Gènes codant pour le Récepteur de Type 1 à l'Angiotensine II (AGTR1) et pour l'Aldostérone Synthase (CYP11B2) : Hypertension Artérielle et Variables de Retentissement Cardiovasculaire chez l'Homme.

Stéphany Gardier

▶ **To cite this version:**

Stéphany Gardier. Gènes codant pour le Récepteur de Type 1 à l'Angiotensine II (AGTR1) et pour l'Aldostérone Synthase (CYP11B2) : Hypertension Artérielle et Variables de Retentissement Cardiovasculaire chez l'Homme.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2004. Français. NNT : . tel-00267989

HAL Id: tel-00267989
https://theses.hal.science/tel-00267989

Submitted on 30 Mar 2008

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.

N° d'ordre : 233-2004 **Année 2004**

THESE

Présentée devant

l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention du

DIPLÔME DE DOCTORAT

(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le

par

Stéphany GARDIER

GENES CODANT POUR LE RECEPTEUR DE L'ANGIOTENSINE II DE TYPE 1 (*AGTR1*) ET POUR L'ALDOSTERONE SYNTHASE (*CYP11B2*) : HYPERTENSION ARTERIELLE ET VARIABLES DE RETENTISSEMENT CARDIOVASCULAIRE CHEZ L'HOMME

Directeur de thèse : Dr. Madeleine **VINCENT**

Jury :

Pr.	B. **CHAMONTIN**	*Rapporteur*
Pr.	X. **JEUNEMAITRE**	*Rapporteur*
Pr.	H. **MILON**	*Président*
Pr.	P. **LANTELME**	
Pr.	J.M. **PEQUIGNOT**	
Dr.	M. **VINCENT**	

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université	**M. le Professeur D. DEBOUZIE**
Vice-Président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J.F. MORNEX
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. le Professeur R. GARRONE
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur G. ANNAT
Secrétaire Général	M. J.P. BONHOTAL

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec	Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche	Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
UFR de Médecine Lyon-Nord	Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE
UFR de Médecine Lyon-Sud	Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
UFR d'Odontologie	Directeur : M. O. ROBIN Maître de Conférences
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Institut Techniques de Réadaptation	Directeur : M. le Professeur L. COLLET
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE
Département de Formation à la Recherche et à l'Evaluation Pédagogiques	Directeur : M. le Professeur M. LAVILLE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique	Directeur : M. le Professeur J.L. VIALLE
UFR de Biologie	Directeur : M. le Professeur H. PINON
UFR de Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
UFR de Génie Electrique et des Procédés	Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET
UFR Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
UFR de Mathématiques	Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE
UFR d'Informatique	Directeur : M. le Professeur M. EGEA
UFR de Chimie Biochimie	Directeur : M. le Professeur J.P. SCHARFF
UFR STAPS	Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI
Observatoire de Lyon	Directeur : M. le Professeur R. BACON
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J.P. PUAUX
Département de 1er cycle Sciences	Directeur : M. J.C. DUPLAN Maître de Conférences
IUT A	Directeur : M. le Professeur M. ODIN
IUT B	Directeur : M. le Professeur G. MAREST
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

Remerciements

A mes juges.

Monsieur le Professeur Bernard Chamontin,

Que je remercie très vivement d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger ce travail. Qu'il soit assuré de ma respectueuse reconnaissance et de mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Xavier Jeunemaître,

Qui m' a fait le très grand honneur de prendre part à ce jury et d'accepter de juger cette thèse. Ses travaux sur la génétique de l'hypertension artérielle ont été une source importante d'inspiration et de réflexion.

Qu'il soit assuré de ma respectueuse reconnaissance et de ma profonde admiration.

Monsieur le Professeur Hugues Milon,

A qui j'adresse mes plus sincères remerciements pour m' avoir accueillie avec beaucoup de gentillesse dans son service de cardiologie, et pour m'avoir ouvert les portes de la recherche clinique. Sa disponibilité, ses conseils et son soutien auront été des éléments clés de ce travail de thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude, et soit assuré de ma respectueuse considération.

Monsieur le Professeur Pierre Lantelme,

Que je remercie vivement d'avoir pris part à ce jury. Ses conseils et les longues heures passées à discuter nos résultats ont toujours été très instructifs. Ce travail n'aurait sans doute pu aboutir sans sa grande disponibilité et son implication sans faille.

Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements et de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Jean-Marc Péquignot,

Que je souhaite remercier très sincèrement d'avoir accepté de participer à ce jury. M'ayant permis de faire mes premiers pas dans le monde de la Recherche alors que je n'étais qu'une jeune étudiante de maîtrise (!), je suis très touchée qu'il ait pu apporter la qualité de son jugement à ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude et soit assuré de ma respectueuse considération.

Madame le Docteur Madeleine Vincent,

Qui m'a donné l'occasion de réaliser ce projet qui m'était si cher. Elle m'a témoignée une grande confiance en me permettant d'entreprendre ce travail de recherche à ses côtés. Les cinq années passées à travailler sous sa direction auront été riches d'enseigenements.

Qu'elle trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude pour m'avoir fait partager ses connaissances et son savoir, et m'avoir permis de mener à bien cette thèse. Qu'elle soit également assurée de ma plus respectueuse admiration.

Que cette thèse soit aussi l'occasion de remercier très vivement tous ceux et celles avec qui j'ai partagé de beaux moments durant ces 5 années passées au Laboratoire de Physiologie de l'Environnement,

Monsieur le Professeur Gharib,

Les mots me manquent pour vous exprimer toute ma reconnaissance. Sans vous cette grande aventure n'aurait jamais été possible et je tiens à vous remercier du soutien sans faille que vous m'avez apporté tout au long de mon parcours. Merci aussi pour toute cette humanité dont vous avez fait preuve au quotidien, le respect et la confiance que vous avez mis en chaque membre de votre équipe et qui ont contribué chaque jour à nous offrir de si belles conditions de travail… Trouvez ici l'assurance de ma profonde reconnaissance et de ma plus sincère admiration.

