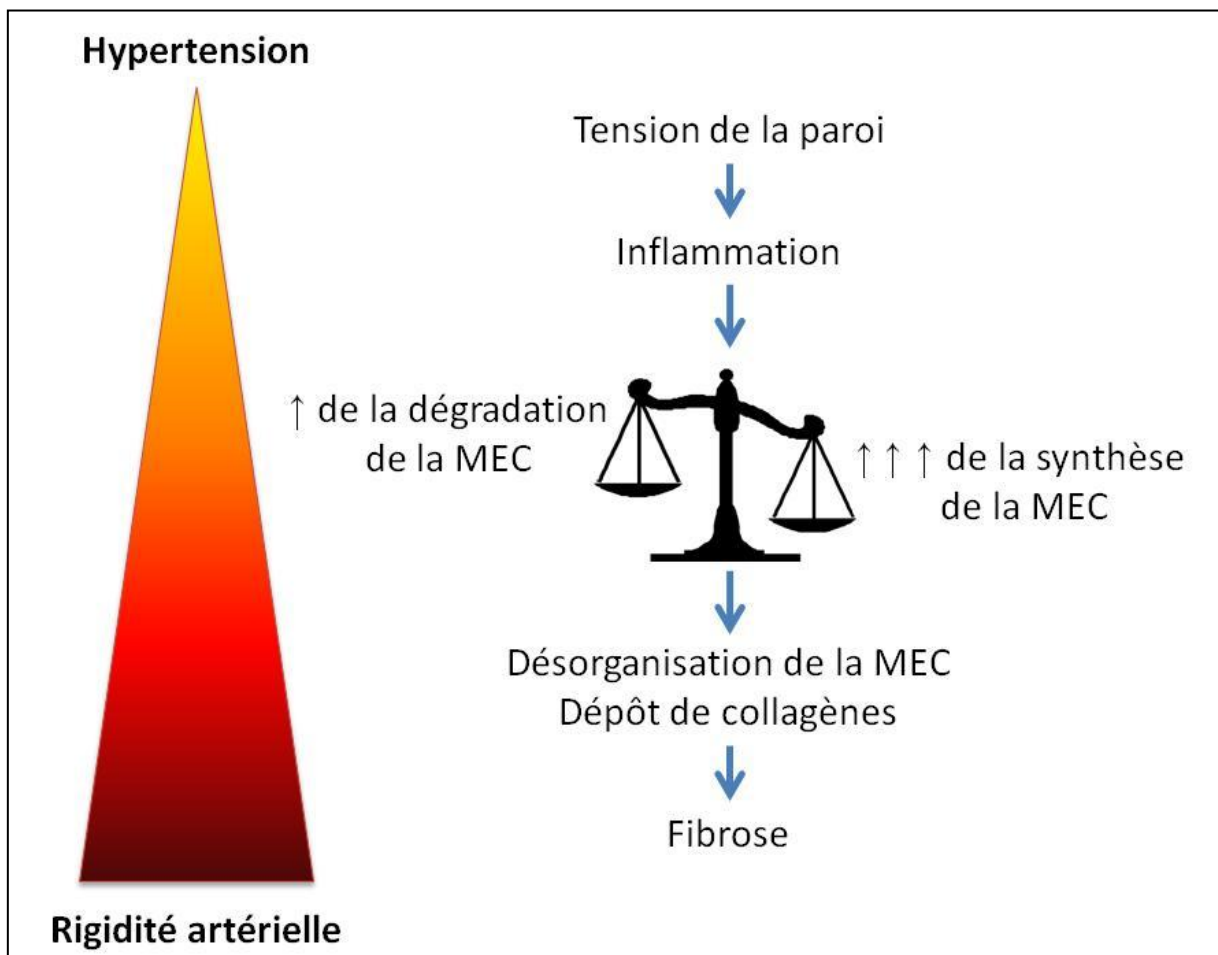


Figure 4 : Du remodelage à la fibrose vasculaire. Schéma illustrant un mécanisme du remodelage vasculaire aboutissant à la fibrose dans la transition de l'hypertension à la rigidité artérielle.

Dans les conditions pathologiques où les pressions restent élevées, il y a un remodelage artériel compromettant l'élasticité du vaisseau ^{15,16}. Au cours de ce remodelage de la paroi vasculaire, il y a un décalage de l'équilibre entre la synthèse d'une part et la dégradation de la MEC d'autre part (**Figure 4**) conduisant à une fibrose. Cette augmentation de matériel rigide, principalement les collagènes, induit une augmentation de la rigidité des artères, altérant la fonction d'amortissement. Ceci entraîne une surcharge de pression pour le ventricule gauche conduisant (ou aggravant) une hypertrophie ventriculaire gauche et une altération de la perfusion des coronaires aboutissant à une fibrose cardiaque. Cela influence la fonction du cœur ainsi que celle des vaisseaux et favorise le développement de l'insuffisance cardiaque (IC) ^{17,18}.

1.5. La rigidité artérielle

La rigidité artérielle est un caractère principal de la manifestation de l'altération fonctionnelle du remodelage vasculaire et résulte de plusieurs facteurs. Les propriétés mécaniques des gros troncs artériels dépendent de leur contenu, dont les collagènes (rigidité), l'élastine (élasticité) et les CMLV (tonus musculaire) sont les principaux constituants.

- Le nombre de liaisons entre les composants de la média a une influence sur le comportement mécanique de la paroi. L'augmentation du nombre d'attaches limite la déformabilité de la paroi, ce qui correspond à une augmentation de la rigidité. Les protéines de la MEC s'associent entre elles et avec les CMLV selon une organisation tridimensionnelle extrêmement complexe. Compte tenu de la composition de la paroi, les liaisons entre les différents composants sont de type matrice-matrice ou cellules-matrice. Les candidats impliqués dans ces interactions sont les protéines d'adhésion de la MEC et leurs récepteurs membranaires, à savoir les intégrines ⁴. Les intégrines sont des récepteurs membranaires dont les ligands peuvent être situés sur la MEC ou sur des cellules. Elles participent à la mécanotransduction cellulaire ¹⁹ et sont impliquées dans la réorganisation du cytosquelette.
- Le tonus musculaire, reflétant le degré d'activation des CMLV, modifie également le comportement de la paroi.

La rigidité globale de la paroi est la somme d'une rigidité passive, correspondant aux composants de la matrice, et d'une rigidité active due au tonus musculaire. Dans les conditions de base, le comportement global est très proche du comportement purement passif indiquant que les cellules sont proches de la relaxation maximale. En cas de sollicitation ponctuelle importante, le comportement mécanique dépend davantage du tonus musculaire et des fibres de collagène.

La rigidité artérielle est évaluée principalement au travers de deux paramètres : la distensibilité et le module élastique. La première exprime les propriétés de l'organe, la deuxième exprime les propriétés des matériaux constitutifs. La rigidité est ainsi appréciée par la résistance mécanique artérielle. Ces dernières années, un développement dans le domaine technologique des ultrasons a abouti à un système d'echotracking vasculaire de haute résolution utilisable tant sur le plan clinique qu'expérimental.

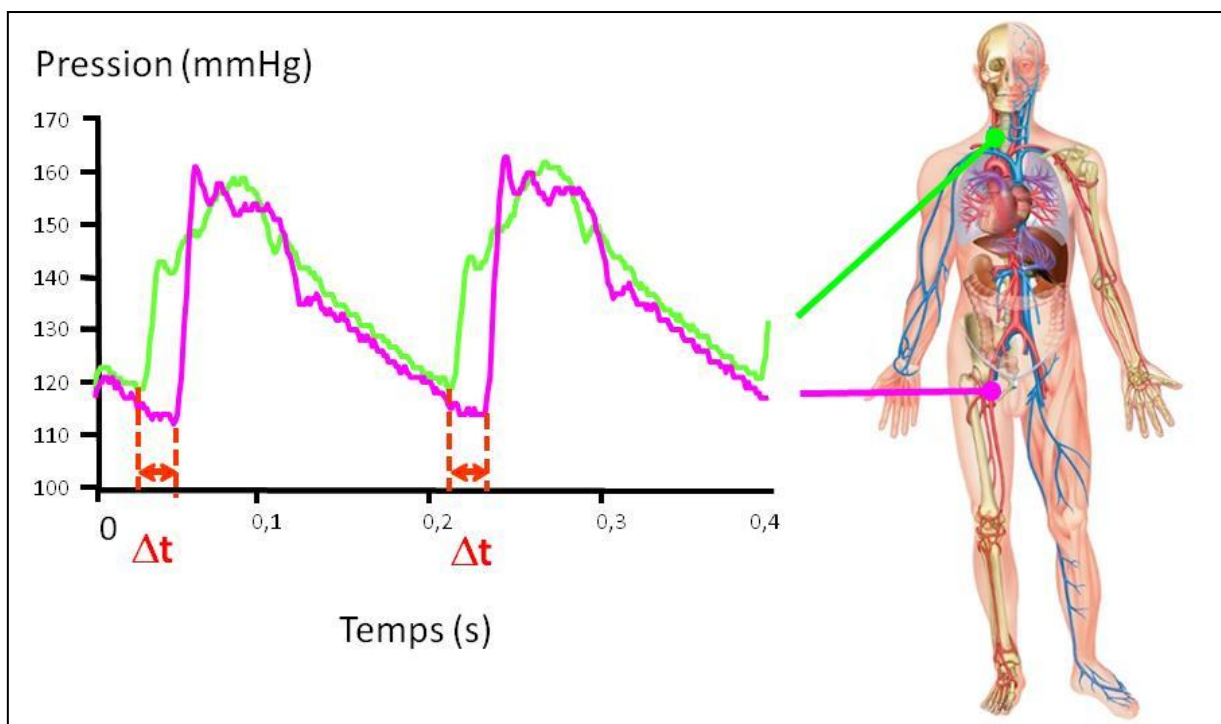


Figure 5 : Mesure de la VOP (Vélocité de l'Onde de Pours). La VOP se mesure à la carotide et au niveau de l'artère fémorale et correspond à la distance entre ces deux points sur le décalage de temps entre les pieds des ondes de pressions mesurées à ces deux points (Δt).

En clinique, l'évaluation de la rigidité se fait soit en mesurant les paramètres décrits précédemment qui fournissent une valeur locale de la rigidité, soit par la mesure d'index validés par des études épidémiologiques qui sont un reflet de la rigidité de l'ensemble de l'arbre artériel considéré. La valeur prédictive sur la rigidité de la pression pulsée centrale a été montrée dans une grande étude clinique²⁰, ainsi que la vélocité de l'onde de pouls (VOP)²¹. D'un point de vue théorique, la VOP est proportionnelle à la racine carrée du module élastique. Il s'agit donc d'un indice de rigidité global parfaitement validé et reproductible. Mesurée entre deux points de l'arbre artériel, elle correspond à la distance entre les deux points de mesure divisée par le temps séparant les pics de deux ondes (*Figure 5*).

2. L'aldostérone

2.1. Physiologie de l'aldostérone

2.1.1. Régulation de la synthèse et de la sécrétion

L'aldostérone (Aldo) est une hormone minéralocorticoïde dérivée du cholestérol (**Figure 6**). Elle est synthétisée au niveau de la zone glomérulée de la corticosurrénale de la glande surrénale. De plus, les résultats de nombreuses études menées au cours de la dernière décennie ont apporté des arguments en faveur d'une synthèse extra-surrénalienne de l'Aldo, notamment dans le cerveau, le cœur et les vaisseaux²². Les processus de régulation et les étapes de biosynthèse de l'Aldo seraient comparables dans la glande surrénale et dans les tissus périphériques. La première réaction catalysée par la cholestérol desmolase constitue une étape limitante dans la synthèse de l'Aldo. À partir du cholestérol, cette enzyme fournit la prégnénolone qui est métabolisée en progestérone par action de la 3- β -hydroxystéroïde. À partir de la progestérone, la 21- β -hydroxylase fournit la 11-deoxycorticostérone et l'hydroxylation par la 11- β -hydroxylase fournit de la corticostérone. Enfin, l'Aldo synthase synthétise l'Aldo à partir de cette corticostérone.

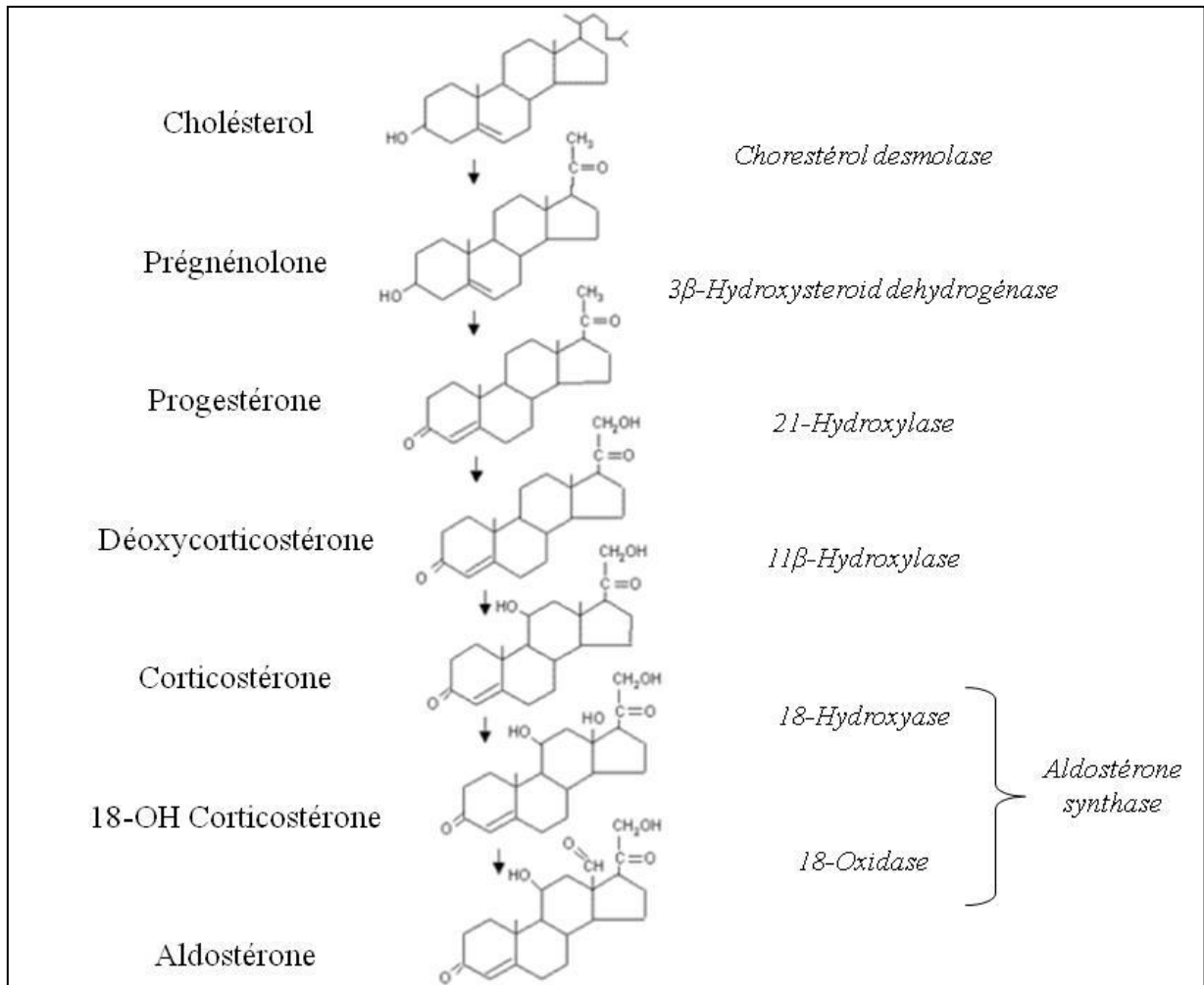


Figure 6 : Voie de synthèse de l'Aldostérone. Illustration de la cascade de réactions partant du cholestérol et aboutissant à la biosynthèse d'aldostérone, avec de gauche à droite le nom des espèces intermédiaires, leur formule chimique et les enzymes catalysant les réactions.

La synthèse d'Aldo est principalement stimulée par l'Ang II, par le potassium, par l'hormone adénocorticotrope l'ACTH, et l'endothéline 1²³. La fonction majeure de l'Ang II passe par les récepteurs AT1, largement présents dans la zone glomérulée de la glande surrénale, et semble impliquer plusieurs voies de signalisation. La voie la plus importante et la mieux décrite est celle de la phospholipase C, dont l'activation induit la libération d'IP3. L'IP3 permet de mobiliser les stocks de calcium intracellulaire, qui joue un rôle majeur dans la stimulation de la synthèse d'Aldo, via sa protéine de liaison, la calmoduline (CaM), et les CaM kinases (CaMKs).

Une sécrétion trop élevée d'Aldo est appelée hyperaldostéronisme et une sécrétion trop basse hypoaldostéronisme. Le premier cas est de beaucoup le plus fréquent et se manifeste par une hypertension artérielle. Il est dit « secondaire » si l'augmentation de cette hormone est la conséquence d'une stimulation de sa production par un mécanisme stimulant l'axe rénine-angiotensine. Autrement, il est appelé « primaire », rentrant dans le cadre d'un syndrome de Conn ou d'une hyperplasie bilatérale des surrénales. Par ailleurs, la sécrétion physiologique d'Aldo peut être délétère dans certaines maladies : c'est le cas de l'IC à fraction d'éjection altérée, où le blocage de sa production ou de son action constitue l'une des clés du traitement^{24,25}.

2.1.2. Actions physiologiques de l'aldostérone

L'Aldo, comme les autres hormones stéroïdes, traverse librement la membrane plasmique des cellules-cibles pour atteindre le cytosol où elle se fixe sur les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) présents dans le cytoplasme. Le MR est une protéine de la superfamille des récepteurs nucléaires, famille des récepteurs stéroïdes. Le MR lie principalement l'Aldo, grâce à la présence de la 11 β -hydroxysteroid deshydrogenase 2 (11 β -HSD2) qui inactive le cortisol (normalement 100 à 1000 fois plus abondant que l'Aldo), l'autre ligand du MR (**Figure 7**)^{26,27}, protégeant ainsi le MR d'une occupation illicite par les glucocorticoïdes. L'Aldo à forte concentration (rare en physiologie) peut également occuper le récepteur glucocorticoïde (GR). Le MR possède la structure classique des récepteurs nucléaires :

- un très grand domaine N-terminal de 602 acides aminés
- un domaine en doigts de zinc classique de liaison à l'ADN
- une région charnière
- un domaine de liaison au ligand (LBD), en C-terminal de la protéine, constitué de 11 hélices α et un feuillet β .

Inactif, il est lié à des protéines chaperonnes, telles que l'HSP90 (protéine de choc thermique - 90) et les immunophilines, qui le maintiennent dans une conformation réceptive pour son ligand²⁸. L'Aldo diffuse dans les cellules, où elle va pouvoir se fixer au domaine de liaison du ligand du MR et entraîner sa dimérisation et sa translocation dans le noyau cellulaire²⁸. Dans le noyau, le MR va se fixer à des éléments de réponse spécifiques et recruter différents cofacteurs transcriptionnels pour activer l'expression des gènes cibles de l'Aldo.

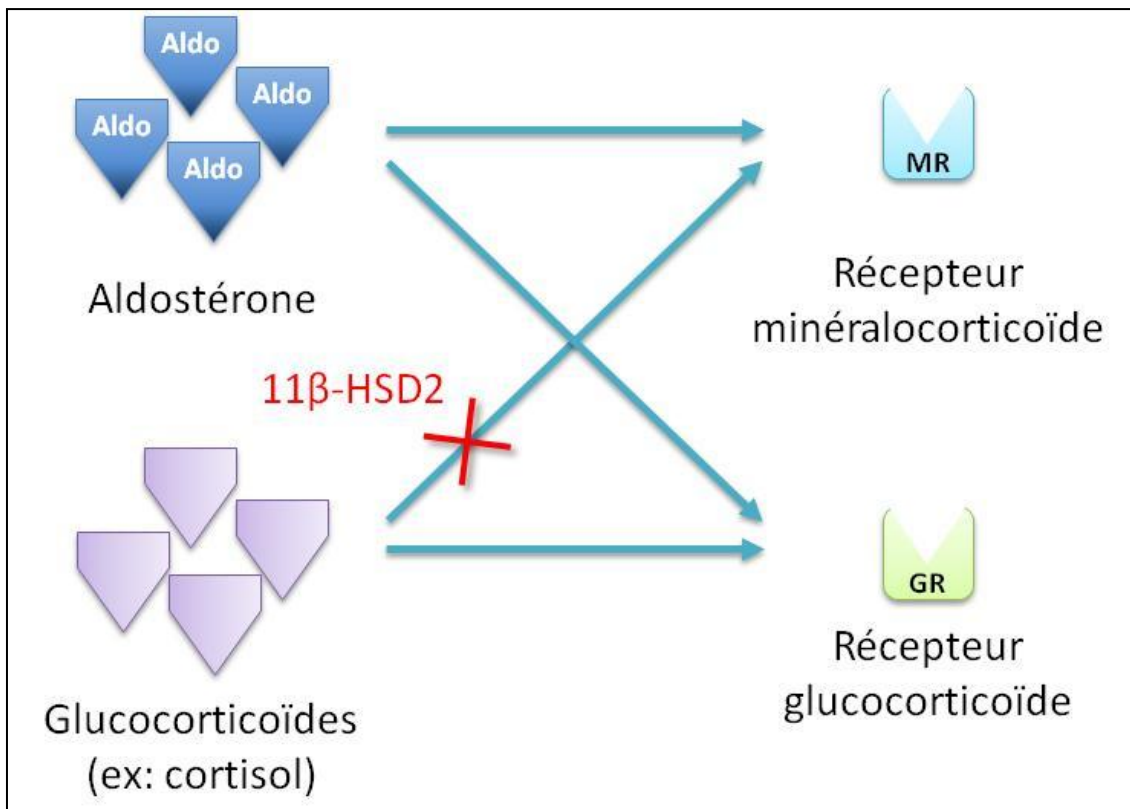


Figure 7 : Compétition des ligands pour les récepteurs aux stéroïdes. Schéma représentant les interactions entre messagers (corticoïdes) et cibles (récepteurs aux corticoïdes). La spécificité de l'aldostérone pour le récepteur minéralocorticoïde est assurée par la 11 β -hydroxysteroid deshydrogenase 2 (11 β -HSD2) qui inactive le cortisol (normalement 100 à 1000 fois plus abondant que l'Aldo), protégeant ainsi ce récepteur d'une occupation illicite.

Actions rénales :

Classiquement, l'Aldo est connue pour son rôle primordial dans le maintien de l'équilibre des volumes liquidiens de l'organisme et dans le contrôle du métabolisme du sodium et du potassium ²⁹ (**Figure 8**). Les cibles principales de l'Aldo sont les cellules épithéliales du néphron, du côlon et également des glandes sudoripares, dans lesquelles elle favorise la rétention hydrosodée et l'excrétion du potassium. Ainsi, parmi les gènes classiquement activés par le MR, il y a ceux impliqués dans la réabsorption de sodium au niveau de la partie du tube collecteur distal du rein. D'autre part, les trois effecteurs de l'action précoce de l'Aldo sont les canaux sodiques, les canaux potassiques et les pompes Na⁺K⁺-ATPase.

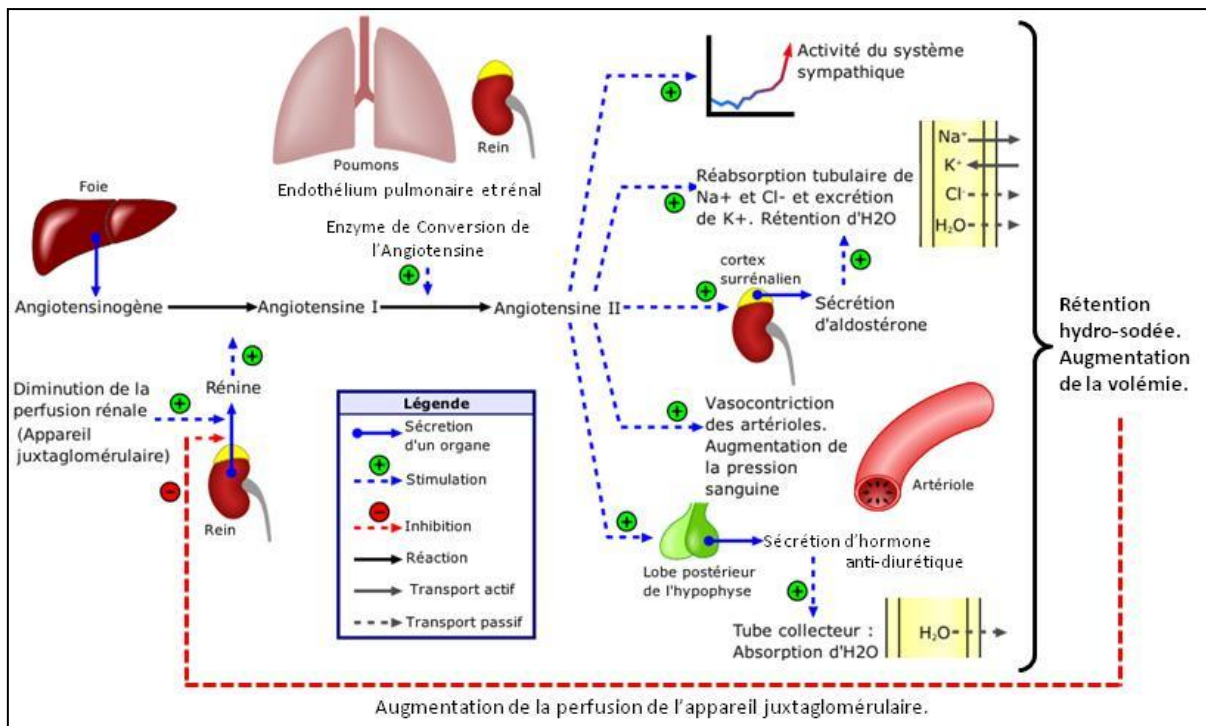


Figure 8 : Système rénine - angiotensine – aldostérone. Le système rénine-angiotensine-aldostérone est une cascade de régulation endocrinienne et enzymatique servant à préserver l'homéostasie hydrosodée (adapté de Broden CC et al., 2009³⁰).

Actions extra-rénales :

Le MR possède également un rôle au niveau du système nerveux central qui est mal connu. Il est exprimé dans l'hippocampe et participerait à la régulation de différents mécanismes cellulaires (l'apoptose par exemple) et physiologiques³¹ (régulation de la pression artérielle ou appétence pour le sel, par exemple). Il se retrouve également au niveau des cellules du système cardiovasculaire, les fibroblastes, les cardiomyocytes, les CMLV et les cellules endothéliales. Le MR active l'expression de plusieurs gènes dont certains participent à la régulation de la pression artérielle comme ceux codants pour les protéines constitutives de la MEC telles que les collagènes^{32,33}.

2.2. L'aldostérone dans le système vasculaire.

Au niveau des CMLV, deux modes d'action de l'Aldo peuvent être distingués : les effets non génomiques, immédiats ou précoces, et les effets tardifs génomiques de l'Aldo.

Les effets non génomiques immédiats ou précoces :

Au niveau des CMLV, l'administration d'Aldo induit une élévation rapide et non génomique de la concentration cellulaire en Ca^{2+} ³⁴ et en AMPc³⁵ modifiant ainsi la contractilité de ces cellules³⁶ et contribue à l'effet de l'Aldo sur la vasoconstriction. L'Aldo est également capable d'activer les voies PI3K, MAPK et ERK1/2 impliquées dans de nombreux phénomènes de régulation, favorisant notamment la croissance cellulaire et inhibant l'apoptose^{37,38}, ou encore intervenant dans le stress oxydant via la NADPH oxydase et dans la fibrose³⁹.

L'existence d'une action immédiate et non génomique de l'Aldo soulève encore de nombreuses questions, comme l'existence ou non de nouveaux récepteurs membranaires ou la façon dont l'Aldo déclenche l'activation de tous les seconds messagers.

Les effets tardifs génomiques de l'Aldo :

L'activation du MR par l'Aldo induit la transcription de nombreux gènes codant pour des facteurs protéiques qui activent eux-mêmes d'autres gènes, dont celui codant pour le collagène de type I^{28,40,41}. Cette transcription induite par l'interaction de l'Aldo avec le MR est effective dans un délai variant de 20 minutes à plusieurs heures et peut être prévenue par l'administration de spironolactone ou d'autres antagonistes des MR.

Indépendamment des effets ioniques, de nombreuses données suggèrent que l'Aldo exerce au niveau cardiaque et vasculaire un puissant effet stimulant de la synthèse des collagènes et de la fibrose. Dans un modèle de rat infusé à l'Aldo, conjugué à une prise de sel importante, une augmentation de la rigidité artérielle est observée, associée à une augmentation de la synthèse de protéines de la MEC (notamment du collagène)^{42,43}. L'activation du MR par

l'Aldo induit par ailleurs une augmentation du stress oxydant, par l'activation de la NADPH oxydase. Cela induit également une réponse inflammatoire, par l'activation de la voie NF- κ B, ICAM-1, MCP-1 ou encore TNF- α ⁴⁴. Dans ce même modèle mais au niveau cardiaque, les rats infusés ont une augmentation de la fibrose cardiaque (interstitielle et périvasculaire), du stress oxydant et de l'inflammation ^{32,33}. Cependant, les mécanismes précis responsables de la régulation de la synthèse des collagènes par l'Aldo restent à déterminer.

2.3. Aspects cliniques et thérapeutiques

L'hyperaldostéronisme observé dans l'IC est de nature secondaire et résulte principalement de l'activation de la production de rénine, bien que d'autres facteurs humoraux y participent. Indépendamment des modifications de synthèse, l'augmentation du taux d'Aldo dans l'IC pourrait être liée en partie à une moindre élimination du minéralocorticoïde. La présence de nombreux facteurs confondants, tels que la charge sodée et les traitements associés, rend difficile l'évaluation exacte de l'augmentation des concentrations d'Aldo chez des patients insuffisants cardiaques. Cependant, plusieurs études anciennes ont pu évaluer ces concentrations chez des patients non traités. Par exemple, dans une analyse d'un sous-groupe de l'étude CONSENSUS II, une augmentation des taux d'Aldo a été notée après un infarctus, uniquement chez les patients présentant une IC ⁴⁵. Une augmentation a également été mesurée chez des patients en IC sévère ⁴⁶. Dans une autre étude similaire, CONSENSUS I, les résultats démontrent une corrélation significative entre les concentrations d'Aldo et la mortalité évaluée à 6 mois ⁴⁷.

L'augmentation des concentrations circulantes d'Aldo facilite la rétention hydrosodée et participe donc au développement d'œdème et de congestion. Chez les patients en IC, la surcharge volumique tend à aggraver le contexte hémodynamique. La baisse de débit cardiaque qui en résulte s'accompagne d'une diminution du débit sanguin rénal et d'une activation supplémentaire du système rénine-angiotensine-aldostérone, contribuant au développement d'un véritable cercle vicieux ou syndrome cardio-rénal ⁴⁸.

Au niveau cardiovasculaire, les conséquences de l'hyperaldostéronisme se traduisent principalement par le développement d'hypertrophie et de fibrose. Un nombre croissant d'éléments cliniques et précliniques suggèrent que l'Aldo joue un rôle physiopathologique important dans le remodelage et les maladies cardiovasculaires en induisant des changements dont l'hypertrophie cardiaque, la fibrose, la rigidité artérielle, ou encore l'inflammation et le stress oxydant ^{41,49-52}. Des éléments provenant des études RALES et EPHEBUS sur des patients avec IC (avec ou sans infarctus du myocarde) suggère que le blocage chronique du MR réduit le taux de peptides de collagène plasmatiques. Ces peptides sont les biomarqueurs circulants témoignant de la fibrose cardiovasculaire, suggérant que l'Aldo est un déterminant important du turnover du collagène dans le système cardiovasculaire ^{24,25,53}. L'ensemble de ces observations suggère une contribution de l'Aldo dans le remodelage cardiovasculaire, où il agirait comme un régulateur du collagène. La fibrose myocardique, qu'elle soit interstitielle ou périvasculaire, peut perturber la perfusion myocardique et diminuer la compliance ventriculaire gauche, contribuant à la dysfonction contractile ⁵⁴. Par ailleurs, l'hétérogénéité de conduction associée au développement de zones focales de fibrose peut augmenter l'incidence des troubles du rythme ventriculaire. Au niveau vasculaire, les effets vasoconstricteurs de l'Aldo peuvent contribuer à augmenter les résistances périphériques, et donc à aggraver l'IC. De plus, le développement de la fibrose des gros troncs pourrait contribuer à diminuer leur compliance ⁵⁵.

L'activité de l'Aldo peut être freinée en bloquant la stimulation de sa production par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (empêchant la conversion de l'Ang I en Ang II). Les antagonistes des récepteurs de l'Ang II (les sartans) ont également pour effet de diminuer la stimulation de la production d'Aldo. D'autres médicaments inhibent indirectement cette voie, c'est le cas en particulier des bêta-bloquants qui bloquent l'action des médiateurs du système adrénergique tels que l'adrénaline. De plus, des antagonistes du MR ont été développés en pharmacologie pour inhiber les effets de l'Aldo, par exemple la spironolactone. Elle possède des effets anti-hypertenseurs et diurétiques par inhibition de la réabsorption de sodium et d'eau au niveau du tubule distal du rein. D'autres, plus spécifiques du MR avec moins d'effets secondaires, ont également été développés comme l'éplérenone et le RU28318.

3. La galectine-3

3.1. La famille des lectines et des galectines

3.1.1. Définition

Les lectines sont des protéines qui reconnaissent des groupements riches en carbone et en hydrogène tels qu'on les retrouve dans les saccharides liés aux protéines ou aux lipides sous la forme de groupements glycosylés. Elles sont ainsi capables de reconnaître la partie oligosaccharidique de glycoprotéines sécrétées à la surface de la cellule ou attachées à la MEC. Elles possèdent de nombreuses fonctions, allant de l'adhésion cellulaire à l'interaction entre cellules en passant par la reconnaissance d'agents pathogènes. Elles comprennent plusieurs familles dont celle des galectines ⁵⁶.

Les Galectines, définies historiquement par leur habilité à reconnaître le β -galactose, sont des lectines de mammifères solubles ayant une affinité particulière pour les galactosides et plus particulièrement, les glycoprotéines comprenant le disaccharide N-acétyl-D-lactosamine (LacNac) ⁵⁷⁻⁵⁹. Bien que les galectines soient caractérisées par une homologie de séquence au niveau de leur site de reconnaissance des sucres (CRD; domaine de reconnaissance des hydrates de carbone), de petites différences dans leurs CRD, ainsi que dans leur organisation, causent des différences d'affinité entre les galectines. Plusieurs galectines ont été identifiées et elles peuvent être classifiées selon trois types :

- Les prototypes sont constitués d'un CRD (galectines 5, 7, 10) qui a la possibilité de se dimériser (galectines-1,-2,-11,-13,-14,-15).
- Les galectines de type tandem sont constituées de deux CRD unis par un lien peptidique (galectines-4,-6,-8,-9,-12).
- Le type chimère quant à lui ne comprend qu'une seule galectine, la galectine-3, qui est constituée d'un CRD et d'un domaine N-terminal non lectine.

3.1.2. Expression et rôle des galectines

Il existe des homologues des galectines chez tous les organismes, depuis les nématodes et les éponges, jusqu'aux mammifères. Chez ces derniers, elles sont exprimées dans la majorité

des tissus et dans un grand nombre de cellules. Le type de galectine, la spécificité de leur CRD ainsi que leur expression dans des tissus ou cellules spécifiques sont à l'origine des nombreuses activités décrites pour les galectines. Chaque organisme exprime habituellement plusieurs membres de la famille des galectines et des cellules différentes vont exprimer différents groupes de galectines ⁵⁷⁻⁵⁹. Les galectines ne contiennent pas de séquence peptidique signal pour la sécrétion hors des cellules. Toutefois, la sécrétion des galectines selon une voie de sécrétion non classique sans altération de l'intégrité membranaire a été observée ^{60,61}.

Les galectines jouent des rôles intracellulaires aussi bien qu'extracellulaires. Elles ont été retrouvées dans plusieurs compartiments cellulaires, dont le noyau, suggérant leur implication dans des fonctions telles que la régulation de la transcription et l'induction de l'apoptose ⁶²⁻⁶⁹. Les rôles intracellulaires des galectines ne sont toutefois habituellement pas liés à leur fonction lectine car la majorité des glycanes ou des glycoprotéines se retrouvent dans le milieu extracellulaire. Ce sont donc les rôles extracellulaires des galectines qui ont attiré le plus d'attention. C'est leur nature multivalente qui permet aux galectines d'effectuer la majorité de leurs fonctions par le pontage de leurs ligands. En effet, puisque les galectines sont composées de un ou deux CRD elles ont la possibilité de s'oligomériser et ponter leurs ligands ⁵⁷⁻⁵⁹. Cette oligomérisation peut conduire à des interactions cellule-cellule ou cellule-MEC, à la transduction de signal par pontage de récepteurs ou à la formation de couche tridimensionnelle de galectines à la surface cellulaire ⁷⁰⁻⁷⁶. Ces interactions interviennent dans plusieurs fonctions, notamment en lien avec la réponse immunitaire et le développement de cancers ^{57-59,74,75,77-84}. L'expression des galectines dans la plupart des cellules impliquées dans la réponse immunitaire ainsi que l'augmentation de leur expression lors de l'inflammation ont contribué à l'association des galectines avec la réponse immunitaire. Les galectines les plus étudiées sont les galectines-1, -3, et -9. La galectine-1 a surtout été associée à des phénomènes d'apoptose et est considérée comme une protéine anti-inflammatoire qui serait impliquée dans la génération préférentielle de réponse Th2 plutôt que Th1 ^{81,82,85-88}. La galectine-9 a tout d'abord été reconnue comme une protéine chimiotactique pour les éosinophiles ^{89,90} et a donc été reliée à la réponse allergique.

3.2. La galectine-3

3.2.1. Relation structure / fonction

La Gal-3 est le membre de la famille des galectines qui a été le plus étudié jusqu'à maintenant. Sa présence avait été suggérée dès 1981 par la découverte d'une activité lectine à la surface des cellules tumorales que la fétuine était capable d'agréger⁹¹. Anciennement appelée Mac-2, CBP-30, CBP-35, L-29 ou ϵ BP c'est une protéine soluble d'un poids moléculaire se situant entre 29 et 35 kDa qui a une affinité particulière pour la structure polylectosamine^{92,93}. L'affinité de la Gal-3 pour ses ligands est directement proportionnelle au nombre d'unités lactosamines présentes dans l'oligosaccharide^{92,93}.

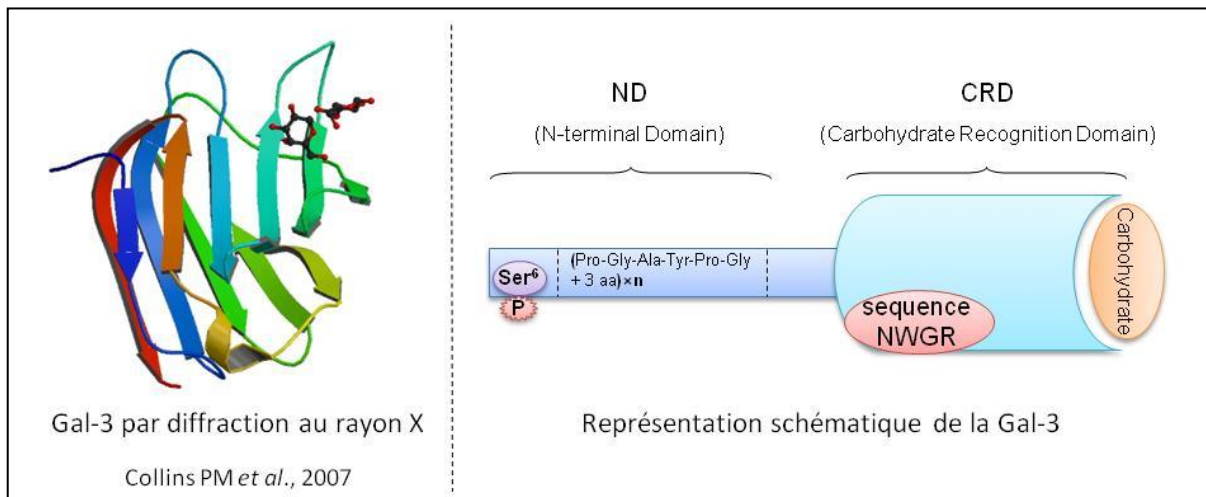


Figure 9 : Représentation de la galectine-3 (Gal-3). La Gal-3 possède un domaine N-Terminal (ND) et un domaine de reconnaissance des hydrates de carbone (CRD).

La Gal-3 est la seule représentante du type chimère. Sa structure diffère sensiblement de toutes les autres galectines : sa longue chaîne polypeptidique forme deux domaines structurellement différents, un domaine N-terminal atypique et un domaine CRD (**Figure 9**). Les différents rôles de la Gal-3 dépendent de la présence de ces deux domaines :

- Le domaine N-terminal, long de 110-130 acides aminés, est une structure relativement flexible composé de 7 à 14 modules répétitifs. Bien qu'il ne possède aucune activité de liaison de groupements glycosylés, il est essentiel à son activité biologique. Des perturbations de ce petit domaine entravent par exemple la sécrétion de la Gal-3 et

perturbent ses propriétés anti-apoptotiques⁹⁴. Ce domaine N-terminal contient les sites de phosphorylation⁹⁵, au niveau de la sérine 6 et 12. Cependant, la plupart des phénomènes de phosphorylation ont lieu au niveau de la sérine 6, uniquement 10 % au niveau de la sérine 12, et est orchestrée par la caséine kinase I et II (démontré *in vitro*)⁹⁶. Les rôles principaux de la phosphorylation (notamment la phosphorylation de la sérine 6) semblent avoir lieu dans le transport de la Gal-3 dans le noyau, ainsi que dans la réduction de sa capacité à lier le ligand. Ainsi, il a été suggéré que cette phosphorylation était une modification régulatrice de l'activité multivalente de la Gal-3⁹⁶.

- Le domaine CRD de la Gal-3 se compose de 130 acides aminés, il forme une structure globulaire qui accueille le site de liaison des groupements carbohydratés et il est similaire au domaine CRD des autres galectines. Ce domaine contient néanmoins un site NWGR qui confère à la galectine-3 son activité anti-apoptotique. Cette séquence est en effet fortement conservée au sein de la famille des protéines de type lymphome à cellules B -2 (Bc1-2)⁹⁷. Elle est également impliquée dans l'agrégation de molécules de galectine-3 en absence du ligand⁹⁸.

Le ligand pour lequel la Gal-3 a le plus d'affinité se compose de N-acetyllactosamine. Il existe de nombreux ligands portant des groupements N-acetyllactosamine et dont l'interaction avec la Gal-3 peut ainsi être inhibée par le lactose, un inhibiteur compétitif. Par contre, toutes les protéines portant ces groupements ne sont pas forcément des ligands de la Gal-3 et l'une des raisons peut être que l'affinité de liaison avec la Gal-3 est plus faible que pour d'autres galectines. La Gal-3 est également capable de lier des protéines non-glycosylées au niveau intracellulaire avec pour effet principal, la régulation des processus apoptotiques⁹⁹. L'interaction entre la Gal-3 ou son CRD avec les oligosaccharides induira un changement de conformation. Par ailleurs, la phosphorylation à la position sérine 6 affecte fortement son affinité pour le ligand et fut proposée comme un interrupteur de la liaison de la Gal-3 à son ligand et de ses effets biologiques consécutifs⁹⁶. Par ailleurs, l'une des caractéristiques les plus importantes est sa forte tendance à former des complexes bi- ou multivalents, bien qu'elle ne possède qu'un seul domaine CRD. Les domaines CRD et N-terminal sont tous les deux impliqués dans la formation de multimères (le plus souvent dans les observations, sous forme de pentamères)¹⁰⁰. Dernièrement, cette multimérisation a pu être mise en évidence à l'aide de la technique de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) et a permis de

conclure que celle-ci était robuste et pouvait ainsi générer des treillis moléculaires pouvant séquestrer et/ou agréger des récepteurs à la surface de la cellule ¹⁰¹.

3.2.2. Expression de la galectine-3

Les galectines sont synthétisées dans le cytosol, sans passer par le réticulum endoplasmique qui leur permettrait des modifications post-traductionnelles. Il manque en effet aux galectines un peptide signal de sécrétion et elles ne sont donc pas sécrétées par la voie classique. Cependant, certaines cellules comme les macrophages inflammatoires sécrètent de façon active la Gal-3, selon une voie de sécrétion non classique qui ne compromet pas l'intégrité de la membrane ^{70,102-109}. Une des voies caractérisées pour la Gal-3 montre que cette dernière est concentrée au niveau d'évaginations de la membrane plasmique qui seraient libérées dans le milieu extracellulaire par un mécanisme impliquant la partie N-terminale de la protéine ¹¹⁰. Elle peut également être libérée dans le milieu extracellulaire de façon passive, lors de la nécrose des cellules ¹¹¹⁻¹¹⁷.

La Gal-3 est exprimée dans de nombreux types cellulaires et dans plusieurs tissus ¹¹⁸, même si elle reste plus fortement exprimée par les cellules inflammatoires (**Tableau 1** et **Tableau 2**). Dans le cœur, en dehors des cellules infiltrées, elle est exprimée par les fibroblastes ¹¹⁹. En revanche, son expression n'a jamais été observée dans les cardiomyocytes. Dans l'aorte, toujours en dehors des cellules infiltrées, elle est exprimée par les cellules endothéliales et les fibroblastes en revanche, son expression dans les CMLV reste très controversée. Il a été décrit que l'ARN et la protéine de la Gal-3 n'étaient pas exprimés *in vivo* dans les CMLV des animaux sains ¹²⁰⁻¹²² même si une expression a été relevée dans des cas pathologiques comme l'athérosclérose. En opposition à ces résultats, une autre étude a montré que les CMLV *in vivo* et en conditions basales expriment cette lectine ¹²³. *In vitro*, l'expression de la Gal-3 a été décrite dans les CMLV en prolifération mais pas dans les cellules quiescentes ¹²⁰.

Tableau 1 : Expression et rôle de la Gal-3 en fonction du type cellulaire.

Type cellulaire	Expression	Effets	Références
Fibroblastes	Oui	↑ Collagène ↑ Prolifération	Sharma UC <i>et al.</i> , 2004 ¹¹⁹
Cardiomyocytes	Non	↑ Taille	Liu YH <i>et al.</i> , 2009 ¹²⁴
Cellules endothéliales	Oui	↑ Prolifération ↑ Angiogénèse	Thijssen <i>et al.</i> , 2008 ¹²⁵ Wan SY <i>et al.</i> , 2011 ¹²⁶
CMLV	Faible	Pas étudié	Arar C <i>et al.</i> , 1998 ¹²⁰
Cellules inflammatoires	Oui	↑ Migration ↑ Survie	Papaspyridonos M <i>et al.</i> , 2008 ¹²²
Cellules rénales	Oui	↑ Collagène ↑ Survie	Okamura DM, <i>et al.</i> , 2011 ¹²⁷
Adipocytes	Oui	↑ Prolifération	Kiwaki K <i>et al.</i> , 2007 ¹²⁸
Cellules cancéreuses	Oui	Survie / Apoptose	Dumic J <i>et al.</i> , 2006 ⁹⁴ ; Lee YJ <i>et al.</i> , 2003 ¹²⁹ Oka N <i>et al.</i> , 2005 ¹³⁰

Tableau 2 : Expression et rôle de la Gal-3 en fonction du tissu.

Type tissulaire	Expression	Effets	Références
Cœur	Oui	↑ Fibrose; Induction d'une dysfonction myocardique	Sharma UC <i>et al.</i> , 2004 ¹¹⁹ Kim H <i>et al.</i> , 2007 ¹¹⁸
Artères	Oui	Rôle dans l'athérosclérose (chémoattraction, fibrose)	Nachtigal M <i>et al.</i> , 1998 ¹²¹
Rein	Oui	↑ Fibrose	Kim H <i>et al.</i> , 2007 ¹¹⁸ Henderson NC <i>et al.</i> , 2008 ¹³¹
Poumon	Oui	↑ Fibrose	Kim H <i>et al.</i> , 2007 ¹¹⁸ Ge XN <i>et al.</i> , 2010 ¹³²

3.2.3. Rôles de la galectine-3

La Gal-3 exerce différents rôles en fonction, entre autres, de sa localisation (*Figure 10*).

Adhésion :

Les rôles les plus reconnus et les plus étudiés sont ceux comme molécule d'adhésion où la Gal-3 est impliquée dans l'activation de plusieurs types cellulaires^{70,76}. Il est décrit que cette lectine est capable de se lier aux intégrines, par exemple, $\alpha3\beta1$ sur les cellules endothéliales¹³³, et de promouvoir ainsi la migration cellulaire. La Gal-3 est également capable de se lier aux glycoprotéines présentes dans la MEC, la fibronectine, la laminine, l'hensine ou l'élastine^{79,134} pour former des ponts permettant les liaisons des cellules entre elles et à la matrice¹³⁵⁻¹³⁷. Comme elle est capable de lier des protéines de façon multivalente, elle agrège les glycoprotéines à la surface cellulaire ce qui a pour effet de créer une cascade de signalisations transmembranaires qui se répercutent sur la signalisation intracellulaire.

Survie et apoptose :

À travers ces mécanismes d'adhésion, de nombreuses fonctions biologiques sont affectées, telles que la migration, la mitose, l'apoptose et la progression dans le cycle cellulaire. Elle joue donc un rôle dans les phénomènes d'apoptose et même s'il a été décrit tantôt un effet pro-apoptotique, tantôt un effet anti-apoptotique, des études tendent à montrer que sa localisation est déterminante dans son action. En effet, la Gal-3 intracellulaire serait anti-apoptotique tandis que la Gal-3 extracellulaire serait plutôt pro-apoptotique^{94,97,99,138}.

Prolifération et cycle cellulaire :

La Gal-3 a également un rôle de facteur de croissance^{68,97,139,140}, ainsi qu'un rôle dans l'épissage alternatif des pré-ARNm⁶², elle est d'ailleurs retrouvée en grande quantité dans le noyau des cellules^{67,141-145}. Elle participe donc à la régulation de la prolifération et du cycle cellulaire, notamment dans les fibroblastes cardiaques^{94,119}. Les mécanismes ne sont pas encore tout à fait élucidés mais elle interagit avec un nombre important de protéines qui

régulent ces phénomènes. Il est important de noter ici que la fonction première des galectines, à savoir lier un groupement glycosylé, n'est pas suffisante dans la plupart des fonctions intracellulaires. Pour assurer ces fonctions intracellulaires, la Gal-3 implique également des interactions protéine-protéine qui restent encore à caractériser.

Inflammation et fibrose :

Cette lectine est également impliquée dans l'inflammation et la fibrose. En effet, il a été démontré que la Gal-3 est associée avec la dysfonction cardiaque via l'induction d'une prolifération des fibroblastes cardiaques, d'un dépôt accru de collagène et d'une dysfonction ventriculaire^{119,146}. Cependant, les effets vasculaires n'ont jamais été étudiés.

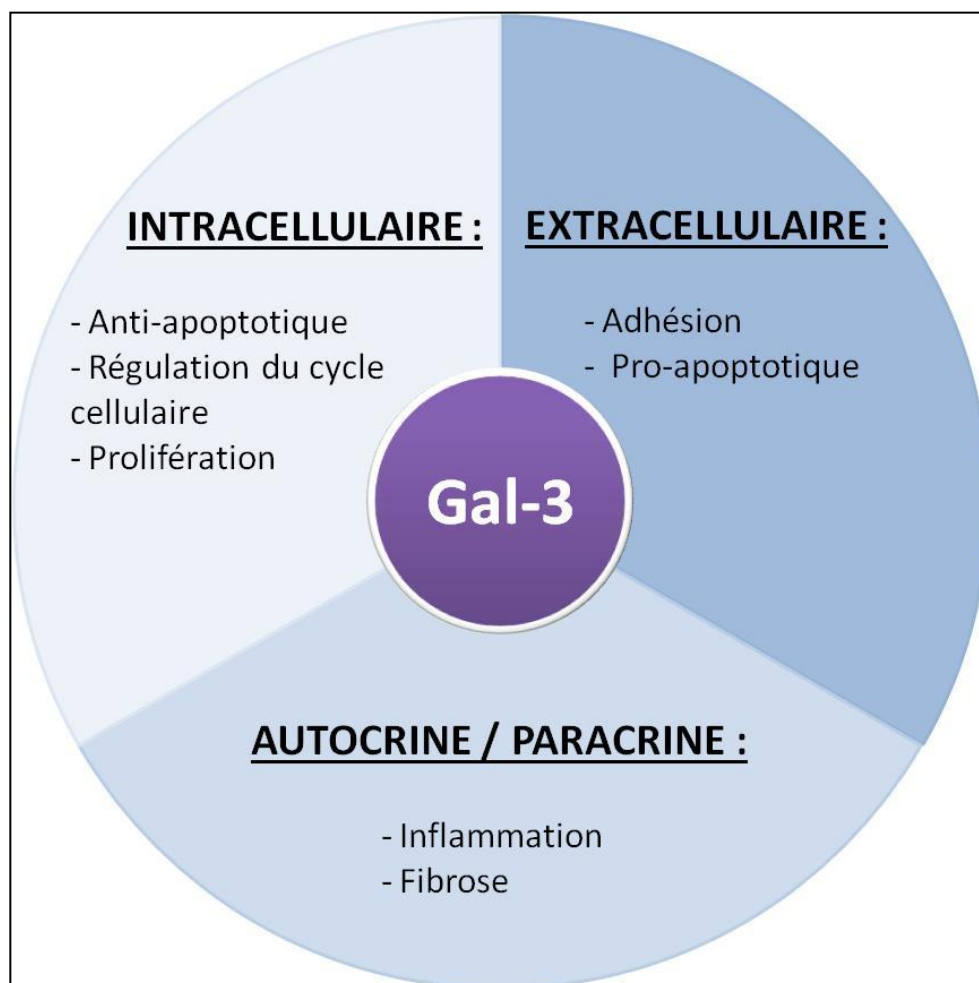


Figure 10 : Rôles de la Gal-3. Illustration présentant les différents effets de la Gal-3 en fonction de sa localisation cellulaire.

3.2.4. Voies de régulation de la galectine-3

Concernant sa régulation, des études précédentes ont montré que plusieurs cytokines (interleukines-2, -4 et -7) régulent l'expression de la Gal-3 dans les lymphocytes T ¹⁴⁷. Une étude d'un intérêt particulier nous a révélé que l'expression myocardique de Gal-3 était augmentée dans les rats Ren-2, sur-exprimant la rénine-2 conduisant à une IC, et dans des souris traitées à l'Ang II ¹¹⁹. Ceci suggère un rôle du système rénine-angiotensine dans la régulation de la Gal-3.

3.2.5. Inhibition

Bien que plusieurs rôles aient été décrits pour la Gal-3 et ce, dans plusieurs conditions, les mécanismes précis pour ces activités demeurent mal caractérisés. Pour mettre à jour ces mécanismes, plusieurs inhibiteurs de la Gal-3 ont été décrits (**Figure 11**):

- Le lactose qui est un glucide naturel.
- Le N-Acétyl-D-lactosamine (LacNac) qui est un disaccharide synthétique, constitué d'unités de galactose et de N-acetylglucose.
- La pectine de citron modifiée ¹⁴⁸ (MCP), utilisé sous forme de complément alimentaire peu coûteux, est un complexe hydrosoluble indigestible et contient des fragments originels de pectine, incluant des régions polysaccharidiques riches en polymères de β -galactose ¹⁴⁹. Il est obtenu à partir de la peau et la pulpe de citron (mais se retrouve dans tous les agrumes) puis il est modifié par changement de pH et traitement thermique. Il est non toxique et déjà utilisé en complément alimentaire et proposé comme traitement anti-métastatique. Ses effets ont été démontrés *in vitro* et *in vivo* (chez l'animal et l'homme) sur les cancers de la prostate, du colon, du sein, les mélanomes, les myélomes, ou les hémangiosarcomes ¹⁴⁸.

Ces inhibiteurs, qui ont une forte affinité et se lient au CRD de la Gal-3 ^{150,151}, bloquant ainsi son activité lectinique, ont été utilisés pour préciser le rôle de la Gal-3 dans des modèles de migration cellulaire, d'adhésion ou de métastase ^{152,153}.

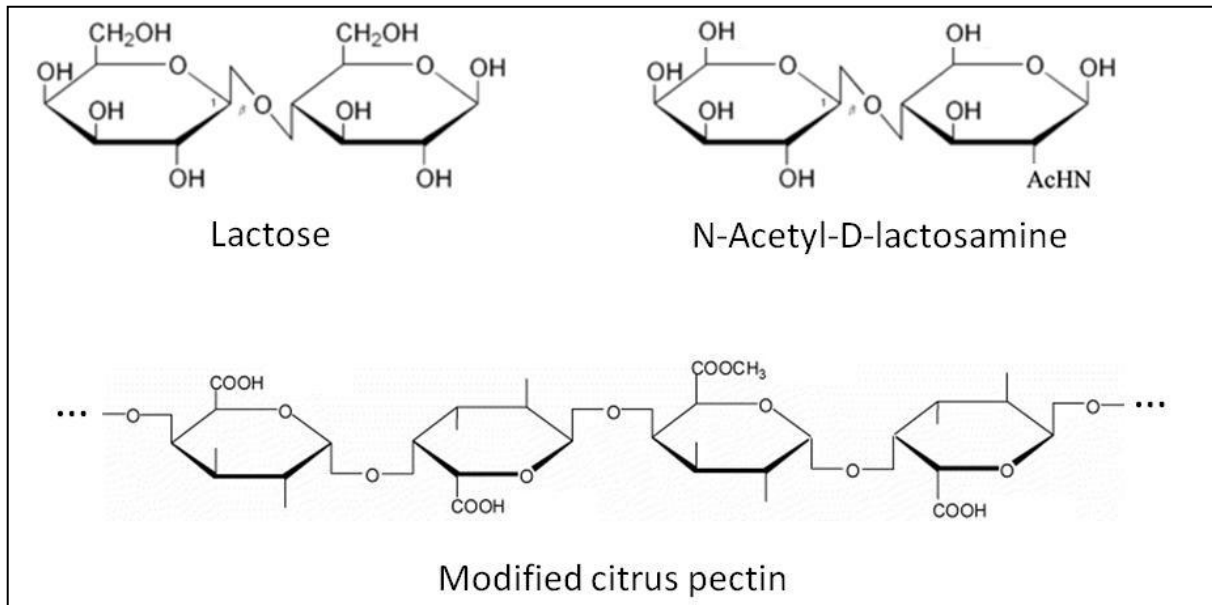


Figure 11 : Les inhibiteurs de la galectine-3 (Gal-3). Formules chimiques des principaux inhibiteurs de la Gal-3. AcHN, groupement acétylamine (NHCOCH₃).

De plus, les deux domaines de la Gal-3, CRD et ND, semblent nécessaires pour la majorité de ses actions^{57-59,114,135,154-159}. En effet, pour déterminer le rôle de chaque domaine des études se sont portées sur la Gal-3 tronquée, isolant ainsi son CRD. Ainsi, lors du clivage du domaine N-terminal de la Gal-3 par les MMP-2 et -9, le CRD seul peut toujours lier ses ligands sans toutefois induire ses différentes fonctions. Ces observations suggèrent que la nature multivalente de la Gal-3 est au cœur de ses différentes fonctions^{100,160,161}. D'ailleurs, il a été démontré, *in vitro* à l'aide de tests biochimiques, que lors de la liaison de ligands par le CRD de la Gal-3 entière, celle-ci précipite en pentamère suggérant une oligomérisation¹⁰⁰. Aucune preuve directe de l'oligomérisation de la Gal-3 lors de ses différentes activités biologiques n'a toutefois été présentée.

Enfin, un dernier inhibiteur de l'expression de la Gal-3 a été décrit, le N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (Ac-SDKP), un peptide naturellement synthétisé par l'organisme et dégradé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Il est capable d'inhiber la synthèse de la Gal-3 diminuant ainsi l'inflammation, la fibrose, l'hypertrophie et la dysfonction cardiaque¹²⁴. Cependant, cet inhibiteur de la Gal-3 n'est pas spécifique de cette protéine.

3.2.6. Modèles animaux

Modèle de souris invalidées pour la Gal-3 :

L'étude des différents rôles de la Gal-3 est maintenant facilitée par la disponibilité de modèles murins dont le gène pour la Gal-3 a été inactivé (souris KO). Pour éteindre le gène codant pour cette lectine, un vecteur a été dessiné pour supprimer, sur le brin d'ADN génomique, les exons II, III et IV. Après électroporation et introduction de ce vecteur dans des cellules souches embryonnaires, les clones ont été sélectionnés par l'analyse de fragment d'ADN digéré par des enzymes de restriction spécifiques. Ces cellules souches ont ensuite été injectées dans des blastocytes pour générer des animaux chimériques et des mâles capables de transmettre l'allèle mutant pour la Gal-3 ont été ainsi obtenus. Ces souris, hétérozygotes, ont été croisées pour obtenir une lignée homozygote Gal-3 (-/-) ¹⁶².

Dans ces souris n'exprimant pas de Gal-3, il devient possible d'étudier les effets d'un déficit de cette lectine dans des modèles complexes de pathologies diverses. Aucun phénotype majeur n'est détectable chez les souris KO et celles-ci se développent normalement ¹⁶². Toutefois, grâce aux souris KO, on a déterminé que la Gal-3 était une protéine importante dans la réaction inflammatoire ¹⁶³, notamment dans un modèle d'athérosclérose ¹⁶⁴. Toujours dans ce modèle, il a été montré que la Gal-3 intervient dans le remodelage des voies aériennes, la fibrose péribronchique, l'augmentation de l'épaisseur de la couche musculaire de la paroi des bronchioles et elle est associée aux marqueurs d'inflammation IL-5, IL-13, VCAM-1, ICAM-1 et MCP-1 ¹³². Dans un modèle d'angiogénèse induit par le facteur de croissance de l'endothélium (VEGF), la Gal-3 est un médiateur du VEGF via l'intégrine $\alpha\beta 3$ ¹⁶⁵. Dans le rein, il a été découvert que la Gal-3 était un récepteur des produits de glycations avancés (AGE) et intervient dans le remodelage de la MEC ¹⁶⁶.

Modèle d'infusion intra-péricardique la Gal-3 chez le rat :

Aucune étude n'a, pour l'heure, utilisé un traitement systémique chronique à la Gal-3 chez l'animal pour étudier ses effets sur le système cardiovasculaire. En revanche, pour étudier ses effets sur le cœur, un modèle de rat traité à la Gal-3 en infusion péricardique a été mis au point ¹¹⁹. En infusant une Gal-3 biotinylée, les auteurs de cette étude ont mis en évidence ses

sites de fixation, qui sont la MEC et les fibroblastes, mais pas les cardiomyocytes. La Gal-3 induit également une IC caractérisée par une diminution de la fraction d'éjection du ventricule gauche, de la fraction de raccourcissement et un dP/dt négatif. De plus, les rats traités à la Gal-3 avaient une augmentation myocardique du collagène de type I, sans différence dans le dépôt de collagène de type III. Cette différence de dépôt entre ces deux collagènes augmente le ratio collagène de type I / collagène de type III dans le sens d'une augmentation de la rigidité. Cette étude révèle ainsi un effet profibrotique de la Gal-3 dans le cœur et sa capacité à induire une IC.

3.2.7. Applications cliniques

Intérêts des biomarqueurs dans les pathologies cardiovasculaires :

La morbi-mortalité importante liée aux maladies cardiovasculaires ainsi que le poids qu'elles représentent en terme de dépenses de santé en ont fait un but primordial de recherche pour la santé publique. Malgré des facteurs de risque bien établis (comme le sexe ou l'âge) connus dans les maladies cardiovasculaires, tous les patients à risque ne peuvent pas être encore identifiés. Par conséquent depuis ces 10 dernières années, les recherches se multiplient sur le développement de nouveaux biomarqueurs cardiovasculaires qui pourraient diagnostiquer et/ou participer à la stratification du risque des pathologies cardiovasculaires, et permettre d'adapter les traitements¹⁶⁷⁻¹⁷⁰.

Dans la littérature, le terme "biomarqueur" renvoie généralement à des molécules circulant dans le sang ou dans les urines. Une définition a été établie lors de la conférence consensus "Advancing Clinical Research and Applications" organisée par la US Food and Drug Administration (FDA) et le National Institutes of Health (NIH) en avril 1999 : un biomarqueur est un critère qui est mesuré et évalué comme un inducteur de processus physiologiques normaux, de processus pathologiques ou un élément de réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique¹⁷¹.

Les biomarqueurs dans l'insuffisance cardiaque :

Les biomarqueurs de l'IC peuvent être des médiateurs neurohormonaux (comme le BNP), des indicateurs de la réponse inflammatoire (très nombreux mais sans spécificité : IL-1, IL-2, IL-18 et autres cytokines, CRP), et des marqueurs de l'agression myocytaire (comme la Troponine) et du remodelage¹⁷²⁻¹⁷⁶ (**Figure 12**).

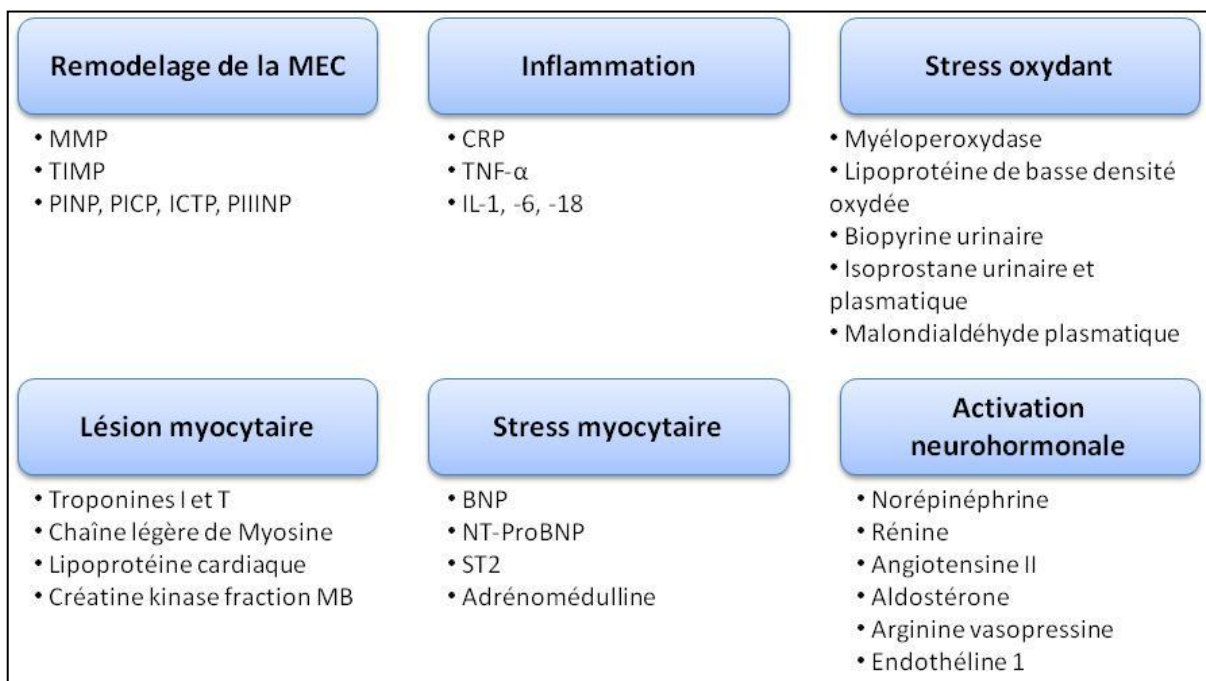


Figure 12 : Les biomarqueurs de l'insuffisance cardiaque. MMP, métalloprotéinase ; TIMP, inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase ; PINP, propeptide aminoterminal du procollagène de type I ; PICP, propeptide C-terminal du procollagène de type I ; ICTP, télopeptide C-terminal du collagène de type I ; PIIINP, propeptide aminoterminal du procollagène de type III ; CRP, protéine C réactive ; TNF- α , facteur de nécrose tumorale α ; IL, interleukines ; BNP, peptide cérébral natriurétique ; NTproBNP, N-terminal propeptide cérébral natriurétique ; ST2, "recepteur-like" 1 de l'interleukine (adapté de Braunwald E. 2008¹⁷²).

La Gal-3 comme un possible biomarqueur de l'IC :

La Gal-3 est également considérée comme un nouveau biomarqueur dans le suivi de l'IC et a démontré son intérêt clinique pour le pronostic des patients atteints d'IC (par exemple, identification de ceux ayant un risque de mourir dans les 60 jours) ¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Plusieurs études montrent que les taux plasmatiques d'amino-terminal proB-type natriuretic peptide (NTproBNP) peuvent faciliter le diagnostic de l'IC et permettent d'identifier les personnes à risque plus élevé de décès dans l'année. Étant donné que de nombreux facteurs biologiques et processus conduisent à l'IC, des tests complémentaires pour plusieurs biomarqueurs permettraient d'affiner les diagnostics des patients au cas par cas. En plus du NTproBNP, qui est un indicateur de stress dans le muscle cardiaque, le niveau de Gal-3, a été suggéré pour le diagnostic et le pronostic des patients en IC ¹⁸⁰⁻¹⁸². L'élévation du niveau de NTproBNP est le plus fort indicateur de l'IC dans la population étudiée, mais le niveau de Gal-3 est aussi nettement augmenté chez les patients ayant une IC. Notre groupe a montré que la concentration sérique de Gal-3 est associée au pronostic cardiovasculaire des patients atteints d'IC ¹⁸³.

Dans une étude réalisée en 2006 sur 599 patients dont 209 diagnostiqués IC, il a été établi une valeur plasmatique seuil de 6,88 ng/ml, au dessus de laquelle la concentration en Gal-3 est associée et reflète une IC (sensibilité de 80 % mais avec une faible spécificité de 52%) ¹⁷⁷. A ce jour, des études de plus grande ampleur ont permis de montrer que les patients atteints d'IC avec des concentrations sanguines supérieures à 17,8 ng/ml de Gal-3 ont un risque plus élevé de mortalité et d'hospitalisation que les patients atteints d'IC mais avec un niveau inférieur à 17,8 ng/ml. Cette valeur est actuellement proposée comme référence par BG Medicine qui commercialise un kit ELISA de détection de cette lectine chez l'Homme.

II. HYPOTHESE ET OBJECTIFS

L'Aldo est impliquée dans la rigidité artérielle et l'IC, mais les mécanismes sous-jacents restent mal connus. Dans le contexte de l'IC, une nouvelle molécule émerge, la Gal-3. C'est une lectine se liant aux β -galactosides qui joue un rôle important dans la fibrose et l'IC dont les effets vasculaire et sa relation avec l'Aldo n'ont encore jamais été explorés.

Notre hypothèse est que la Gal-3 pourrait être un nouveau facteur induisant un remodelage vasculaire via la synthèse de collagène par les CMLV. De plus, nous proposons que cette lectine pourrait être un médiateur des effets de l'Aldo dans le remodelage vasculaire.

Pour valider cette hypothèse, nous avons utilisé des modèles complémentaires *in vitro* et *in vivo*, pour y réaliser les objectifs suivants :

- *In vitro*, dans un modèle de culture primaire de CMLV de rat :
 1. mettre en évidence l'expression de la Gal-3,
 2. étudier les effets de la Gal-3 sur le remodelage matriciel,
 3. analyser les effets de l'Aldo sur le remodelage matriciel dans ce type cellulaire,
 4. déterminer si la Gal-3 est un médiateur des effets de l'Aldo sur le remodelage matriciel.

- *In vivo* et *ex vivo*, dans des rats Wistar et des souris sauvages versus KO pour la Gal-3, traités à l'Aldo :
 1. mettre en évidence l'expression de la Gal-3 dans l'aorte,
 2. analyser les effets de l'Aldo sur le remodelage matriciel aortique,
 3. déterminer si la Gal-3 est un médiateur des effets vasculaires de l'Aldo.

III. MATERIELS ET METHODES

1. Culture cellulaire

1.1. Isolement des CMLV de rats Wistar

Les CMLV sont isolées à partir de l'aorte thoracique de rats Wistar mâles, âgés de 6 semaines. L'aorte thoracique est placée dans un milieu sans sérum. Puis l'adventice est retirée, l'aorte est ouverte et la couche de cellules endothéliales est enlevée en grattant l'intérieur avec le dos d'une pince. La média est découpée en petits fragments, mise dans 1ml de PBS contenant 1mg de collagénase de type II et 0,5 mg d'élastase puis mise à agiter durant 1 à 2 heures à 37°C. La digestion est arrêtée avec un milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Puis les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM-F12 supplémenté avec 10% de SVF et 3 mg/ml pénicilline-streptomycine dans un environnement avec 5% de CO₂ pour 95% d'air. Le milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'à la confluence des CMLV. Lorsque les cellules sont confluentes, elles sont mises en suspension avec de la trypsine et réensemencées. Les cellules sont lavées avec du tampon PBS afin d'éliminer tout le sérum. 5 ml de trypsine-EDTA est ensuite ajouté dans chaque boîte de 75 cm² et les cellules sont incubées pendant 5-8 minutes à 37°C afin de favoriser l'action de l'enzyme et décoller les cellules. La réaction est arrêtée en ajoutant 5 ml de milieu avec du sérum, et les cellules sont centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes. Les passages suivants sont réalisés selon le même protocole. Les cellules sont utilisées entre les passages 4 et 8. Pour chaque expérience, des cellules issues de 3 rats différents sont utilisées.

1.2. Stimulation des CMLV

Tableau 3 : Liste des inhibiteurs utilisés dans les stimulations de culture cellulaire.

Inhibiteur	Rôle	Solvant	Concentration	Fournisseur
actinomycine D	inhibiteur de la transcription	DMSO	10 ⁻⁶ M	Calbiochem
cycloheximide	inhibiteur de la traduction	DMSO	10 ⁻⁶ M	Calbiochem
eplerenone	antagoniste du récepteur MR	DMSO	10 ⁻⁶ M	Sigma
RU28318	antagoniste du récepteur MR	éthanol	10 ⁻⁶ M	Tocris Bioscience
MCP	inhibiteur de la Gal-3	PBS	10 ⁻⁶ M	Econugenics
LacNac	inhibiteur de la Gal-3	PBS	10 ⁻⁶ M	Sigma

MCP, pectine de citron modifiée ; LacNac, N-acétyl-D-lactosamine

Les cellules sontensemencées à la concentration de 3×10^5 cellules par puits dans des plaques six puits avec du milieu contenant 10% de sérum. A 70% de confluence, elles sont synchronisées par privation de sérum (1% pendant 12 heures). Les CMLV sont ensuite stimulées à l'Aldo (Sigma) à $10^{-8}M$. Tous les inhibiteurs (**Tableau 3**) sont ajoutés 30 minutes avant la stimulation à l'Aldo. Les cellules sont ensuite incubées 6h ou 24h pour les analyses d'ARN ou de protéines respectivement (**Figure 13**). Tous les inhibiteurs ont fait l'objet d'une détermination de la concentration optimale par dose-réponse et n'ont pas d'effets seul sur les paramètres testés.

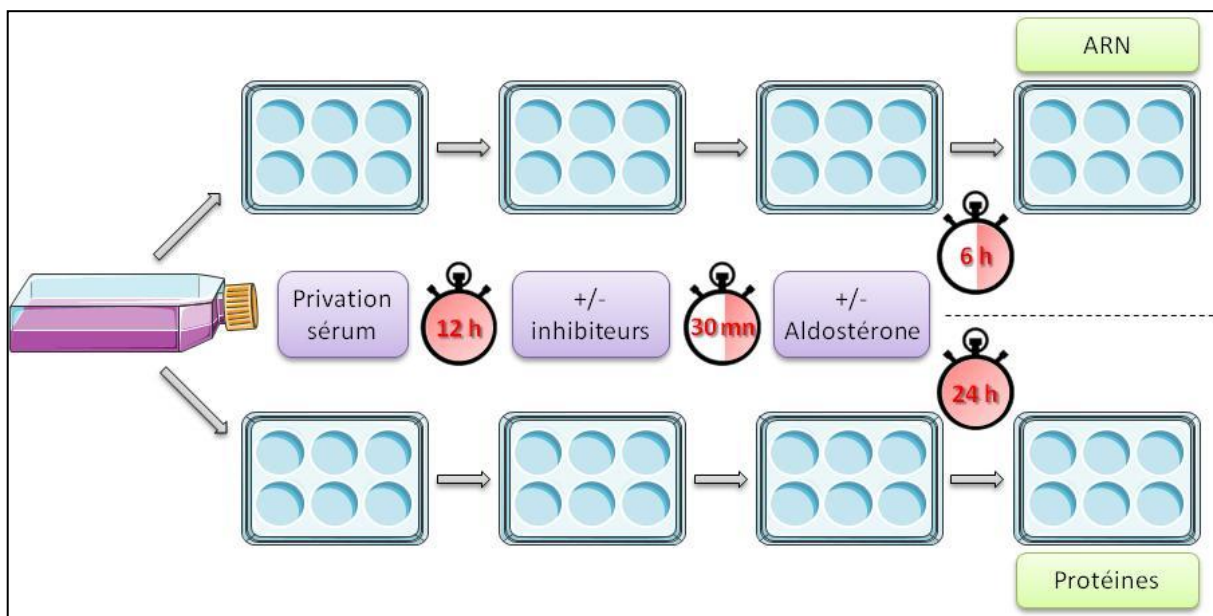


Figure 13: Modèle de stimulation des CMLV. Illustration présentant les conditions de stimulation des cellules à l'aldostérone.

Des expériences dose-réponse de $10^{-10}M$ à $10^{-8}M$ d'Aldo pendant 24 heures et temps réponse de 0 à 48 heures (avec des points à 0, 6, 12, 24, 36 et 48 heures) à $10^{-8}M$ d'Aldo ont également été réalisées.

1.3. Technique de transfection plasmidique

1.3.1. Construction des plasmides

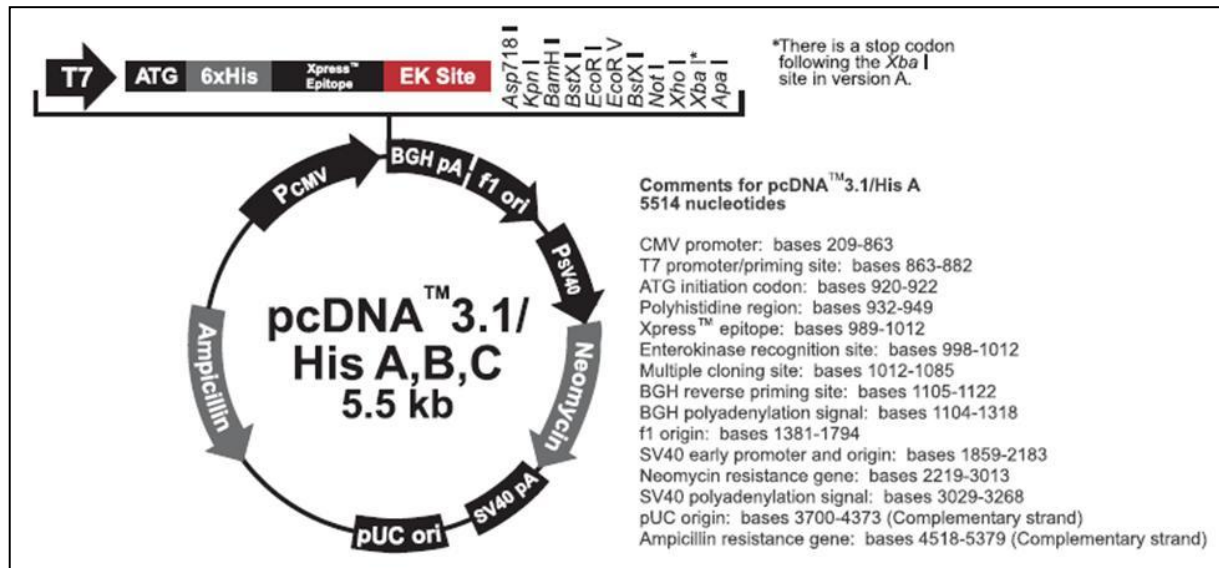


Figure 14 : Schéma du plasmide *pcDNA3.1/HisMax* (adapté d'Invitrogen). Carte du plasmide utilisé pour transfecter les cellules. Les gènes ont été insérés entre *NheI*-HF et *EcoRI*. Les protéines recombinantes synthétisées à partir de ce gène possèdent en plus une queue polyhistidine.

Le plasmide *pcDNA3.1/HisMax A* (Invitrogen, **Figure 14**) est utilisé comme vecteur de transfection. Le plasmide est ouvert par les enzymes de restriction *NheI*-HF et *EcoRI* (Invitrogen) puis il est refermé par des ligases (Invitrogen) soit sur lui-même pour donner le vecteur vide contrôle, soit avec le gène codant pour la Gal-3 recombinante humaine (*rhGal-3*) entière ou la Gal-3 recombinante humaine tronquée, correspondant au CRD recombinant humain (*rhCRD*), fournie par Dr Pascal REBOUL (CNRS, Université de Lorraine UMR 7561, Vandoeuvre-Lès-Nancy, F-54500, France). Les plasmides sont ensuite isolés par électrophorèse suivi d'une purification avec le kit Quiaquick Gel Extraction (Quiagen). Puis ils sont introduits dans des *E. coli* compétentes (Invitrogen) par choc thermique selon les instructions du fabricant pour être amplifiés. Les bactéries transformées sont sélectionnées par culture dans un milieu contenant de l'ampicilline et les plasmides sont clonés par multiplication, toujours dans un milieu contenant de l'ampicilline. Les plasmides sont ensuite extraits par le kit Mini prep (Quiagen) et sont contrôlés par électrophorèse et par PCR après digestion et séparation (**Figure 15**).