Eric,

Ton arrivée au labo, plus précisément ton installation dans « mon bureau » (!) a été pour moi le début d'un grand bonheur ! J'ai été très heureuse que tu viennes rompre la solitude dans laquelle ma thèse avait débuté !!!…. J'ai donc beaucoup souffert (et le mot est faible !) de tes incessants déplacements: Toulouse, Moscou, Strasbourg et pour finir Nagoya… mais malgré les distances nos liens ne se sont que renforcés et je tiens aujourd'hui à sincèrement te remercier pour ton indéfectible soutien, ta gentillesse… et les ballades en roller (promis je vais faire des efforts !!!). Sois assuré de ma profonde gratitude et de ma plus sincère amitié. Je te souhaite tout le succès que tu mérites dans ta nouvelle vie angevine.

Nat

Ton –trop court- passage au labo a été un grand rayon de soleil… qui n'a cessé de briller depuis !!! Mille mercis pour tout ton soutien, certaines périodes auraient sans doute été bien plus pénibles sans « tes accompagnements, tes encouragements, et tes applaudissements » ! Trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de ma plus profonde amitié. Je te souhaite beaucoup de réussite pour tes futurs projets, et beaucoup de bonheur dans les mois à venir…

Mes compagnons d'infortune (!) des deux autres couloirs :

Julie & David

Dont les soirées resteront dans les mémoires des thésards de Rock' pendant des générations !!! Un grand merci pour votre gentillesse et votre disponibilité… sans bornes !!! A Grenoble, ou à Rennes… ou ailleurs (!) que votre avenir soit radieux, aux côtés de votre petit Poulpe.

Stéphane,

De notre trinôme en TP de physio, au doctorat, en passant par les inoubliables séjours à Tamaris, nous aurons partagé beaucoup de chouettes moments… Je te souhaite toute la réussite que tu mérites (donc BEAUCOUP !), et surtout beaucoup de bonheur avec ton petit Jedi qui ne devrait pas tarder à pointer le bout de son petit nez…

Christophe,

Compatriote de la Yaute, avec qui j'ai partagé de magnifiques moments, tôt le matin les mains dans la « tripaille » de Rat… Mais que ne serions-nous pas prêts à faire pour la gloire universitaire de la Physiologie ?! Je te souhaite beaucoup de réussite dans ta toute nouvelle vie de Docteur et beaucoup de bonheur dans ton nouveau rôle de jeune papa

Mes co-équipières dans la grande aventure de la Biologie Moléculaire, Rolande & Valérie

Vous m'avez accueillie avec une immense gentillesse, entourée de votre affection, soutenue dans les moments difficiles et encouragée quand il le fallait. Nous aurons partagé de mémorables moments autour de notre thermocycleur, et de grands instants d'angoisse devant notre table à UV (!), mais toujours dans une bonne humeurs sans faille. Trouvez ici le témoignage de ma sincère gratitude et de ma plus profonde sympathie.

Martine,

MERCI… MERCI…. MERCI… MERCI…. …

Pour toute l'aide logistique que tu m'a apportée tout au long de mon séjour au labo : mais qu'aurais-je fais sans toi ?!!!! Un grand merci aussi et surtout pour ta présence et ton soutien. Trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance et sois assurée de ma profonde sympathie.

Laurence, Catherine, Stéphane, Marc-Antoine,

Les « anciens » qui ont su m'accueillir avec beaucoup de gentillesse, et qui ont transmis les valeurs du labo aux jeunes impétrants que nous étions…. Même si notre « génération » aura été moins assidue que vous sur le rituel des croissants du samedi matin !!!! Trouvez ici l'expression de ma plus sincère sympathie.

Anne-Marie,

La gentillesse et la disponibilité sans limite dont tu as toujours fait preuve envers tes collègues, et nous les étudiants du labo, m'ont beaucoup touchée. J'ai également beaucoup d'admiration pour tout le travail de recherche que tu as réalisé au labo… Tu restes pour moi un modèle d'enseignant-chercheur, et j'espère arriver à garder une ouverture d'esprit aussi grande que la tienne au fil des années ! Trouve ici l'expression de toute mon admiration, et de ma sincère reconnaissance. Sois également assurée de ma profonde sympathie.

Ghislaine, Ginette, Noëlle, Christel, Rose-Marie, Annick, Florence, Sylviane, M'sieur Frut', et Jean-Marie,

Vous m'avez accueillie au labo avec beaucoup de gentillesse, et j'ai toujours pu compter sur votre disponibilité pour m'apporter votre aide quand j'en ai eu besoin. Je garderai de mes années passées à vos côtés de très bons souvenirs. Recevez tous mes remerciements, et trouvez ici l'expression de ma plus sincère sympathie.

Je tiens également à remercier tous ceux et toutes celles qui comptent tellement pour moi, et qui par leur amour et leur amitié m'ont permis, non seulement de mener cette thèse à son terme, mais surtout de ne jamais perdre de vue l'essentiel ….

Mes parents,

Vous avez toujours été là….pour partager tous les doutes, les peines et les galères. Aujourd'hui c'est un grand moment de bonheur que je vous propose de partager…. La confiance que vous avez mise en moi depuis mes premiers pas m'aura permis de croire en mes rêves, et finalement d'en réaliser un ! Merci … infiniment… et plus que ça encore !!!

Ma soeur,

… j 'espère que tu as enfin compris à quoi servaient toutes mes « rayures » ?!!! En tout cas je te remercie d'avoir toujours fait en sorte de t'intéresser à mon travail, et surtout d'être venue assister à ma soutenance : sans toi ça n'aurait pas été pareil !!!

Ma marraine,

Un grand merci… pour TOUT ce que tu as partagé avec moi depuis 28 ans !!! Je suis heureuse d'avoir pu partager ce moment si important pour moi avec toi.

Le Docteur Oliviet Bolliet (!),

Simplement « merci » pour tout le bonheur que tu mets dans chaque instant de ma vie et le sens que tu lui a donné….

Mon Biloose,

La physiologie est, et restera ma discipline de prédilection pour au moins une chose : c'est grâce à elle que nous nous sommes rencontrées !!!! Mes années passées sur les bancs de la fac à tes côtés resteront des souvenirs inoubliables… comme beaucoup des moments partagés avec toi d'ailleurs !

…Merci pour tout ma Virg'…. Et je te souhaite de connaître vite, vite, vite tout le bonheur et le succès que tu mérites !!!