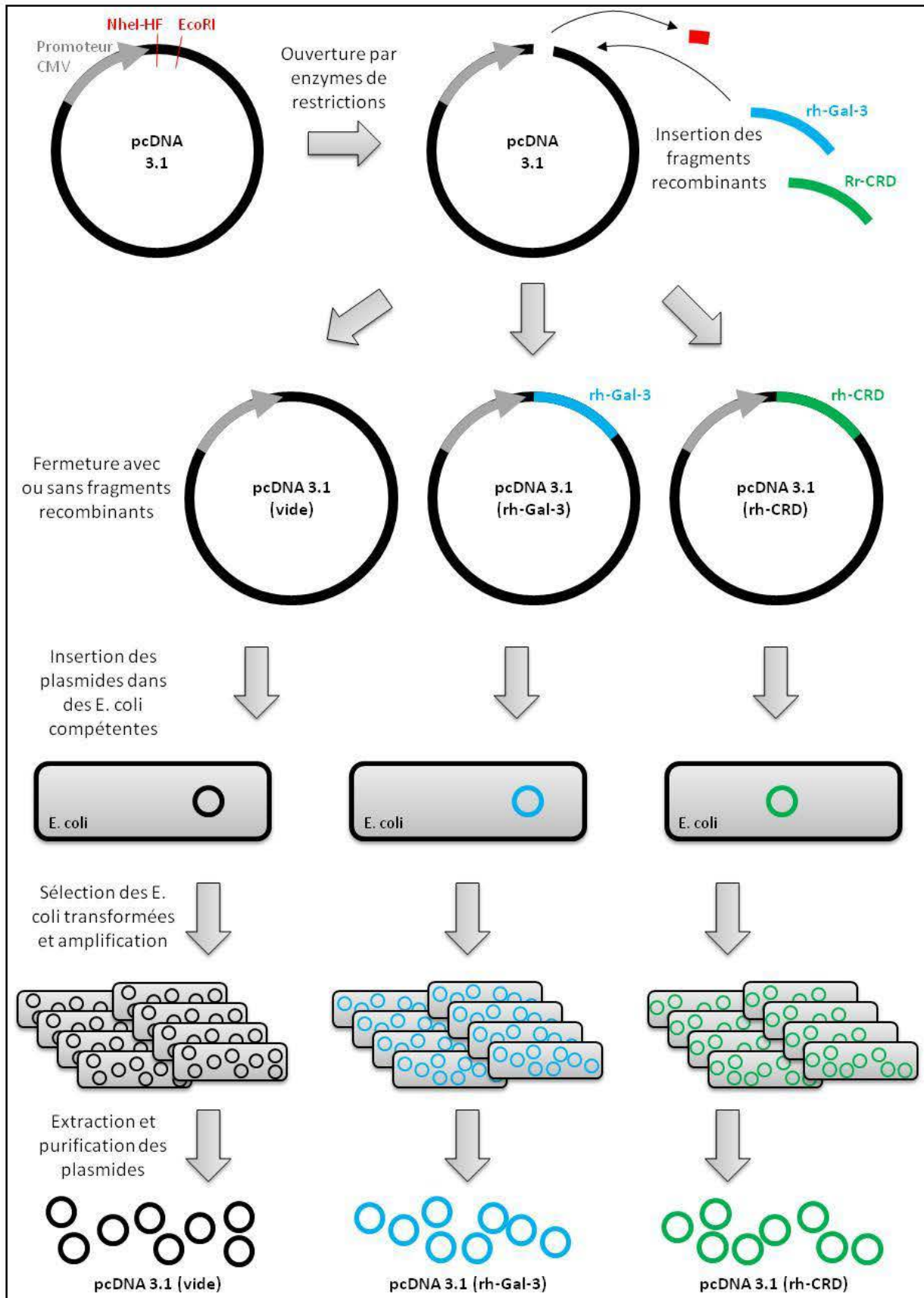


Figure 15 : Préparation des plasmides. Illustration représentant les principales étapes de la construction et de l'obtention des plasmides utilisés.

1.3.2. Transfection par le système X-tremGENE9

Les transfections des plasmides dans les CMLV sont réalisées avec le système X-tremGENE9 (Roche) selon un protocole adapté à partir des instructions du fabricant : les CMLV sont ensemencées dans des plaques 6 puits à 70 % de confluence, synchronisées par privation de sérum pendant 12 h, puis transfectées (ratio ADN / X-tremGENE9 égale à 1/3), après la transfection, les cellules sont laissées 48 heures avec 1 % de sérum avant d'être utilisées.

1.4. Technique de siRNA

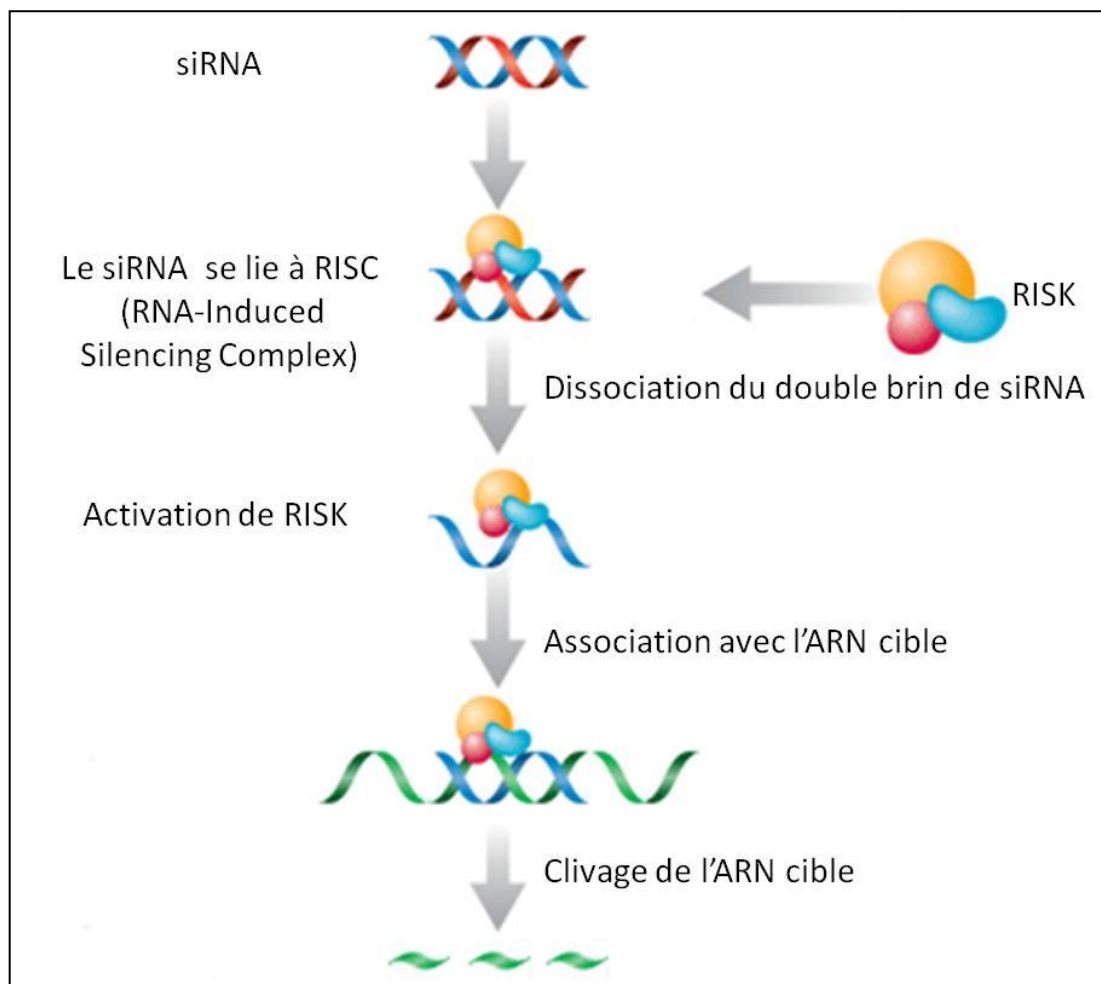


Figure 16 : Principe de fonction intracellulaire d'un siRNA. Schéma représentant la cascade de réaction et le complexe induisant l'extinction des ARN (RISC) recruté lors de l'inactivation des ARN par siRNA (adapté de Santa cruz).

Les ARN interférents (siARN) permettent d'inhiber complètement ou partiellement l'expression d'un gène spécifique et d'aboutir aux effets de « knock-down » des gènes cibles (**Figure 16**).

Dans nos études, les cellules sontensemencées à la concentration de 8×10^5 cellules par puits dans un milieu à 10% de SVF. Après 16 heures d'incubation, le milieu est changé. 1 μg de siARN (Gal-3 ou scramble) est mis dans 200 μl de milieu DMEM/F12 qui est ensuite mélangé avec 3 μl de MATra-si dans un autre tube. Le mélange est agité doucement au vortex et incubé pendant 20 minutes à température ambiante. Le mélange siARN –MATra-si est distribué sur les cellules et agité par des allers-retours. La plaque est mise sur un support "Magnet plate" et incubée 15 minutes à 37°C, pour faire pénétrer les siRNA dans les cellules (**Figure 17**). Ensuite le milieu est changé (10% de sérum) et les cellules sont laissées 24 heures à 37°C pour leur permettre de se remettre de la transfection, avant d'être stimulées à l'Aldo comme décrit précédemment.

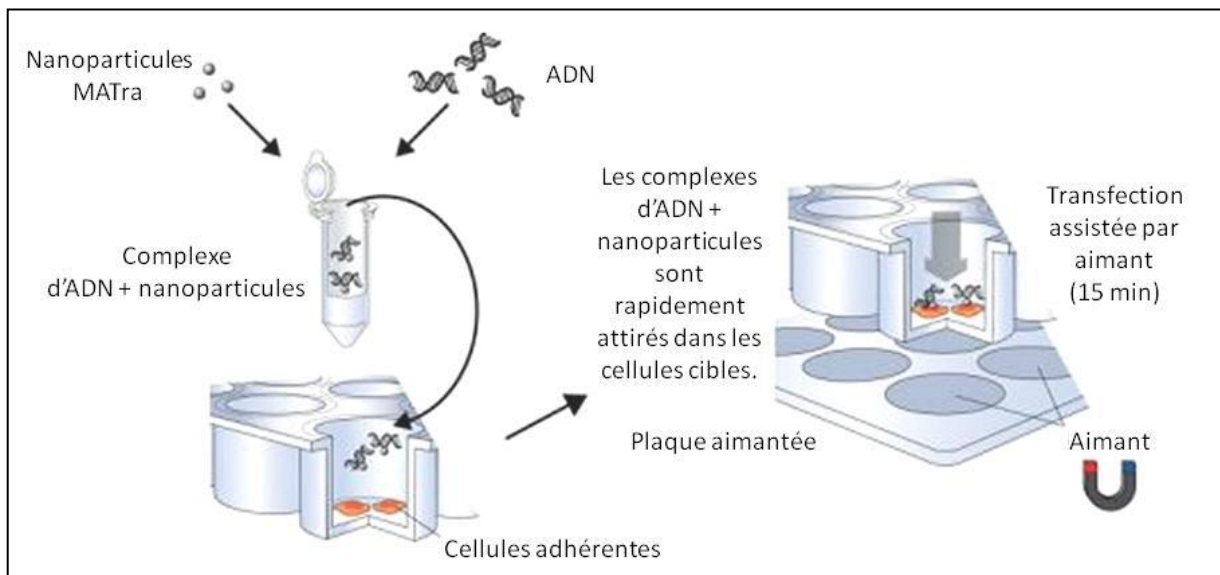


Figure 17 : Principe de transfection par le système MATra. Illustration du fonctionnement du système de pénétration des ADN (dans notre cas les plasmides) liés aux billes métalliques dans les cellules par attraction de ces complexes par la plaque aimantée disposée sous les puits (adapté d'IBA life science).

1.5. Détection des radicaux libres par dihydroéthidium

Le dihydroéthidium (DHE) est utilisé pour mesurer la production d'anion superoxyde (O_2^-). Les cellules sontensemencées et stimulées à l'Aldo comme décrit précédemment, puis 50 μ l de DHE (Invitrogen) à 5×10^{-6} M dans du DMSO est ajouté dans chaque puits et incubé à l'abri de la lumière pendant 30 minutes à température ambiante. Les puits sont rincés 2 fois au PBS puis 4 gouttes de PBS sont ajoutées par puits et le signal est révélé par un microscope à fluorescence (excitation à 706 nm). Les images sont capturées et l'intensité de la couleur rouge dans les noyaux représente la présence d' O_2^- .

2. Modèles animaux

2.1. Modèle expérimental de rat aldostérone + sel

L'expérimentation sur les animaux est réalisée en conformité avec les lois d'éthique animale en vigueur. Le modèle expérimental est constitué de 6 groupes de rats male Wistar (250 g; Harlan Iberica) traités 3 semaines, répartis comme suit (**Figure 18**) :

Contrôle (n=10) : Injection sous-cutanée d'un volume équivalent au groupe Aldo-sel d'huile de tournesol.

Aldo-sel (n=10) : Injection sous-cutanée d'Aldo (1 mg/kg/jour, dilué dans l'huile de tournesol) et une solution saline (NaCl 1%) à volonté comme eau de boisson.

Aldo-sel + Spiro (n=10) : Injection sous-cutanée d'Aldo (1 mg/kg/jour, dilué dans l'huile de tournesol) plus la spironolactone (200 mg/kg/jour, dilué dans l'huile de tournesol) et une solution saline (NaCl 1%) à volonté comme eau de boisson.

Aldo-sel + MCP (n=9) : Injection sous-cutanée d'Aldo (1 mg/kg/jour, dilué dans l'huile de tournesol), avec le MCP (100 mg/kg/jour) incorporé dans la nourriture et une solution saline (NaCl 1%) à volonté comme eau de boisson.

Spiro (n=7) : Injection sous-cutanée de spironolactone (200 mg/kg/jour, dilué dans l'huile de tournesol).

MCP (n=5) : MCP (100 mg/kg/jour) dans la nourriture.

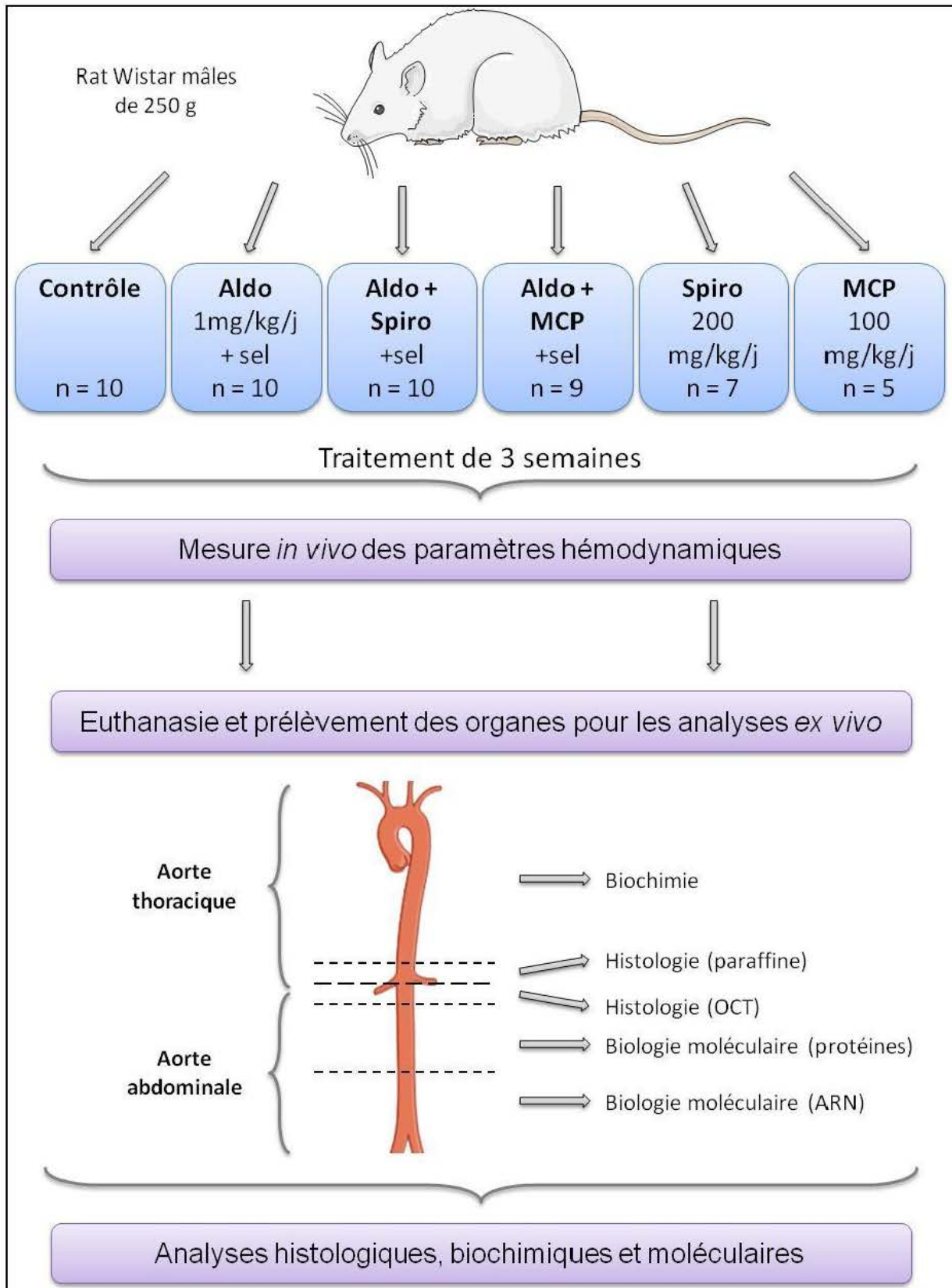


Figure 18 : Modèle rat Aldo + sel. Illustration présentant les conditions de traitement des rats dans le modèle Aldo + sel. Aldo, aldostérone ; Spiro, spironolactone ; MCP, pectine de citron modifiée.

Le modèle et la dose d'Aldo ont été choisis en fonction d'études précédentes dans lesquelles le traitement augmentait la pression artérielle systolique (PAS) et diastolique (PAD) ¹⁸⁴.

Mesures *in vivo* et prélèvement des tissus :

Après 2 semaines de traitement, les rats sont placés dans des cages à métabolisme pendant 24 h et les urines sont récupérées. A la fin du traitement, les rats sont anesthésiés avec de la ketamine (Imalgene 1000, Merial; 70 mg/kg, intra-peritoneal) plus du xylazine (Rompun 2%, Kup Pharma; 6 mg/kg, intra-peritoneal). Un cathéter (Sciense FT211B, 1.5mm diameter) est introduit dans le ventricule gauche par la carotide droite et connecté à un système d'acquisition (PowerLab/800, ADInstruments) pour mesurer et enregistrer les paramètres cardiaques et hémodynamiques, via le logiciel Chart for Windows (version 4.2). Au moment du sacrifice, le sang est collecté, les rats sont euthanasiés par exsanguination et par injection dans le coeur de chlorure de potassium. Enfin, les organes sont prélevés et lavés dans du PBS.

- Le cœur, débarrassé du péricarde et des oreillettes est pesé et ensuite découpé transversalement en 3 parties, pour les analyses moléculaires et histologiques (en paraffine et en OCT).
- L'aorte thoracique est prélevée délicatement, deux anneaux distaux sont coupés pour l'histologie en paraffine et OCT, et le reste de l'aorte est directement plongé dans l'azote liquide pour les analyses biochimiques.
- L'aorte abdominale, servant aux analyses moléculaires, est isolée, puis l'endothélium et l'adventice sont retirés (par frottements avec une pince). Elle est ensuite séparée en 2 parties, l'une servant à l'analyse protéique et l'autre à l'analyse des ARN.
- Les reins sont décapsulés, le gauche est coupé en deux selon le plan frontal pour les analyses histologiques en paraffine et OCT. Dans le rein droit, la médula et le cortex sont séparés et réservés pour les analyses moléculaires.

Les tissus pour les analyses moléculaires d'ARN et de protéines sont coupés en fragments puis plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Les tissus pour l'histologie en paraffine sont prélevés et placés dans un bain de formaline à 4 % pendant 24 h pour être fixés. Enfin, les tissus pour l'histologie en OCT sont prélevés et plongés dans un bain de saccharose (30 %) avant d'être inclus dans l'OCT et conservés à -80°C.

2.2. Modèle expérimental de traitement aigu à l'aldostérone de souris KO Gal-3

Des souris mâles adultes C57BJ6 sauvages et KO pour la Gal-3 sont utilisées dans un modèle de traitement aigu à l'Aldo sans sel (*Figure 19*). Les souris WT et les KO sont divisées en 2 groupes de 6 animaux chacun qui ont reçu une injection intra-péritonéale soit de véhicule (0,1 ml injecté, 150 mmol/litre de NaCl dans 5 % d'éthanol), soit d'Aldo (0,1 ml injecté, 1 mg/kg), comme il a été précédemment décrit ¹⁸⁵.

Mesures *in vivo* et prélèvement des tissus :

La pression à la queue est mesurée 12 h avant l'injection et 6 h après. Les animaux sont sacrifiés (6 h après l'injection) par décapitation sous anesthésie (3 % d'isoflurane/O₂). Les aortes sont ensuite prélevées, nettoyées de l'endothélium et de l'adventice (par frottements avec une pince), congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C pour ensuite analyser l'expression des ARNm.

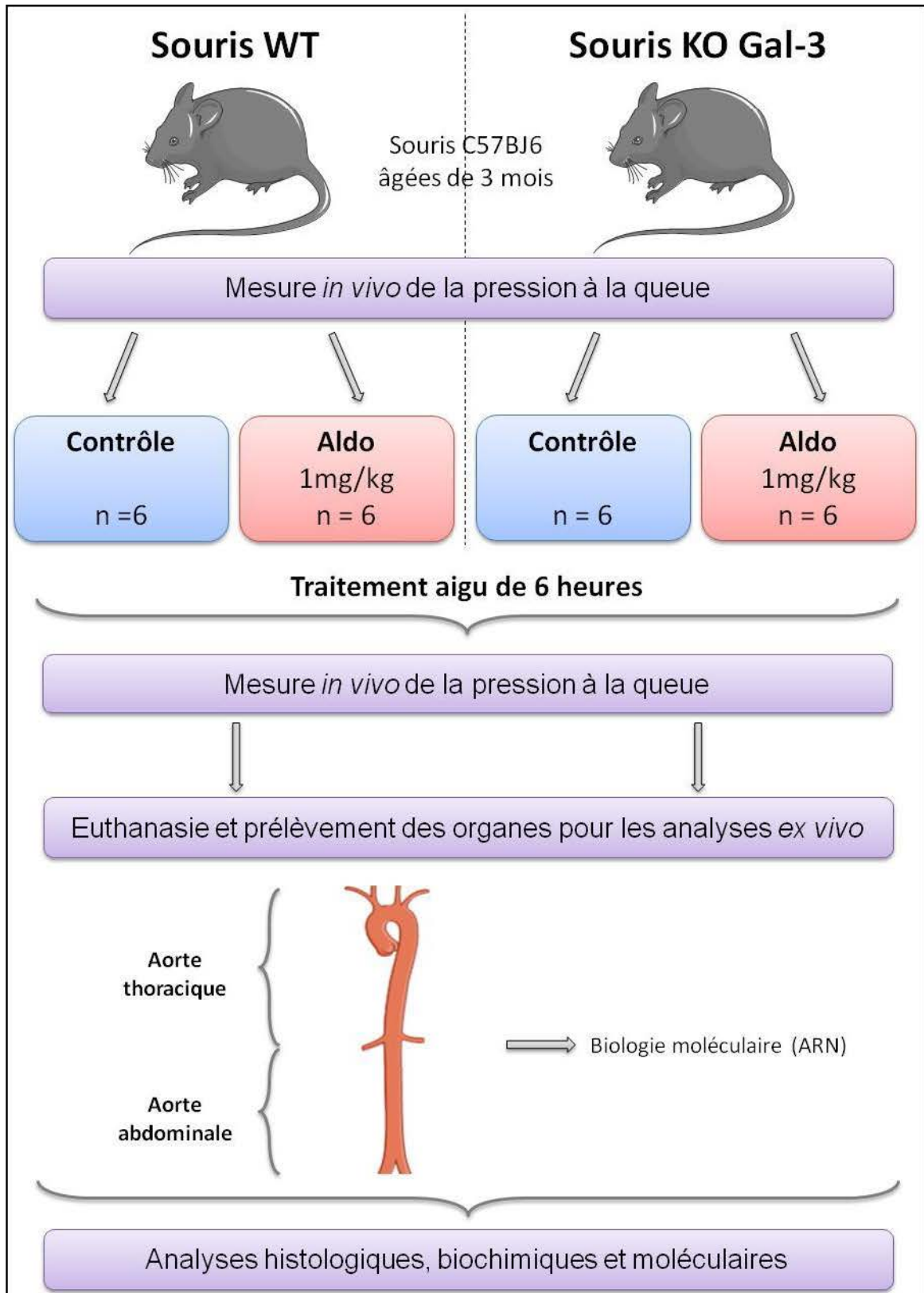


Figure 19 : Modèle aigu de souris WT vs KO Gal-3 traitées à l'Aldo. Illustration présentant les conditions de traitement des souris dans le modèle de traitement aigu à l'Aldo. WT, souche sauvage ; KO, souche mutée n'exprimant pas la protéine d'intérêt ; Aldo, aldostérone ; Gal-3, galectine-3 ; Spiro, spironolactone ; MCP, pectine de citron modifiée.

3. Analyses biochimiques et moléculaires

3.1. Analyse des protéines par Western blot

3.1.1. Extraction protéique

Pour les tissus, chaque échantillon est réduit en poudre dans un mortier avec de l'azote liquide puis décongelé dans 300 µl d'une solution commerciale de lyse (complete lysis-M EDTA-free, Roche) contenant des inhibiteurs de protéases (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Les échantillons sont agités (dans la solution de lyse), les broyats obtenus sont ensuite centrifugés (20 min à 12 000 rpm) et les surnageants contenant les protéines sont conservés à -20°C.

Pour les cellules, elles sont rincées avec du PBS. Après aspiration de tout le PBS, les étapes suivantes sont réalisées à 4°C. Un volume de 300 µl de tampon de lyse pour protéines (Passive Lysis, Promega) est ajouté par puits, les cellules sont grattées et transférées dans des tubes puis incubées 10 à 15 min à température ambiante. Pendant la lyse, les tubes sont agités par vortex au moins 3 fois. Les lysats cellulaires sont centrifugés 30 min à +4°C à 13000 g. Les surnageants contenant les protéines sont récupérés et conservés à -20°C.

3.1.2. Mesure de la concentration de protéines

La concentration en protéines est mesurée par la méthode Lowry (avec le kit Dc protein assay, Bio-Rad). Il s'agit d'une technique classique de dosage (mise au point en 1951 par Lowry), couramment utilisée dont le principe repose sur la réactivité de l'azote des acides aminés en milieu basique. La concentration des échantillons est donc révélée par la mesure de l'absorbance et exprimée en µg/µl.

3.1.3. Western blot

Le Western blot, établi par Laemmli en 1970 pour évaluer la quantité relative de certaines protéines, se compose de plusieurs étapes, réalisées avec du matériel BioRad :

- **Préparation du gel d'électrophorèse** : gel d'acrylamide 10%.
- **Chargement** : dépôt au fond des puits de 20 µg de protéines par échantillon préalablement mélangées avec du bleu de charge Laemmli et dénaturées (3min à 100°C et refroidi dans la glace).
- **Migration** : 60 mA pendant 1h30 environ.
- **Transfert** : un "sandwich" est placé dans les cassettes, composé du gel d'électrophorèse, de la membrane de nitrocellulose (Hybond-C Extra Amersham Biosciences) et placé entre deux papiers filtres, eux-mêmes placés entre deux mousses. Le tout migre à 400 mA pendant 1h15 à 4°C.
- **Rinçage** : dans un tampon de TBS-Tween (3 rinçages de 10 min chacun).
- **Blocage** : blocage des sites non spécifiques dans du lait en poudre (10%).
- **Anticorps primaire** : incubation des membranes avec l'anticorps primaire toute la nuit à 4°C (*Tableau 4*).
- **Rinçage** : dans un tampon de TBS-Tween (3 rinçages de 10 min chacun).
- **Anticorps secondaire** : incubation des membranes avec l'anticorps secondaire (couplé à une peroxydase) pendant 1h à température ambiante. Les anticorps secondaires utilisés comprennent un anticorps anti-épitopes de lapin (1/1000 Amersham biosciences) et un anti-épitopes de souris (1/1000 Amersham biosciences).
- **Rinçage** : dans un tampon de TBS-Tween (3 rinçages de 10 min chacun).
- **Révélation** : par chimiluminescence, plusieurs kits de révélation sont utilisés suivant la sensibilité de détection voulue (ECL+, GE Healthcare ; ECL Advance, GE Healthcare ; Immun-Star, Bio-Rad), la capture se fait grâce au système d'acquisition LAS-4000 (Fujifilm).
- **Analyse des images** : le traitement et la quantification se fait à l'aide du logiciel Multi Gauge V3.0 (Fujifilm). Les valeurs ainsi calculées sont normalisées avec les valeurs obtenues pour la protéine de référence β -actine afin de limiter l'erreur due aux variations de chargement des puits en protéines.

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés en Western blot.

Protéine	Fournisseur	Nature anticorps I	Dilution
Collagène I	Abcam	Lapin	1 / 500
Collagène III	Santa Cruz Biotechnology	Lapin	1 / 2000
Elastine	Abcam	Souris	1 / 100
Fibronectine	Millipore	Souris	1 / 750
Galectine-3	Thermo Scientific	Souris	1 / 500
β-actine	Sigma Aldrich	Souris	1 / 1000

3.2. Analyse de l'activité des MMP par Zymographie

Le principe de cette analyse consiste en une séparation par électrophorèse des protéines dans un gel de polyacrylamide-SDS imprégné de gélatine ou de caséine^{186,187}. Les MMP sont mises en évidence par leur capacité à dégrader leur substrat (ici la gélatine) et se traduisant, après coloration des gels au bleu de Coomassie, par des bandes blanches sur fond bleu. Le protocole utilisé pour mener cette analyse est le suivant, réalisé avec du matériel BioRad :

- **Préparation du gel d'électrophorèse** : gel d'acrylamide 10 % et 1 % de gélatine.
- **Chargement** : dépôt au fond des puits de 40 μ g de protéines par échantillon préalablement mélangées avec du bleu de charge Laemmli adapté à la zymographie (Zymographie Sample Buffer, Bio-Rad) et non dénaturées.
- **Migration** : 60 mA pendant 2 h 30 environ.
- **Rinçage** : dans un tampon PBS - Triton à 2,5 % (3 rinçages de 10 min chacun).
- **Incubation** : dans un tampon d'incubation (50 mM Tris-HCl (pH 7,5 ; 5 mM CaCl₂, and 1% Triton X-100), 48 h à 37°C.
- **Coloration** : 2 h dans du bleu de Coomassie (en solution aqueuse : 0.5 % de bleu de Coomassie, 10 % d'acide acétique et 25 % d'isopropanol).
- **Rinçage** : à l'eau courante.
- **Analyse des images** : la capture des images est réalisée par le système d'acquisition LAS-4000 (Fujifilm), le traitement et l'analyse densitométrique sont faits à l'aide du logiciel Multi Gauge V3.0. Si possible, les valeurs ainsi calculées sont normalisées par la densité des protéines inactives (proMMP) afin de limiter l'erreur due aux variations de chargement des puits en protéines.

3.3. Histologie

3.3.1. Fixation, inclusion, coupe

Les tissus fixés 24 heures dans la formaline à 4 % sont ensuite rincés 3 fois 45 minutes avec du PBS, conservés dans de l'éthanol 70 % et inclus dans la paraffine en collaboration avec le laboratoire de Madrid (Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Fisiologia). Les blocs de paraffine sont coupés en sections de 5 µm d'épaisseur en utilisant un microtome rotatif (Leica) et les coupes sont étalées sur une couche d'eau sur des lames de polysine (Menzel-Glaser) chauffées à 37°C. L'eau est ensuite retirée et les lames sont mises à sécher à 37°C.

3.3.2. Coloration

La coloration avec le Rouge Sirius est utilisée pour mettre en évidence le collagène et la coloration avec l'orcéine pour l'élastine. Les lames sont déparaffinées pendant une nuit à 37°C puis passées successivement dans des bains de xylène pendant 30 minutes, puis des bains de 5 minutes d'alcool 100 %, 90 %, 70 %, puis d'eau pour les hydrater. Pour le collagène, les coupes sont incubées pendant 30 minutes dans un bain micro-sirius (0,1% d'acide picrique) puis lavées à l'eau courante. Pour l'élastine, les coupes sont colorées en respectant les instructions fournies par le fournisseur du Kit Elastika van Gieson coffret de coloration (Merck). Enfin, les sections sont déshydratées avant d'être montées avec l'Eukitt (O. Kindler GmbH & Co), liquide de montage permettant la conservation des coupes.

3.3.3. Immunohistochimie

Les sections sont déparaffinées, hydratées, lavées dans le PBS et la peroxydase endogène est bloquée dans le H₂O₂ (0.3%) pendant 10 minutes. Pour certains anticorps, il est nécessaire de démasquer l'épitope par un traitement au sodium de citrate (1 minute au micro-onde + 10 minutes à température ambiante). Ensuite les lames sont bloquées avec du sérum de cheval (2,5%) pendant 1 heure à température ambiante et incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (**Tableau 5**). Les coupes sont lavées dans du PBS puis incubées avec une peroxydase conjuguée à un anticorps secondaire suivie d'une peroxydase-antiperoxydase

(PAP) (système commercial Immpress Vector) et révélées avec le 3,3-diaminobenzidine (DAB, Dako) qui produit une couleur marron. Enfin, les sections sont déshydratées avant d'être montées avec l'Eukitt, liquide de montage permettant la conservation des coupes.

Tableau 5 : Liste des anticorps primaires utilisés en immunohistochimie

Protéine	Fournisseur	Nature anticorps I	Dilution
Galectine-3	Thermo Scientific	Souris	1 / 50
Collagène I	Abcam	Lapin	1 / 50
Collagène III	Santa Cruz Biotechnology	Lapin	1 / 50

3.3.4. Immunocytochimie

Les cellules sont rincées au PBS 3 fois puis sont fixées pendant 30 minutes dans de la formaline 4%. Après un rinçage au PBS, la peroxydase endogène est bloquée dans le H₂O₂ (0.3%) pendant 10 minutes et les cellules sont perméabilisées au triton 0,1% pendant 5 minutes. Ensuite les lames sont bloquées, traitées avec les anticorps (**Tableau 5**) révélées et montées comme précédemment décrit pour l'immunohistochimie.

3.3.5. Quantification des colorations et des marquages

Les mesures et la quantification du marquage sont faites par le logiciel Quancoul, après acquisition des images par microscopie à partir des lames colorées. Les résultats sont exprimés en pourcentage du marquage sur la surface totale du champ de la lame. Les observations sont faites à l'aveugle par deux observateurs différents pour vérifier que les résultats étaient concordants et indépendants de l'opérateur.

3.4. Analyse biochimique des aortes

L'élastine insoluble, le collagène total et le contenu cellulaire en protéines sont mesurés sur l'aorte thoracique, comme décrit précédemment¹⁸⁸. Les segments aortiques sont ouverts longitudinalement, l'adventice est enlevée et la longueur de la media est mesurée sous loupe binoculaire. La média est ensuite dégraissée, séchée et pesée. Le contenu protéique des cellules de la média est ensuite extrait par une solution de dodécyle sulfate de sodium (SDS)

et dosé. L'élastine insoluble est purifiée par chauffage dans une solution ammoniacale et pesée. Les protéines récoltées dans la solution ammoniacale sont ensuite hydrolysées et le collagène total est quantifié par dosage colorimétrique de l'hydroxyproline.

3.5. Technique d'analyse de l'expression des gènes

3.5.1. Extraction des ARN

Pour les tissus, l'échantillon (de maximum 30 mg) est réduit en poudre dans un mortier avec de l'azote liquide puis mélangé dans 1 ml de Trizol. Pour les cellules, 1 ml de Trizol est directement ajouté dans les puits après 3 rinçages au PBS. Ensuite, dans les deux cas, le lysat est incubé avec 200 μ L de chloroforme puis centrifugé à 12 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Cette étape permet de séparer les trois phases : la phase supérieure aqueuse contenant l'ARN, l'interphase et la phase inférieure de couleur rose qui contient les protéines et l'ADN. La phase aqueuse est prélevée et y sont ajouté 500 μ L d'isopropanol avant une centrifugation à 12 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est récupéré et agité par vortex dans 1 mL d'éthanol 75%. Enfin une dernière centrifugation à 9 800 rpm pendant 5 minutes à 4°C permet de récupérer le culot d'ARN qui est remis en suspension dans de l'eau ultra pure (RNase free).

Ensuite les ARN sont purifiés en utilisant le kit RNeasy mini kit (Qiagen) et en suivant les recommandations du fournisseur. Le dosage des ARN est réalisé par spectrophotométrie (Thermo Scientifique nano drop 1000).

3.5.2. Transcription inverse (RT)

L'ADNc est obtenu à partir de 1 μ g d'ARN par transcription inverse (RT) en utilisant des amorces de polydT se fixant sur la séquence poly-adénylée des ARNm. La RT est réalisée dans un mélange comprenant 1 μ g d'ARN, 10 μ M d'oligo (dT), 25 mM de dNTP, 20 U d'inhibiteur de RNases, 200 U de M-MuLV Reverse Transcriptase et le tampon de réaction 5X à 42°C pendant 90 minutes. La réaction est arrêtée en mettant les tubes à 72°C pendant 10 minutes. Les ADNc sont ensuite conservés à -20°C puis dilués pour être utilisés pour la réaction de PCR. Tous les produits proviennent de Fermentas.

3.5.3. Réaction de PCR quantitative en temps réel

La phase d'amplification est réalisée avec un système de SYBR green I (Bio-rad). Après une étape de dénaturation réalisée à 95°C pendant 3 minutes, l'amplification jusqu'à saturation de l'ADNc se fait selon 50 cycles dans l'Icycler MyiQ single color Realtime PCR detection system (BioRad). Le schéma d'un cycle est le suivant : 10 secondes de dénaturation à 95°C ; 45 secondes d'hybridation des amorces à 60 ou 62°C (dépend du couple d'oligonucléotides) ; 60 secondes d'élongation à 72°C. Les résultats sont analysés par le logiciel MyiQ (Bio-rad). L'expression est normalisée avec le contrôle endogène de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ou de la hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT).

4. Traitement statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM) pour chaque étude. Chaque expérience est réalisée au moins trois fois. Les tests statistiques utilisés sont le test T de Student (paramétrique), le test Mann Whitney (non paramétrique) ou un test-trend ANOVA suivi de Tukey B ou Scheffé. Toutes les valeurs de probabilités (p) inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives. Une analyse de la sensibilité ajustée à la PAM dans le modèle de rat a aussi été réalisée en utilisant une ANOVA à 2 facteurs.

IV. RESULTATS

1. Culture cellulaire de CMLV

1.1. Expression basale de la Gal-3

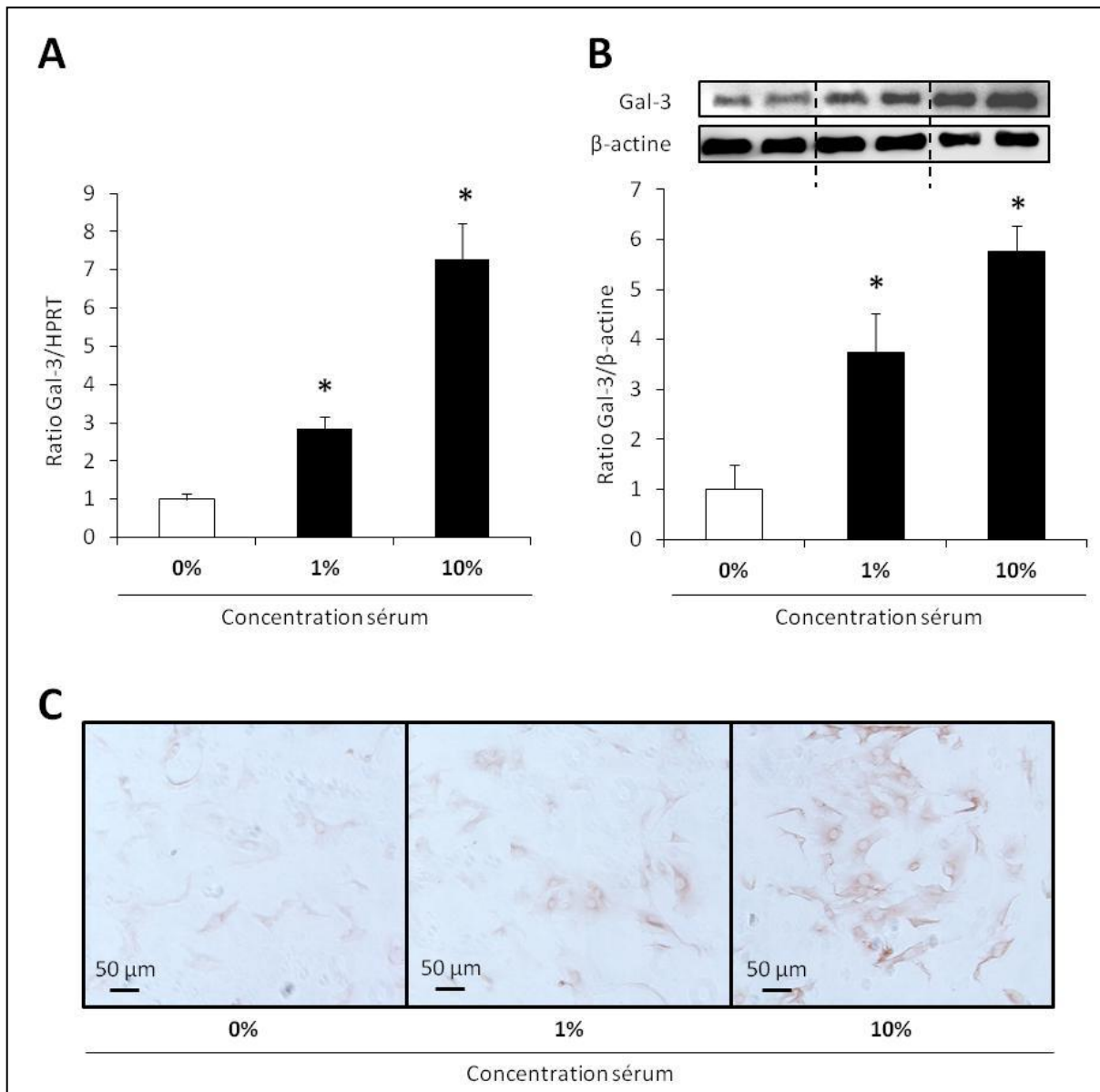


Figure 20 : Les cultures primaires de CMLV de rat expriment spontanément la Gal-3. Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par la β -actine ou par l'HPRT pour les protéines ou les ARN respectivement. *, $p < 0.05$ vs. contrôle.

Les CMLV en cultures primaires expriment spontanément la Gal-3 intracellulaire à l'état quiescent, à 0% de sérum (**Figure 20**), au niveau ARN évalué par RT-PCR (A), et au niveau protéique évalué par Western blot (B) et par immunocytochimie (C). La Gal-3

localisée est principalement périnucléaire. Le sérum entraîne une augmentation de l'expression de la Gal-3 de manière dose-dépendante (**Figure 21**).