Vaness', Aurel, Audrey, Alain & Stephan, Vrinette, Michèle & Pierrick, Marie & Gaël,

Notre amitié date d'hier, d'avant hier ou de bien plus longtemps, mais votre présence, nos bons moments partagés, votre soutien dans les moments difficiles, nos heures passées au téléphone (!), votre énergie et la confiance que vous avez mise en moi quand je n'y croyais plus m'ont portée jusque là. Trouvez ici l'expression de ma plus sincère reconnaissance, et de ma plus sincère amitié.

Et ma bande de la Yaute : Véro & Jojo, Arnaud, Lolo,

On avait partagé nos rêves et nos espoirs de lycéens, il y a presque 10 ans déjà… On ne s'était pas donné rendez-vous sur une place (!) mais votre présence auprès de moi en ce jour si important voulait dire beaucoup, et m'a énormément touchée. Merci d'avoir toujours été là tout au long de ces années….Dans les bons, et les moins bons moments, j'ai toujours pu compter sur votre soutien et votre affection. Soyez aujoud'hui assurés de ma profonde gratitude et de mon indéfectible amitié.

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont pu être réalisés grâce aux financements du Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche, et de la Société Française d'Hypertension Artérielle.

Le travail présenté dans cette thèse a donné lieu aux articles et communications suivants :

Articles

$A^{1166}C$ polymorphism of Angiotensin II Type 1 Receptor, Blood Pressure and Arterial Stiffness in Hypertension

Gardier S, Vincent M, Lantelme P, Rial M.O, Bricca G, Milon H.

Journal of Hypertension 2004, 22 :2135-2142.

Determinants of Cardiac and Vascular Damages in Hypertension: Differences according to *CYP11B2* Gene Polymorphism

Gardier S, Lantelme P, Champomier P, Bricca G, Milon H, Vincent M.

American Journal of Hypertension (soumis)

Article associé au travail

Significance of Urinary Angiotensinogen in Essential Hypertension as a Function of Plasma Renin and Aldosterone Status

Lantelme P, Rohrwasser A, Vincent M, Cheng T, Gardier S, Legedz L, Bricca G, Milon H.

Journal of Hypertension 2005 (sous presse)

Communication orale

XXI^{es} Journées de l'Hypertension Artérielle. Société Française d'Hypertension Artérielle. Paris-Décembre 2001

Hyperaldostéronisme Sensible à la Dexaméthasone dans une population d'Hypertendus Hospitalisés. Etude d'un cas index.

Gardier S, Mestre C, Lantelme P, Vincent M, Milon H.

Communications affichées

Joint Meeting. 19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension - 12th European Meeting on Hypertension. Prague-Juin 2002

Familial Hyperaldosteronism Type-I in Hospitalized Hypertensive Patients.

Gardier S, Lantelme P, Mestre C, Vincent M, Milon H

XIVth European Meeting on Hypertension. European Society of Hypertension.
Paris-Juin 2004
Pulse Wave Velocity and $A^{1166}C$ Polymorphism of Angiotensin II type 1 Receptor in Hypertension
Gardier S, Lantelme P, Rial M.O, Bricca G, Milon H, Vincent M.

XXVI^{es} Journées de l'Hypertension Artérielle. Société Française d'Hypertension Artérielle. Paris-Décembre 2004
Polymorphisme –344C/T du Gène de l'Aldostérone Synthase (CYP11B2) et Remodelage Cardiovasculaire dans l'Hypertension artérielle
Gardier S, Lantelme P, Bricca G, Champomier, Milon H, Vincent M.

Liste des Abréviations

ACTH	Adrenocorticotrophic hormone
ADH	Anti-diuretic hormone
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGT	Angiotensinogène
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ang	Angiotensine
ARA	Antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II
ARNm	Acide ribonucléique messager
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CaM	Calmoduline
CaMK	Calmoduline kinase
CML	Cellule musculaire lisse
DAG	Diacylglycérol
EC	Enzyme de conversion
ENaC	Canal sodium épithélial amiloride-sensible
HSD	Hyperaldostéronisme sensible à la dexaméthasone
HTA	Hypertension artérielle
HVG	Hypertrophie ventriculaire gauche
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
IMVG	Index de masse ventriculaire gauche
IP_3	Inositol triphosphate
MAPA	Mesure ambulatoire de la pression artérielle
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEC	Matrice extracellulaire
MR	Mineralocorticoid
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NO	Monoxyde d'azote
PA	Pression artérielle
PAD	Pression artérielle diastolique
PAS	Pression artérielle systolique
PCR	Polymerase chain reaction
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
SRA	Système rénine-angiotensine
SRAA	Système rénine-angiotensine aldostérone
TGF_β	Transforming growth factor bêta
TNF_α	Tumor necrosis factor alpha
VOP	Vitesse de l'onde de pouls

Table des Matières

Remerciements 3

Introduction 18

PARTIE 1 : Revue Bibliographique 21

I Physiologie du Système Rénine –Angiotensine – Aldostérone 22

A Historique 22

B La Rénine 23

1 Synthèse de la rénine 23

1.1 Rénine active et inactive 23

1.2 Régulation de la synthèse rénale de rénine 24

a) Barosensibilité de la sécrétion de rénine 24

b) Macula densa et influence du sel sur la sécrétion de rénine 25

c) Système nerveux sympathique 25

d) Rétrocontrôle exercé par l'angiotensine II 26

C L'angiotensinogène 27

D Les angiotensines 27

1 Synthèse de l'angiotensine II 28

1.1 Voie de l'Enzyme de conversion 28

1.2 Autres voies de synthèse 28

2 Dégradation de l'Ang II et synthèse des angiotensines III, IV et (1-7) 29

E Récepteurs des Angiotensines 31

1 Récepteurs de l'angiotensine II 31

1.1 Récepteurs AT1 31

a) Voie de signalisation des phospholipases 32

b) Voie des protéines kinases 33

1.2 Récepteurs AT2 35

1.3 Récepteurs aux angiotensines III, IV, et (1-7) 35

F Effets physiologiques de l'Angiotensine II 36

1.1 Actions sur le métabolisme hydrosodé 37

a) Stimulation de la sécrétion d'aldostérone 38

b) Actions rénales 38

c) Actions sur le système nerveux central 38

1.2 Action vasoconstrictrice 40

G L'aldostérone 41

1 Synthèse 41

2 Régulation de la synthèse et de la sécrétion 41

2.1 Angiotensine II 42

2.2 Potassium 44

2.3 Hormone adénocorticotrope (ACTH) 45

3 Actions physiologiques de l'aldostérone 46

3.1 Effets génomiques et récepteurs aux minéralocorticoïdes 46

3.2 Effets non-génomiques 49

II Les systèmes rénine-angiotensine aldostérone tissulaires 51

A SRA intrarénal 52

B SRAA cardiaque 53

C SRAA vasculaire 54

D SRA surrénalien 55

E SRA cérébral 55

III Angiotensine II, aldostérone et retentissement cardiovasculaire 56

A Angiotensine II et retentissement cardiovasculaire 56

1 Angiotensine II et retentissement cardiaque 56

2 Angiotensine II et vaisseaux 59

B Aldosterone et retentissement cardiovasculaire 61

1 Effets de l'aldostérone sur la structure et la fonction cardiaque ... 61
2 Effets de l'aldostérone sur les vaisseaux ... 62
3 Facteurs influençant l'impact cardiovasculaire de l'aldostérone ... 63

IV Génétique du SRAA et Système Cardiovasculaire ... 64
A Génétique et Hypertension Artérielle ... 64
B Formes Monogéniques d'HTA ... 64
1 Hyperaldostéronisme sensible à la dexaméthasone (HSD) ... 65
2 Autres formes monogéniques d'hypertension ... 68
C Principaux Polymorphismes des Genes du SRAA ... 71
1 Gène de la rénine *REN* ... 71
2 Gène de l'angiotensinogène *AGT* ... 71
3 Gène de l'enzyme de conversion *ACE* ... 72
4 Gène du récepteur de type 1 à l'angiotensine II *AGTR1* ... 72
5 Gène de l'aldostérone synthase *CYP11B2* ... 76

Objectifs ... 81

PARTIE 2 : Méthodes ... 84

I Population d'étude et Bilan Standardisé ... 85
A Population d'étude ... 85
B Bilan standardisé ... 85
1 Données cliniques et variables de retentissement cardiovasculaire utilisées dans ce travail. ... 85
a) Auto-questionnaire ... 85
b) Mesure de la pression artérielle ... 86
- Mesure conventionnelle et Dinamap ... 86
- Mesure ambulatoire de la pression artérielle (MAPA) ... 86

c) Vitesse d'onde de pouls ... 86
d) Echocardiographie trans-thoracique ... 88
2 Dosages Biologiques ... 89

II Détermination des génotypes ... 90
A Principes du génotypage ... 90
B Polymorphisme A 1166 C du récepteur de type 1 de l'angiotensine (*AGTR1*) ... 90
1 Le polymorphisme ... 90
2 Les amorces ... 90
3 Conditions expérimentales ... 91
4 Electrophorèse et lecture des génotypes ... 92
C Polymorphisme –344 C/T de l'aldostérone synthase *(CYP11B2*) ... 93
1 Le polymorphisme ... 93
2 Les amorces ... 94
3 Conditions Expérimentales ... 95
4 Electrophorèse et lecture des génotypes ... 95

III Diagnostic moléculaire de l'HSD ... 97

PARTIE 3 : Résultats ... 101

I Polymorphisme du gène du récepteur de type 1 à l'angiotensine II (*AGTR1*), pression artérielle et rigidité artérielle chez l'Hypertendu. ... 102
A Buts de l'étude ... 102
B Sujets et Méthodes ... 102
C Résultats ... 103
D Conclusions ... 103

II Influences du polymorphisme -344 C/T du gène de l'aldostérone synthase (*CYP11B2*) sur les déterminants de l'hypertrophie ventriculaire gauche et de la rigidité artérielle, chez l'Hypertendu. ... 104
A Buts de l'étude ... 104
B Sujets et Méthodes ... 104
C Résultats ... 105
D Conclusions ... 105

III Hyperaldostéronisme sensible à la dexaméthasone Dans une population d'Hypertendus Hospitalisés 106
A Buts de l'étude 106
B Sujets et Méthodes 107
C Résultats 107
1 Bilan complémentaire du cas index 108
a) Test à la Dxm 108
b) Stéroïdes urinaires 18-hydroxy et 18- oxo dérivés du cortisol 109
2 Dépistage et étude des apparentés 109
D Conclusion 111

PARTIE 4 : Discussion Perspectives Conclusions 112

I Discussion 113
A Hyperaldostéronisme sensible à la dexaméthasone (HSD) 113
B Apport des études d'association 116
1 SRAA, pression artérielle et HTA 116
2 SRAA et rigidité artérielle 117
3 SRAA et structure cardiaque 118
4 Limites de notre travail et des études d'association 120

II Perspectives -Conclusions 124

Références Bibliographiques 125

Article associé au travail 150

Annexes 151

I Extraction de l'ADN génomique 152

Introduction

Le système rénine-angiotensine aldostérone (SRAA) est un système hormonal qui joue un rôle de tout premier plan dans la régulation de la pression artérielle (PA) et le contrôle de la balance hydrosodée. L'angiotensine II (Ang II) et l'aldostérone, les deux hormones de ce système, combinent leurs effets à court, moyen, et long terme sur leurs principaux organes cibles : les vaisseaux, le cœur, le rein et le cerveau. Ces actions sont responsables d'une vasoconstriction, d'une rétention hydrosodée, mais aussi de modifications structurales de ces organes.

L'hypertension artérielle (HTA) est une pathologie complexe, multifactorielle, dont le déterminisme est associé à des facteurs environnementaux et génétiques. Il est maintenant bien admis que la variance de la PA est pour environ 30% génétiquement déterminée. Le rôle du SRAA dans la physiopathologie de l'HTA est fondamental. Des modifications au niveau des gènes codant pour les différentes protéines de ce système ont été les premières à être incriminées et étudiées.