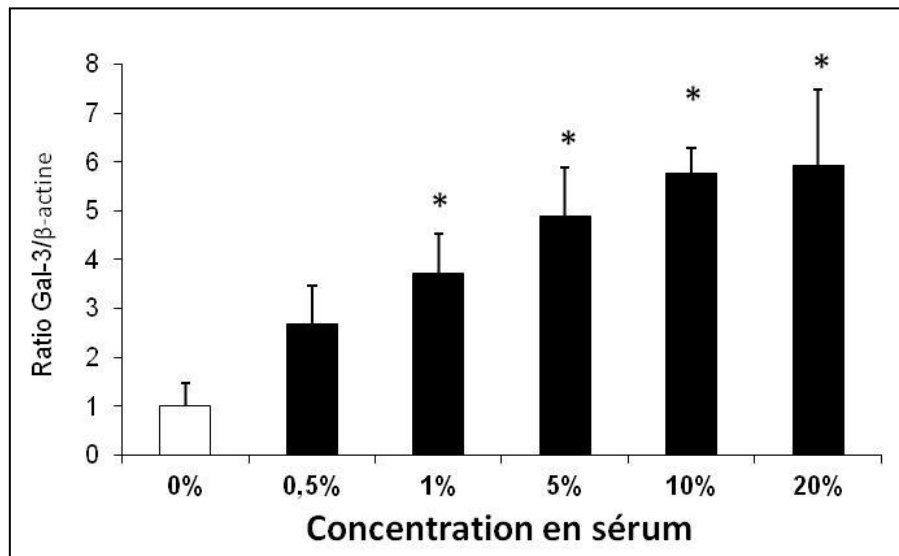


Figure 21 : Expression de la Gal-3 dans les CMLV en réponse au sérum. Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par la β -actine. *, $p < 0.05$ vs. contrôle.

Au cours du temps, représenté par le nombre de passage des CMLV en multiplication dans un milieu à 10% de sérum, l'expression de la Gal-3, évaluée par Western blot, diminue de 4 fois puis se stabilise rapidement après 3 passages (**Figure 22**).

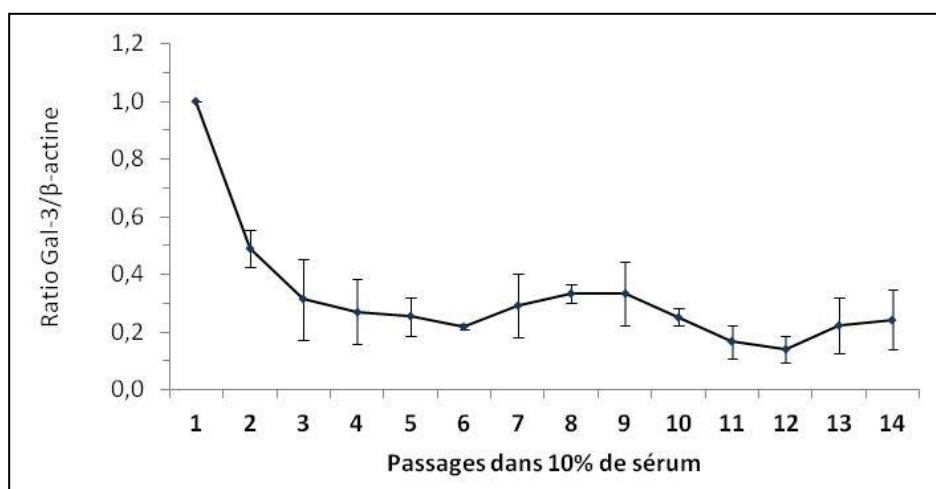


Figure 22 : Expression de la Gal-3 au cours du temps. Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par la β -actine.

1.2. Effets de la Gal-3 sur la matrice extracellulaire

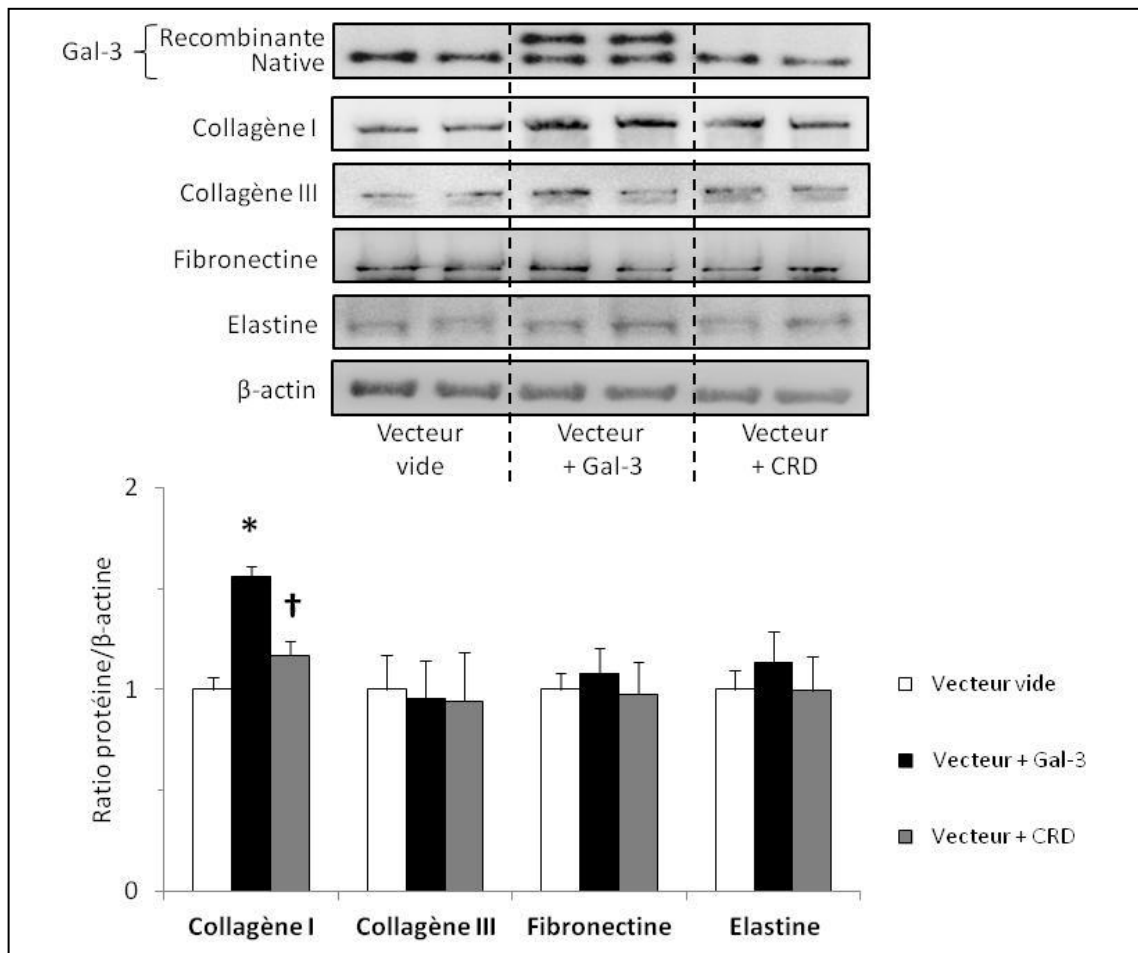


Figure 23 : La surexpression de la Gal-3 entraîne une augmentation de l'expression de collagène de type I dans les CMLV. Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par la β -actine. *, $p < 0.05$ vs. vecteur vide; †, $p < 0.05$ vs. vecteur + Gal-3.

Les CMLV ont été traitées avec un vecteur contrôle vide ou un vecteur contenant soit la rhGal-3 soit le rhCRD (**Figure 23**). L'efficacité des transfections dans les CMLV a été vérifiée par Western blot pour la rhGal-3 (poids moléculaire rhGal-3 = 35 kDa) qui montre une bande plus haute que la forme native (poids moléculaire Gal-3 = 30 kDa). La différence de poids entre les deux formes s'explique par la queue polyhistidine qui a été ajoutée sur la forme recombinante. L'efficacité a également été vérifiée par RT-PCR pour rhGal-3 mais surtout pour rhCRD qui n'est pas reconnu par l'anticorps anti-Gal-3 (résultats non montrés). Comme le montrent les images de Western blot pour la Gal-3, les cellules sur-exprimant la

rhGal-3 et le rhCRD expriment également la Gal-3 native, à des niveaux comparables à ceux des cellules contrôles.

Les cellules sur-exprimant la rhGal-3 ont une augmentation (1,6 fois, $p < 0,05$) de l'expression du collagène de type I, sans changement pour le collagène de type III, la fibronectine ou l'élastine par comparaison aux contrôles. Les CMLV sur-exprimant le rhCRD ne montrent pas de variations significatives des protéines testées.

1.3. Régulation de la Gal-3 par l'Aldo

Le traitement par l'Aldo augmente le niveau de Gal-3 protéique de manière dose-dépendante dans les cultures primaires de CMLV (**Figure 24, A**). Cette augmentation, comparée au contrôle, est significative pour les deux concentrations d'Aldo 10^{-9} M (2,3 fois, $p < 0,05$) et 10^{-8} M (3,6 fois, $p < 0,05$). Le suivi de l'expression de la Gal-3 au cours du temps (**Figure 24, B**) montre que l'induction de l'expression de cette lectine par l'Aldo commence à 12 h (1,6 fois) et atteint un maximum à 24 h (2,3 fois, $p < 0,05$).

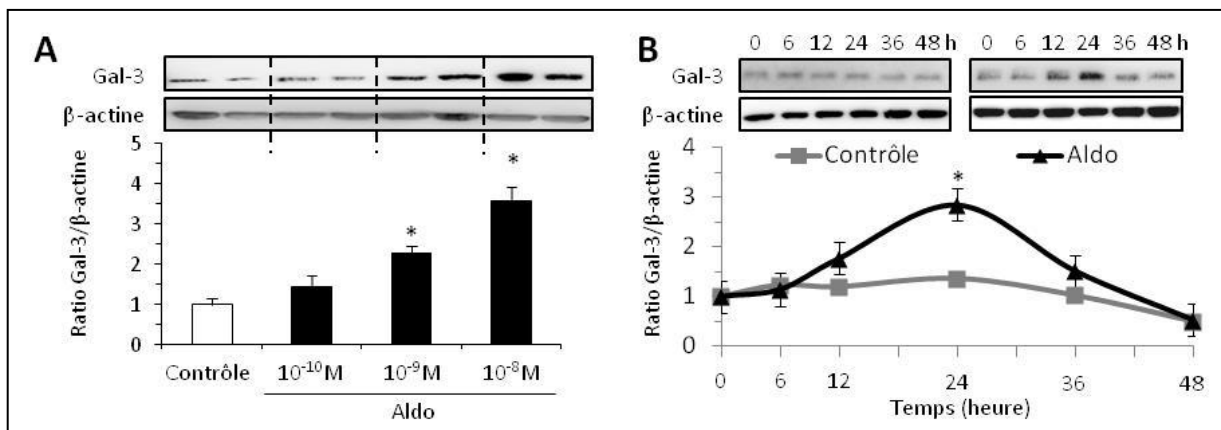


Figure 24 : L'Aldo stimule l'expression de la Gal-3 dans les CMLV. Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par la β -actine. *, $p < 0,05$ vs. contrôle; †, $p < 0,05$ vs. Aldo.

Pour rechercher si la stimulation de la Gal-3 par l'Aldo requiert l'implication du MR, deux antagonistes de ce récepteur ont été utilisés, l'éplérénone et le RU28318 (**Figure 25**). Les deux antagonistes testés bloquent ($p < 0,05$) les effets de l'Aldo sur la Gal-3 au niveau ARN (A) et protéique (B).

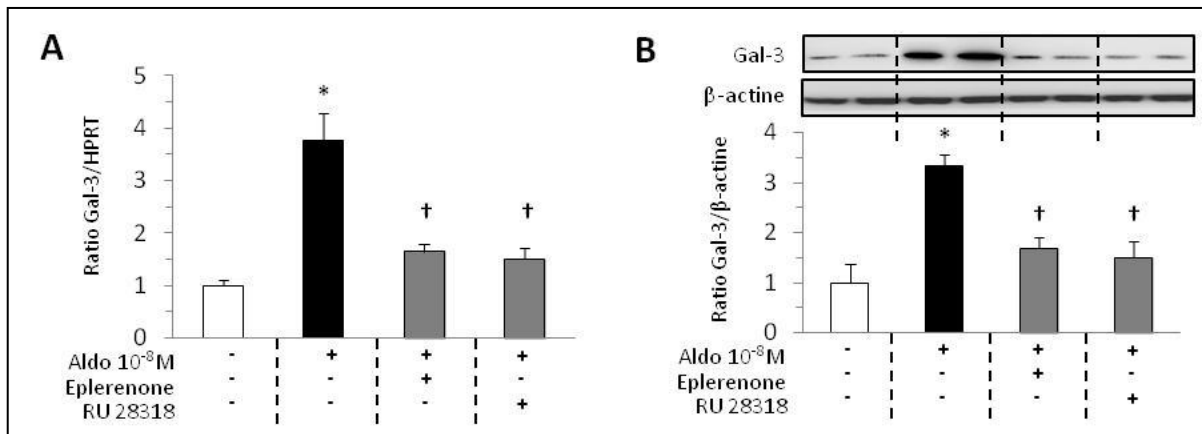


Figure 25 : La stimulation de la Gal-3 par l'Aldo dans les CMLV est dépendante du MR. Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par la β -actine ou par l'HPRT pour les protéines ou les ARN respectivement. *, $p < 0.05$ vs. contrôle; †, $p < 0.05$ vs. Aldo.

Pour évaluer si la stimulation de la Gal-3 par l'Aldo induit la synthèse de composés intermédiaires, les effets d'inhibiteurs de la transcription (actinomycine D) et de la traduction (cycloheximide) ont été analysés (**Figure 26**). Au niveau ARN (A), l'inhibiteur de la transcription et de la traduction bloquent la synthèse d'ARN codant pour la Gal-3 ($p < 0,05$). Au niveau protéique (B), les deux inhibiteurs bloquent l'augmentation de Gal-3 ($p < 0,05$).

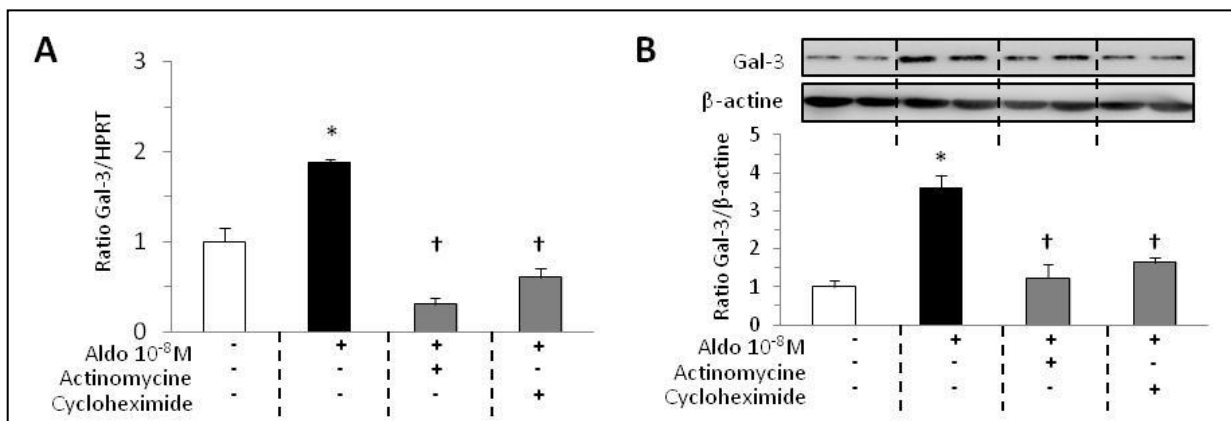


Figure 26 : La stimulation de la Gal-3 par l'Aldo dans les CMLV fait intervenir la synthèse de composé(s) intermédiaire(s). Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par la β -actine ou par l'HPRT pour les protéines ou les ARN respectivement. *, $p < 0.05$ vs. contrôle; †, $p < 0.05$ vs. Aldo.

1.4. Rôle de la Gal-3 comme médiateur des effets de l'Aldo sur le remodelage matriciel

1.4.1. Effets de l'Aldo

Nous avons validé dans notre modèle les effets de l'Aldo sur la production de MEC par les CMLV (**Figure 27**). L'Aldo entraîne une augmentation de l'expression de collagène de type I (1,52 fois, $p < 0,05$), de fibronectine (1,68 fois, $p < 0,05$) et d'élastine (1,54 fois, $p < 0,05$). De plus, la stimulation par l'Aldo du collagène de type I, mais pas de l'élastine, est bloquée ($p < 0,05$) par les antagonistes du MR, éplérénone et RU28318.

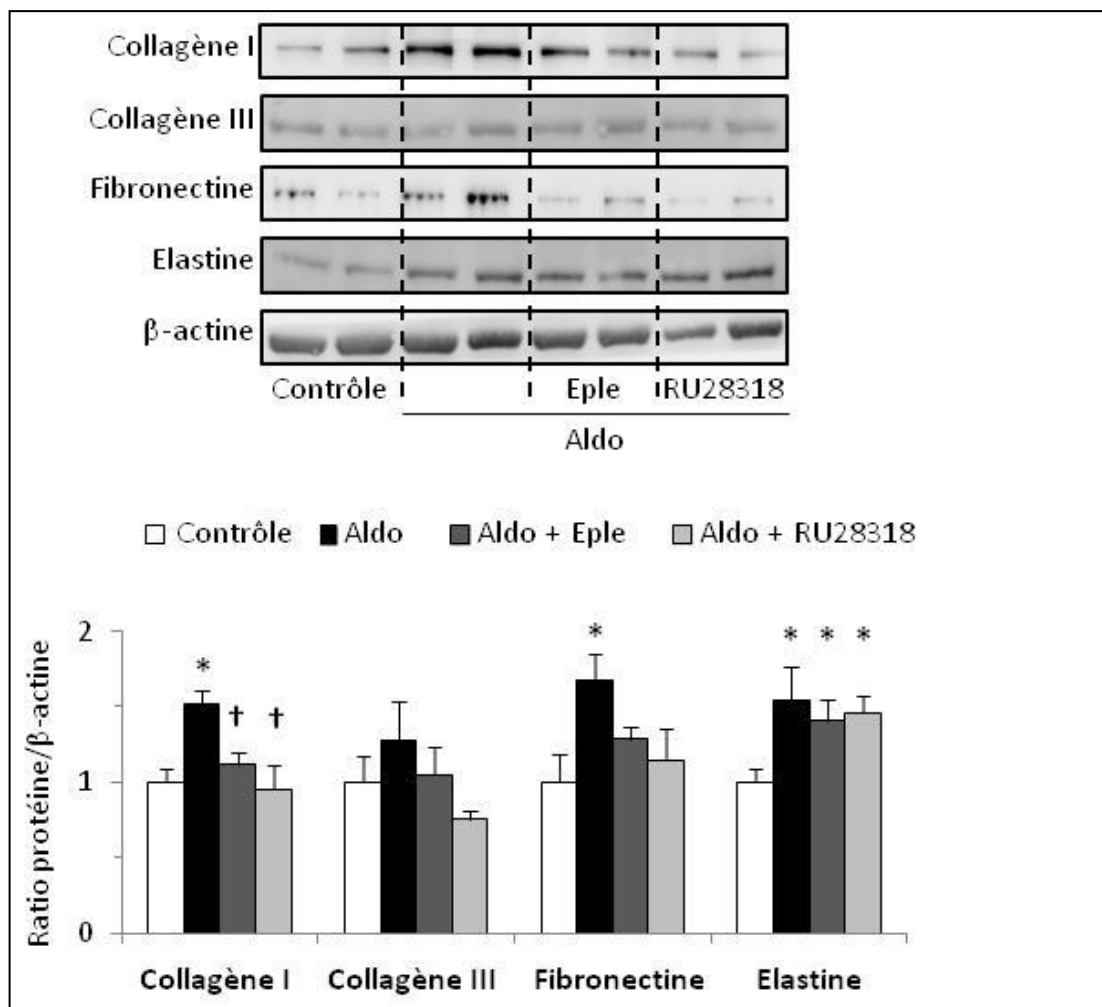


Figure 27 : La synthèse du collagène de type I mais pas celle de l'élastine dépend du MR. Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par la β -actine. *, $p < 0.05$ vs. contrôle; †, $p < 0.05$ vs. Aldo.

1.4.2. Rôle médiateur de la Gal-3

Pour étudier le rôle de la Gal-3 dans les altérations de la MEC induites par l'Aldo, l'expression de la Gal-3 a été éteinte par siRNA (**Figure 28**). Cette technique réduit efficacement l'expression de sa cible, la Gal-3 (0.5 fois vs. scramble, $p < 0,05$). Par ailleurs, cette diminution n'affecte pas l'expression basale des protéines de la MEC étudiées qui restent au même niveau que les cellules traitées avec un scramble.

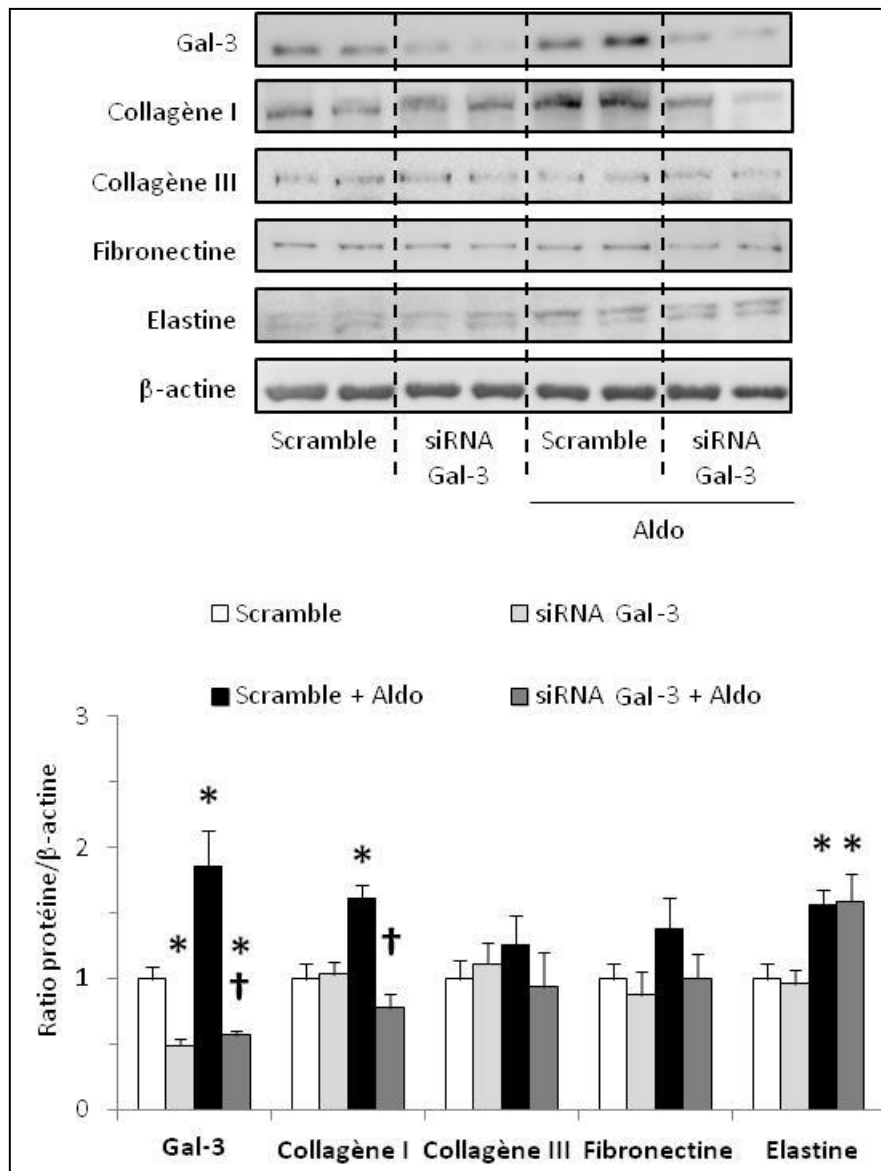


Figure 28 : La sous-expression de la Gal-3 bloque les effets de l'Aldo. Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par la β -actine. *, $p < 0,05$ vs. scramble; †, $p < 0,05$ vs. scramble + Aldo.

Les cultures primaires de CMLV traitées avec scramble + Aldo montrent une augmentation significative du collagène de type I (1,6 fois vs. scramble, $p < 0,05$) et de l'élastine (1,6 fois vs. scramble, $p < 0,05$). Les cellules éteintes pour la Gal-3 et traitées avec l'Aldo n'ont pas cette augmentation pour le collagène de type I ($p < 0,05$) alors que l'élastine continue d'être stimulée par l'Aldo. Les différents traitements n'ont pas d'effets statistiquement significatifs sur le collagène de type III ou la fibronectine.

Dans le but de confirmer si la Gal-3 est nécessaire pour l'induction de la synthèse de collagène par l'Aldo, deux inhibiteurs de la Gal-3 ont été testés sur des cultures primaires de CMLV (**Figure 29**). En accord avec les résultats précédents, en absence d'inhibiteurs de la Gal-3, l'Aldo entraîne une augmentation des niveaux de Gal-3, de collagène de type I et d'élastine, comparé aux contrôles. Le MCP et le LacNac bloquent l'augmentation, induite par l'Aldo, de la Gal-3 et du collagène de type I ($p < 0,05$) mais restent sans effets face à l'augmentation de l'élastine induite par l'Aldo.

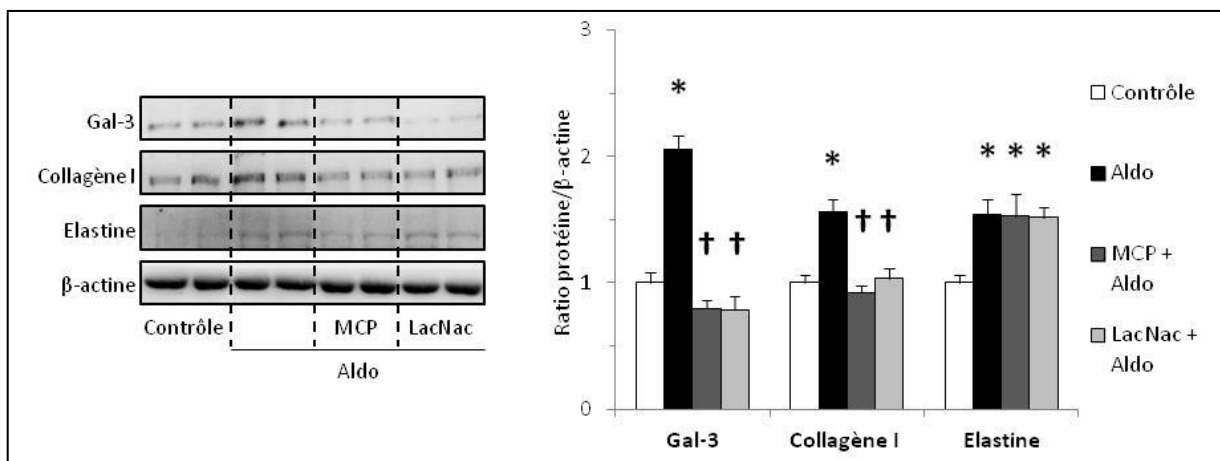


Figure 29 : Les inhibiteurs de la Gal-3 bloquent les effets de l'Aldo. Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par la β -actine. *, $p < 0.05$ vs. contrôle; †, $p < 0.05$ vs. Aldo.

2. Modèle chronique de rats traités à l'Aldo-sel

2.1. Régulation de la Gal-3 par l'Aldo

Le traitement à l'Aldo + sel induit une augmentation de l'indice cardiaque ($p < 0,05$) qui est corrigé par le co-traitement à la spironolactone ou au MCP ($p < 0,05$) (**Tableau 6**). Les traitements à la spironolactone ou au MCP seul n'affectent pas ces paramètres.

Tableau 6 : Paramètres généraux des rats dans le modèle Aldo-sel.

	Contrôle	Aldo	Aldo+Spiro	Aldo+MCP	Spiro	MCP
n	10	10	10	9	7	5
Poids animal	340 ± 8,2	323 ± 6,4	313 ± 3,5	316 ± 4,6	304 ± 8,7	351 ± 7,5
Poids cœur	0,85 ± 0,04	0,93 ± 0,04	0,79 ± 0,03†	0,81 ± 0,02†	0,69 ± 0,03†	0,77 ± 0,03†
Indice cardiaque	0,25 ± 0,01	0,29 ± 0,01*	0,25 ± 0,01†	0,26 ± 0,01†	0,23 ± 0,01†	0,22 ± 0,01†

Les poids sont exprimés en g et l'indice est le résultat du ratio poids de l'organe / poids de l'animal. Les valeurs sont exprimées ± ESM, *, $p < 0,05$ vs. groupe contrôle; †, $p < 0,05$ vs. groupe Aldo-sel.

2.2. Régulation de la Gal-3 par l'Aldo

Les niveaux d'expression de la Gal-3 ont été mesurés dans l'aorte de rats traités 3 semaines à l'Aldo en combinaison ou non avec des inhibiteurs de l'Aldo (spironolactone) et de la Gal-3 (MCP) (**Figure 30**). Le traitement à l'Aldo augmente le niveau de Gal-3 en ARN (2,6 fois, $p < 0,05$; A) et en protéine (4,4 fois vs contrôle, $p < 0,05$; B). La spironolactone bloque les effets de l'Aldo sur la Gal-3 au niveau ARN ($p < 0,05$; A) comme au niveau protéique ($p < 0,05$; B). De plus, l'inhibiteur de la Gal-3, le MCP, inhibe lui aussi l'augmentation de la Gal-3.

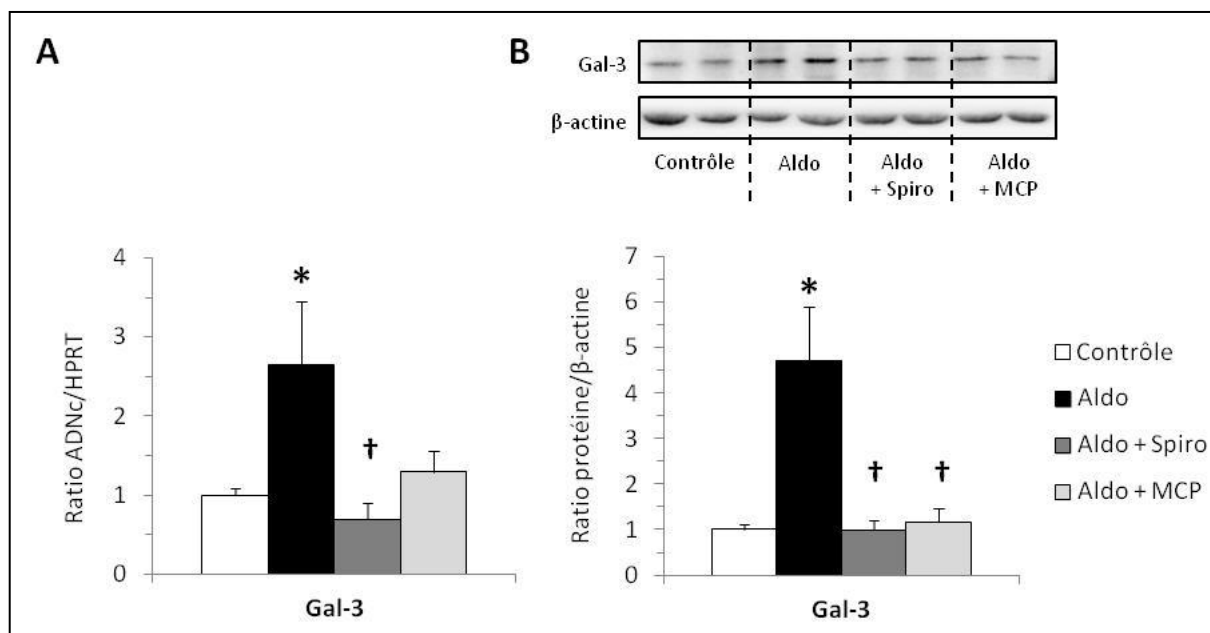


Figure 30 : L'Aldo stimule l'expression de la Gal-3 dans l'aorte de rat. Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par la β -actine ou par l'HPRT pour les protéines ou les ARN respectivement. *, $p < 0.05$ vs. contrôle; †, $p < 0.05$ vs. Aldo.

2.3. Rôles de la Gal-3 comme médiateur des effets de l'Aldo sur le remodelage matriciel

Le traitement à l'Aldo + sel induit une augmentation ($p < 0,05$) des pressions artérielles systolique (PAS), diastolique (PAD) et moyenne (PAM), de la pression pulsée (PP) et une diminution de la fréquence cardiaque (FC) (**Tableau 7**). Tous ces paramètres sont corrigés ($p < 0,05$) par le co-traitement avec la spironolactone ou le MCP à l'exception de la FC qui n'est pas normalisée par la spironolactone. Les traitements à la spironolactone ou au MCP seul n'affectent pas les paramètres mesurés.

Tableau 7 : Paramètres cardiaques et hémodynamiques des rats dans le modèle Aldo+sel.

	Contrôle	Aldo	Aldo+Spiro	Aldo+MCP	Spiro	MCP
n	10	10	10	9	7	5
PAS	123 ± 0,6	149 ± 1,3*	128 ± 0,7†	118 ± 2,5†	124 ± 1,9†	124 ± 2,8†
PAD	88 ± 0,6	101 ± 0,9*	90 ± 1,1†	77 ± 2,3†	89 ± 1,3†	84 ± 0,7†
PAM	101 ± 0,6	118 ± 1,1*	103 ± 0,9†	90 ± 2,3†	100 ± 1,4†	97 ± 1,0†
PP	35 ± 0,4	48 ± 1,0*	37 ± 0,9†	41 ± 1,2†	35 ± 1,0†	40 ± 3,0
FC	322 ± 4,5	258 ± 3,5*	290 ± 4,8	351 ± 6,3†	330 ± 13,5†	324 ± 11†

*PAS, pression artérielle systolique; PAD, pression artérielle diastolique; PAM, pression artérielle moyenne; PP, pression pulsée; FC, fréquence cardiaque (battements/min). Les pressions sont exprimées en mmHg. Les valeurs sont exprimées ± ESM, *, p<0.05 vs. groupe contrôle; †, p<0.05 vs. groupe Aldo-sel.*

La composition de la média de l'aorte thoracique a été déterminée par analyses biochimiques (**Tableau 8**). Le poids sec par centimètre et le contenu en protéines cellulaires sont augmentés significativement (p<0,05) par le traitement à l'Aldo + sel, révélant une hypertrophie de la média. Ces augmentations ne se retrouvent pas dans les groupes co-traités avec les inhibiteurs spironolactone et MCP. Cette augmentation du poids sec reflète non seulement une augmentation du contenu des CMLV mais également une augmentation de certains composants de la MEC. Une augmentation significative (p<0,05) du contenu en collagène et en élastine est observée dans le groupe Aldo + sel et est corrigée par le co-traitement avec les inhibiteurs spironolactone et MCP. Il est également observé dans le groupe traité à l'Aldo + sel une augmentation du ratio collagène / élastine, qui est normalisé par les co-traitements avec la spironolactone ou le MCP. Les traitements à la spironolactone ou au MCP seul n'affectent pas ces paramètres.

Tableau 8 : Composition de la média aortique des rats dans le modèle Aldo+sel.

	Contrôle	Aldo	Aldo+Spiro	Aldo+MCP	Spiro	MCP
n	5	5	5	9	3	5
Poids sec	2,02 ± 0,08	2,39 ± 0,10*	1,93 ± 0,09†	2,07 ± 0,07†	2,06 ± 0,03†	1,97 ± 0,06†
Protéines cellulaires	0,66 ± 0,03	1,67 ± 0,08*	0,78 ± 0,07†	0,76 ± 0,11†	0,87 ± 0,01†	0,70 ± 0,07†
Elastine	1,00 ± 0,06	1,23 ± 0,03*	1,02 ± 0,04†	1,09 ± 0,03†	1,01 ± 0,01†	1,03 ± 0,05†
Collagène	4,46 ± 0,49	9,44 ± 0,33*	6,66 ± 0,12*†	4,55 ± 0,37†	4,15 ± 0,13†	5,07 ± 0,32†
Collagène /Elastine	0,24 ± 0,01	0,44 ± 0,01*	0,31 ± 0,02†	0,27 ± 0,02†	0,26 ± 0,01†	0,29 ± 0,02†

Le poids sec et le contenu en protéines sont exprimés en mg/cm. Les valeurs sont exprimées ± ESM, *, $p < 0.05$ vs. groupe contrôle; †, $p < 0.05$ vs. groupe Aldo-sel.

Cette hypertrophie observée par biochimie est confirmée par l'analyse de la morphométrie des aortes (**Tableau 9**). Les coupes transversales des aortes des rats traités à l'Aldo + sel ont une augmentation de l'épaisseur ainsi qu'une augmentation de l'aire de la média (MCSA). Ces observations sont normalisées par les co-traitements avec les inhibiteurs spironolactone et MCP, qui n'ont par ailleurs pas d'effet seul sur ces paramètres.

Tableau 9 : Morphométrie de la média aortique des rats dans le modèle Aldo+sel.

	Control	Aldo	Aldo+Spiro	Aldo+MCP	Spiro	MCP
n	5	5	5	9	3	5
Epaisseur	81.1 ± 3.7	97.9 ± 1.6 *	83.6 ± 1.6 †	79.6 ± 3.3 †	81.7 ± 3.2 †	81.7 ± 4.9 †
MCSA	344 ± 33	426 ± 15 *	332 ± 20 †	345 ± 36 †	322 ± 56 †	376 ± 12 †

MCSA, aire de la section de la média aortique. L'épaisseur et l'aire de la média aortique sont exprimées respectivement en μm et en $10^3 \mu\text{m}^2$. Les valeurs sont exprimées ± ESM, *, $p < 0.05$ vs. groupe contrôle; †, $p < 0.05$ vs. groupe Aldo-sel.

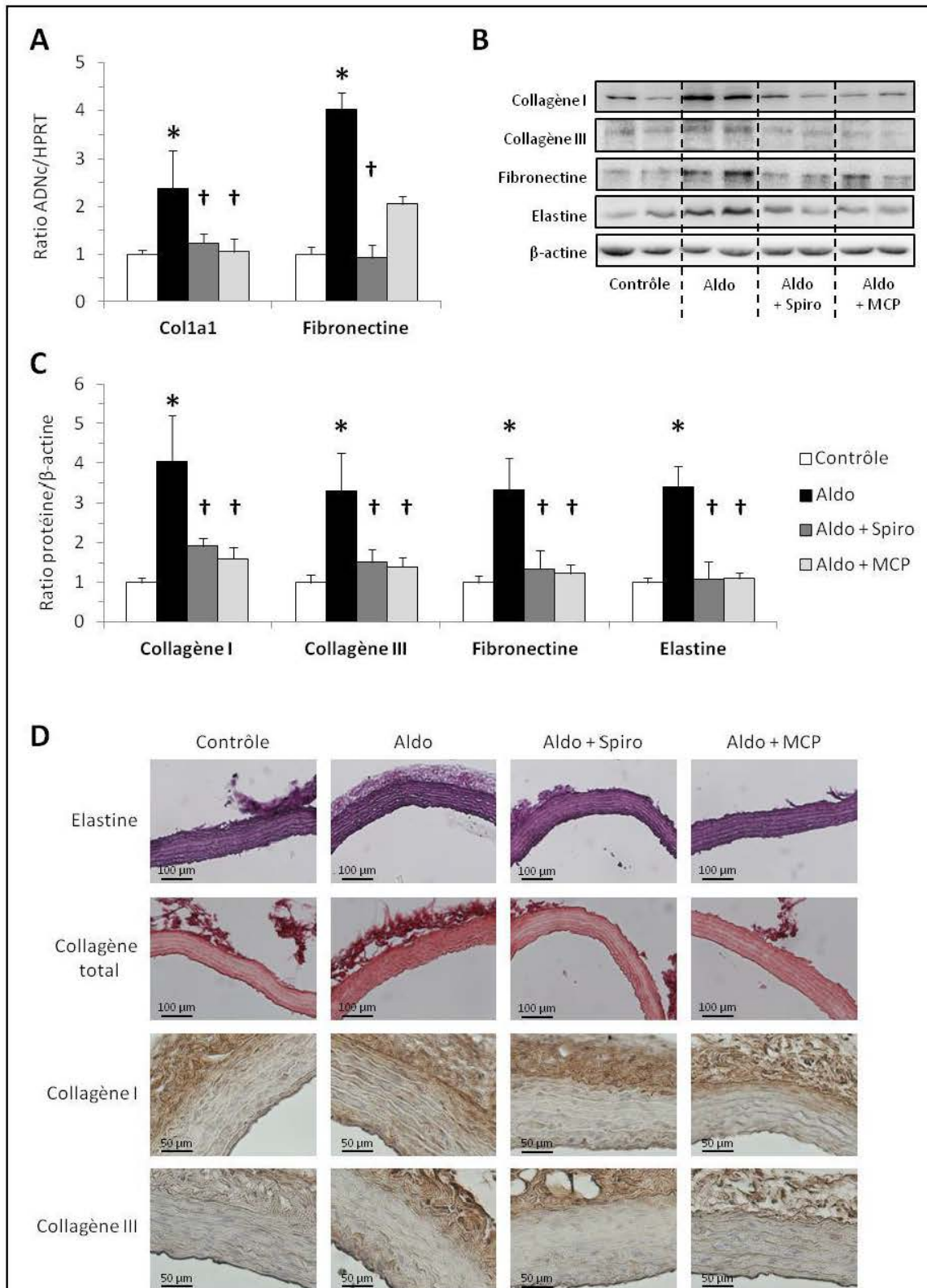


Figure 31 : L'Aldo entraîne une augmentation de la synthèse et de l'expression des protéines de la MEC dans l'aorte de rat. Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par la β -actine ou par l'HPRT pour les protéines ou les ARN respectivement. *, $p < 0.05$ vs. contrôle; †, $p < 0.05$ vs. Aldo.

Ces résultats sont confirmés par des approches complémentaires (**Figure 31**). L'analyse des ARNm de la média (A) révèle que le traitement à l'Aldo + sel stimule ($p < 0,05$) la synthèse de colla1 et de fibronectine, par ailleurs bloquées par le co-traitement avec les inhibiteurs spironolactone et MCP. La production de protéines est également affectée (B, C et D). Le traitement à l'Aldo + sel augmente ($p < 0,05$) l'expression de collagène (de type I et de type III), de fibronectine et d'élastine. Ces effets sont également bloqués ($p < 0,05$) par le co-traitement avec la spironolactone ou le MCP.

Afin de pouvoir analyser ces résultats en éliminant le biais dû aux variations de la pression artérielle, des analyses statistiques ajustées à la pression (PAM) permettant d'éliminer ce facteur confondant ont été réalisées. Il en ressort que les effets inhibiteurs du MCP sur le remodelage vasculaire induit par l'Aldo (au travers des paramètres mesurés précédemment) persistent indépendamment des variations de pression alors que les effets de la spironolactone disparaissent.

Pour évaluer le remodelage de la matrice dans son ensemble, l'activité des MMPs (contribuant à la dégradation de la MEC) a également été mesurée (**Figure 32**). Le traitement à l'Aldo + sel induit une augmentation de l'activité de MMP-2 et -13 par rapport au groupe contrôle et elles sont normalisées par le co-traitement avec les inhibiteurs spironolactone et MCP.

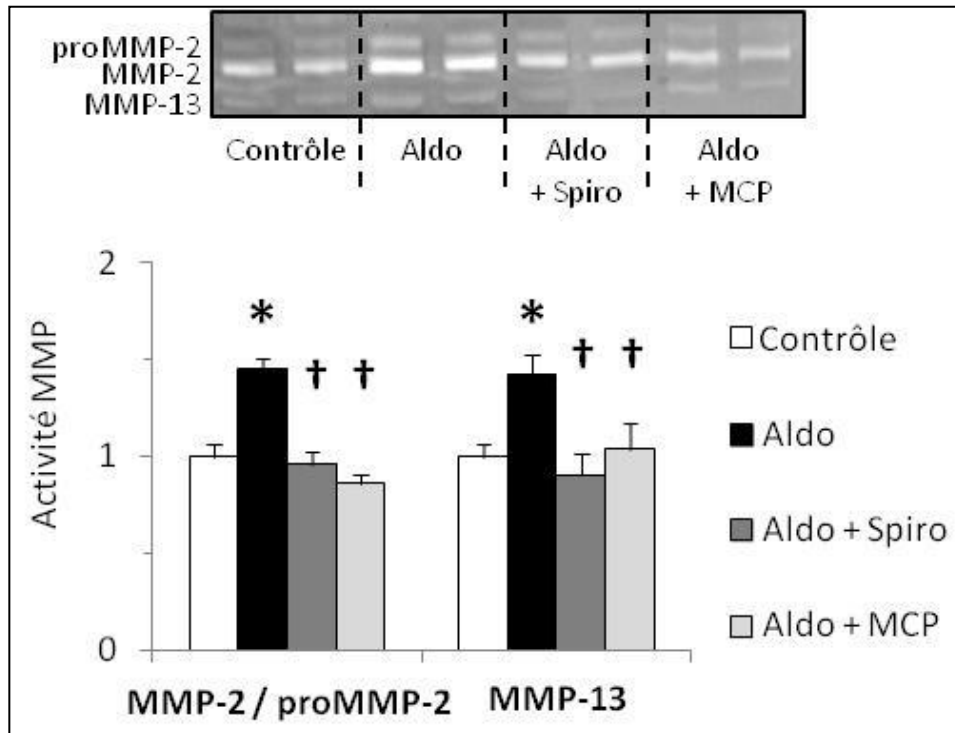


Figure 32: L'Aldo entraîne une augmentation de la dégradation de MEC dans l'aorte de rat. Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par la forme proMMP correspondante quand elle était détectable. *, $p < 0.05$ vs. contrôle; †, $p < 0.05$ vs. Aldo.

3. Modèle aigu de souris traitées à l'Aldo

3.1. Régulation de la Gal-3 par l'Aldo

Le traitement à l'Aldo entraîne dans la paroi aortique des souris (**Figure 33**) une augmentation de l'expression d'ARNm codant pour la Gal-3 (4,7 fois, $p < 0,05$).

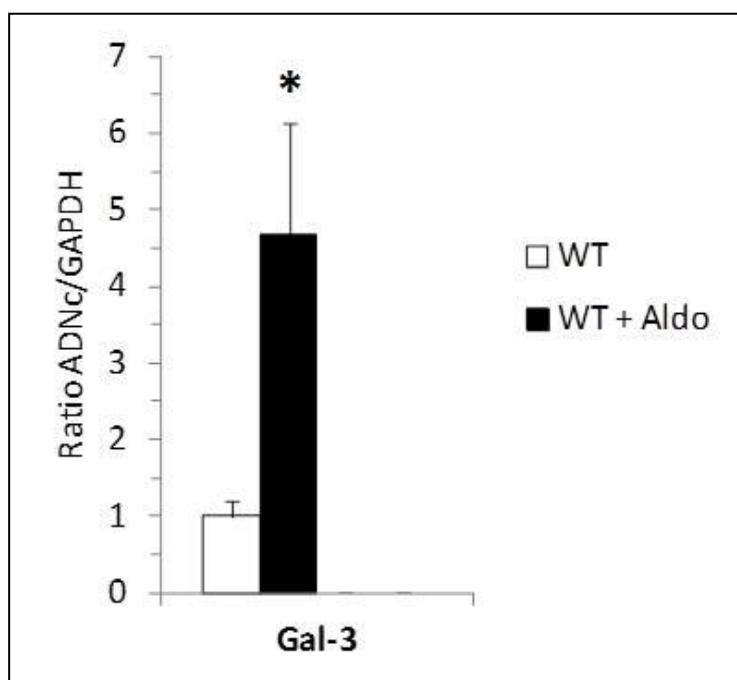


Figure 33 : L'Aldo entraîne une augmentation de l'expression d'ARN codant pour la Gal-3 dans les aortes de souris WT. Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par l'HPRT. *, $p < 0.05$ vs. contrôle.

3.2. Rôles de la Gal-3 comme médiateur des effets de l'Aldo sur le remodelage matriciel

Pour compléter la compréhension du mode d'action de la Gal-3 dans le remodelage vasculaire induit par l'Aldo, des souris sauvages (WT) et KO pour la Gal-3 ont été traitées en aigu à l'Aldo, lequel n'entraîne pas de variation de la PAS (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Mesures de la pression à la queue des souris dans le modèle aigu WT vs KO traités à l'Aldo.

	WT	WT + Aldo	Gal-3 KO	Gal-3 KO + Aldo
n	6	6	6	6
PAS avant injection	106,7 \pm 2,7	108,8 \pm 4,0	110,4 \pm 3,9	112,7 \pm 7,0
PAS après injection	116,0 \pm 3,5	115,0 \pm 3,9	117,8 \pm 4,3	116,0 \pm 8,1

PAS, pression artérielle systolique en mmHg. Les valeurs sont exprimées \pm ESM.

Les souris WT traitées à l'Aldo présentent une augmentation significative de l'expression de Col1a1 (2,2 fois, $p < 0,05$) et une légère tendance non significative à l'augmentation du col3a1 (1.6 fois) et de la fibronectine (1.9 fois). En revanche, dans les souris KO, le traitement à l'Aldo n'entraîne aucune variation pour aucun de ces ARN (**Figure 34**).

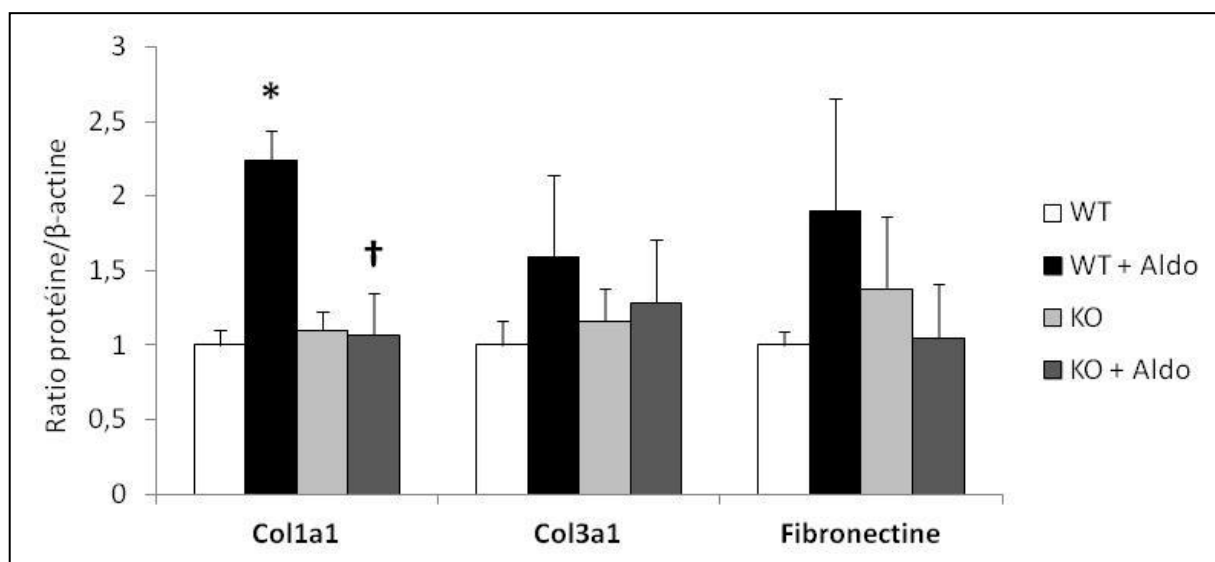


Figure 34 : Les souris KO pour la Gal-3 sont résistantes aux effets de l'Aldo sur la synthèse de la MEC. Les barres d'histogrammes représentent la moyenne \pm ESM sur au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs ont été normalisées par l'HPRT. *, $p < 0.05$ vs. contrôle; †, $p < 0.05$ vs. Aldo.

V. DISCUSSION

1. Rappel des principaux résultats

Le but de cette étude était d'étudier les effets de la Gal-3 sur les CMLV et de préciser son rôle comme médiateur de l'Aldo dans ses effets sur le remodelage de la MEC *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons démontré que la Gal-3 est exprimée spontanément dans les cultures primaires de CMLV et que sa surexpression augmente spécifiquement la production de collagène de type I. Cet effet est dépendant du domaine N-terminal puisque la forme entière et non la forme tronquée (CRD) est efficace.

D'autre part, l'Aldo stimule l'expression de la Gal-3 intracellulaire via le MR dans les CMLV *in vitro* et *in vivo* dans la média aortique. L'inhibition de la Gal-3 *in vitro* (par siRNA ou par des inhibiteurs de la Gal-3) bloque spécifiquement le dépôt de collagène de type I induit par l'Aldo. De plus, l'inhibition *in vivo* (avec des souris KO pour la Gal-3 ou des rats traités avec le MCP, un inhibiteur spécifique de la Gal-3) bloque le remodelage de la MEC de la média et normalise les variations hémodynamiques induits par l'Aldo.

La Gal-3 apparaît comme une voie de signalisation clef impliquée dans la régulation de l'expression du collagène de type I des CMLV et comme un médiateur potentiel de la fibrose vasculaire induite par l'Aldo.

2. Les apports du modèle de culture primaire de CMLV

2.1. Expression de la Gal-3 dans les CMLV

L'expression de la Gal-3 a été décrite dans de nombreux tissus dont le cœur^{118,119}, le rein¹¹⁸ ou les poumons^{118,132}. En ce qui concerne l'aorte, il existe une controverse sur l'expression de cette lectine. Deux études ont montré que la Gal-3 était exprimée *in vivo* dans les lésions athérosclérotiques (chez l'animal et l'Homme) mais pas dans les aortes thoraciques en conditions normales^{121,122}. De plus, cette étude montre qu'au niveau de ces plaques la Gal-3 est localisée de manière prédominante dans les macrophages et rarement dans les CMLV. Dans une autre étude, la Gal-3 a été mise en évidence *in vivo* dans des aortes de lapin hypercholestérolémique et dans des aortes "stressées" par l'introduction d'un ballonnet chez des rats¹²⁰. *In vitro*, l'ARN de la Gal-3 a été détecté dans des cultures primaires de CMLV de lapin en

prolifération mais pas dans les cellules quiescentes. En opposition avec ces observations, une étude réalisée sur des cultures primaires de CMLV de rat a montré que ces cellules étaient capables d'exprimer la Gal-3 à l'état quiescent ¹²³. Nos résultats montrent clairement que la Gal-3 est exprimée spontanément au niveau ARN et protéique dans les cultures primaires de CMLV à l'état quiescent comme à l'état prolifératif mais également dans la média des aortes de rats et de souris à l'état basal. Les résultats discordants des diverses études peuvent provenir des méthodes d'analyses. Les techniques et les produits utilisés de nos jours sont plus précis qu'il y a une quinzaine d'année, date des premiers papiers cités ci-dessus et traitant de la localisation de la Gal-3 dans les aortes et les CMLV.

Nos expériences sur les cultures de CMLV en présence de sérum montrent une augmentation de l'expression de la Gal-3 de manière dose-dépendante. Ceci est en accord avec des travaux précédents suggérant un élément de réponse au sérum dans le promoteur du gène codant pour la Gal-3 ¹⁴³.

2.2. Effets de l'Aldo dans les CMLV

Malgré des études proposant des mécanismes pour expliquer l'inflammation et la fibrose vasculaire induite par l'Aldo ⁴¹, les effets de l'Aldo *per se* sur le remodelage matriciel reste controversés. D'un côté, certains auteurs soutiennent que l'Aldo seul n'est pas capable d'induire la synthèse de collagène ¹⁸⁹. En effet, ces auteurs rapportent que, sur des CMLV humaines en culture primaire, l'ajout d'Aldo ne stimule pas la synthèse de collagène de type I, III, ou IV. En revanche, en combinaison avec l'Aldo, l'addition d'un stress par l'ajout d'une espèce réactive de l'oxygène (H₂O₂) induit l'augmentation de la synthèse de collagène et cet effet est bloqué par l'inhibition du MR. D'un autre côté, d'autres auteurs rapportent que, sur des cultures primaires de CMLV de rat, l'addition d'Aldo augmente l'incorporation de [³H]proline, par ailleurs inhibée par l'éplérénone. Ces auteurs montrent ainsi que l'Aldo induit la synthèse de collagène via le MR dans les CMLV ³⁹.

Les mécanismes mis en avant pour expliquer les différentes réponses des cellules à l'Aldo ne sont pas clairs, mais les différences observées entre les diverses études proviennent probablement de la différence entre les espèces et très certainement des conditions de cultures

et d'analyses. Dans notre modèle expérimental, en réponse à la stimulation à l'Aldo, les CMLV de rat en culture primaire montrent une augmentation, significative et dépendante du MR, de l'expression du collagène de type I, de la fibronectine et une tendance non significative à l'augmentation de l'expression du collagène de type III. En réponse à l'Aldo, les cellules augmentent également la synthèse de l'élastine mais indépendamment du MR, conformément à la littérature dans laquelle une voie spécifique a été décrite, impliquant PI3 Kinase et Akt^{190,191} (**Figure 35**).

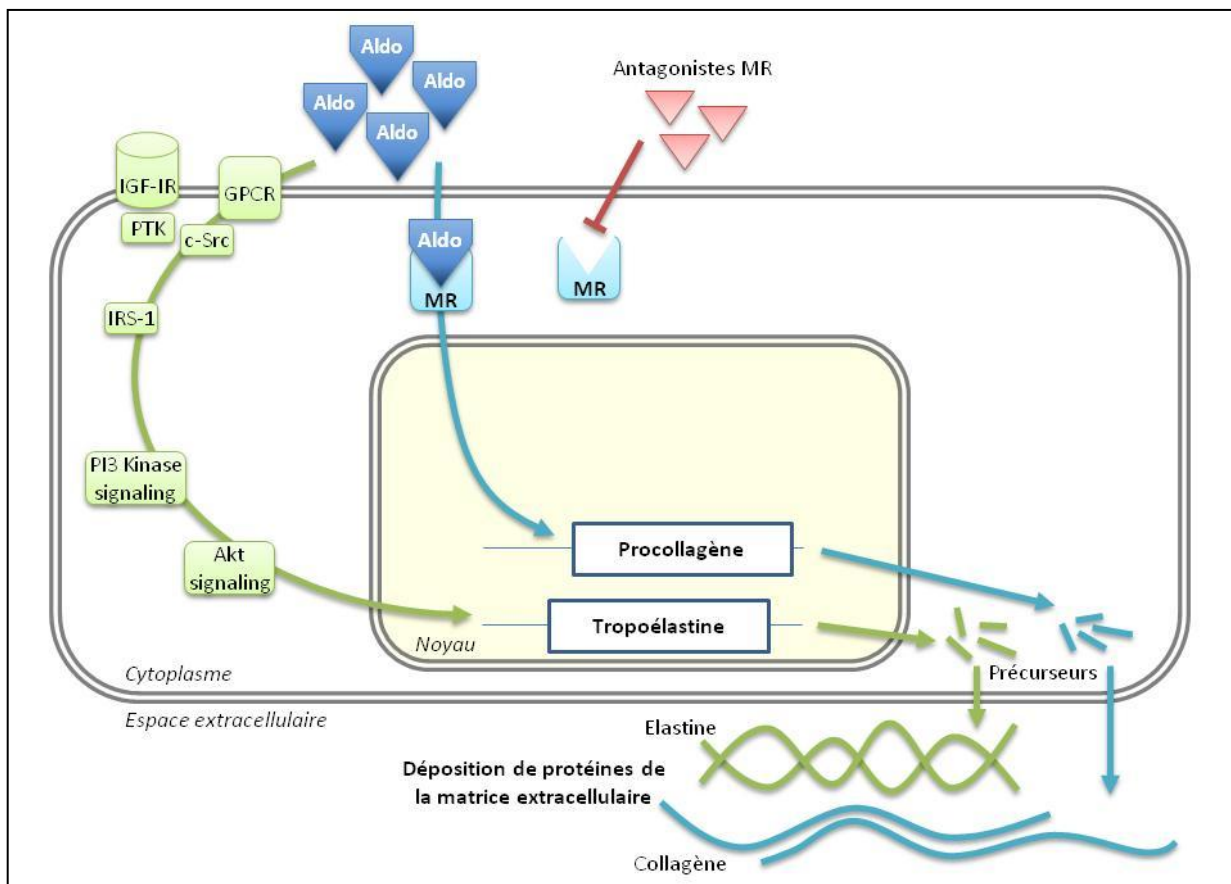


Figure 35 : Schéma cellulaire de la voie profibrotique de l'Aldo : modèle de stimulation à l'Aldo avec antagonistes du MR. Aldo, aldostérone ; MR, récepteur minéralocorticoïde ; IGF-IR, récepteur de type I au facteur de croissance l'insuline-like ; GPCR, récepteur couplé à une protéine G ; PTK, protéine tyrosine kinase ; C-src : protéine tyrosine kinase liée à la membrane ; IRS-1 : substrat-1 du récepteur à l'insuline ; PI3 : Phosphatidylinositol 3 ; Akt : protéine kinase B.

En plus de ses effets sur la MEC, nos observations montrent que l'Aldo stimule la synthèse de Gal-3 dans les CMLV (**Figure 36**). Sa localisation est intracellulaire et plus spécifiquement péri-nucléaire. En ce qui concerne la possibilité d'une libération extracellulaire de la Gal-3, ni à l'état basal, ni sous stimulation à l'Aldo, nous n'avons pu mettre en évidence la présence de cette lectine par Western blot. Ces observations suggèrent un rôle intracellulaire de la Gal-3 en réponse à l'Aldo.

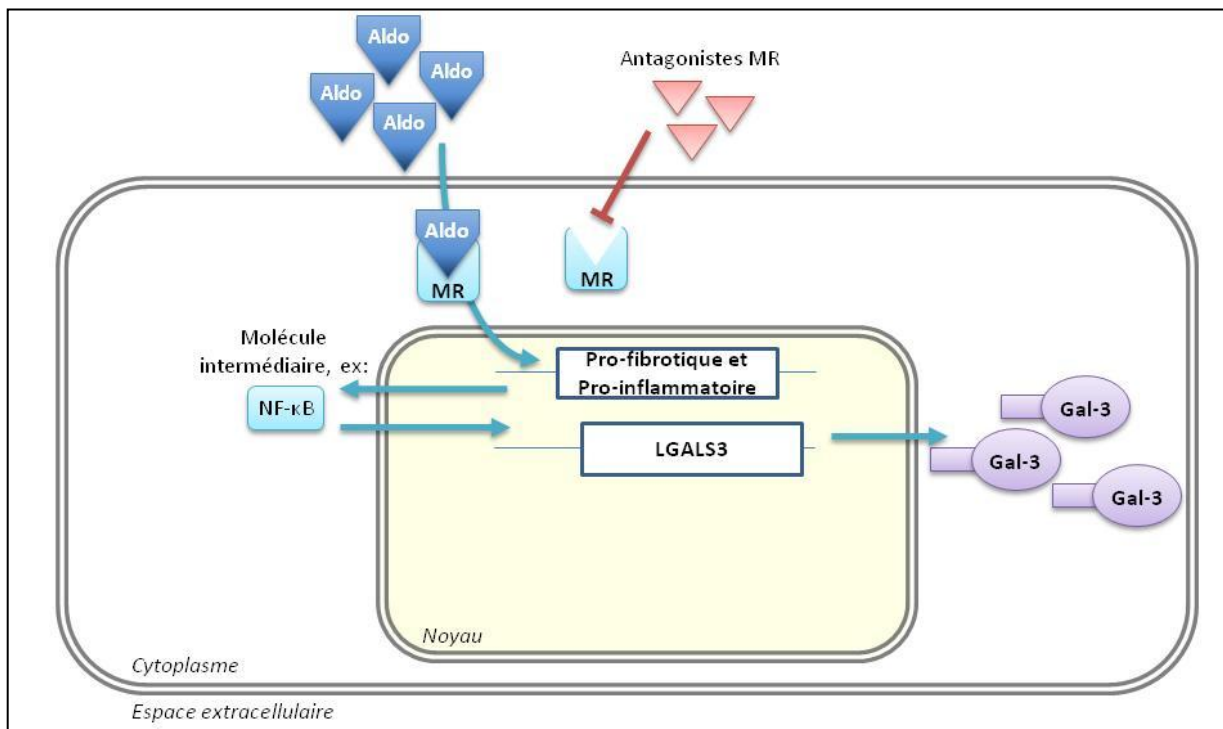


Figure 36 : Schéma cellulaire de la voie de stimulation de la Gal-3 par l'Aldo : modèle de stimulation à l'Aldo avec antagonistes du MR. Aldo, aldostérone ; MR, récepteur minéralocorticoïde ; NF-κB, facteur nucléaire "kappa-light-chain-enhancer" de cellules B activées ; LGALS3, gène codant pour la galectine-3 ; Gal-3, galectine-3

Cette stimulation de l'expression de la Gal-3 par l'Aldo passe par le MR puisque des antagonistes de ce récepteur bloquent l'augmentation de Gal-3. Elle induit également la synthèse de nouvelles protéines Gal-3 et non la libération ou l'activation de Gal-3 stockée puisque qu'un inhibiteur de la synthèse protéique bloque l'augmentation de cette lectine. De plus, cette voie fait intervenir des composés intermédiaires, puisque l'inhibition de la synthèse de protéine par la cycloheximimide bloque la synthèse d'ARN codant pour la Gal-3 (**Figure 37**).

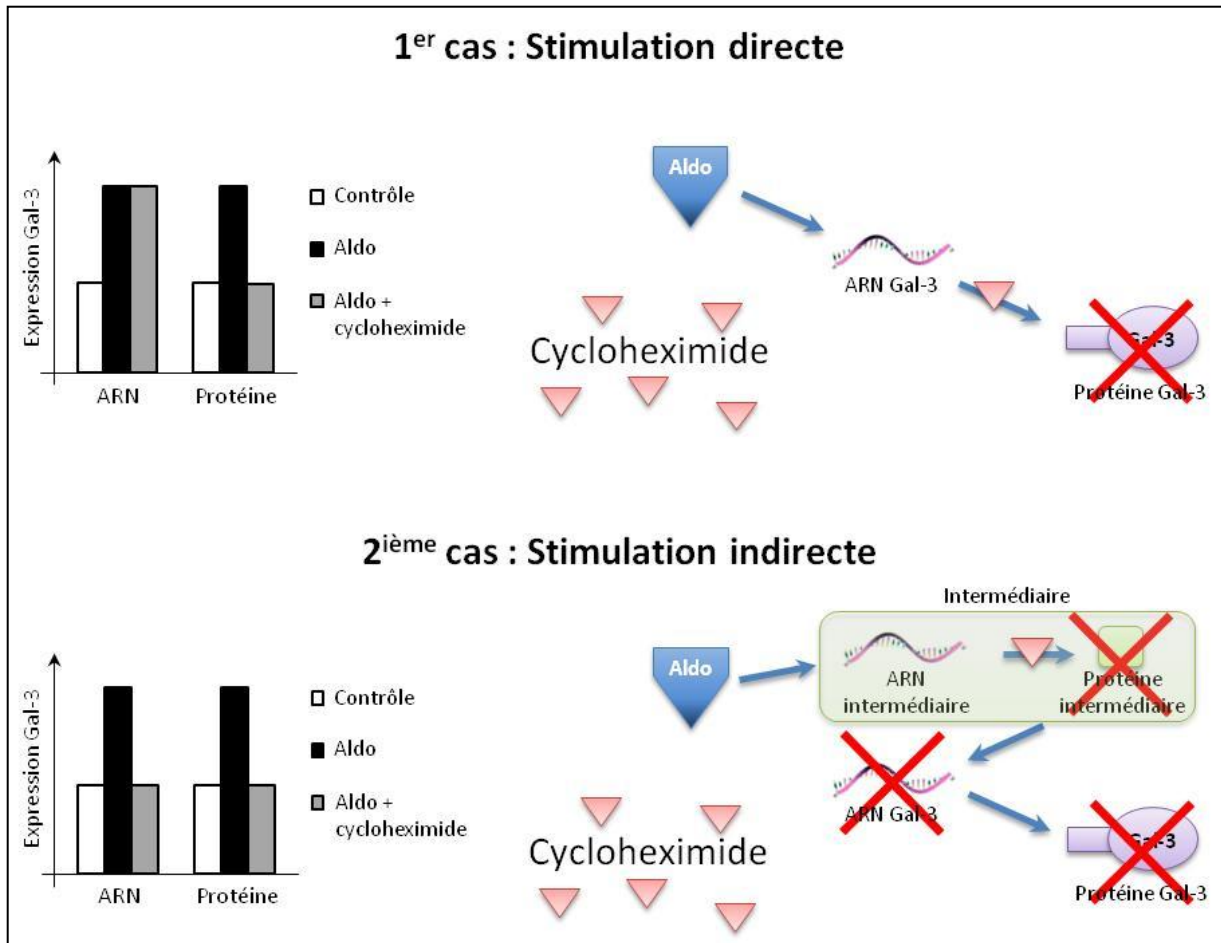


Figure 37 : Schémas et projections sur le mode d'action du cycloheximide dans la voie de synthèse de la Gal-3 stimulée par l'Aldo. Aldo, aldostérone ; Gal-3, galectine-3.

2.3. Effets de la Gal-3 dans les CMLV

Pour mettre en évidence le rôle intracellulaire de la Gal-3, nous l'avons surexprimée dans les cultures primaires de CMLV. Nous avons ainsi montré pour la première fois que sa surexpression stimule spécifiquement l'expression du collagène de type I, sans affecter les niveaux du collagène III, de la fibronectine ou de l'élastine. Ceci conduit à une augmentation des ratios collagène de type I / collagène de type III et collagène de type I / élastine qui, *in vivo*, sont des indices en faveur d'une augmentation de la rigidité de la MEC ^{119,192}. Cette augmentation spécifique de l'expression du collagène de type I est un phénomène responsable, à l'échelle de l'aorte, de la fibrose vasculaire et donc un important facteur pouvant augmenter la rigidité artérielle ^{11,193}.

Cette spécificité d'action de la Gal-3 sur le collagène de type I peut être expliquée par son rôle comme cofacteur de transcription^{119,151}. En effet, le promoteur du collagène de type I mais pas celui de type III contient un grand nombre de sites de liaison à SP-1¹⁹⁴ à travers lesquels la Gal-3 est capable d'agir¹⁹⁵ (**Figure 38**).

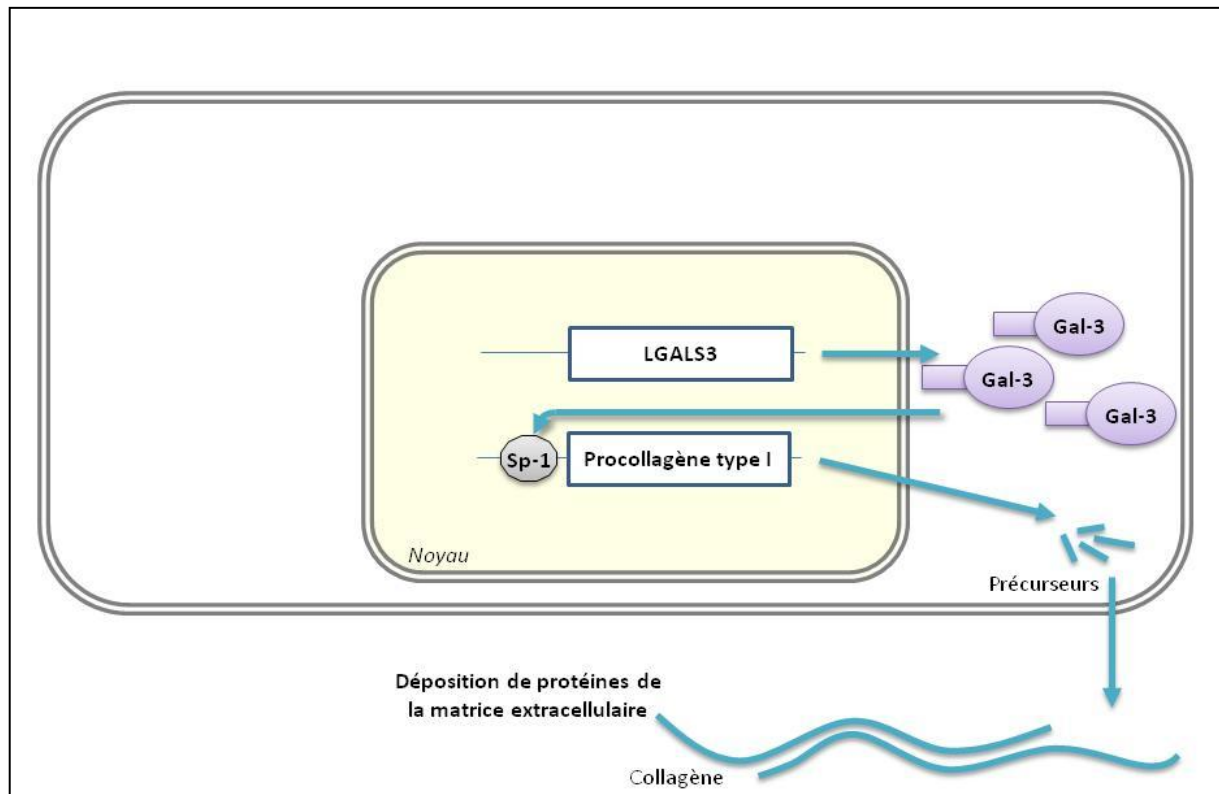


Figure 38 : Schéma cellulaire de la voie profibrotique de l'Aldo : modèle de sur-expression de la Gal-3. *Sp-1*, protéine spécifique 1 ; *LGALS3*, gène codant pour la galectine-3 ; *Gal-3*, galectine-3.

Par ailleurs, pour affiner la compréhension du mode d'action de la Gal-3, nous avons également surexprimé une Gal-3 tronquée correspondant au CRD de cette lectine et conservant donc ses fonctions lectiniques. Les résultats montrent que le CRD seul n'est pas suffisant pour remplir le rôle de la Gal-3 dans la synthèse de collagène de type I, mettant en avant le rôle indispensable du domaine N-terminal. Ce domaine est également indispensable à la multimérisation de la Gal-3 et contient les sites de phosphorylation de la protéine, laissant penser que ces phénomènes sont donc nécessaires à la Gal-3 pour qu'elle remplisse efficacement son rôle profibrotique.

Ce rôle profibrotique de la Gal-3 à l'échelle cellulaire a déjà été observé ¹¹⁹. *In vivo*, il a été montré dans cette étude que la Gal-3 recombinante se fixait sur des cibles intracellulaires (non identifiées) dans des fibroblastes cardiaques. Sur des fibroblastes en culture primaire, la stimulation avec la Gal-3 recombinante entraîne une augmentation de l'incorporation de [³H]proline, témoin d'une augmentation de la production de collagène. Cet effet se retrouve *in vivo*, puisqu'elle induit une fibrose cardiaque par augmentation du dépôt de collagène aboutissant à une IC.

2.4. La Gal-3 médiateur de l'Aldo dans la synthèse de collagène de type I

D'une part, nos résultats montrent que l'Aldo a un effet profibrotique dont les mécanismes restent encore à clarifier et augmente l'expression de la Gal-3 intracellulaire. D'autre part, la sur-expression de la Gal-3 intracellulaire induit une augmentation de la synthèse de collagène de type I. Nous avons donc cherché si la Gal-3 était un intermédiaire de l'Aldo pour ses effets profibrotiques dans les CMLV. Pour cela, deux approches différentes et complémentaires ont été utilisées : l'inhibition de l'expression de la Gal-3 (siRNA) et de son activité (inhibiteurs).

L'efficacité des siRNA contre l'ARN de la Gal-3 a été vérifiée par RT-PCR et par Western blot, entraînant une diminution de l'expression de la protéine de plus de la moitié par rapport au contrôle (scramble). Cette diminution n'entraîne pas de modification dans l'expression de protéines de la MEC, suggérant que la Gal-3 n'intervient pas sur la synthèse de la MEC à l'état basal.

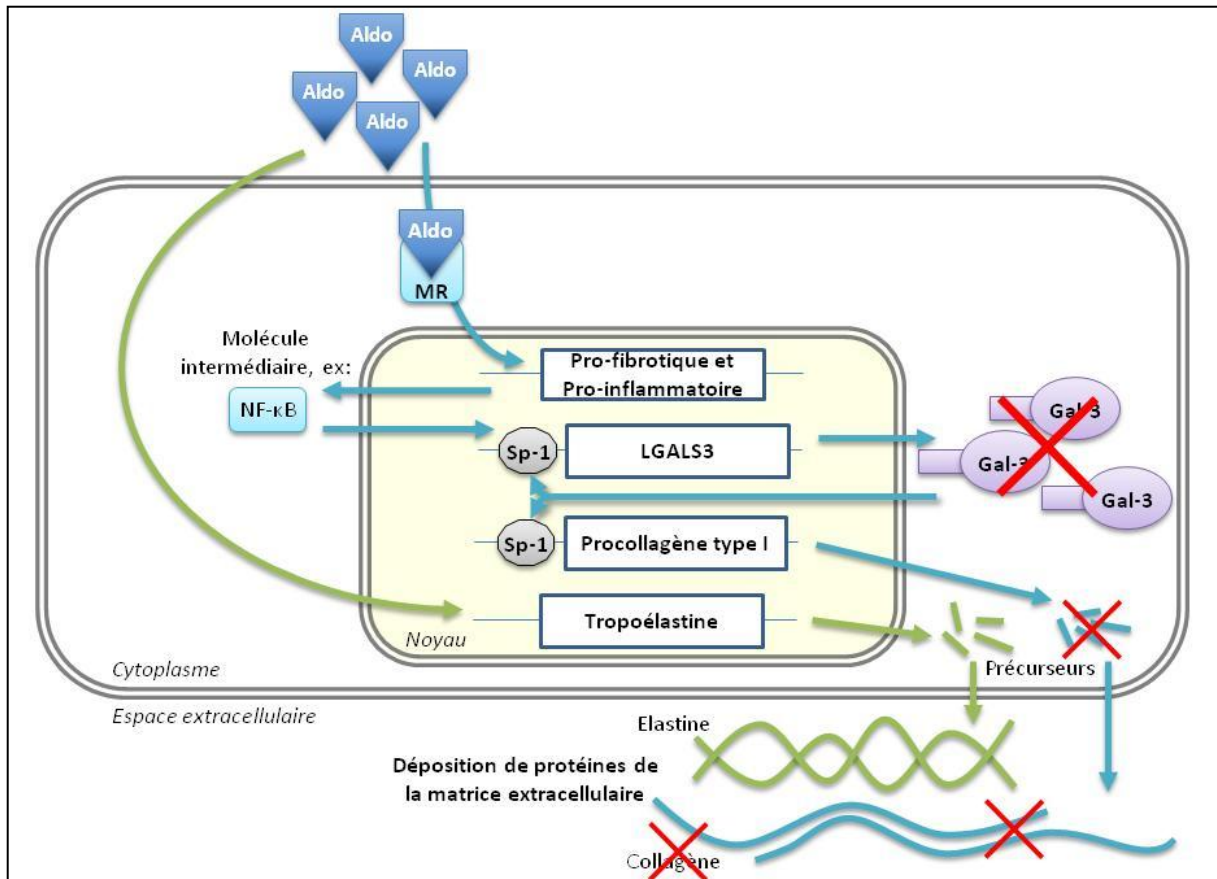


Figure 39 : Schéma cellulaire de la voie profibrotique de l'Aldo : modèle siRNA Gal-3. Aldo, aldostérone ; MR, récepteur minéralocorticoïde ; NF- κ B, facteur nucléaire "kappa-light-chain-enhancer" de cellules B activées ; Sp-1, protéine spécifique 1 ; LGALS3, gène codant pour la galectine-3 ; Gal-3, galectine-3.

De plus, sur les cellules avec les siRNA scrambles, comme attendu, la stimulation à l'Aldo induit l'augmentation de l'expression de protéines de la MEC, notamment le collagène de type I et l'élastine. Concernant la fibronectine, le traitement avec les siRNA scrambles stresse les cellules, entraînant une perte de la significativité de l'augmentation de la fibronectine par rapport aux stimulations directes sur CMLV par l'Aldo. En revanche, les CMLV sous-exprimant la Gal-3 sont résistantes à l'augmentation du collagène de type I induit par l'Aldo tandis que le niveau d'élastine reste augmenté (**Figure 39**). Ceci montre le rôle crucial de la Gal-3 dans la voie permettant à l'Aldo de stimuler la synthèse de collagène de type I. Cela permet également d'exclure la Gal-3 dans la voie de signalisation permettant à l'Aldo de stimuler la synthèse d'élastine.

Ce rôle-clef pour la Gal-3 est confirmé par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la Gal-3, le LacNac et le MCP (**Figure 40**). La Gal-3 a une très forte affinité pour ces inhibiteurs et va se lier sur eux plutôt que sur ses ligands naturels, bloquant son activité lectinique. Le co-traitement à l'Aldo et le LacNac ou le MCP bloque la stimulation du collagène de type I. En revanche, l'augmentation de l'élastine induite par l'Aldo n'est pas affectée par ces inhibiteurs de la Gal-3. Ces résultats renforcent le rôle majeur de la Gal-3 comme médiateur de l'Aldo spécifiquement dans la synthèse de collagène de type I, composant principal de la fibrose. De plus, ces inhibiteurs spécifiques de la Gal-3, et utilisés à des concentrations moins élevées que le lactose, s'avèrent aussi efficaces que la sous-expression de la lectine. L'absence d'effets secondaires, contrairement au lactose moins spécifique qui doit être utilisé à forte concentration, ouvre la voie à de possibles utilisations *in vivo*.

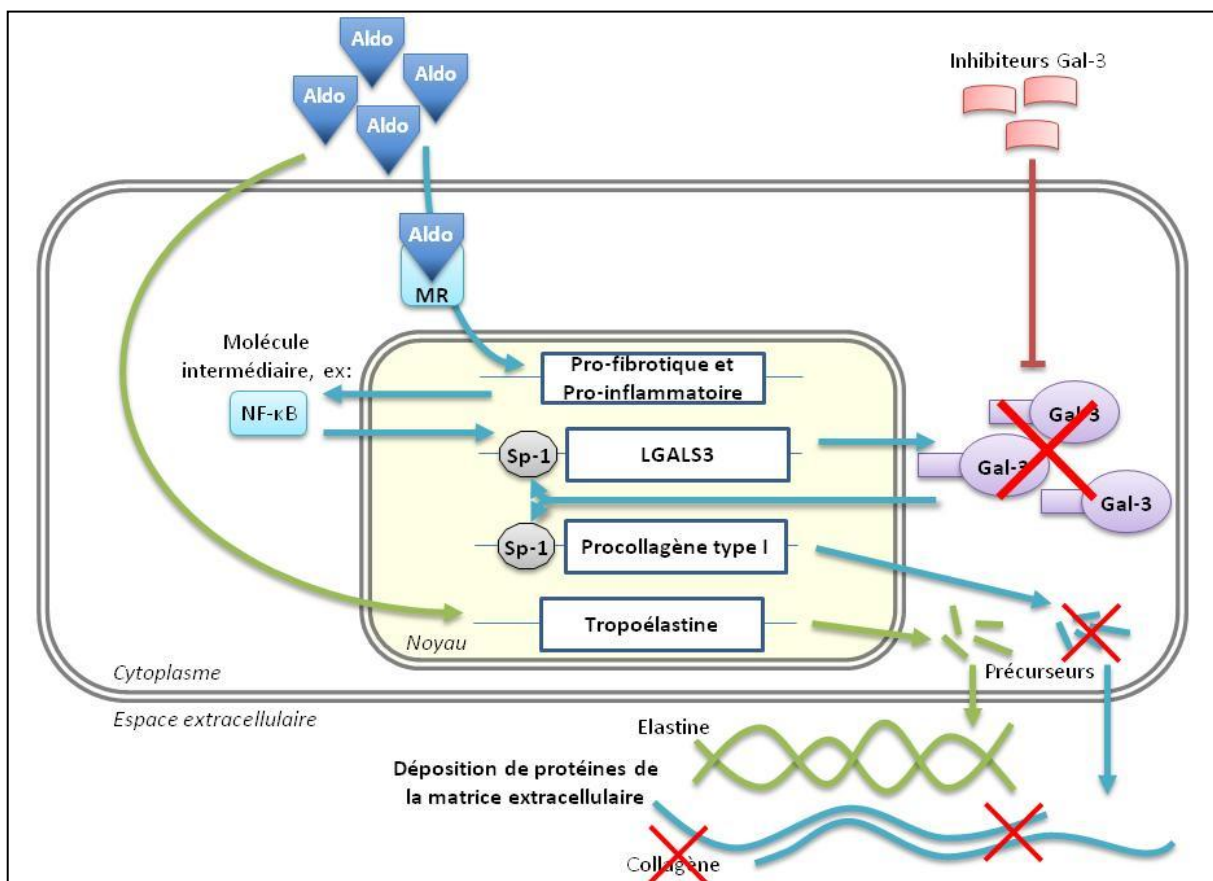


Figure 40 : Schéma cellulaire de la voie profibrotique de l'Aldo : modèle d'inhibiteurs de la Gal-3. Aldo, aldostérone ; MR, récepteur minéralocorticoïde ; NF-κB, facteur nucléaire "kappa-light-chain-enhancer" de cellules B activées ; Sp-1, protéine spécifique 1 ; LGALS3, gène codant pour la galectine-3 ; Gal-3, galectine-3.