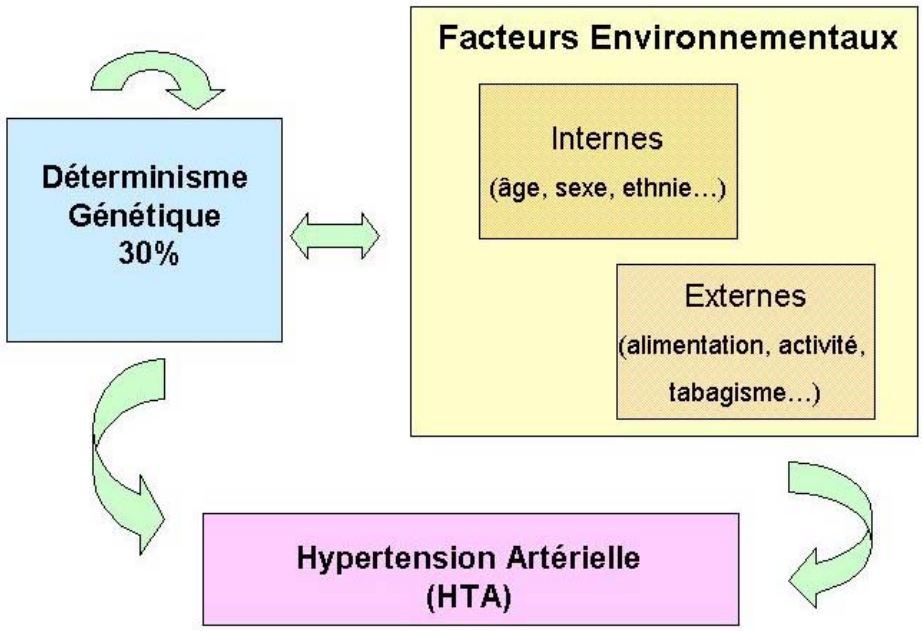

Figure 0. Schématisation des interactions gènes-gènes, et gènes-environnement impliquées dans la pathogénèse de l'hypertension artérielle.

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à étudier l'implication génétique du SRAA dans la pathologie hypertensive au sein d'une population de patients hypertendus

hospitalisés, en utilisant deux approches : les études d'association concernant les gènes *AGTR1* et *CYP11B2*, et l'étude d'une forme rare d'HTA monogénique, l'hyperaldostéronisme sensible à la dexaméthasone (HSD).

Avant de présenter les résultats de notre travail personnel, nous rappellerons les bases physiologiques du fonctionnement du SRAA, son rôle dans la pathologie hypertensive, et les données actuelles concernant son implication dans le déterminisme génétique de l'HTA, et dans le retentissement cardiovasculaire associé.

PARTIE 1 : Revue Bibliographique

I PHYSIOLOGIE DU SYSTEME RENINE–ANGIOTENSINE–ALDOSTERONE

A HISTORIQUE

La première étape dans l'histoire du système rénine-angiotensine (SRA) fut la mise en évidence en 1898 par Tigerstedt de l'effet presseur d'un extrait aqueux de rein de Lapin (*Tigerstedt et al, 1898*). Plus tard, Ruyter et Oberlin, respectivement en 1925 et 1927, décrivent pour la première fois l'appareil juxtaglomérulaire du rein de Mammifère, et notent la présence de grains de sécrétion dans les cellules myoépithélioïdes des artérioles préglomérulaires. Dans les années 1930 de grandes avancées ont été faites avec les découvertes de Goldblatt et Pickering qui montrèrent qu'un rein ischémique induisait une hypertension artérielle systémique, et que la substance responsable de cet effet, était une substance humorale sécrétée par l'appareil juxtaglomérulaire : la rénine.

L'activité enzymatique de la rénine fut découverte au début des années 1940 par les groupes de Page, et de Nunoz et Braun-Menendez. Les expériences qu'ils menèrent montraient que le substrat de la rénine, l'angiotensinogène, était présent dans le plasma et que l'élévation de la pression artérielle observée était due au produit de la réaction rénine + substrat.

D'abord connue sous le nom d'*hypertensin*, l'angiotensine I (Ang I), fut isolée, puis séquencée par l'équipe de Skeggs au milieu des années 1950 (*Skeggs, Jr. et al, 1954* ; *1955*). Ils montrèrent que la séquence de l'Ang I correspondait aux 10 acides aminés N-terminaux de l'angiotensinogène, et que l'Ang I était inactive mais avait la capacité de se cliver en un peptide plus petit, vasoactif, l'angiotensine II (Ang II) dont la séquence fut publiée par la même équipe en 1956 (*Skeggs, Jr. et al, 1956b* ; *1956a*). Dans les années qui suivirent le lien fut établi entre l'Ang II et la sécrétion de l'aldostérone, hormone isolée en 1954 par l'équipe de Simpson et Tait (*Simpson et al, 1954*). La régulation de la réponse pressive à l'Ang II par le niveau initial de rénine et d'angiotensinogène fut mise en évidence dans la même période, et au début des années 60, grâce aux travaux de Gross et de Genest, la boucle de régulation hormonale entre la charge sodée, le système rénine-angiotensine et la sécrétion d'aldostérone était décrite.

B LA RENINE

La rénine appartient à la famille très ancienne des aspartyl protéases, enzymes qui agissent en présence d'une molécule d'eau et qui hydrolysent leur substrat, sans le lier de manière covalente. Ces enzymes sont constituées de 2 domaines délimitant un sillon catalytique hydrophobe au fond duquel sont localisés les aspartates et le site actif de l'enzyme, ce qui explique la nécessité d'un substrat également hydrophobe. En ce qui concerne la rénine les aspartates sont en position 32 et 215, et bien que chacune appartienne à un domaine, elles sont allostériquement assez proches l'une de l'autre. La rénine a la particularité d'avoir un pH optimum (5 à 7,5 pour la rénine humaine) beaucoup plus alcalin que les autres aspartyl protéases qui agissent habituellement dans des conditions de pH comprises entre 2 et 4. Par ailleurs. la rénine possède un substrat spécifique, l'angiotensinogène, alors que les autres aspartyl protéases ne présentent pas cette spécificité d'action (*Gould et al, 1971*).