Par ailleurs, les expériences montrent que les inhibiteurs de la Gal-3, LacNac et MCP, bloquent l'augmentation de l'expression de la Gal-3 induite ici par l'Aldo. Ces résultats ont déjà été observés dans un modèle d'insuffisance rénale traitée au MCP ¹⁵¹, sans qu'une explication n'ait été avancée. Un mécanisme possible serait une boucle de rétro-contrôle positif de la Gal-3 sur elle-même, puisqu'elle possède un élément de réponse à Sp-1 sur son propre promoteur ¹⁹⁶, mais cette hypothèse reste à vérifier et nécessite de plus amples investigations spécifiques à cette question. Une autre explication possible serait que le MCP agit sur d'autres molécules que la Gal-3, inhibant la voie de signalisation aboutissant à la synthèse de la Gal-3. Cette hypothèse a été avancée dans une étude montrant que le MCP bloquait la voie NF-κB, mais les mécanismes, le lieu et le mode d'action du MCP restent indéfinis ¹⁹⁷. Là encore, de plus amples investigations dédiées à l'analyse de cette hypothèse seraient nécessaires.

2.5. Conclusions sur le modèle *in vitro*

En conclusion de la partie *in vitro*, nous avons montré dans notre modèle que l'Aldo entraînait une augmentation de la synthèse de collagène, et plus particulièrement du collagène de type I, via l'activation du MR et de la Gal-3. L'Aldo induit également la synthèse d'élastine mais indépendamment du MR et de la Gal-3 (**Figure 41**).

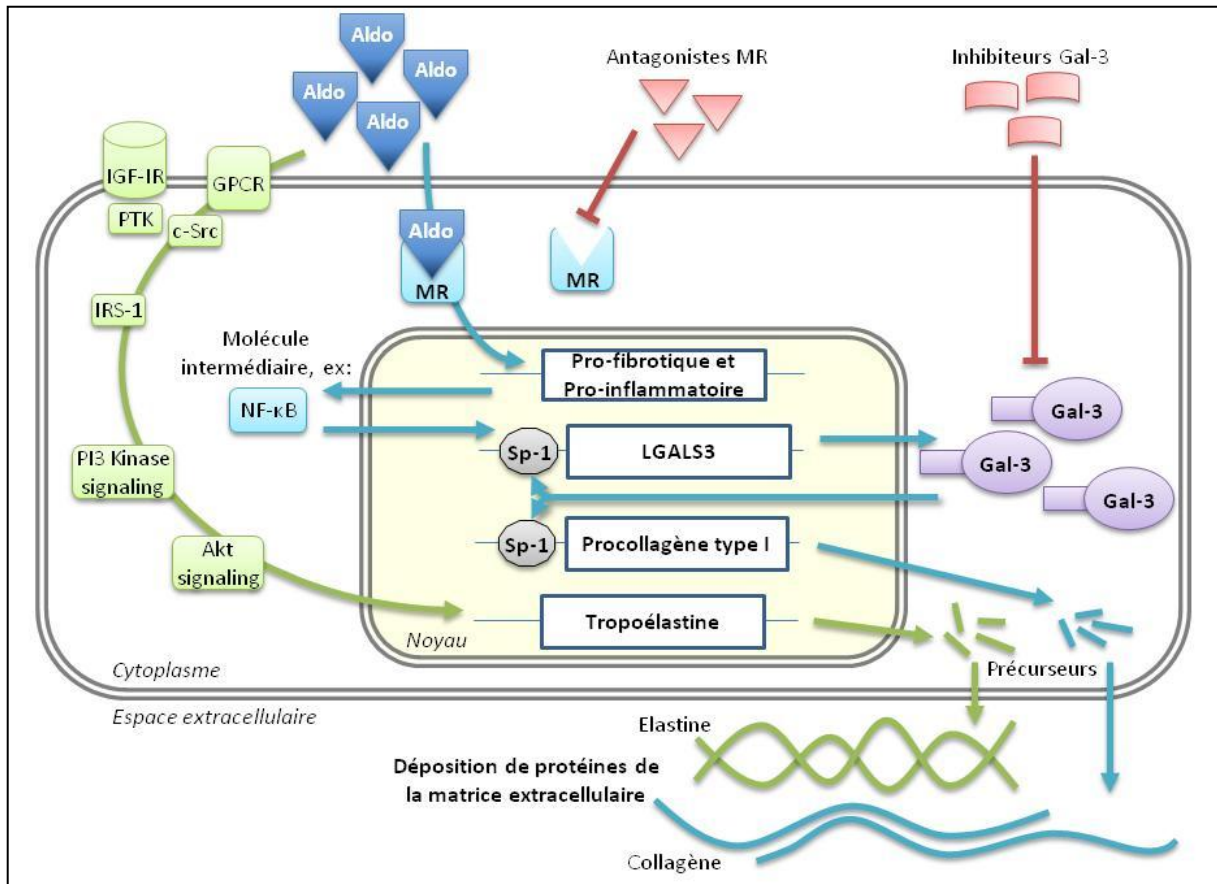


Figure 41 : Schéma cellulaire de la voie profibrotique de l'Aldo impliquant la Gal-3. Aldo, aldostérone ; MR, récepteur minéralocorticoïde ; NF- κ B, facteur nucléaire "kappa-light-chain-enhancer" de cellules B activées ; LGALS3, gène codant pour la galectine-3 ; Gal-3, galectine-3

3. Les apports des modèles animaux –Rat

3.1. Aldostérone et altérations hémodynamiques

L'analyse des paramètres hémodynamiques révèle que le traitement des rats à l'Aldo + sel induit une augmentation de la pression (systolique, diastolique et moyenne) et une diminution de la fréquence cardiaque. Tout cela est normalisé par le co-traitement avec la spironolactone. Ces résultats sont conformes à ceux que notre équipe a déjà publiés dans ce modèle ¹⁸⁴.

L'Aldo combinée avec une prise élevée en sel est utilisée comme modèle expérimental classique d'hypertension, décrit pour la première fois par l'équipe de Brilla en 1990 et largement utilisé depuis ¹⁹⁸. En confirmant ces résultats attendus, nous avons ainsi validé notre modèle d'étude.

3.2. Aldostérone et réponse fibrotique

Il est connu que l'Aldo exerce des effets importants sur la structure des vaisseaux et nos résultats confirment dans notre modèle des conclusions déjà présentées dans d'autres études. L'administration de cette hormone est associée avec un remodelage vasculaire dans les grosses et les petites artères caractérisé par l'augmentation de l'épaisseur de la média ^{50,199,200}. Dans notre étude, les analyses de la composition de la média aortique révèlent que l'Aldo induit une hypertrophie des CMLV et une augmentation de l'activité de dégradation de la MEC (augmentation de l'activité des MMP-2 et -13) désorganisant son réseau. Parallèlement, elle induit également une plus forte augmentation de la synthèse de protéines de la MEC résultant en une augmentation du dépôt des collagènes de type I et III, de la fibronectine et de l'élastine. Ces changements induits par l'Aldo se traduisent au niveau de l'aorte par une hypertrophie de la paroi caractérisée par une augmentation de son épaisseur et de la MCSA. Tous ces effets sont dépendants du MR puisqu'ils sont bloqués par la spironolactone.

L'impact de l'Aldo sur les vaisseaux est aussi soutenu par le fait que les patients avec un hyperaldostéronisme primaire présentent une augmentation du ratio média / lumière consécutive à l'augmentation de l'épaisseur de la média ²⁰¹. De plus, différentes études montrent que l'administration d'antagonistes du MR dans différents modèles d'hypertension est associé à l'amélioration du remodelage vasculaire et diminuait l'accumulation de collagène et de fibronectine ²⁰², prévenant ainsi les effets profibrotiques de l'Aldo. Ainsi, au travers des altérations fibrotiques de la structure des vaisseaux, l'Aldo peut induire des changements des propriétés mécaniques de la paroi artérielle.

3.3. L'aldostérone stimule la galectine-3

Les résultats obtenus *in vivo* confirment ceux obtenus *in vitro* sur les cultures primaires de CMLV. En effet, le traitement à l'Aldo entraîne une augmentation de la synthèse de Gal-3 (ARN et protéine) au niveau de la média aortique. De plus, cette stimulation est dépendante du MR puisque la spironolactone bloque cet effet.

Ce résultat est complètement nouveau, il n'avait jamais été montré un lien entre l'Aldo et la Gal-3 dans aucun type cellulaire. En revanche, un groupe avait déjà trouvé un lien entre l'Ang II et la Gal-3. Il a été démontré *in vitro* sur des fibroblastes cardiaques et *in vivo* dans le myocarde de rat que la Gal-3 était associée aux effets profibrotiques de l'Ang II ¹¹⁹.

3.4. Effets de l'inhibiteur de la galectine-3

Le co-traitement avec le MCP dans ce modèle est une approche inédite du blocage des effets de l'Aldo, puisqu'habituellement le MCP est étudié pour son action anticancéreuse. Son rôle sur les effets classiques de l'Aldo dans ce modèle de rat Aldo + sel, à savoir la fibrose, la morphologie vasculaire et l'hémodynamique, a donc été analysé. Le co-traitement des rats avec l'Aldo et le MCP permet de montrer pour la première fois que le MCP bloque le remodelage de la MEC de la paroi aortique. Les analyses de la composition de la média aortique révèlent que, comme la spironolactone, le MCP bloque les effets de l'Aldo et inhibe l'hypertrophie des CMLV et normalise l'augmentation de l'activité des MMP, de la synthèse et du dépôt des protéines de la MEC (collagènes de type I et III, fibronectine et élastine). Cette inhibition des changements induits par l'Aldo se traduit au niveau de l'aorte par une inhibition de l'hypertrophie de la paroi caractérisée par une normalisation de son épaisseur et de la MCSA.

Une étude s'est penchée sur l'inhibition de la fibrose associée à la Gal-3 dans le modèle d'insuffisance rénale provoquée par un traitement à l'acide folique évoqué plus haut ¹⁵¹. Dans les reins des souris traitées avec le MCP, l'augmentation du collagène de type I est normalisée, en revanche la collagène de type III reste augmenté. Cette différence sur le

collagène de type III par rapport à notre modèle d'étude (où il est également normalisé par le MCP comme toutes les principales protéines de la MEC) peut s'expliquer par le fait que le modèle de rat Aldo + sel présente un facteur confondant connu pour agir sur la composition et les propriétés des artères, à savoir l'hypertension.

Ces résultats mettent donc en évidence le rôle anti-fibrotique du MCP. La première explication possible pour ses effets est son rôle inhibiteur de la Gal-3. Conformément aux résultats obtenus *in vitro*, le MCP bloque l'augmentation de l'expression de la Gal-3 également *in vivo*. Cependant, le MCP a un effet inattendu, et jamais décrit, sur les paramètres hémodynamiques, normalisant la PAS, la PAD, la PAM, la PP et la FC. Le fait que les aortes de rats co-traités avec l'Aldo et le MCP présentent des niveaux normaux d'expressions des protéines de la MEC pourrait être en partie dû à la normalisation de la pression induit par le MCP. En effet, il a été décrit que le remodelage vasculaire et la pression sont liés, l'un agissant sur l'autre et inversement ¹¹. Pour autant, des analyses statistiques ajustées à la pression (PAM), éliminant ce facteur confondant, montrent que les effets du MCP sur le remodelage vasculaire persistent (alors que les effets de la spironolactone disparaissent). Ces observations suggèrent donc un rôle anti-fibrotique pour le MCP indépendamment de la pression artérielle.

4. Souris KO

4.1. Phénotype basal des souris KO galectine-3

Dans le modèle de souris KO pour la Gal-3, aucune différence entre les phénotypes des souris WT et KO n'a été observée sur les paramètres mesurés. L'expression des gènes profibrotique ainsi que la pression artérielle ne sont donc pas affectées au niveau basal par l'absence de Gal-3. Ce résultat sur la pression artérielle est en accord avec des résultats, non publiés, obtenus en collaboration par l'équipe de De Boer et mesurant la pression sur plus d'une centaine de souris par télémétrie.

4.2. Aldostérone et pression

Pour s'affranchir des effets dus à l'augmentation de la pression artérielle dans le modèle de rat Aldo + sel, des souris KO pour la Gal-3 traitées à l'Aldo sans sel ont été utilisées. Dans ce modèle ont été étudiées la réponse immédiate à l'Aldo dans le traitement aigu (6 heures).

Par ailleurs, dans le modèle aigu, tous les groupes présentent une légère augmentation non statistiquement significative entre la mesure de la PAS relevée avant et celle relevée après l'injection. Cette variation est probablement imputable au stress que représentent les manipulations pour ces souris.

4.3. Traitement aigu à l'aldostérone

Comme il l'a été soulevé précédemment, les effets de l'Aldo *per se* restent encore controversés. Dans notre modèle aigu chez la souris, l'Aldo entraîne une augmentation significative de la synthèse de Gal-3, de collagène de type I et tend (mais non statistiquement significatif) à augmenter le collagène de type III et la fibronectine. L'Aldo a donc des effets directs sur la synthèse de protéines de la MEC indépendamment de la pression.

En ce qui concerne les effets de l'Aldo dans les souris KO pour la Gal-3, elles s'avèrent résistantes aux effets profibrotiques de l'Aldo. En effet, en accord avec les résultats obtenus *in vitro* sur les CMLV sous-exprimant la Gal-3 et stimulées à l'Aldo, cette hormone n'arrive pas à induire spécifiquement la synthèse de collagène de type I dans les souris n'exprimant pas la Gal-3, suggérant que l'absence de cette lectine bloque la fibrose vasculaires dépendante l'Aldo. Ceci étaye ainsi l'hypothèse selon laquelle la Gal-3 est un médiateur nécessaire permettant à l'Aldo d'induire de la fibrose via notamment la synthèse de collagène de type I.

5. Limites

5.1. Etat, cibles et mode d'action de la galectine-3

Dans notre étude, nous nous sommes penchés sur les effets de la Gal-3, en revanche, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent méconnus et certains points pourraient être approfondis.

Concernant la structure de la Gal-3 et son mode d'action, les résultats montrent que le CRD seul n'est pas suffisant pour remplir le rôle de la Gal-3 dans la synthèse de collagène, mettant ainsi en avant le rôle indispensable du domaine N-terminal. Cependant, comme ce domaine possède 2 fonctions, multimérisation et phosphorylation de la Gal-3, il n'est pas possible de discriminer la part de chacune dans les effets de la Gal-3. Pour affiner notre compréhension de ces mécanismes, des expériences visant spécifiquement à évaluer l'état de la Gal-3 (phosphorylée ou non, multimérisée ou non) sont nécessaires. A court terme, l'évaluation de la phosphorylation de la galectine *in vitro* est possible dans notre laboratoire et permettrait de répondre à cette question.

Pour ce qui est de son mode d'action, de nombreuses questions restent là encore à élucider. Beaucoup de cibles ont été décrites pour la Gal-3 intracellulaire, membranaire ou extracellulaire et le fait qu'elle ne possède pas de récepteur unique connu mais plutôt une multitude de ligands complique encore plus l'analyse de ses voies de signalisation. Dans notre modèle, nous n'avons pas clairement identifié ses cibles. En revanche, nous avons localisé la Gal-3 principalement au niveau péri-nucléaire ce qui pourrait suggérer, comme il a déjà été proposé, qu'elle agit au niveau de la maturation des ARN ou au niveau de la traduction. Cependant, toujours dans notre modèle et conformément à la littérature, l'hypothèse serait une action en tant que facteur de transcription, suggérant ainsi une translocation de cette galectine dans le noyau. Ces hypothèses restent donc encore à étudier, par exemple en étudiant la capacité de la Gal-3 d'interagir avec SP-1 et de se lier au promoteur du gène codant pour le collagène de type I.

Enfin, si les effets des inhibiteurs de la Gal-3 sur le blocage de son activité étaient prévisibles, en revanche, le fait qu'ils bloquent également l'augmentation de son expression est un effet inattendu qui reste difficile à expliquer. En effet, le mode d'action des inhibiteurs de la Gal-3 (LacNac et MCP) classiquement décrit est leur capacité à se lier au CRD de la galectine et ainsi, par compétition, de bloquer son action. Bien que cet effet ait déjà été observé, aucun mécanisme n'a été clairement mis au jour. Deux hypothèses évoquées précédemment sont alors possibles, une boucle de rétrocontrôle positif de la Gal-3 sur elle-même, ou une action de ces inhibiteurs sur la voie de signalisation aboutissant à la synthèse de la Gal-3. Pour répondre à cette question, il serait envisageable de stimuler les cellules avec de la Gal-3 et d'observer la synthèse d'ARN codant pour cette même lectine pour statuer sur une possible boucle de rétrocontrôle positif.

5.2. Voie de signalisation de l'Aldo

Nos résultats suggèrent que la stimulation de la Gal-3 par l'Aldo fait intervenir des composés intermédiaires. A partir d'informations tirées de la littérature, nous pouvons retenir trois hypothèses pour cet intermédiaire : la voie NF- κ B, le stress oxydant via la production de ROS et l'inflammation. Pour pouvoir déterminer l'implication de ces intermédiaires, il serait intéressant de réaliser des expériences sur des cultures cellulaires avec des inhibiteurs de ces voies.

5.3. MCP et pression artérielle

L'effet du MCP normalisant l'augmentation de pression dans le traitement des rats Aldo + sel était inattendu et d'autant plus intéressant. C'est la première fois que cette observation est reportée dans une étude puisque les autres travaux publiés jusque là n'étudiaient pas les effets de cet inhibiteur sur le système cardiovasculaire et ne mesuraient donc pas la pression artérielle ¹⁵¹.

Les modifications de la structure du système cardiovasculaire (hypertrophie, rigidité), et plus particulièrement dans notre étude les modifications de la paroi aortique, modifient les propriétés mécanique de ces tissus. Ces changements influent sur la pression artérielle et inversement, la pression artérielle modifie la structure du système cardiovasculaire. L'un s'adaptant aux changements de l'autre dans un équilibre dynamique. En agissant sur la fibrose par l'ajout d'Aldo et sur l'hypertension par l'excès de sel, l'équilibre se trouve déplacé et il devient difficile de déterminer si les effets observés du MCP sont dus à une inhibition de la fibrose ou à un effet plus direct du MCP sur la pression artérielle. Bien que notre étude dans son ensemble montre les effets du MCP sur le blocage du remodelage de la MEC, nos modèles ne nous permettent pas d'exclure un possible effet direct de cet inhibiteur sur la pression. En revanche, le fait que le MCP seul n'ait pas d'effet (tout comme l'absence de Gal-3 dans le phénotype basal des souris KO) laisse penser qu'il n'agit que lors d'un stress, comme une hyperaldostéronémie.

6. Perspectives à court terme

6.1. Traitement chronique à l'aldostérone

Pour s'affranchir des effets dus à l'augmentation de la pression artérielle dans le modèle de rat Aldo + sel, nous avons utilisé des souris WT et KO pour la Gal-3 traitées à l'Aldo sans sel pour étudier la réponse immédiate à l'Aldo dans un traitement aigu (6 heures). Pour compléter ce modèle et étudier la réponse sur le long terme, nous avons commencé un traitement chronique (3 semaines) : comme dans le traitement aigu, des souris mâles adultes C57BJ6 sauvages et KO pour la Gal-3 sont utilisées dans un modèle de traitement chronique à l'Aldo sans sel. Les souris WT sont divisées en 2 groupes, un groupe contrôle et un groupe Aldo dans lequel une mini-pompe osmotique diffusant de l'Aldo (1 mg/kg/jour) a été implantée chirurgicalement en sous-cutané. Les souris KO sont divisées également de la même manière. Sur ces souris, la pression à la queue est mesurée avant et à la fin des 3 semaines de traitement. Après les 3 semaines de traitement, les animaux sont sacrifiés par décapitation sous anesthésie. Au moment du sacrifice, le sang est collecté et les organes sont prélevés selon le même protocole que celui utilisé pour les rats.

Ce modèle permettra d'aller au-delà de l'analyse de l'expression précoce des gènes intervenant dans le remodelage artériel. L'analyse portera sur les modifications de la paroi artérielle en réponse à l'Aldo, par RT-PCR, Western blot et histologie et aidera à la détermination du rôle de la Gal-3 dans ce système, indépendamment de variations de la pression artérielle.

6.2. Relation aldostérone / galectin-3 dans le système cardio-rénal

Pour étendre notre compréhension des relations entre l'Aldo et la Gal-3 au delà de la paroi artérielle, nous prévoyons d'utiliser nos trois modèles (rats Aldo+sel, souris Aldo aigu et chronique) pour étudier les effets au niveau cardio-rénal. En effet, comme nous l'avons vu, la Gal-3 a un effet profibrotique dans le cœur et dans le rein, mais aucune relation n'a encore été montrée avec l'Aldo ou avec la pression artérielle.

Dans cet objectif, nous avons prélevé le cœur et les reins pour pouvoir les analyser par RT-PCR, Western blot et histologie.

7. Conclusions

Nous avons montré pour la première fois le rôle profibrotique de Gal-3 au niveau artériel et plus particulièrement dans les CMLV. Nous avons également mis en évidence que cette lectine est un intermédiaire-clef dans le remodelage matriciel induit par l'Aldo et une cible thérapeutique potentielle dans la prise en charge de la rigidité artérielle et de l'hypertension avec le traitement par un inhibiteur de la Gal-3, le MCP.

Par ailleurs, d'autres équipes ont montré que la Gal-3 est impliquée dans les maladies cardiovasculaires comme médiateur de l'apparition et du développement de l'IC. Il a été également décrit que le niveau de Gal-3 plasmatique augmente au cours du développement de l'IC et est associé à la dysfonction cardiaque, ce qui en fait un possible biomarqueur dans le diagnostic et la stratification pronostique des patients atteints d'IC. De plus amples études seront nécessaires pour établir une relation entre cette lectine et l'Aldo dans les pathologies cardiovasculaires chez l'Homme et pour étudier les bénéfices thérapeutiques potentiels de l'inhibition de la Gal-3 par le MCP dans ces pathologies.

A plus long terme, pour prolonger cette étude sur la Gal-3 et l'Aldo chez l'homme, il serait envisageable de mesurer le niveau plasmatique de cette galectine chez des patients présentant une hyperaldostéronémie afin de pouvoir transposer à l'homme les résultats obtenus dans nos modèles animaux. Dans ce sens, une étude clinique du groupe dirigé par John G.F. Cleland (Department of Cardiology, University of Hull, Kingston upon Hull, UK) vise à traiter des patients atteints d'IC par le MCP pour évaluer les bénéfices thérapeutiques du blocage de la Gal-3 dans ces pathologies.

Pour conclure, nous avons levé un coin du voile sur le rôle de la Gal-3 dans les pathologies cardiovasculaire aboutissant à l'IC. Cette lectine est un acteur clef offrant des perspectives encourageantes dans l'aide au diagnostic et le traitement de l'IC dont l'intérêt grandissant du monde de la recherche médicale en est le témoin.

VI. Références bibliographiques

1. Belz GG. Elastic properties and Windkessel function of the human aorta. *Cardiovasc Drugs Ther* 1995; 9: 73-83.
2. Davis MJ. Perspective: physiological role(s) of the vascular myogenic response. *Microcirculation* 2012; 19: 99-114.
3. Laurent S, Lacolley P, Girerd X, Boutouyrie P, Bezie Y, Safar M. Arterial stiffening: opposing effects of age- and hypertension-associated structural changes. *Can J Physiol Pharmacol* 1996; 74: 842-849.
4. Heerkens EH, Izzard AS, Heagerty AM. Integrins, vascular remodeling, and hypertension. *Hypertension* 2007; 49: 1-4.
5. Diez J, Gonzalez A, Lopez B, Querejeta R. Mechanisms of disease: pathologic structural remodeling is more than adaptive hypertrophy in hypertensive heart disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005; 2: 209-216.
6. Pariente JL, Villars F, Conort P. Biological materials. *Prog Urol* 2005; 15: 964-970.
7. Dobrin PB. Mechanical properties of arteries. *Physiol Rev* 1978; 58: 397-460.
8. Bishop JE, Lindahl G. Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovasc Res* 1999; 42: 27-44.
9. Wachi H. Role of Elastic Fibers on Cardiovascular Disease. *J Health Science* 2011; 57: 449-457.
10. Magnusson MK, Mosher DF. Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1363-1370.
11. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 2001; 38: 581-587.
12. Ma C, Tarnuzzer RW, Chegini N. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in mesothelial cells and their regulation by transforming growth factor-beta1. *Wound Repair Regen* 1999; 7: 477-485.
13. Deschamps AM, Spinale FG. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 666-676.
14. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 562-573.
15. Lehoux S, Tedgui A. Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J Biomech* 2003; 36: 631-643.

16. Lin J, Lopez EF, Jin Y, Van Remmen H, Bauch T, Han HC, Lindsey ML. Age-related cardiac muscle sarcopenia: Combining experimental and mathematical modeling to identify mechanisms. *Exp Gerontol* 2008; 43: 296-306.
17. Boutouyrie P, Laurent S, Girerd X, Benetos A, Lacolley P, Abergel E, Safar M. Common carotid artery stiffness and patterns of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Hypertension* 1995; 25: 651-659.
18. Safar ME, Benetos A. Factors influencing arterial stiffness in systolic hypertension in the elderly: role of sodium and the renin-angiotensin system. *Am J Hypertens* 2003; 16: 249-258.
19. Martinez-Lemus LA, Wu X, Wilson E, Hill MA, Davis GE, Davis MJ, Meininger GA. Integrins as unique receptors for vascular control. *J Vasc Res* 2003; 40: 211-233.
20. Williams B, Lacy PS, Thom SM, Cruickshank K, Stanton A, Collier D, Hughes AD, Thurston H, O'Rourke M. Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study. *Circulation* 2006; 113: 1213-1225.
21. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006; 27: 2588-2605.
22. MacKenzie SM, Connell JM, Davies E. Non-adrenal synthesis of aldosterone: a reality check. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 350: 163-167.
23. Aguilera G. Factors controlling steroid biosynthesis in the zona glomerulosa of the adrenal. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 45: 147-151.
24. Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, Fay R, Nuee J, Ketelslegers JM, Vincent J, Pitt B, Zannad F. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study. *Circulation* 2009; 119: 2471-2479.
25. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 2000; 102: 2700-2706.
26. Farman N. Molecular and cellular determinants of mineralocorticoid selectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; 8: 45-51.

27. Farman N, Bocchi B. Mineralocorticoid selectivity: molecular and cellular aspects. *Kidney Int* 2000; 57: 1364-1369.
28. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83: 835-839.
29. Rogerson FM, Fuller PJ. Mineralocorticoid action. *Steroids* 2000; 65: 61-73.
30. Broden CC. Acute renal failure and mechanical ventilation: reality or myth? *Crit Care Nurse* 2009; 29: 62-75; quiz 76.
31. Gomez Sanchez EP. What is the role of the central nervous system in mineralocorticoid hypertension? *Am J Hypertens* 1991; 4: 374-381.
32. Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 1992; 120: 893-901.
33. Young M, Fullerton M, Dilley R, Funder J. Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 1994; 93: 2578-2583.
34. Wehling M, Neylon CB, Fullerton M, Bobik A, Funder JW. Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; 76: 973-979.
35. Christ M, Gunther A, Heck M, Schmidt BM, Falkenstein E, Wehling M. Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1999; 99: 1485-1491.
36. Arima S, Kohagura K, Xu HL, Sugawara A, Abe T, Satoh F, Takeuchi K, Ito S. Nongenomic vascular action of aldosterone in the glomerular microcirculation. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2255-2263.
37. Liu SL, Schmuck S, Chorazczyewski JZ, Gros R, Feldman RD. Aldosterone regulates vascular reactivity: short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation. *Circulation* 2003; 108: 2400-2406.
38. Uhrenholt TR, Schjerning J, Hansen PB, Norregaard R, Jensen BL, Sorensen GL, Skott O. Rapid inhibition of vasoconstriction in renal afferent arterioles by aldosterone. *Circ Res* 2003; 93: 1258-1266.
39. Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S, Schiffrin EL. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension* 2005; 45: 773-779.
40. Duprez D, De Buyzere M, Rietzschel ER, Clement DL. Aldosterone and vascular damage. *Curr Hypertens Rep* 2000; 2: 327-334.

41. Brown NJ. Aldosterone and vascular inflammation. *Hypertension* 2008; 51: 161-167.
42. Robert V, Silvestre JS, Charlemagne D, Sabri A, Trouve P, Wassef M, Swynghedauw B, Delcayre C. Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension* 1995; 26: 971-978.
43. Safar ME, Millasseau S, Mahmud A, Blacher J. Relations between large artery structure and function and aldosterone. *J Hypertens* 2011; 29: 1676-1683.
44. Young MJ, Rickard AJ. Mechanisms of mineralocorticoid salt-induced hypertension and cardiac fibrosis. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 350: 248-255.
45. Sigurdsson A, Held P, Swedberg K. Short- and long-term neurohormonal activation following acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1993; 126: 1068-1076.
46. Anand IS, Ferrari R, Kalra GS, Wahi PL, Poole-Wilson PA, Harris PC. Edema of cardiac origin. Studies of body water and sodium, renal function, hemodynamic indexes, and plasma hormones in untreated congestive cardiac failure. *Circulation* 1989; 80: 299-305.
47. Swedberg K, Eneroth P, Kjeksus J, Wilhelmsen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation* 1990; 82: 1730-1736.
48. Bohm M, Voors AA, Ketelslegers JM, Schirmer SH, Turgonyi E, Bramlage P, Zannad F. Biomarkers: optimizing treatment guidance in heart failure. *Clin Res Cardiol* 2011; 100: 973-981.
49. Brilla CG. Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz* 2000; 25: 299-306.
50. Lacolley P, Labat C, Pujol A, Delcayre C, Benetos A, Safar M. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone. *Circulation* 2002; 106: 2848-2853.
51. Struthers AD, MacDonald TM. Review of aldosterone- and angiotensin II-induced target organ damage and prevention. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 663-670.
52. Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 174-180.
53. MacFadyen RJ, Barr CS, Struthers AD. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 30-34.

54. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 1991; 83: 1849-1865.
55. Duprez DA, De Buyzere ML, Rietzschel ER, Taes Y, Clement DL, Morgan D, Cohn JN. Inverse relationship between aldosterone and large artery compliance in chronically treated heart failure patients. *Eur Heart J* 1998; 19: 1371-1376.
56. Varki A. Essentials of Glycobiology, 2nd edition. *Cold Spring Harbor* 2009.
57. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76: 597-598.
58. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994; 269: 20807-20810.
59. Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* 1993; 3: 297-304.
60. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473: 172-185.
61. Mehul B, Hughes RC. Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 10): 1169-1178.
62. Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 1213-1217.
63. Hsu DK, Yang RY, Liu FT. Galectins in apoptosis. *Methods Enzymol* 2006; 417: 256-273.
64. Patterson RJ, Wang W, Wang JL. Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus. *Glycoconj J* 2004; 19: 499-506.
65. Vyakarnam A, Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4730-4737.
66. Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1673: 75-93.
67. Wang L, Inohara H, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 is a nuclear matrix protein which binds RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217: 292-303.
68. Yang RY, Liu FT. Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 267-276.

69. Zanetta JP. Structure and functions of lectins in the central and peripheral nervous system. *Acta Anat (Basel)* 1998; 161: 180-195.
70. Almkvist J, Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J* 2004; 19: 575-581.
71. Brewer CF. Thermodynamic binding studies of galectin-1, -3 and -7. *Glycoconj J* 2004; 19: 459-465.
72. Dennis JW, Pawling J, Cheung P, Partridge E, Demetriou M. UDP-N-acetylglucosamine:alpha-6-D-mannoside beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1573: 414-422.
73. Lowe JB. Glycosylation, immunity, and autoimmunity. *Cell* 2001; 104: 809-812.
74. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol* 2002; 23: 313-320.
75. Rabinovich GA, Gruppi A. Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunol* 2005; 27: 103-114.
76. Rabinovich GA, Toscano MA, Ilarregui JM, Rubinstein N. Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses. *Glycoconj J* 2004; 19: 565-573.
77. Califice S, Castronovo V, Van Den Brule F. Galectin-3 and cancer (Review). *Int J Oncol* 2004; 25: 983-992.
78. Cooper DN, Barondes SH. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology* 1999; 9: 979-984.
79. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 2001; 83: 667-676.
80. Liu FT. Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136: 385-400.
81. Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med (Berl)* 1998; 76: 402-412.
82. Rabinovich GA. Galectin-1 as a potential cancer target. *Br J Cancer* 2005; 92: 1188-1192.
83. Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 274-284.
84. van den Brule F, Califice S, Castronovo V. Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J* 2004; 19: 537-542.

85. Barrionuevo P, Beigier-Bompadre M, Ilarregui JM, Toscano MA, Bianco GA, Isturiz MA, Rabinovich GA. A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. *J Immunol* 2007; 178: 436-445.
86. Rabinovich GA, Ariel A, Hershkovich R, Hirabayashi J, Kasai KI, Lider O. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology* 1999; 97: 100-106.
87. Rabinovich GA, Riera CM, Sotomayor CE. Galectin-1, an alternative signal for T cell death, is increased in activated macrophages. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 557-567.
88. Rabinovich GA, Sotomayor CE, Riera CM, Bianco I, Correa SG. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1331-1339.
89. Hirashima M, Kashio Y, Nishi N, Yamauchi A, Imaizumi TA, Kageshita T, Saita N, Nakamura T. Galectin-9 in physiological and pathological conditions. *Glycoconj J* 2004; 19: 593-600.
90. Wada J, Kanwar YS. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *J Biol Chem* 1997; 272: 6078-6086.
91. Raz A, Lotan R. Lectin-like activities associated with human and murine neoplastic cells. *Cancer Res* 1981; 41: 3642-3647.
92. Sato S, Hughes RC. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polygalactosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J Biol Chem* 1992; 267: 6983-6990.
93. Sparrow CP, Leffler H, Barondes SH. Multiple soluble beta-galactoside-binding lectins from human lung. *J Biol Chem* 1987; 262: 7383-7390.
94. Dumic J, Dabelic S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 616-635.
95. Huflejt ME, Turck CW, Lindstedt R, Barondes SH, Leffler H. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I. *J Biol Chem* 1993; 268: 26712-26718.
96. Mazurek N, Conklin J, Byrd JC, Raz A, Bresalier RS. Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *J Biol Chem* 2000; 275: 36311-36315.
97. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6737-6742.

98. Yang RY, Hill PN, Hsu DK, Liu FT. Role of the carboxyl-terminal lectin domain in self-association of galectin-3. *Biochemistry* 1998; 37: 4086-4092.
99. Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* 2005; 10: 267-275.
100. Ahmad N, Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R, Liu B, Macaluso F, Brewer CF. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem* 2004; 279: 10841-10847.
101. Nieminen J, Kuno A, Hirabayashi J, Sato S. Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 2007; 282: 1374-1383.
102. Cherayil BJ, Weiner SJ, Pillai S. The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE. *J Exp Med* 1989; 170: 1959-1972.
103. Craig SS, Krishnaswamy P, Irani AM, Kepley CL, Liu FT, Schwartz LB. Immunoelectron microscopic localization of galectin-3, an IgE binding protein, in human mast cells and basophils. *Anat Rec* 1995; 242: 211-219.
104. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR, Jr. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol* 1995; 147: 1016-1028.
105. Sato S, Burdett I, Hughes RC. Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Exp Cell Res* 1993; 207: 8-18.
106. Sato S, Hughes RC. Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *J Biol Chem* 1994; 269: 4424-4430.
107. Sato S, Hughes RC. Control of Mac-2 surface expression on murine macrophage cell lines. *Eur J Immunol* 1994; 24: 216-221.
108. Sato S, Nieminen J. Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj J* 2004; 19: 583-591.
109. Wollenberg A, de la Salle H, Hanau D, Liu FT, Bieber T. Human keratinocytes release the endogenous beta-galactoside-binding soluble lectin immunoglobulin E (IgE-binding protein) which binds to Langerhans cells where it modulates their binding capacity for IgE glycoforms. *J Exp Med* 1993; 178: 777-785.

110. Menon RP, Hughes RC. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Eur J Biochem* 1999; 264: 569-576.
111. Hsu DK, Dowling CA, Jeng KC, Chen JT, Yang RY, Liu FT. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1999; 81: 519-526.
112. Ohshima S, Kuchen S, Seemayer CA, Kyburz D, Hirt A, Klinzing S, Michel BA, Gay RE, Liu FT, Gay S, Neidhart M. Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2788-2795.
113. Pugliese G, Pricci F, Leto G, Amadio L, Iacobini C, Romeo G, Lenti L, Sale P, Gradini R, Liu FT, Di Mario U. The diabetic milieu modulates the advanced glycation end product-receptor complex in the mesangium by inducing or upregulating galectin-3 expression. *Diabetes* 2000; 49: 1249-1257.
114. Sato S, Ouellet N, Pelletier I, Simard M, Rancourt A, Bergeron MG. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *J Immunol* 2002; 168: 1813-1822.
115. van den Berg TK, Honing H, Franke N, van Remoortere A, Schiphorst WE, Liu FT, Deelder AM, Cummings RD, Hokke CH, van Die I. LacdiNAc-glycans constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition. *J Immunol* 2004; 173: 1902-1907.
116. Vray B, Camby I, Vercruysse V, Mijatovic T, Bovin NV, Ricciardi-Castagnoli P, Kaltner H, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R. Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. *Glycobiology* 2004; 14: 647-657.
117. Zuberi RI, Frigeri LG, Liu FT. Activation of rat basophilic leukemia cells by epsilon BP, an IgE-binding endogenous lectin. *Cell Immunol* 1994; 156: 1-12.
118. Kim H, Lee J, Hyun JW, Park JW, Joo HG, Shin T. Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. *Cell Biol Int* 2007; 31: 655-662.
119. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, Andre S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 2004; 110: 3121-3128.

120. Arar C, Gaudin JC, Capron L, Legrand A. Galectin-3 gene (LGALS3) expression in experimental atherosclerosis and cultured smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1998; 430: 307-311.
121. Nachtigal M, Al-Assaad Z, Mayer EP, Kim K, Monsigny M. Galectin-3 expression in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1998; 152: 1199-1208.
122. Papaspyridonos M, McNeill E, de Bono JP, Smith A, Burnand KG, Channon KM, Greaves DR. Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 433-440.
123. Seki N, Hashimoto N, Sano H, Horiuchi S, Yagui K, Makino H, Saito Y. Mechanisms involved in the stimulatory effect of advanced glycation end products on growth of rat aortic smooth muscle cells. *Metabolism* 2003; 52: 1558-1563.
124. Liu YH, D'Ambrosio M, Liao TD, Peng H, Rhaleb NE, Sharma U, Andre S, Gabius HJ, Carretero OA. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H404-412.
125. Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW. The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol* 2008; 172: 545-553.
126. Wan SY, Zhang TF, Ding Y. Galectin-3 enhances proliferation and angiogenesis of endothelial cells differentiated from bone marrow mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2011; 43: 3933-3938.
127. Okamura DM, Pasichnyk K, Lopez-Guisa JM, Collins S, Hsu DK, Liu FT, Eddy AA. Galectin-3 preserves renal tubules and modulates extracellular matrix remodeling in progressive fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300: F245-253.
128. Kiwaki K, Novak CM, Hsu DK, Liu FT, Levine JA. Galectin-3 stimulates preadipocyte proliferation and is up-regulated in growing adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15: 32-39.
129. Lee YJ, Song YK, Song JJ, Siervo-Sassi RR, Kim HR, Li L, Spitz DR, Lokshin A, Kim JH. Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt. *Exp Cell Res* 2003; 288: 21-34.
130. Oka N, Nakahara S, Takenaka Y, Fukumori T, Hogan V, Kanayama HO, Yanagawa T, Raz A. Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-

- induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 7546-7553.
131. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, Liu FT, Hughes J, Sethi T. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol* 2008; 172: 288-298.
 132. Ge XN, Bahaie NS, Kang BN, Hosseinkhani MR, Ha SG, Frenzel EM, Liu FT, Rao SP, Sriramarao P. Allergen-induced airway remodeling is impaired in galectin-3-deficient mice. *J Immunol* 2010; 185: 1205-1214.
 133. Fukushi J, Makagiansar IT, Stallcup WB. NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 3580-3590.
 134. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 2004; 19: 527-535.
 135. Kuwabara I, Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol* 1996; 156: 3939-3944.
 136. Lee EC, Woo HJ, Korzelius CA, Steele GD, Jr., Mercurio AM. Carbohydrate-binding protein 35 is the major cell-surface laminin-binding protein in colon carcinoma. *Arch Surg* 1991; 126: 1498-1502.
 137. Lin JJ, Partin J, Kaskel FJ. Changes in laminin during recovery from postischemic acute renal failure in rats. *Exp Nephrol* 1996; 4: 279-285.
 138. Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res* 1997; 57: 5272-5276.
 139. Hsu DK, Liu FT. Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj J* 2004; 19: 507-515.
 140. Lin HM, Moon BK, Yu F, Kim HR. Galectin-3 mediates genistein-induced G(2)/M arrest and inhibits apoptosis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1941-1945.
 141. Davidson PJ, Davis MJ, Patterson RJ, Ripoché MA, Poirier F, Wang JL. Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glycobiology* 2002; 12: 329-337.
 142. Davidson PJ, Li SY, Lohse AG, Vandergaast R, Verde E, Pearson A, Patterson RJ, Wang JL, Arnoys EJ. Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. I. Conditions and signals for nuclear import. *Glycobiology* 2006; 16: 602-611.