1 Synthèse de la rénine

1.1 Rénine active et inactive

La rénine rénale est synthétisée sous forme de pré-prorénine. Ce segment « pré- » est un peptide signal qui permet l'ancrage de la molécule dans les structures membranaires de l'appareil de Golgi où la molécule subit une maturation qui la transforme en prorénine. Cette forme inactive peut être sécrétée telle quelle ou subir une dernière maturation dans les granules de sécrétion, qui aboutira à la forme active de la rénine. Le pro-peptide est un fragment de 45 acides aminés dont le positionnement allostérique inhibe l'activité enzymatique de la rénine, en masquant le site actif de l'enzyme au substrat qu'est l'angiotensinogène. La maturation de la prorénine en rénine active est spécifique des cellules myoépithélioïdes des artérioles afférentes des glomérules rénaux et in vivo il n'existe pas d'activation périphérique de prorénine inactive en rénine active (*Toffelmire et al, 1989*).

1.2 Régulation de la synthèse rénale de rénine

Le taux de sécrétion de la rénine par le rein constitue le déterminant majeur de l'activité du système rénine–angiotensine. La stimulation aiguë de la sécrétion de rénine s'accompagne d'une dégranulation immédiate des cellules myoépithélioïdes, aboutissant à une décharge de rénine active dans le plasma. C'est la sécrétion de rénine active qui est régulée, et elle est contrôlée par la barosensibilité rénale, la macula densa, le système nerveux sympathique et l'angiotensine II.

a) Barosensibilité de la sécrétion de rénine

Les barorécepteurs rénaux, situés dans l'artériole afférente, ont pour fonction de contrôler en permanence la perfusion rénale et de déclencher la sécrétion de rénine dans le cas d'une baisse de pression artérielle rénale. Les cellules juxtaglomérulaires joueraient elles aussi un rôle dans la détection des variations de perfusion rénale, grâce à une possible sensibilité à l'étirement.

En dessus d'une valeur seuil, aux environs de 80 mmHg, les variations de pression de perfusion rénale n'ont peu ou pas d'effet sur la quantité de rénine sécrétée. Par contre une fois la valeur seuil franchie, la sécrétion de rénine est déclenchée et elle augmente ensuite de manière linéaire proportionnellement à la chute de pression (Fig. 1).

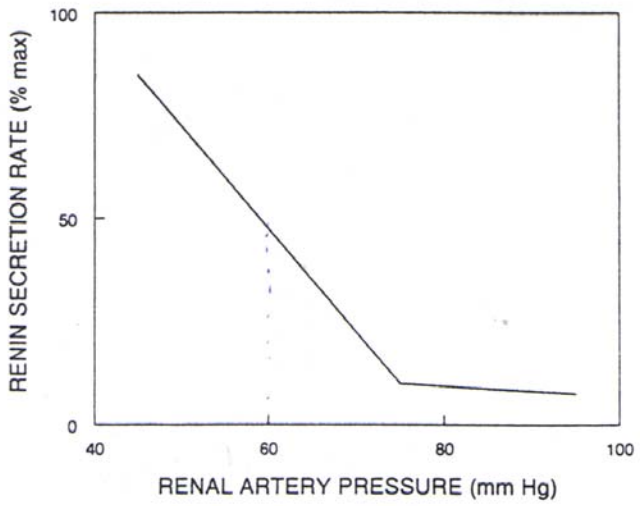

Figure 1. Relation entre la sécrétion de rénine (exprimée en % du maximum) et la pression de perfusion rénale. (*Reid, 1998*)

b) Macula densa et influence du sel sur la sécrétion de rénine

Il a été montré que l'influence du régime sodé sur la sécrétion de rénine passe par la macula densa qui agit comme un capteur sensible au sel (*Skott et al, 1987*). La proximité anatomique de la macula densa et de l'artériole afférente explique les interactions fonctionnelles entre ces deux composantes de l'appareil juxtaglomérulaire. La macula densa détecte les variations de concentration de NaCl du contenu du tubule distal et modifie en conséquence la sécrétion de rénine dans les cellules myoépithélioïdes de l'artériole afférente (*Schnermann, 1998*). Ainsi un régime pauvre en sel stimule la sécrétion de rénine, alors qu'à l'inverse un régime riche en sel va freiner cette sécrétion. Les mécanismes responsables de la transmission du signal « sel » aux cellules myoépithélioïdes restent pour une part à décrire mais il semble que le chlore soit le signal principal. En effet, une relation positive existe entre la concentration d'ions chlorure dans la macula densa et la sécrétion de rénine. Cette réponse pourrait être médiée par les co-transporteurs Na^+-K^+-$2Cl^-$.situés à la face luminale du tubule distal. D'autres messagers pourraient être impliqués dans cette voie de signalisation cellulaire comme l'adénosine et le monoxyde d'azote.

c) Système nerveux sympathique

Comme tous les autres composants vasculaires et tubulaires du rein, les cellules juxtaglomérulaires sont innervées par des neurones post-ganglionnaires sympathiques. Il a ainsi été montré que la sécrétion de rénine est étroitement liée au tonus sympathique rénal. Elle augmente lors de la stimulation des nerfs orthosympathiques rénaux et au contraire diminue quand les reins sont dénervés (*DiBona et al, 1997* ; *Grandjean et al, 1978*) (Fig. 2). Les effets du système nerveux sympathique sur la sécrétion de rénine sont médiés par des décharges locales de noradrénaline qui, en se liant à des récepteurs β_1-adrénergiques, activent une voie de transduction du signal via l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Le tonus sympathique peut également agir indirectement sur la sécrétion de rénine en stimulant les récepteurs α-adrénergiques, ce qui conduit à une vasoconstriction de l'artériole afférente. Cette vasoconstriction active les barorécepteurs rénaux et stimule la macula densa aboutissant à une augmentation de la sécrétion de rénine.