143. Openo KP, Kadrofske MM, Patterson RJ, Wang JL. Galectin-3 expression and subcellular localization in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res* 2000; 255: 278-290.
144. Smetana K, Jr., Dvorankova B, Chovanec M, Boucek J, Klima J, Motlik J, Lensch M, Kaltner H, Andre S, Gabius HJ. Nuclear presence of adhesion-/growth-regulatory galectins in normal/malignant cells of squamous epithelial origin. *Histochem Cell Biol* 2006; 125: 171-182.
145. Weinberger PM, Adam BL, Gourin CG, Moretz WH, 3rd, Bollag RJ, Wang BY, Liu Z, Lee JR, Terris DJ. Association of nuclear, cytoplasmic expression of galectin-3 with beta-catenin/Wnt-pathway activation in thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 133: 503-510.
146. de Boer RA, Voors AA, Muntendam P, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 811-817.
147. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 555-564.
148. Glinsky VV, Raz A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydr Res* 2009; 344: 1788-1791.
149. Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 2001; 57: 929-967.
150. Gunning AP, Bongaerts RJ, Morris VJ. Recognition of galactan components of pectin by galectin-3. *FASEB J* 2009; 23: 415-424.
151. Kolatsi-Joannou M, Price KL, Winyard PJ, Long DA. Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury. *PLoS One* 2011; 6: e18683.
152. Liu HY, Huang ZL, Yang GH, Lu WQ, Yu NR. Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 7386-7391.
153. Matarrese P, Fusco O, Tinari N, Natoli C, Liu FT, Semeraro ML, Malorni W, Iacobelli S. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int J Cancer* 2000; 85: 545-554.

154. Pelletier I, Sato S. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. *J Biol Chem* 2002; 277: 17663-17670.
155. Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J Immunol* 1995; 154: 3479-3487.
156. Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156: 899-909.
157. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M, Liu FT. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol* 2000; 165: 2156-2164.
158. Karlsson A, Follin P, Leffler H, Dahlgren C. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. *Blood* 1998; 91: 3430-3438.
159. Nieminen J, St-Pierre C, Sato S. Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1127-1135.
160. Hsu DK, Zuberi RI, Liu FT. Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *J Biol Chem* 1992; 267: 14167-14174.
161. Ahmad N, Gabius HJ, Sabesan S, Oscarson S, Brewer CF. Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *Glycobiology* 2004; 14: 817-825.
162. Colnot C, Fowles D, Ripoché MA, Bouchaert I, Poirier F. Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. *Dev Dyn* 1998; 211: 306-313.
163. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, Liu FT. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol* 2000; 156: 1073-1083.
164. Nachtigal M, Ghaffar A, Mayer EP. Galectin-3 gene inactivation reduces atherosclerotic lesions and adventitial inflammation in ApoE-deficient mice. *Am J Pathol* 2008; 172: 247-255.
165. Markowska AI, Liu FT, Panjwani N. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J Exp Med* 2010; 207: 1981-1993.
166. Iacobini C, Menini S, Oddi G, Ricci C, Amadio L, Pricci F, Olivieri A, Sorcini M, Di Mario U, Pesce C, Pugliese G. Galectin-3/AGE-receptor 3 knockout mice show

- accelerated AGE-induced glomerular injury: evidence for a protective role of galectin-3 as an AGE receptor. *FASEB J* 2004; 18: 1773-1775.
167. Lathia CD, Amakye D, Dai W, Girman C, Madani S, Mayne J, MacCarthy P, Pertel P, Seman L, Stoch A, Tarantino P, Webster C, Williams S, Wagner JA. The value, qualification, and regulatory use of surrogate end points in drug development. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 86: 32-43.
 168. Marcovina SM, Crea F, Davignon J, Kaski JC, Koenig W, Landmesser U, Pieri PL, Schulz-Menger J, Shaw LJ, Sobesky J. Biochemical and bioimaging markers for risk assessment and diagnosis in major cardiovascular diseases: a road to integration of complementary diagnostic tools. *J Intern Med* 2007; 261: 214-234.
 169. May A, Wang TJ. Biomarkers for cardiovascular disease: challenges and future directions. *Trends Mol Med* 2008; 14: 261-267.
 170. Wagner JA. Biomarkers: principles, policies, and practice. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 86: 3-7.
 171. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95.
 172. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* 2008; 358: 2148-2159.
 173. Kotlyar E, Vita JA, Winter MR, Awtry EH, Siwik DA, Keaney JF, Jr., Sawyer DB, Cupples LA, Colucci WS, Sam F. The relationship between aldosterone, oxidative stress, and inflammation in chronic, stable human heart failure. *J Card Fail* 2006; 12: 122-127.
 174. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res* 2002; 91: 988-998.
 175. Mann DL. Tumor necrosis factor-induced signal transduction and left ventricular remodeling. *J Card Fail* 2002; 8: S379-386.
 176. Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Frampton C, Espiner EA, Turner JG, Buttimore RC, Lainchbury JG, Elliott JM, Ikram H, Crozier IG, Smyth DW. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 1998; 97: 1921-1929.
 177. van Kimmenade RR, Januzzi JL, Jr., Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, Martinez A, Crijns HJ, MacRae CA, Menheere PP, Pinto YM. 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* 2006; 48: 1217-1224.

178. de Boer RA, van Veldhuisen DJ, Gansevoort RT, Muller Kobold AC, van Gilst WH, Hillege HL, Bakker SJ, van der Harst P. The fibrosis marker galectin-3 and outcome in the general population. *J Intern Med* 2011.
179. Lok DJ, Van Der Meer P, de la Porte PW, Lipsic E, Van Wijngaarden J, Hillege HL, van Veldhuisen DJ. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. *Clin Res Cardiol* 2010; 99: 323-328.
180. Felker GM, Fiuzat M, Shaw LK, Clare R, Whellan DJ, Bettari L, Shirolkar SC, Donahue M, Kitzman DW, Zannad F, Pina IL, O'Connor CM. Galectin-3 in ambulatory patients with heart failure: results from the HF-ACTION study. *Circ Heart Fail* 2012; 5: 72-78.
181. Jaarsma T, Van Der Wal MH, Hogenhuis J, Lesman I, Luttk ML, Veeger NJ, Van Veldhuisen DJ. Design and methodology of the COACH study: a multicenter randomised Coordinating study evaluating Outcomes of Advising and Counselling in Heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 227-233.
182. Jaarsma T, van der Wal MH, Lesman-Leege I, Luttk ML, Hogenhuis J, Veeger NJ, Sanderman R, Hoes AW, van Gilst WH, Lok DJ, Dunselman PH, Tijssen JG, Hillege HL, van Veldhuisen DJ. Effect of moderate or intensive disease management program on outcome in patients with heart failure: Coordinating Study Evaluating Outcomes of Advising and Counseling in Heart Failure (COACH). *Arch Intern Med* 2008; 168: 316-324.
183. Lopez-Andres N, Rossignol P, Iraqi W, Fay R, Nuee J, Ghio S, Cleland JG, Zannad F, Lacolley P. Association of galectin-3 and fibrosis markers with long-term cardiovascular outcomes in patients with heart failure, left ventricular dysfunction, and dyssynchrony: insights from the CARE-HF (Cardiac Resynchronization in Heart Failure) trial. *Eur J Heart Fail* 2012; 14: 74-81.
184. Lopez-Andres N, Martin-Fernandez B, Rossignol P, Zannad F, Lahera V, Fortuno MA, Cachofeiro V, Diez J. A role for cardiotrophin-1 in myocardial remodeling induced by aldosterone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: H2372-2382.
185. Lopez-Andres N, Inigo C, Gallego I, Diez J, Fortuno MA. Aldosterone induces cardiotrophin-1 expression in HL-1 adult cardiomyocytes. *Endocrinology* 2008; 149: 4970-4978.

186. Fujikura H, Seko Y, Tokoro T, Mochizuki M, Shimokawa H. Involvement of mechanical stretch in the gelatinolytic activity of the fibrous sclera of chicks, in vitro. *Jpn J Ophthalmol* 2002; 46: 24-30.
187. Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY. Gelatin zymography and substrate cleavage assays of matrix metalloproteinase-2 in breast carcinoma cells overexpressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Lab Invest* 2002; 82: 1583-1590.
188. Huang W, Alhenc Gelas F, Osborne-Pellegrin MJ. Protection of the arterial internal elastic lamina by inhibition of the renin-angiotensin system in the rat. *Circ Res* 1998; 82: 879-890.
189. Gekle M, Mildenerger S, Freudinger R, Grossmann C. Altered collagen homeostasis in human aortic smooth muscle cells (HAoSMCs) induced by aldosterone. *Pflugers Arch* 2007; 454: 403-413.
190. Bunda S, Liu P, Wang Y, Liu K, Hinek A. Aldosterone induces elastin production in cardiac fibroblasts through activation of insulin-like growth factor-I receptors in a mineralocorticoid receptor-independent manner. *Am J Pathol* 2007; 171: 809-819.
191. Bunda S, Wang Y, Mitts TF, Liu P, Arab S, Arabkhari M, Hinek A. Aldosterone stimulates elastogenesis in cardiac fibroblasts via mineralocorticoid receptor-independent action involving the consecutive activation of Galpha13, c-Src, the insulin-like growth factor-I receptor, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Biol Chem* 2009; 284: 16633-16647.
192. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kuhl U, Schultheiss HP. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 1999; 99: 2750-2756.
193. Briones AM, Arribas SM, Salaices M. Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010; 19: 187-194.
194. Bornstein P, McKay J, Morishima JK, Devarayalu S, Gelinas RE. Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human alpha 1(I) collagen gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 8869-8873.
195. Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene* 2002; 21: 8001-8010.
196. Fukuda S, Horimai C, Harada K, Wakamatsu T, Fukasawa H, Muto S, Itai A, Hayashi M. Aldosterone-induced kidney injury is mediated by NFkappaB activation. *Clin Exp Nephrol* 2011; 15: 41-49.

197. Chen CH, Sheu MT, Chen TF, Wang YC, Hou WC, Liu DZ, Chung TC, Liang YC. Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1001-1009.
198. Brilla CG PR, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res.* 1990; 67: 1355-1364.
199. Pu Q, Neves MF, Viridis A, Touyz RM, Schiffrin EL. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension* 2003; 42: 49-55.
200. Park JB, Schiffrin EL. ET(A) receptor antagonist prevents blood pressure elevation and vascular remodeling in aldosterone-infused rats. *Hypertension* 2001; 37: 1444-1449.
201. Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Muiesan P, Giulini SM, Agabiti-Rosei E. Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension* 1996; 28: 785-790.
202. Cachofeiro V, Miana M, de Las Heras N, Martin-Fernandez B, Ballesteros S, Fernandez-Tresguerres J, Lahera V. Aldosterone and the vascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 109: 331-335.

VII. Article associé

GALECTIN-3 MEDIATES ALDOSTERONE-INDUCED VASCULAR FIBROSIS

Authors: Calvier Laurent ¹, Miana Maria ², Reboul Pascal ³, Cachofeiro Victoria ², Martinez-Martinez Ernesto ², de Boer Rudolf A. ⁴, Poirier Françoise ⁵, Lacolley Patrick ¹, Zannad Faiez ^{1,6}, Rossignol Patrick ^{1,6}, López-Andrés Natalia ¹

Affiliations: ¹ INSERM, Université de Lorraine UMR 961, Vandoeuvre-Lès-Nancy, F-54500, France. ² Universidad complutense de Madrid, Madrid, Spain. ³ CNRS, Université de Lorraine UMR 7561, Vandoeuvre-Lès-Nancy, F-54500, France. ⁴ Department of Cardiology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, the Netherlands. ⁵ CNRS, Paris-Diderot University, UMR 7592, Paris, F-75000, France. ⁶ CHU Nancy, Inserm clinical investigation center, CIC 9501. Vandoeuvre-Lès-Nancy, F-54500, France.

First author's surname and short title: Calvier - Gal-3 mediates Aldo-induced vascular fibrosis

Corresponding Author:

Dr Natalia López-Andrés

Inserm, U961. Faculty of Medicine.

Université de Lorraine.

Vandoeuvre-lès-Nancy

Tel: +33 (0)3 83 68 36 25

Fax : +33 (0)3 83 68 36 39

e-mail: nlopand@alumni.unav.es

Word count of body: 6236

Word count of abstract: 192

Total number of figures and tables: 6

ABSTRACT

Background. Aldosterone (Aldo) is involved in arterial stiffness and heart failure (HF), but the mechanisms have remained unclear. Galectin-3 (Gal-3), a β -galactoside-binding lectin, plays an important role in inflammation, fibrosis and HF. We investigated here whether Gal-3 is involved in Aldo-induced vascular fibrosis.

Methods and Results. In rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) Gal-3 over-expression enhanced specifically collagen type I synthesis. Moreover Gal-3 inhibition by modified citrus pectin (MCP) or siRNA blocked Aldo-induced collagen type I synthesis. Rats were treated with Aldo-salt combined with spironolactone or modified citrus pectin (MCP) for 3 weeks. Hypertensive Aldo-treated rats presented vascular hypertrophy, inflammation, fibrosis and increased aortic Gal-3 expression. Spironolactone or MCP treatment reversed all the above effects. Wild type (WT) and Gal-3 knock-out (KO) mice were treated with Aldo for 6 hours or 3 weeks. Aldo increased aortic Gal-3 expression, inflammation and collagen type I in WT mice at both the short- and the long-term, whereas no changes occurred in Gal-3 KO mice.

Conclusions. Our data indicate that Gal-3 is required for inflammatory and fibrotic responses to Aldo in VSMCs *in vitro* and *in vivo*, suggesting a key role for Gal-3 in vascular fibrosis.

Keywords: Galectin-3, aldosterone, VSMCs, fibrosis, collagen type I

Aldosterone (Aldo), a mineralocorticoid hormone that acts classically via an intracellular mineralocorticoid receptor (MR), is a well known key regulator of blood pressure (BP) and electrolytic balance ¹. A growing body of clinical and pre-clinical evidence suggests that Aldo plays an important pathophysiological role in cardiovascular remodeling and diseases by promoting changes involving cardiac hypertrophy, fibrosis, arterial stiffness, as well as in inflammation and oxidative stress ²⁻⁶. Aldosterone increases inflammation through an MR-dependent pathway both *in vitro* and *in vivo* ^{3,7}. Concerning fibrosis, evidence from animal experiments as well as RALES and EPHEsus studies in patients with heart failure (HF) (with or without previous myocardial infarction) suggest that chronic MR blockade reduces markedly blood collagen peptides. These peptides are the biological markers of cardiovascular fibrosis, suggesting that Aldo is an important determinant of cardiovascular collagen turnover ⁸⁻¹⁰. In rats, Aldo infusion concomitantly with a high-sodium intake, increases arterial stiffness with development of extracellular matrix (ECM) protein synthesis and inflammation ¹¹. These findings are reinforced at the cellular level in vascular smooth muscle cells (VSMCs) where Aldo increases collagen synthesis via MR ^{3,12}. Taken together, the published data indicate the potential contribution of Aldo in vascular remodeling, acting as a collagen regulator. However, the precise mechanisms responsible for Aldo-induced collagen synthesis in VSMCs remain to be determined.

Galectin-3 (Gal-3) is a 29–35 kDa protein, member of a β -galactoside binding lectin family. It is present in the cytoplasm, nucleus, extracellular space, and bound to the cell surface ¹³. It is composed of a highly conserved N-terminal domain, which is required for its multimerization or for binding unglycosylated molecules ¹⁴, and a C-terminal carbohydrate recognition domain (CRD), which interacts preferentially with glycoproteins (extracellular and at the cell surface) ¹⁵. It has been proposed that Gal-3 interacts with numerous ligands such as cell surface receptors (integrins) and ECM proteins (collagen, elastin, fibronectin) ¹⁶.

The expression of Gal-3 has been reported in many tissues¹⁷ (including myocardium). Gal-3 is expressed in fibroblasts¹⁸, endothelial cells^{19,20} and inflammatory cells such as macrophages²¹ which appear to be involved in most models of injury.

This lectin is involved in numerous physiological and pathological processes some of which, inflammation and fibrosis, are pivotal contributing to pathophysiological mechanisms in the development and progression of arterial stiffness. Indeed, it has been demonstrated that Gal-3 is a central contributor to the pathology of atherosclerotic plaque progression by amplification of key pro-inflammatory molecules in the aorta²¹. Moreover, Gal-3 is associated with cardiac dysfunction through induction of cardiac fibroblast proliferation, collagen deposition, and ventricular dysfunction^{18,22}. However, its vascular effects have never been investigated. Previous studies have demonstrated that several cytokines (interleukin-2, -4 and -7) regulate Gal-3 expression in T lymphocytes²³. Of particular interest was the finding that myocardial Gal-3 expression was enhanced in Ren-2 rats and in angiotensin-II-treated mice¹⁸, suggesting a role for the renin-angiotensin system in Gal-3 regulation. Indeed, it has been recently demonstrated that angiotensin II stimulates Gal-3 expression in cardiac myofibroblasts²⁴. Several inhibitors of Gal-3 have been well described, such as lactose, N-Acetyl-D-lactosamine (LacNac) and the modified citrus pectin²⁵ (MCP, a complex water soluble indigestible polysaccharide rich in β -galactose). MCP contains fragments of the original pectin molecule, including rhamnogalacturonan 1 regions which contain galactan side-chains²⁶ which are recognized CRD of galectin-3^{27,28} with a high affinity and block the lectin's activity. These inhibitors have been used to determine the role of Gal-3 in cell migration and adhesion as well as in a metastasis model^{29,30}. In humans, plasma Gal-3 emerges as a biomarker associated with HF onset, morbidity and mortality³¹.

Therefore, our hypothesis was that Gal-3 may be a new important factor inducing not only cardiac, but also vascular remodeling via facilitating collagen synthesis in VSMCs. Moreover,

we propose that this lectin could be involved in Aldo-induced vascular fibrosis. The aim of this study was to investigate the expression and the effects of Gal-3 in VSMCs and to determine whether Gal-3 could be a mediator of Aldo effects in VSMCs *in vitro* and *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Detailed Materials and Methods are available in the online-only Data Supplement.

Animals

The investigation was performed in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (publication no. 82-23, revised in 1996).

For the Aldo+salt model, adult male Wistar rats were treated for 3 weeks with vehicle (n=10), Aldo-salt (1 mg/kg/day, n=10 and 1% NaCl as drinking water), Aldo-salt plus Spironolactone (Spiro) (200 mg/kg/day, n=10), Aldo-salt plus MCP (100 mg/kg/day, n=9), Spiro (n=7) or MCP (n=5) alone. The model and the dose of Aldo were chosen from previous studies in which the treatment increased systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP)³².

As described previously³³, to analyze short-term effects of Aldo, adult male C57BJ6 wild-type mice and Gal-3 KO mice³⁴ received one intraperitoneal injection of Aldo (0.1 ml injected, 1 mg/kg) or vehicle (0.1 ml injected, 150 mmol/liter NaCl, 5% ethanol) (n = 6, each group). Tail cuff blood pressure was measured 12 h before and 6 h after injection. Animals were sacrificed 6 h after the injection. To analyze long-term effects of Aldo, adult male C57BJ6 wild-type mice and Gal-3 KO mice³⁴ were infused for 3 weeks with Aldo (1 mg/kg/day) or vehicle (150 mmol/liter NaCl, 5% ethanol) using an osmotic minipump (Alzet) (n = 7, each group). Tail cuff blood pressure was monitored throughout the treatment.

VSMCs Isolation and culture

Primary rat aortic VSMCs were isolated from the thoracic aorta of male Wistar rats as described previously³⁵. VSMCs were stimulated with Aldo at 10^{-8} mol/liter and inhibitors at 10^{-6} mol/liter. Transient transfections with plasmid were performed in VSMCs by XtremGENE9 (Roche) according to the manufacturer's recommendations, with a vector construct containing either the recombinant human full-length sequence of Gal-3 (rhGal-3)

and cloned in pcDNA3.1 plasmid (Invitrogen) or a sequence coding for a truncated form of recombinant human Gal-3 (coding amino acids 104 to 250; rhCRD) and an empty vector was used as control. Transfection of VSMCs with siRNA was realized with Gal-3 mRNA target-specific and using MATra-si (IBA) according to the manufacturer's recommendations, and scramble siRNAs were used as control.

Statistics

Results are presented as mean \pm SEM, computed from the average measurements obtained from each group of cells or animals. Normal distribution of data was checked by means of the Shapiro Willks test and a Levene statistic test was performed to check the homogeneity of variances. Differences among more than 2 experimental conditions were tested by the ANOVA one way test, followed by the Scheffé test to analyze differences between groups. The unpaired Student's t test or the Mann Whitney U test were used to assess statistical differences between two experimental conditions. P values lower than 0.05 were considered significant. A sensitivity analysis adjusting for BP variations in the rat model was also performed, using a two way ANOVA.

RESULTS

Aldo induced Gal-3 up-regulation.

Gal-3 expression was detected at the mRNA and the protein levels in primary cultured quiescent VSMCs (Figure 1) and was localized in the perinuclear area (data not shown).

Treatment with Aldo increased Gal-3 protein levels in a concentration-dependent manner in primary VSMC cultures. This increase was significant compared to the control for the two concentrations of Aldo, 10^{-9} M (2.3-fold, $p < 0.05$) and 10^{-8} M (3.6-fold, $p < 0.05$) (Figure 1A).

Time-course examination showed that induction of Gal-3 expression by Aldo started at 12h (1.6-fold) and peaked significantly at 24 h (2.3-fold, $p < 0.05$) (Figure 1B).

We investigated next the involvement of MR in Aldo-induced Gal-3 up-regulation. Both eplerenone and RU28318 abolished ($p < 0.05$) Aldo-induced Gal-3 up-regulation at the mRNA and protein levels (Figure 1C and 1D). Neither eplerenone nor RU28318 affected Gal-3 levels in the absence of Aldo (data not shown).

To evaluate whether Aldo-induced Gal-3 increase involved *a-de novo* synthesis of intermediary proteins, we analyzed the effects of transcription (actinomycin D) inhibitor.

It completely inhibited ($p < 0.05$) the increase in Gal-3 mRNA (Figure 1E) and protein (Figure 1F) induced by Aldo. Actinomycin D did not affect Gal-3 levels in the absence of Aldo (data not shown).

Gal-3 over-expression induced collagen type I protein synthesis.

VSMCs were transfected with either the control vector (empty) or the vector containing rhGal-3 or rhCRD sequence (Figure 2). Cells over-expressing rhGal-3 presented both native Gal-3 (molecular weight = 30 kDa) and recombinant Gal-3 (molecular weight = 35 kDa) with a higher molecular weight compared to native due to the polyhistidine tail. As our antibody was unable to recognize the rhCRD, we have performed complementary experiments of transfection and analyzed the messengers of each rh protein by RT-PCR with primers able to

discriminate human from rat to validate the expression of the recombinant forms (data not shown). Cells over-expressing rhGal-3 exhibited increased (1.6-fold, $p < 0.05$) collagen type I deposition, without changes in collagen type III, fibronectin or elastin levels as compared to cells transfected with the empty vector. Cells over-expressing rhCRD did not show significant variation in any protein of interest.

Gal-3 inhibition blocked Aldo-induced Collagen type I deposition.

In order to investigate the role of Gal-3 in Aldo-induced ECM changes, Gal-3 silencing was used. Gal-3 siRNA reduced efficiently its target decreasing Gal-3 level (0.5-fold vs. scramble, $p < 0.05$; Figure 3A). However, Gal-3 silencing had no significant effect on ECM protein deposition at the basal level compared to the scramble. Primary VSMC cultures treated with Aldo showed a significant increase in collagen type I (1.6-fold vs. scramble, $p < 0.05$) and elastin (1.6-fold vs. scramble, $p < 0.05$). Gal-3 knockdown blocked Aldo-increased collagen type I deposition ($p < 0.05$). However, Gal-3 silencing did not modify the elastin increase induced by Aldo. Collagen type III level was not affected by Gal-3 siRNA when VSMCs were treated with Aldo. Moreover, using MR antagonists eplerenone and RU28318, Aldo-induced collagen type I expression was blocked and therefore was mediated by MR whereas elastin expression was MR independent (data not shown).

In order to confirm whether Gal-3 is necessary for Aldo to induce collagen synthesis, two Gal-3 inhibitors binding with high affinity to the sugar-recognizing site were used in primary VSMC cultures as a second experimental approach. To determine the most efficient concentration, preliminary dose-response experiments were performed for each inhibitor tested (data not shown). In accordance with our previous results, in the absence of Gal-3 inhibitors, Aldo enhanced Gal-3, collagen type I, and elastin levels as compared to control (Figure 3B). MCP and LacNac blocked Aldo-induced Gal-3 expression ($p < 0.05$). Moreover, the two inhibitors tested abrogated Aldo-induced collagen type I synthesis, whereas the elastin

increase was not blocked. Neither MCP nor LacNac incubated in the absence of Aldo affected Gal-3, collagen or elastin levels (data not shown).

Aldo-salt-induced hypertension, inflammation and vascular fibrosis were blocked by Spiro or MCP treatment in rats.

First, we used immunochemistry techniques to localize which cells express Gal-3 in the aortic tunica media (Figure 4A). Gal-3 was co-localized with α -smooth muscle actin (α -SMA), a specific marker of VSMC.

Average body weight (BW) as well as BP and heart rate (HR) for the 6 groups of rats are presented in Table 1. BW did not differ between all the groups. Aldo-salt treatment induced an increase in systolic BP (SBP), diastolic BP (DBP) and mean BP (MBP) as well as pulse pressure (PP), and a decrease in HR. Hypertension as well as the decrease in HR were prevented by Spiro and MCP treatments. All the above parameters were unaffected by Spiro or MCP without Aldo. These changes were accompanied by morphometric modifications of the aorta. Aldo-treated rats presented increased aortic media thickness (1.2-fold, $p < 0.05$) as well as aortic media cross sectional area (MCSA) (1.2-fold, $p < 0.05$) as compared to the control rats. Morphological changes were normalized by concomitant treatment with Spiro or MCP ($p < 0.05$). Both parameters were unaffected by treatment with Spiro or MCP without Aldo.

The thoracic aortic media wall composition is described in the Table 1. Dry weight per centimeter and the cell protein content were significantly increased by the Aldo-salt treatment compared with control rats, indicating that hypertrophy of the media had occurred. These significant increases were not observed under co-treatment with Spiro or MCP. The increased dry weight reflects not only the increase in VSMC content but also an increase in some extracellular components. A significant increase in collagen (2.1- fold, $p < 0.05$) and elastin (1.2-fold, $p < 0.05$) content was observed, and consequently, there was a significant increase in

the collagen to elastin ratio after Aldo-salt treatment that was corrected by both Spiro and MCP.

These results on ECM remodeling were confirmed by complementary approaches and completed by inflammatory response analysis. Aortic mRNA analysis (Figure 4B) revealed that Aldo-induced Gal-3, *coll1a1*, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and osteopontin (OPN) synthesis were inhibited by both Spiro and MCP treatment ($p < 0.05$). Aldo-induced Interleukin-6 (IL-6) synthesis was partially blocked by Spiro and completely inhibited by MCP treatment ($p < 0.05$). Aortic protein productions of Gal-3, collagens (type I and type III), elastin, MCP-1 and OPN ($p < 0.05$, Figures 4C and 4D) were enhanced by Aldo-treatment. These increases were normalized by treatment with Spiro or MCP ($p < 0.05$). Neither Spiro nor MCP treatment in the absence of Aldo affected measured protein levels (data not shown).

Sensitivity analyses were performed in order to investigate the influence of BP variations on Gal-3 and collagen expressions. SBP was found the parameter the most strongly associated with these factors. The BP component has been removed by adjustment for SBP variations and the association of Spiro with Gal-3 and collagen variations was no longer found significant. However, the effect of MCP on these factors remained significant, thereby suggesting that MCP exerted anti-Gal-3 and anti-fibrotic activities independently of BP variations.

Aldo induces the short-term expression of *coll1a1* mRNA in WT but not in KO Gal-3 mice

To complete the understanding of Gal-3 actions in Aldo-induced vascular collagen accumulation, WT and Gal-3 KO mice were challenged in a short-term model with acute exposure to Aldo. No differences in baseline aortic morphology (media thickness and MCSA) were observed between the two strains WT and KO (data not shown). No differences in BP levels were noticed between WT and KO mice at baseline or after treatment (data not shown).

Gal-3 mRNA was present in the media of aorta even under basal conditions (Figure 5A).

Moreover, Aldo-treated WT mice presented increased aortic Gal-3 (4.7-fold, $p < 0.05$), *coll1a1* (2.2-fold, $p < 0.05$) and OPN (3.9-fold, $p < 0.05$) mRNA expressions but no significant changes in *col3a1* mRNA expression. In Gal-3 KO mice, Aldo treatment did not modify *coll1a1*, *col3a1* nor OPN mRNA expressions.

Gal-3 KO mice are protected from inflammation and collagen type I deposition induced by the long-term Aldo treatment.

The treatment by Aldo of WT and Gal-3 KO mice was extended to a 3-week infusion of Aldo. This treatment did not alter BP levels in WT nor in Gal-3 KO mice (data not shown). Basal levels of *coll1a1*, *col3a1*, OPN and brain natriuretic peptide (BNP) were similar in untreated WT and Gal-3 KO mice, whereas Gal-3 KO mice presented increased bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) level as compared to WT. Aldo-treated WT mice presented increased aortic mRNA expression of Gal-3 (1.6-fold, $p < 0.05$), *coll1a1* (2.5-fold, $p < 0.05$), *col3a1* (2.1-fold, $p < 0.05$), OPN (2.7-fold, $p < 0.05$), and decreased BNP mRNA expression (0.3-fold, $p < 0.05$) (Figure 5B) as compared to control WT mice. Meanwhile, no significant changes in BMP-4 mRNA expression were observed. In Gal-3 KO mice, Aldo treatment did not modify *coll1a1*, *col3a1*, OPN, BMP-4 nor BNP mRNA expressions. Aortic Gal-3 protein concentration was increased in Aldo-treated WT mice (2.1-fold, $p < 0.05$) compared to control WT mice (Figure 5C). Aldo-treated WT mice presented increased protein expression of collagen type I (1.9-fold, $p < 0.05$) and type III (1.5-fold, $p < 0.05$), whereas Gal-3 KO mice were specifically resistant to Aldo-dependent increase in collagen type I (Figure 5D). Aldo-induced collagen type III expression was not affected in Gal-3 lacking mice. KO mice were also resistant to Aldo-induced MCP-1 and OPN expressions in the aortic tunica media (Figure 5E).

DISCUSSION

The purpose of this study was to investigate Gal-3 effects on VSMCs and its role as a mediator of Aldo-induced ECM remodeling *in vitro* and *in vivo*. We demonstrate that Gal-3 is spontaneously expressed in primary VSMCs, and its over-expression increases specifically collagen type I production. This effect depends on the multimerization of Gal-3 because only the full length and not the truncated protein (CRD) is effective. Furthermore, Aldo increases Gal-3 expression in cultured VSMCs and in aortic tunica media from rats and mice. In primary VSMC cultures and in aorta, this effect is dependent on MR activation. Additionally, the inhibition of Gal-3 *in vitro* (siRNA and blockade of its lectin-binding activity) or *in vivo* (MCP-treated rats, Gal-3 KO mice), blocks specifically Aldo-induced inflammation, collagen type I deposition and vascular remodeling. Thus, Gal-3 emerges as a key pathway involved in collagen regulation in VSMCs and as a potential mediator of Aldo-induced vascular fibrosis.

It is generally believed that the composition of the ECM is a critical determinant of arterial stiffness, but the signalling pathways involved in this process are not fully understood³⁶. In our study, we describe for the first time that Gal-3 over-expression in primary VSMCs results in increased collagen type I synthesis without changes in collagen type III or elastin levels, therefore increasing collagen type I / III and collagen type I / elastin ratios favoring matrix stiffness^{18,37}. Moreover, over-expression of truncated Gal-3 does not affect ECM protein synthesis, suggesting that multimerization is necessary for its fibrotic role.

Interestingly, in accordance with our observations, it has been demonstrated in rat acute kidney injury that Gal-3 plays a major role in renal collagen deposition, because its specific blockade with MCP prevents specifically collagen type I accumulation but not collagen type III²⁸. To explain this specificity of Gal-3 on collagen type I, the authors propose that the collagen type I promoter contains a high number of SP-1 binding sites³⁸ through which Gal-3 might act³⁹ but they are not present for collagen type III. This increase in collagen deposition

is responsible for a large part of vascular fibrosis, an important factor leading to arterial stiffness^{36,40}. In addition to vascular fibrosis, accumulating evidence shows that Gal-3 is a profibrotic factor mediating lung, cardiac, and renal fibrosis^{18,28,41}, suggesting a major role for this lectin in organ fibrosis.

In our experimental models, in response to stimulation with Aldo, VSMCs show MR dependent increased expression in Gal-3, *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, as reported previously²⁸ in kidney, our results show that Gal-3 inhibitors block the lectin's activity and decrease Gal-3 levels in VSMCs. However, the mechanism remains unclear and warrants further dedicated studies.

In spite of studies unveiling partial mechanisms to explain Aldo-induced ECM protein production³, the effect of Aldo *per se* in matrix remodeling is still under debate^{12,42}. As regards the inflammatory response, our results show that Gal-3 blockade (in rat) or depletion (in mice) inhibits Aldo-induced vascular inflammation, demonstrating the critical role of the Gal-3 in this mechanism. This response is mediated by MR pathways because the MR inhibitor block vascular inflammation. This suggests, as previously described^{43,44}, that inflammation and macrophage infiltration are a prerequisite to aldosterone-induced fibrosis and arterial stiffness. Concerning Gal-3 synthesis, it has been already described that infiltrated cells such as macrophages²¹ as well as endothelial cells^{19,20} and fibroblasts¹⁸ express Gal-3. However, our results show clearly for the first time *in vitro* and *in vivo* that VSMCs also express Gal-3 under basal conditions. This expression is specifically enhanced by Aldo as suggested by co-localisation of Gal-3 with α -SMA in the media of Aldo-treated rats compared to controls, suggesting that VSMCs could be a new cell type expressing Gal-3.

Concerning collagen production, Aldo-treated primary rat VSMC cultures and rats show MR dependent increased expression of collagen type I (in the same range of percentage compared to previous studies^{12,42}). Moreover, our results demonstrate that Gal-3, via its lectin

activity, is a necessary mediator allowing Aldo-induced collagen type I synthesis, because the blockade of Gal-3 with MCP (in cell cultures and in rats) or LacNac (in cell cultures) abolishes Aldo-induced collagen type I deposition. In confirmation of the pharmacological data, Gal-3-depleted VSMCs and Gal-3 KO mice are resistant to Aldo profibrotic effects, especially collagen type I deposition. Indeed, in mice deficient for Gal-3, Aldo increases collagen type III expression but fails to increase collagen type I, thus, normalizing the collagen type I / III ratio and the matrix stiffness. In comparison, WT mice treated with Aldo present an increase in the collagen type I / III ratio. This observation reinforces the specificity of Gal-3 action on collagen type I. In addition, KO mice are also resistant to Aldo-induced decrease in the antifibrotic factor BNP. Hence, Aldo fails specifically to induce collagen type I expression in VSMCs and mice lacking Gal-3, suggesting that the absence of this lectin blocks Aldo effects on vascular fibrosis. Regarding elastin production, in primary rat VSMC cultures, Aldo induces elastin deposition in a MR and Gal-3 independent manner. This result is in accordance with previous studies that describe Aldo-induced elastogenesis as not dependent of MR⁴⁵. Thus, our current findings provide a new mechanism MR and Gal-3 dependent underlying vascular fibrosis and remodeling caused by Aldo.

That MCP alone does not alter BP levels but blunts Aldo-induced hypertension was unexpected since such an effect on BP levels has not been reported previously, and is an exciting finding. The fact that rats co-treated with Aldo+MCP present normal levels of all vascular ECM proteins (not only the collagen type I but also collagen type III and elastin), could be partly a consequence of the reduction in BP induces by MCP because it has been widely described that changes in vascular remodeling and BP have close links, acting on each other³⁶. Interestingly, sensitively analyses adjusted for BP variation show the persistence effect of MCP (but not Spiro) on fibrosis inhibition in rats. A finding corroborates by our results in the Aldo-treated mice model (short- and long-term), without BP variation. However,

additional studies focusing on heart, kidney and small vessel interactions may highlight the mechanisms involved in BP normalization.

In conclusion, we propose that Gal-3 is a key player in Aldo-induced vascular inflammation as well as vascular remodeling, and a potential therapeutic target in vascular stiffness occurring during hypertension in which aldosterone is involved. Moreover, it has been suggested that Gal-3 is involved in cardiovascular diseases as a mediator of HF development and progression. It has been further described that Gal-3 plasma levels increase during HF development, associated with cardiac dysfunction^{18,31}. Further clinical studies are required to establish a relation between this lectin and Aldo in cardiovascular pathologies (including hypertension and HF) and the potential therapeutic benefit of Gal-3 inhibition with MCP.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Elodie Rousseau and Raquel Jurado for their technical help, Pr Simon Thornton for editing this manuscript, Delephine Delacour for fruitful discussions and Renaud Fay for statistical analyses.

SOURCES AND FUNDING

This work was supported by a grant from: INSERM, Programme National de Recherche Cardiovasculaire, Société Française d'Hypertension artérielle, Région Lorraine, The 6th EU-FP Network of Excellence "Ingenious HyperCare" (contract number LSHM-CT-2006-037093), the 7th EU-FP MEDIA project (261409), ARC and Ligue contre le cancer, comité de Paris, RECAVA and BG Medicine.

DISCLOSURE

This work was supported by a Research Grant from BG Medicine, Inc (Waltham, MA, USA). BG Medicine has certain rights with respect to the use of Gal-3 in heart failure. Drs. de Boer, Zannad, and Lopez-Andres received honoraria from BG Medicine.

REFERENCES

1. Rogerson FM, Fuller PJ. Mineralocorticoid action. *Steroids* 2000; 65: 61-73.
2. Brilla CG. Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz* 2000; 25: 299-306.
3. Brown NJ. Aldosterone and vascular inflammation. *Hypertension* 2008; 51: 161-167.
4. Struthers AD, MacDonald TM. Review of aldosterone- and angiotensin II-induced target organ damage and prevention. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 663-670.
5. Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 174-180.
6. Lacolley P, Labat C, Pujol A, Delcayre C, Benetos A, Safar M. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone. *Circulation* 2002; 106: 2848-2853.
7. Azibani F, Benard L, Schlossarek S, Merval R, Tournoux F, Fazal L, Polidano E, Launay JM, Carrier L, Chatziantoniou C, Samuel JL, Delcayre C. Aldosterone inhibits antifibrotic factors in mouse hypertensive heart. *Hypertension* 2012; 59: 1179-1187.
8. MacFadyen RJ, Barr CS, Struthers AD. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 30-34.
9. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 2000; 102: 2700-2706.
10. Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, Fay R, Nuee J, Ketelslegers JM, Vincent J, Pitt B, Zannad F. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study. *Circulation* 2009; 119: 2471-2479.
11. Safar ME, Millasseau S, Mahmud A, Blacher J. Relations between large artery structure and function and aldosterone. *J Hypertens* 2011; 29: 1676-1683.
12. Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S, Schiffrin EL. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension* 2005; 45: 773-779.
13. Domic J, Dabelic S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 616-635.
14. Ahmad N, Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R, Liu B, Macaluso F, Brewer CF. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem* 2004; 279: 10841-10847.
15. Dennis JW, Pawling J, Cheung P, Partridge E, Demetriou M. UDP-N-acetylglucosamine:alpha-6-D-mannoside beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1573: 414-422.
16. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 2004; 19: 527-535.
17. Kim H, Lee J, Hyun JW, Park JW, Joo HG, Shin T. Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. *Cell Biol Int* 2007; 31: 655-662.
18. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, Andre S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. Galectin-3 marks activated

- macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 2004; 110: 3121-3128.
19. Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW. The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol* 2008; 172: 545-553.
 20. Wan SY, Zhang TF, Ding Y. Galectin-3 enhances proliferation and angiogenesis of endothelial cells differentiated from bone marrow mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2011; 43: 3933-3938.
 21. Papaspyridonos M, McNeill E, de Bono JP, Smith A, Burnand KG, Channon KM, Greaves DR. Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 433-440.
 22. de Boer RA, Voors AA, Muntendam P, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 811-817.
 23. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 555-564.
 24. Martin R, Miana M, Jurado-Lopez R, Martinez-Martinez E, Gomez-Hurtado N, Delgado C, Bartolome MV, San Roman JA, Cordova C, Lahera V, Nieto ML, Cachofeiro V. DIOL triterpenes block profibrotic effects of angiotensin II and protect from cardiac hypertrophy. *PLoS One* 2012; 7: e41545.
 25. Glinsky VV, Raz A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydr Res* 2009; 344: 1788-1791.
 26. Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 2001; 57: 929-967.
 27. Gunning AP, Bongaerts RJ, Morris VJ. Recognition of galactan components of pectin by galectin-3. *FASEB J* 2009; 23: 415-424.
 28. Kolatsi-Joannou M, Price KL, Winyard PJ, Long DA. Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury. *PLoS One* 2011; 6: e18683.
 29. Liu HY, Huang ZL, Yang GH, Lu WQ, Yu NR. Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 7386-7391.
 30. Matarrese P, Fusco O, Tinari N, Natoli C, Liu FT, Semeraro ML, Malorni W, Iacobelli S. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int J Cancer* 2000; 85: 545-554.
 31. Lopez-Andres N, Rossignol P, Iraqi W, Fay R, Nuee J, Ghio S, Cleland JG, Zannad F, Lacolley P. Association of galectin-3 and fibrosis markers with long-term cardiovascular outcomes in patients with heart failure, left ventricular dysfunction, and dyssynchrony: insights from the CARE-HF (Cardiac Resynchronization in Heart Failure) trial. *Eur J Heart Fail* 2011; 14: 74-81.
 32. Lopez-Andres N, Martin-Fernandez B, Rossignol P, Zannad F, Lahera V, Fortuno MA, Cachofeiro V, Diez J. A role for cardiotrophin-1 in myocardial remodeling induced by aldosterone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: 2372-2382.
 33. Lopez-Andres N, Inigo C, Gallego I, Diez J, Fortuno MA. Aldosterone induces cardiotrophin-1 expression in HL-1 adult cardiomyocytes. *Endocrinology* 2008; 149: 4970-4978.
 34. Colnot C, Fowles D, Ripoche MA, Bouchaert I, Poirier F. Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. *Dev Dyn* 1998; 211: 306-313.