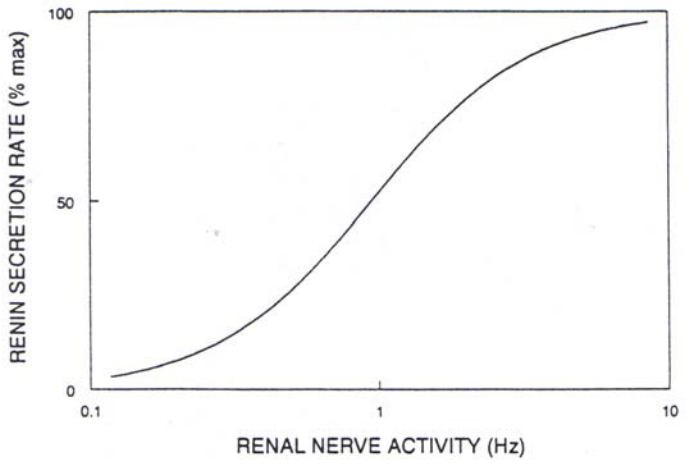

Figure 2. Relation entre la sécrétion de rénine (exprimée en % du maximum) et l'activité nerveuse sympathique rénale. (*Reid, 1998*)

d) Rétrocontrôle exercé par l'angiotensine II

L'angiotensine II inhibe la sécrétion de rénine tout d'abord par ses propriétés vasoconstrictrices, en augmentant la pression artérielle. Mais elle agit aussi directement sur les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire pour diminuer la sécrétion de rénine. L'angiotensine II exerce donc un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de rénine.

La figure 3 résume les principaux facteurs qui régulent la sécrétion de rénine.

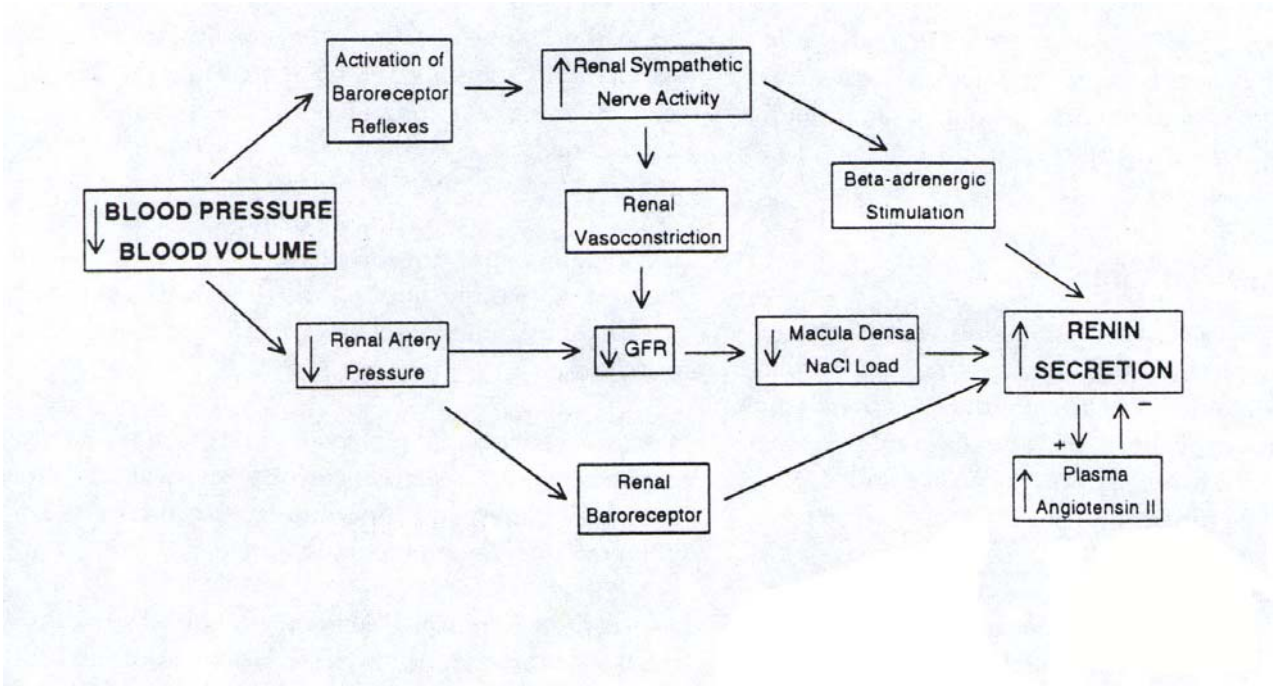

Figure 3. Résumé des voies de régulation de la sécrétion rénale de rénine active. GFR : glomerular filtration rate. (d'après *Reid, 1998*)

C L'ANGIOTENSINOGENE

L'angiotensinogène, est une glycoprotéine appartenant à la famille des inhibiteurs des sérine-protéases (serpines) qui sont des protéines hépatiques jouant un rôle dans l'inflammation, comme l'α1-antitrypsine, l'antithrombine III et l'ovalbumine (*Doolittle, 1983*). L'angiotensinogène est principalement synthétisé et sécrété dans le foie. Il existe néanmoins d'autres lieux de synthèse d'angiotensinogène comme le cerveau, le rein, le cœur et la glande surrénale. Cependant, les quantités ainsi produites restent minimes (environ 4 % de la synthèse hépatique pour le cerveau et 1 à 1,5 % pour les autres tissus). La protéine mature humaine comporte 452 acides aminés et les 10 premiers acides aminés amino-terminaux correspondent à l'angiotensine I. La rénine clive son substrat entre l'acide aminé en position 10 (leucine) et celui en position 11 (leucine ou valine chez l'homme) pour libérer l'angiotensine I. La molécule protidique résiduelle, Des-AI-angiotensinogène, ne semble pas avoir de fonction propre.

Il n'y a pas de processus de stockage de l'angiotensinogène et son taux de sécrétion est donc principalement régulé au niveau transcriptionnel. Les oestrogènes, les glucocorticoïdes, les hormones thyroïdiennes et l'angiotensine II augmentent la sécrétion d'angiotensinogène. Etant une serpine, l'angiotensinogène peut voir son taux de production augmenter jusqu'à 70 % dans les situations de stress inflammatoire. Cette réponse aiguë est sans doute médiée par des cytokines d'origine leucocytaire et potentialisée par la présence de glucocorticoïdes. Si le taux circulant d'angiotensinogène dépend principalement du taux de sa synthèse hépatique et de sa consommation par la rénine, il faut noter que l'expression du gène de l'angiotensinogène dans les autres tissus que le foie, peut être stimulée par d'autres facteurs.