35. Rossignol P, Bouton MC, Jandrot-Perrus M, Bryckaert M, Jacob MP, Bezeaud A, Guillin MC, Michel JB, Meilhac O. A paradoxical pro-apoptotic effect of thrombin on smooth muscle cells. *Exp Cell Res* 2004; 299: 279-285.
36. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 2001; 38: 581-587.
37. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kuhl U, Schultheiss HP. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 1999; 99: 2750-2756.
38. Bornstein P, McKay J, Morishima JK, Devarayalu S, Gelinas RE. Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human alpha 1(I) collagen gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 8869-8873.
39. Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene* 2002; 21: 8001-8010.
40. Briones AM, Arribas SM, Salaices M. Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010; 19: 187-194.
41. Ge XN, Bahaie NS, Kang BN, Hosseinkhani MR, Ha SG, Frenzel EM, Liu FT, Rao SP, Sriramarao P. Allergen-induced airway remodeling is impaired in galectin-3-deficient mice. *J Immunol* 2010; 185: 1205-1214.
42. Gekle M, Mildenerger S, Freudinger R, Grossmann C. Altered collagen homeostasis in human aortic smooth muscle cells (HAoSMCs) induced by aldosterone. *Pflugers Arch* 2007; 454: 403-413.
43. Nguyen Dinh Cat A, Jaisser F. Extrarenal effects of aldosterone. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012; 21: 147-156.
44. Park S, Lakatta EG. Role of inflammation in the pathogenesis of arterial stiffness. *Yonsei Med J* 2012; 53: 258-261.
45. Bunda S, Liu P, Wang Y, Liu K, Hinek A. Aldosterone induces elastin production in cardiac fibroblasts through activation of insulin-like growth factor-I receptors in a mineralocorticoid receptor-independent manner. *Am J Pathol* 2007; 171: 809-819.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Aldo-treatment increased Gal-3 expression in a MR dependent manner in VSMCs.

Dose response histogram obtained by incubating VSMCs with Aldo (10^{-10} M to 10^{-8} M) for 24 h (**A**) and time-response curves by incubating VSMCs with Aldo (10^{-8} M) from 6 to 48 h (**B**), showing that Aldo stimulated Gal-3 increase in a dose- and time-dependent manner.

Eplerenone (10^{-6} M) and RU 28318 (10^{-6} M) blocked Aldo-induced (10^{-8} M) Gal-3 expression (**C** mRNA levels and **D** protein levels). Actinomycin D (10^{-6} M) blocked Aldo-induced (10^{-8} M) Gal-3 expression (**E** mRNA levels and **F** protein levels). Primary cultures of VSMCs from at least three different rats were used and all conditions were performed at least in triplicate. Histogram bars represent the mean \pm SEM of the three independent experiments. Densitometry values were normalized to β -actin or HPRT respectively for protein and mRNA. *, $p < 0.05$ vs. without Aldo; †, $p < 0.05$ vs. Aldo.

Figure 2. Gal-3 over-expression enhanced collagen deposition. rhGal-3 or rhCRD were over-expressed in VSMCs by transfection with a plasmid. rhGal-3 over-expression enhanced collagen type I levels without changes in collagen type III, fibronectin or elastin. rhCRD over-expression did not modify significantly ECM protein deposition. Primary cultures of VSMCs from at least three different rats were used and all conditions were performed at least in triplicate. Histogram bars represent the mean \pm SEM of the three independent experiments. Densitometry values were normalized to β -actin. *, $p < 0.05$ vs. empty vector; †, $p < 0.05$ vs. Gal-3.

Figure 3. Gal-3 inhibition blocked Aldo-induced collagen synthesis. Gal-3 was knocked-down using a siRNA approach (**A**). Gal-3 silencing did not induce changes in ECM proteins at the basal level but prevented Aldo-induced collagen type I enhancement without effects on collagen type III or elastin when VSMCs were treated with Aldo (10^{-8} M). Gal-3 carbohydrate binding activity was inhibited using MCP (10^{-6} M) or LacNac (10^{-6} M) (**B**). Both inhibitors

blocked Aldo-induced collagen type I but not elastin deposition. Primary cultures of VSMCs from at least 3 different rats were used and all conditions were performed at least in triplicate. Histogram bars represent the mean \pm SEM of the three independent experiments.

Densitometry values were normalized to β -actin. *, $p < 0.05$ vs. control; †, $p < 0.05$ vs. Aldo.

Figure 4. Gal-3 mediated Aldo-induced arterial inflammation and fibrosis. Representative fluorescent photomicrographs of confocal microscopy sections of the aortic tunica media from rats are shown (A). Aortas are staining for nuclei (blue), α -SMA (green) and Gal-3 (red). Arrows show Gal-3 and α -SMA staining merged (yellow/orange). Aortas from rats treated with Aldo-salt (1mg/kg/day) in combination with Spiro (200mg/kg/day) or MCP (100mg/kg/day) were analysed. mRNA expression of Gal-3, *coll1a1*, IL-6, monocyte chemotactant protein-1 (MCP-1) and osteopontin (OPN) are shown (B). Spiro and MCP co-treatment blocked Aldo-induced mRNA synthesis. Protein expression of Gal-3, collagen type I and type III as well as elastin are shown (C). Spiro and MCP co-treatment reversed Aldo-induced ECM protein deposition. Representative pictures of slides stained for elastin as well as immunostained for collagen type I, collagen type III, MCP-1 and OPN are presented (D). Spiro and MCP co-treatment reversed Aldo-induced inflammation and fibrosis. All conditions were performed at least in triplicate. Histogram bars represent the mean \pm SEM of the three independent experiments, in arbitrary units normalized to β -actin and HPRT respectively for protein and mRNA. *, $p < 0.05$ vs. control; †, $p < 0.05$ vs. Aldo.

Figure 5. KO Gal-3 mice were resistant to Aldo-induced inflammation and fibrosis. Short-term aortic mRNA expression of Gal-3, *coll1a1*, *col3a1* and osteopontin (OPN) was quantified in WT and Gal-3 KO mice 6 hours after a single intraperitoneal injection of Aldo (1mg/kg) or vehicle (A). Aortic mRNA expression of Gal-3, *coll1a1*, *col3a1*, OPN, bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) and brain natriuretic peptide (BNP) was quantified in WT and Gal-3 KO mice after 3-week infusion with Aldo (1mg/kg/day) (B). Aortic concentration of Gal-3 was

measured by ELISA in control and 3 weeks-Aldo-treated WT mice (**C**). Long-term aortic protein expression of collagen type I and type III was analysed (**D**) as well as MCP-1 and OPN expressions (**E**). KO mice were resistant to Aldo-induced inflammation and fibrosis. All conditions were performed at least in triplicate. Histogram bars represent the mean \pm SEM of each group of animals (minimum 6 mice per group), in arbitrary units normalized to β -actin and GAPDH respectively for protein and mRNA. * $p < 0.05$ vs WT group; †, $p < 0.05$ vs. WT+Aldo group; ‡, $p < 0.05$ vs KO group.

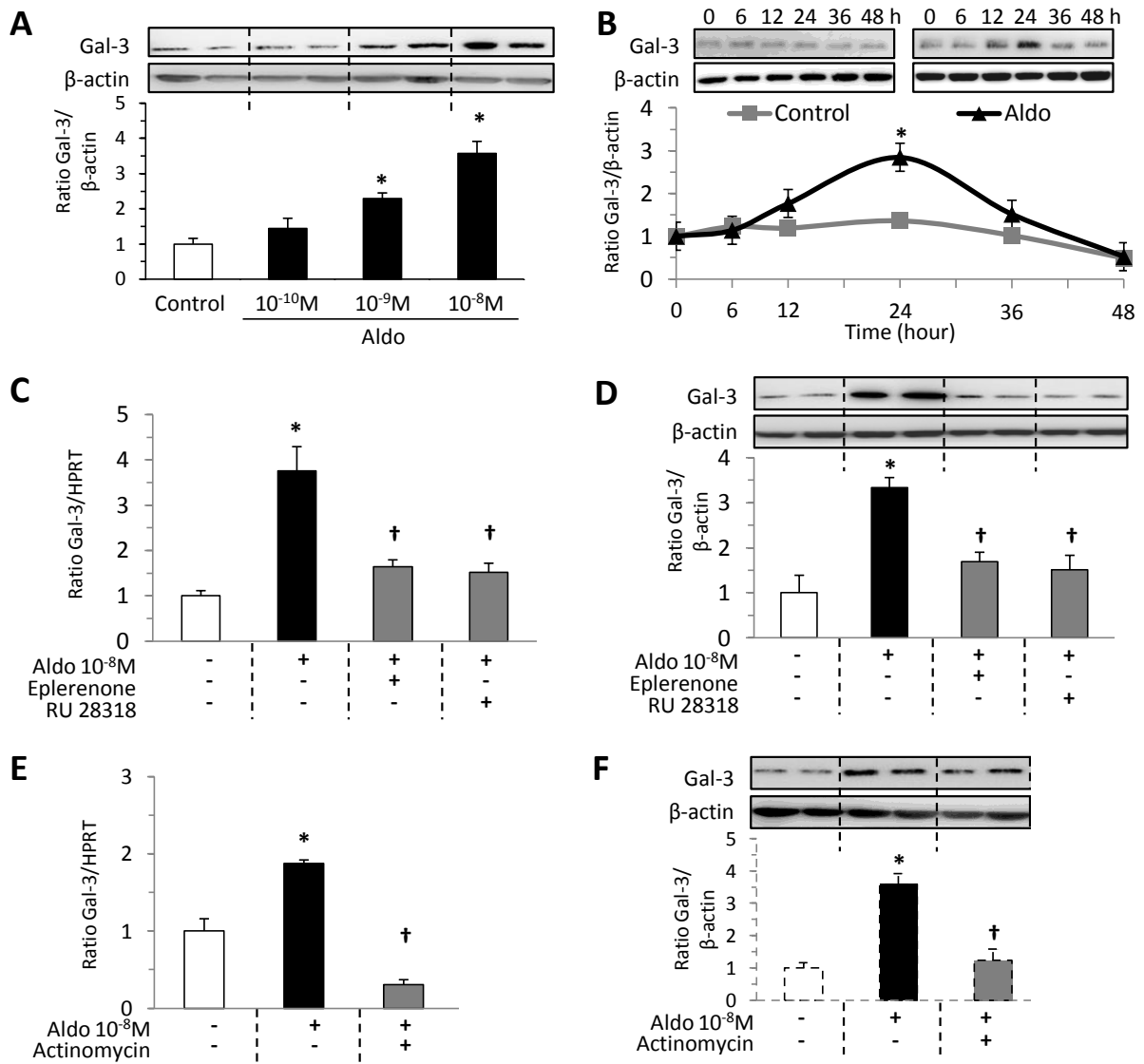


Fig. 1

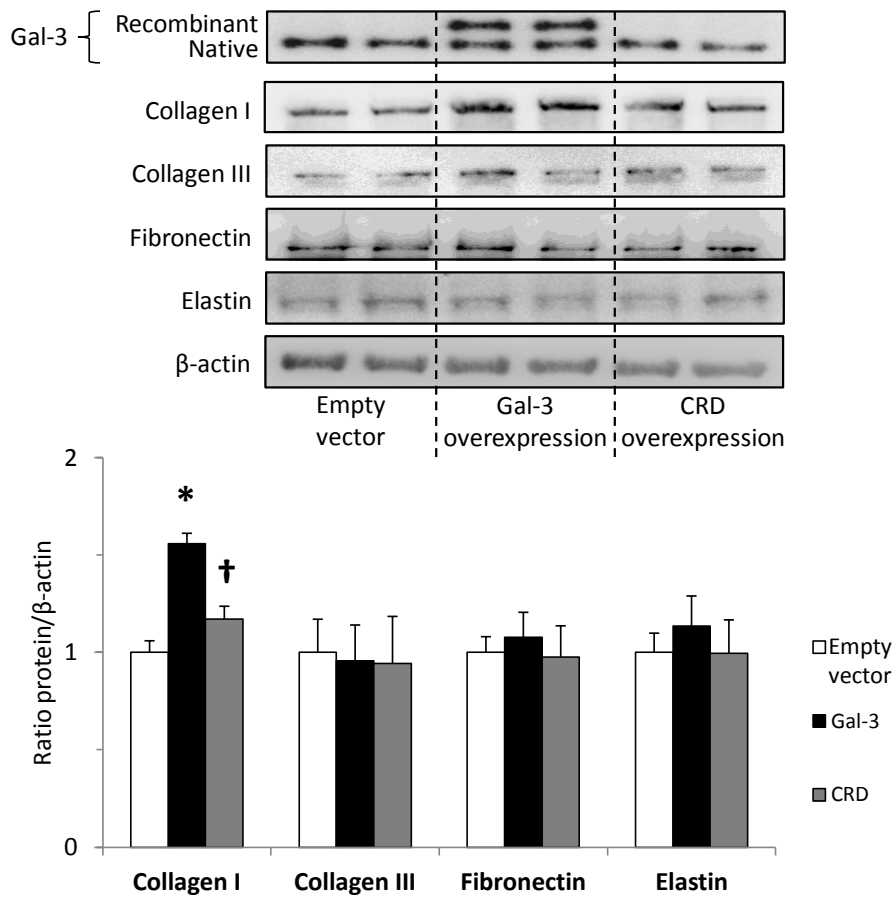
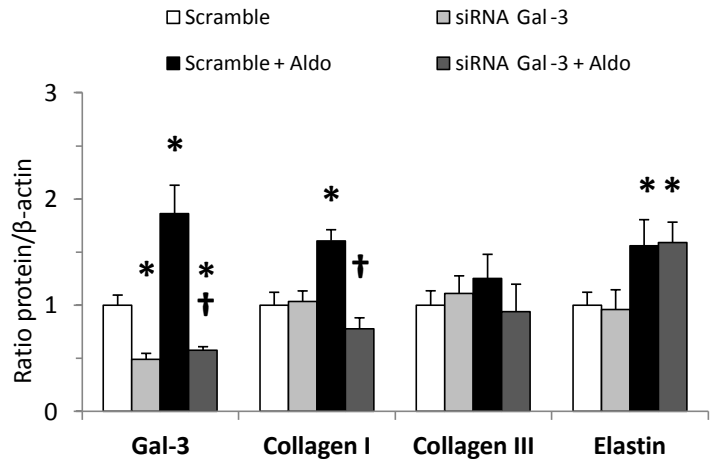
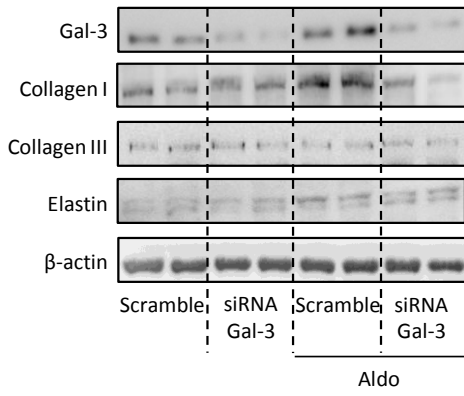


Fig. 2

A



B

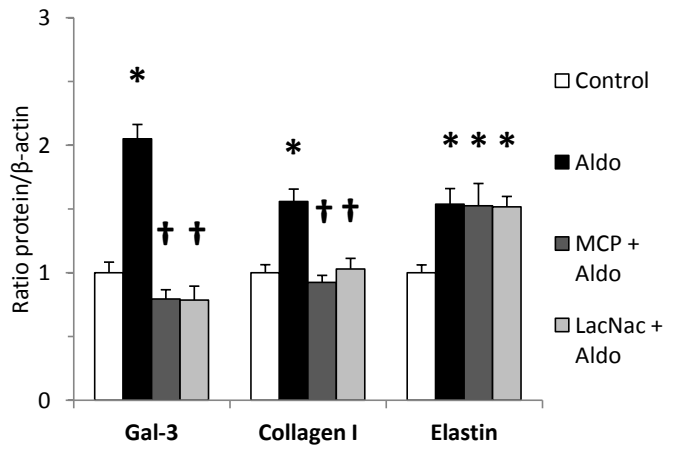
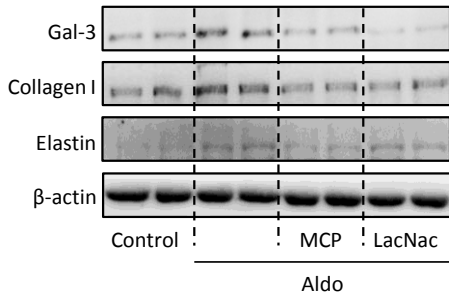


Fig 3

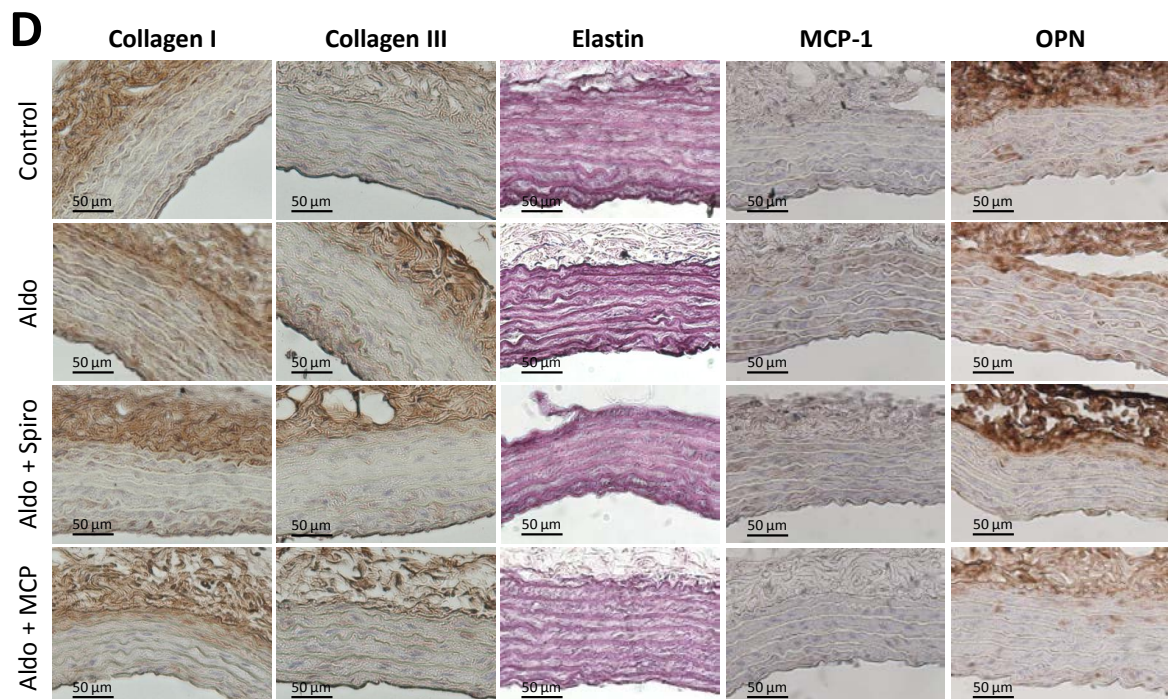
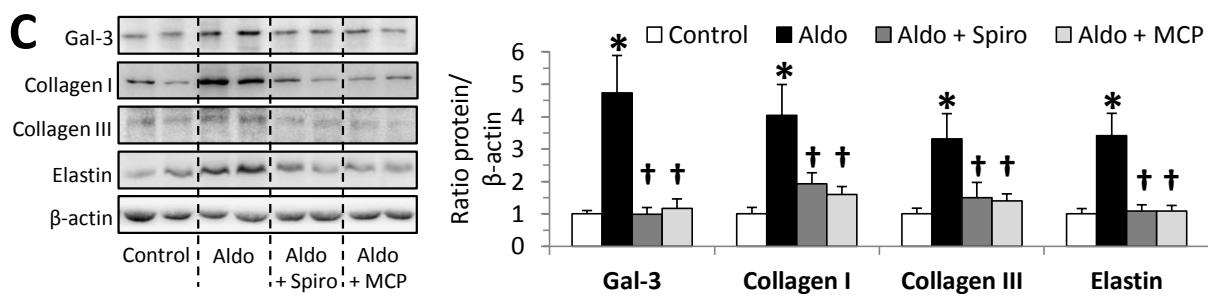
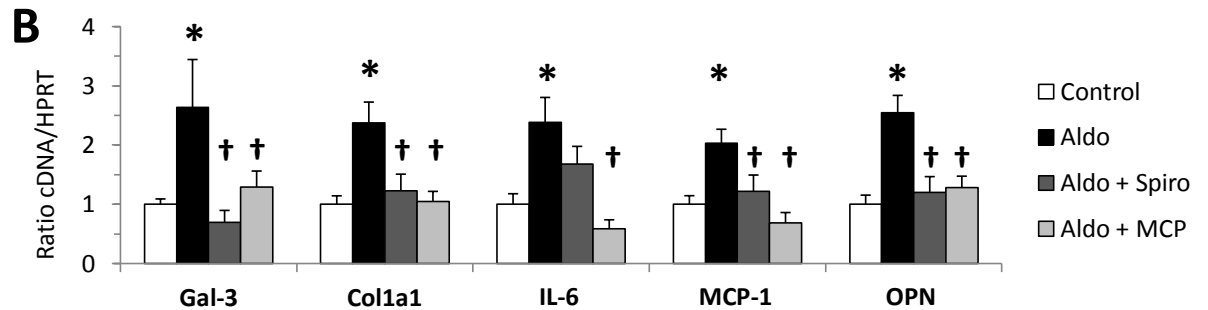
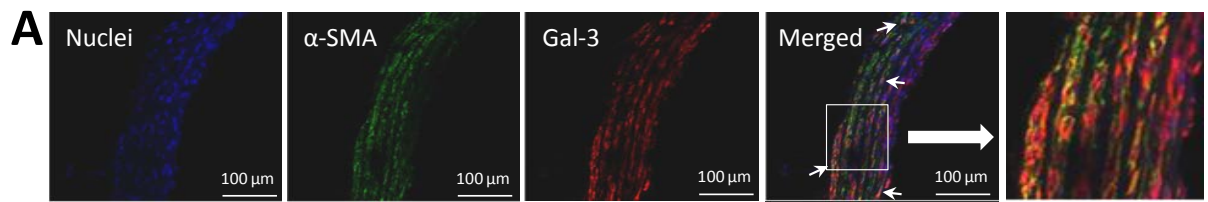


Fig 4

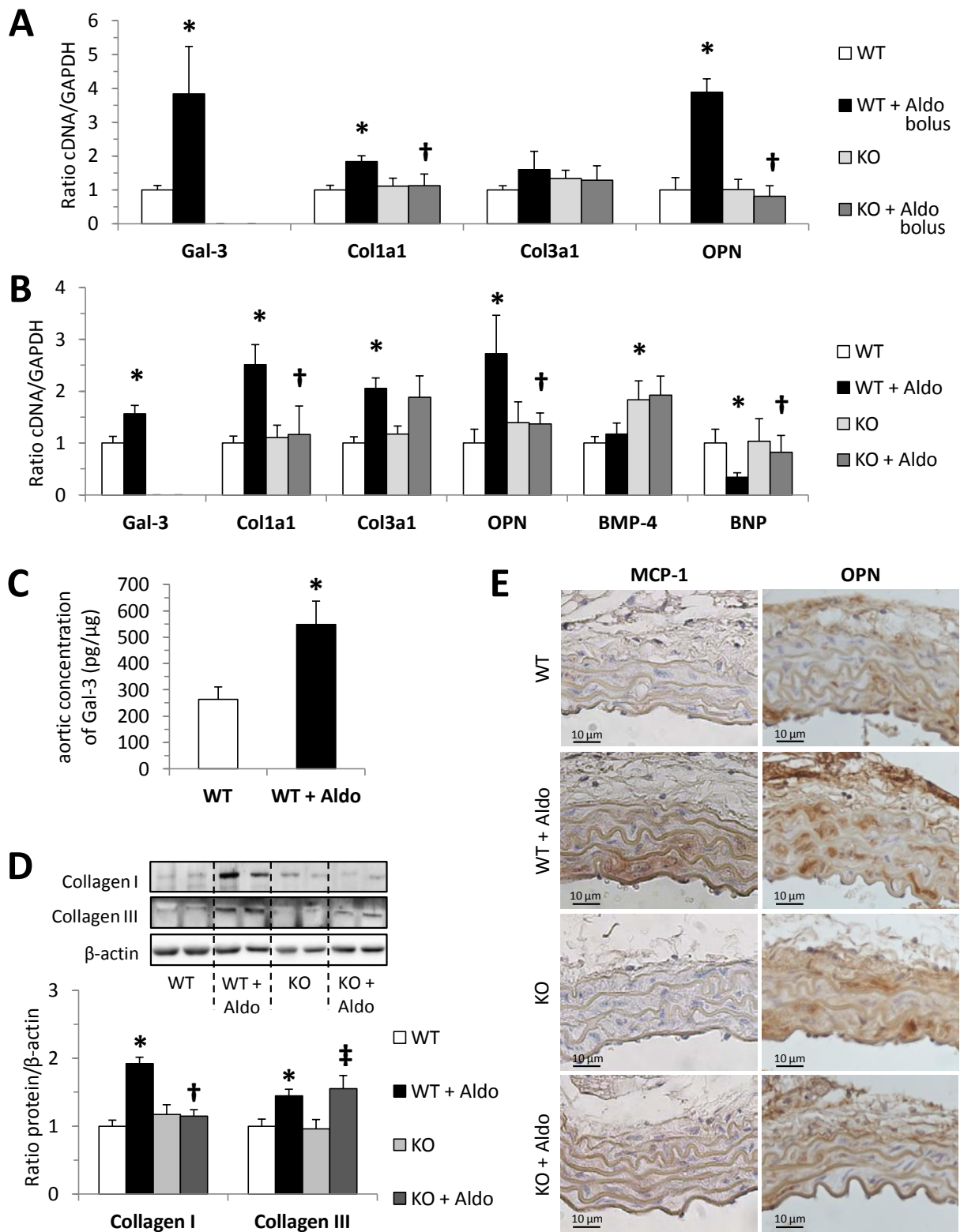


Fig. 5

Table 1. Haemodynamic parameters and aortic wall composition in rats.

	Control	Aldo	Aldo+Spiro	Aldo+MCP	Spiro	MCP
<i>General parameters</i>						
n	10	10	10	9	7	5
BW (g)	322 ± 2.3	322 ± 0.8	308 ± 2.0	314 ± 2.1	310 ± 3.1	341 ± 4.1
SBP (mmHg)	123 ± 0.6	149 ± 1.3*	128 ± 0.7†	118 ± 2.5†	124 ± 1.9†	124 ± 2.8†
DBP (mmHg)	88 ± 0.6	101 ± 0.9*	90 ± 1.1†	77 ± 2.3†	89 ± 1.3†	84 ± 0.7†
MBP (mmHg)	101 ± 0.6	118 ± 1.1*	103 ± 0.9†	90 ± 2.3†	100 ± 1.4†	97 ± 1.0†
PP (mmHg)	35 ± 0.4	48 ± 1.0*	37 ± 0.9†	41 ± 1.2†	35 ± 1.0†	40 ± 3.0
HR (beat/min)	322 ± 4.5	258 ± 3.5*	290 ± 4.8	351 ± 6.3†	330 ± 13.5†	324 ± 11†
<i>Media aortic parameters</i>						
n	5	5	5	9	3	5
Dry weight	2.02±0.08	2.39±0.10*	1.93±0.09†	2.07±0.07†	2.06±0.03†	1.97±0.06†
Cell proteins	0.66±0.03	1.67±0.08*	0.78±0.07†	0.76±0.11†	0.87±0.01†	0.70±0.07†
Elastin	1.00±0.06	1.23±0.03*	1.02±0.04†	1.09±0.03†	1.01±0.01†	1.03±0.05†
Collagen	4.46±0.49	9.44±0.33*	6.66±0.12*†	4.55±0.37†	4.15±0.13†	5.07±0.32†
Collagen /Elastin	0.24±0.01	0.44±0.01*	0.31±0.02†	0.27±0.02†	0.26±0.01†	0.29±0.02†
Media thickness	81.1 ± 3.7	97.9 ± 1.6 *	83.6 ± 1.6 †	79.6 ± 3.3 †	81.7 ± 3.2 †	81.7 ± 4.9 †
MCSA	344 ± 33	426 ± 15 *	332 ± 20 †	345 ± 36 †	322 ± 56 †	376 ± 12 †

Spiro, spironolactone; MCP, modified citrus pectin; BW, body weight; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; MBP, mean blood pressure; PP, pulse pressure; HR, heart rate; MCSA, media cross sectional area of the aorta. Dry weight and contents in proteins are expressed in mg/cm, media thickness in μm and MCSA in $10^3\mu\text{m}^2$. Values are mean \pm SEM, *, $p < 0.05$ vs. control group; †, $p < 0.05$ vs. Aldo-treated group.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

MATERIALS AND METHODS

Animals

The investigation was performed in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (publication no. 82-23, revised in 1996). Male Wistar rats (250 g; Harlan Iberica) were treated for 3 weeks with vehicle (sunflower oil, subcutaneous injection, n=10), Aldo-salt (1 mg/kg/day, subcutaneous injection, n=10 and 1% NaCl as drinking water), Aldo-salt plus Spironolactone (Spiro) (200 mg/kg/day, subcutaneous injection, n=10), Aldo-salt plus MCP (100 mg/kg/day, in food, n=9), Spiro (n=7) or MCP (n=5) alone. The model and the dose of Aldo were chosen from previous studies in which the treatment increased systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) ¹.

Adult male C57BJ6 wild-type mice and Gal-3 KO mice ² were infused for 3 weeks with Aldo (1 mg/kg/day) or vehicle (150 mmol/liter NaCl, 5% ethanol) using an osmotic minipump (Alzet) (n = 7, each group). Tail cuff blood pressure was monitored throughout the treatment. As described previously ³, to analysed short effects of Aldo mice received one intraperitoneal injection of Aldo (0.1 ml injected, 1 mg/kg) or vehicle (0.1 ml injected, 150 mmol/liter NaCl, 5% ethanol) (n = 6, each group). Tail cuff blood pressure was measured 12 h before and 6 h after injection. Animals were sacrificed 6 h after the injection under 3% isoflurane/O₂ anesthesia.

Haemodynamic parameters

Rats were anaesthetized with ketamine (Imalgene 1000, Merial; 70 mg/kg, I.P.) plus xylazine (Rompun 2%, Kup Pharma; 6 mg/kg, I.P.), and a catheter (Sciense FT211B, 1.5mm diameter) was advanced into the left ventricle through the right carotid artery. The catheter

was connected to a data acquisition system (PowerLab/800, ADInstruments), and signals were monitored and digitally stored for analysis with the software Chart for Windows (version 4.2).

VSMCs isolation and culture

Primary rat aortic VSMCs were isolated from the thoracic aorta of male Wistar rats as described previously⁴. VSMCs were used between passages 3 and 8. For experiments, cells were seeded into 6-well plates at 90% confluence and serum starved (1 %) for 12h. Then, cells were cultured in the same medium and stimulated with Aldo (Sigma) at 10^{-10} to 10^{-8} mol/liter for 6 or 24 h respectively for mRNA and protein determination, except for the Aldo (10^{-8} mol/liter) time-response experiments (from 0 to 48 h). To investigate the intracellular pathways, the following reagents were added 30 min before Aldo (10^{-8} mol/liter) addition: RNA synthesis inhibitor actinomycin D (10^{-6} mol/liter; Calbiochem), two MR antagonists eplerenone (10^{-6} mol/liter; Sigma) and RU28318 (10^{-6} mol/liter; Tocris Bioscience), two Gal-3 inhibitors MCP (10^{-6} mol/liter; Econugenics) and LacNac (10^{-6} mol/liter; Sigma).

Western Blot analysis

The aortas were dissected, cut longitudinally (to remove the endothelium), and the adventitia layer was removed. Then aortic tunica medias were immediately frozen in liquid nitrogen for molecular studies. Aliquots of 20 μ g of proteins were electrophoresed on SDS polyacrylamide gels and transferred to Hybond-c Extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). The following specific antibodies were used: Gal-3 at 1:500 (Thermo Scientific), collagen type I at 1:500 (Biogenesis), collagen type III at 1:500 (Santa Cruz), fibronectin at 1:500 (Chemicon), elastin at 1:250 (Abcam), and β -actin at 1:1000 (Sigma). Bound antibodies were detected by peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham Biosciences) and visualized using the Immun-Star western kit (Bio-rad) or ECL-Advance chemiluminescence detection system (Amersham). After densitometric analyses, optical density values were expressed as arbitrary units and β -actin was used to normalise protein

loading. All Western Blots were performed at least in triplicate for each experimental condition.

ELISA

Gal-3 concentrations were measured by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

Reverse-transcription PCR

Total RNA was extracted with Trizol Reagent (Euromedex) and purified using the RNeasy kit, according to the manufacturer's instructions (Qiagen). First strand cDNA was synthesized according to the manufacturer's instructions (Roche). Quantitative PCR analysis was then performed with SYBR green PCR technology (ABGene). List of the primers (Invitrogen) used in rat:

Gene	Primers	Sequence (5' to 3')
Gal-3	Forward	AGC CCA ACG CAA ACA GTA TC
	Reverse	GGC TTC AAC CAG GAC CTG TA
HPRT	Forward	AGG ACC TCT CGA AGT GT
	Reverse	ATT CAA ATC CCT GAA GTA CTC AT
IL-6	Forward	GCC CTT CAG GAA CAG CTA TG
	Reverse	GTC TCC TCT CCG GAC TTG TG
MCP-1	Forward	TTC CTT ATT GGG GTC AGC AC
	Reverse	CAG TTA ATG CCC CAC TCA CC
OPN	Forward	ATG AGA CTG GCA GTG GTT
	Reverse	GCT TTC ATT GGA GTT GCT
Col1a1	Forward	GCC TCC CAG AAC ATC ACC TA
	Reverse	ATG TCT GTC TTG CCC CAA GT

And in mouse:

Gene	Primers	Sequence (5' to 3')
Col1a1	Forward	TAC TCG AAC GGG AAT CCA TC
	Reverse	ACT GGT ACA TCA GCC CGA AC
Col3a1	Forward	ACC AAA AGG TGA TGC TGG AC
	Reverse	GAC CTC GTG CTC CAG TTA GC
Gal-3	Forward	GCT TAT CCT GGC TCA ACT GC
	Reverse	TTC ACT GTG CCC ATG ATT GT
GAPDH	Forward	AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG
	Reverse	GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT
BMP-4	Forward	TGA GCC TTT CCA GCA AGT TT

	Reverse	CTT CCC GGT CTC AGG TAT CA
BNP	Forward	AGA CCC AGG CAG AGT CAG AA
	Reverse	CAG CTC TTG AAG GAC CAA GG
OPN	Forward	GAC TGG TGC GTG ACC CAT CT
	Reverse	TTC ATT GGA ATT GCT TGG AAG A

Relative quantification was achieved with MyiQ (Bio-rad) software according to the manufacturer's instructions. HPRT or GAPDH, in rat or mouse models respectively, was used as the endogenous control. All PCRs were performed at least in triplicate for each experimental condition.

Transient transfection with plasmid

VSMCs were seeded into 6-well plates at 70% confluence, and serum starved for 12h, then transfected with 1 µg each of a vector construct containing either the recombinant human full-length sequence of Gal-3 (rhGal-3) cloned in pcDNA3.1 plasmid (Invitrogen) or a sequence coding for a truncated form of recombinant human Gal-3 (coding amino acids 104 to 250; rhCRD). An empty vector was used as a control. Transfections were performed with XtremGENE9 (Roche) according to the manufacturer's recommendations for 24h. Expressed proteins are tagged with a polyhistidine tail. Cells were then incubated in medium with 1% FBS for 48h before cell harvest. Validation of the transfections was made by Western Blot and RT-PCR.

Transfection of VSMCs with siRNA

VSMCs were seeded into 6-well plates at 70% confluence and transfected with a pool of three siRNAs (GeneCust) Gal-3 target-specific and using MATra-si (IBA) according to the manufacturer's recommendations. Cells were allowed to recover for 24h before serum privation and stimulation. Scramble siRNAs were used as a control.

Aortic composition

Aortic segments were opened longitudinally, the media separated from the adventitia and the medial length measured under a microscope. Media were then defatted, dried and

weighed. Medial cell proteins were extracted by 0.3% sodium dodecyl sulfate (SDS) and subsequently assayed, insoluble elastin was purified by the hot alkali method and quantified by weighing. Proteins in the NaOH extract were then hydrolysed, and total medial collagen was quantified by assaying hydroxyproline in the hydrolysate, using a colorimetric assay.

Morphological and histological evaluation

Sections (5µm-thick) were stained with orcein for elastin content. Media thickness of the aorta was measured in five different regions and media cross sectional area of the aorta (MCSA) was measured in triplicate with NIS software (Nikon).

Immunochemistry

Paraffin-embedded aorta sections of 5 µm were used. Slides were treated with H₂O₂ for 10 min to block peroxidase activity. All sections were blocked with 5% normal goat serum in PBS for 1 h and incubated overnight with collagen type I, collagen type III, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) or osteopontin (OPN) (1:50 dilution; Abcam), washed three times, and then incubated for 30 min with the horseradish peroxidase-labeled polymer conjugated to secondary antibodies (Dako Cytomation, Carpinteria, CA). The signal was revealed by using DAB Substrate Kit (BD Pharmingen).

Double staining immunochemistry

Arterial segments were placed in Krebs buffer containing 30% sucrose, transferred to a cryomold containing Tissue-Tek OCT embedding medium (Jung Tissue Freezing Medium, Leica), and frozen in liquid nitrogen. Tissues were kept at -80°C until the day of the experiments. Frozen transverse sections (6 µm) were cut onto APS-coated slides and air-dried for at least 60 min. Preincubation was carried out for 60 minutes in a PBS solution containing 30% normal goat serum. Slides were then incubated overnight at 4 °C in a solution containing a mouse monoclonal antibody against alpha smooth muscle actin (α -SMA) (1:100, Biocare Medical, USA) and a rabbit monoclonal antibody against Gal-3 (1:50, Epitomics,

USA). After three washings (5 min each) with the secondary antibody, a donkey anti-mouse or anti-rabbit IgG conjugated to Alexa 488 or Alexa 546 (Molecular Probes, Life Technologies, Madrid, Spain) for 1 h at 37°C. Cells' nuclei were staining using 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (1mg/ml; DAPI; Sigma; USA). After washing, immunofluorescent signals were viewed using an inverted Leica TCS SP2 confocal laser scanning microscope with oil immersion lens (x40). The specificity of the immunostaining was evaluated by omission of the primary antibody and processed as above. Under these conditions, no staining was observed in the vessel wall.

Statistics

Results are presented as mean±SEM, computed from the average measurements obtained from each group of cells or animals. Normal distribution of data was checked by means of the Shapiro Willks test and a Levene statistic test was performed to check the homogeneity of variances. Differences among more than 2 experimental conditions were tested by the ANOVA one way test, followed by the Scheffé test to analyze differences between groups. The unpaired Student's t test or the Mann Whitney U tests were used to assess statistical differences between two experimental conditions. P values lower than 0.05 were considered significant. A sensitivity analysis adjusting for BP variations in the rat model was also performed, using a two way ANOVA.

REFERENCES

1. Lopez-Andres N, Martin-Fernandez B, Rossignol P, Zannad F, Lahera V, Fortuno MA, Cachofeiro V, Diez J. A role for cardiotrophin-1 in myocardial remodeling induced by aldosterone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: 2372-2382.
2. Colnot C, Fowles D, Ripoche MA, Bouchaert I, Poirier F. Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. *Dev Dyn* 1998; 211: 306-313.
3. Lopez-Andres N, Inigo C, Gallego I, Diez J, Fortuno MA. Aldosterone induces cardiotrophin-1 expression in HL-1 adult cardiomyocytes. *Endocrinology* 2008; 149: 4970-4978.
4. Rossignol P, Bouton MC, Jandrot-Perrus M, Bryckaert M, Jacob MP, Bezeaud A, Guillin MC, Michel JB, Meilhac O. A paradoxical pro-apoptotic effect of thrombin on smooth muscle cells. *Exp Cell Res* 2004; 299: 279-285.