D LES ANGIOTENSINES

Comme nous l'avons vu précédemment, l'angiotensine I (Ang I) est le produit de la réaction de la rénine sur son substrat l'angiotensinogène. Ce peptide, dont la séquence correspond aux 10 acides aminés NH2 terminaux de l'angiotensinogène, est une molécule inactive, qui peut être clivée par différentes enzymes pour produire des peptides biologiquement actifs, dont l'angiotensine II (Ang II), considérée comme l'effecteur majeur du SRA sur le système cardiovasculaire.

1 Synthèse de l'angiotensine II

1.1 Voie de l'Enzyme de conversion

L'enzyme de conversion (EC) est une dipeptide-carboxypeptidase très répandue chez les Mammifères et très largement distribuée dans l'organisme puisqu'elle est présente dans presque tous les tissus. Sa fonction principale est d'hydrolyser les deux derniers acides aminés de l'extrémité carboxy-terminale des peptides. L'activité de cette métallo-enzyme à zinc nécessite la présence d'anions, en particulier le chlore. On lui connaît plusieurs substrats dont les enképhalines, la substance P, les bradykinines et le plus important, l'Ang I. Il existe 3 formes d'enzyme de conversion, une membranaire, la plus répandue, une circulante et une testiculaire. La biosynthèse de l'EC, quelle que soit sa forme, est sous le contrôle d'un seul gène, composé de 7 exons et 8 introns situé sur le chromosome 17q23 chez l'homme (*Mattei et al, 1989*).

La forme membranaire de l'EC est présente sur toutes les cellules endothéliales et épithéliales, donc particulièrement dans les lits vasculaires, d'autant plus qu'ils sont riches en capillaires. Les membranes des cellules musculaires lisses et des fibroblastes contiennent aussi de l'EC mais en moindre quantité. La localisation de l'EC sur la face luminale des cellules endothéliales lui permet un accès facile aux peptides circulants. Ainsi, dans les poumons, particulièrement riches en EC, toute l'Ang I circulante peut être transformée en Ang II en un seul passage pulmonaire.

L'expression tissulaire et le taux circulant de l'EC sont régulés à la fois par des modifications environnementales (i.e certaines conditions pathologiques) et génétiques, ces deux modes de régulation étant en étroite interaction. Chez l'homme, le taux d'EC est génétiquement déterminé et lié à un polymorphisme insertion/délétion situé dans l'intron 16 du gène codant pour l'EC (*Rigat et al, 1990a*). Il existe une relation directe entre le niveau d'expression du gène et ce polymorphisme, bien que celui-ci ne soit pas explicatif.

1.2 Autres voies de synthèse

Outre la voie de synthèse classique, mettant en jeu l'enzyme de conversion, il existe des voies de synthèse de l'Ang II alternatives. Ces voies métaboliques permettent la production d'Ang II soit à partir de l'Ang I, soit directement à partir de l'angiotensinogène.

Bien qu'il reste sans doute beaucoup à découvrir sur ces productions parallèles d'Ang II, un certain nombre d'enzymes sont d'ores et déjà connues, il s'agit notamment de l'α-chymase, de la CAGE (*chymostatin-sensitive angiotensine II-generating enzyme*) et des cathepsines G et D (Fig 4). Ces voies de synthèse non-classiques semblent particulièrement impliquées dans la synthèse d'Ang II dans les SRA locaux, que nous décrirons en détails au chapitre II (*Lavoie et al, 2003*). Ainsi chez l'homme l'α-chymase jouerait un rôle prépondérant dans la synthèse d'Ang II cardiaque (*Balcells et al, 1997* ; *Urata et al, 1993*).

Quelle que soit la voie de synthèse empruntée, le facteur limitant de la production d'Ang II reste la biodisponibilité en rénine.

2 Dégradation de l'Ang II et synthèse des angiotensines III, IV et (1-7)

L'Ang II est rapidement retirée de la circulation, et dégradée par des carboxypeptidases, des endopeptidases et des aminopeptidases très largement distribuées dans l'organisme. Leur présence au niveau du rein en fait un lieu privilégié de la dégradation de l'Ang II filtrée. L'aminopeptidase A joue un rôle crucial dans cette dégradation, elle hydrolyse l'asparagine NH2-terminale de l'Ang II, ce qui aboutit à la formation d'angiotensine (2-8) ou angiotensine III (Ang III). Cette molécule peut se lier aux récepteurs de l'Ang II et bien qu'elle ne possède environ que 10 % de son activité biologique, elle reste suffisamment active pour induire une vasoconstriction ou stimuler la synthèse d'aldostérone. C'est l'aminopeptidase B qui est responsable en grande partie de la dégradation de l'Ang III en angiotensine (3-8) appelée angiotensine IV (Ang IV) (Fig 4). Cette molécule a tout d'abord été considérée comme un peptide inactif, avant que des études, en nombre croissant au cours des dernières années, ne mettent en évidence des propriétés vasoactives, et surtout des effets importants au niveau cérébral, en particulier concernant les processus mnésiques (*Wright et al, 2004a*) (*Bohlen und, 2003*).

De manière locale, l'Ang II peut également être le substrat d'une enzyme découverte récemment, l'enzyme de conversion 2 (EC 2), qui catalyse la production d'un peptide vasoactif, l'Ang (1-7) (*Donoghue et al, 2000* ; *Tipnis et al, 2000*). L'EC 2 est localisée principalement dans les myocytes cardiaques, les cellules endothéliales et tubulaires rénales ainsi que dans les testicules (*Chappell et al, 1998*). Cette enzyme utilise également, dans une moindre mesure, l'Ang I comme substrat pour former un peptide inactif, l'Ang (1-9), elle-même transformée en Ang (1-7) par l'EC (Fig. 4). L'Ang (1-7) peut également être produite

à partir de l'Ang I, sous l'action de propyl-endopeptidases et d'endopeptidases neutres. En contribuant à la dégradation de l'Ang I, la formation de l'Ang (1-7) tend donc à concurrencer la biosynthèse de l'Ang II.

Par ailleurs, il semble que les effets physiologiques de ce peptide soient globalement opposés à ceux de l'Ang II. Il a en effet été montré que l'Ang (1-7) tend à stimuler la synthèse de monoxyde d'azote (NO) et la sécrétion de prostaglandines ; elle potentialiserait également l'action des bradykinines, en diminuant leur dégradation par l'EC (*Carey et al, 2003b*).

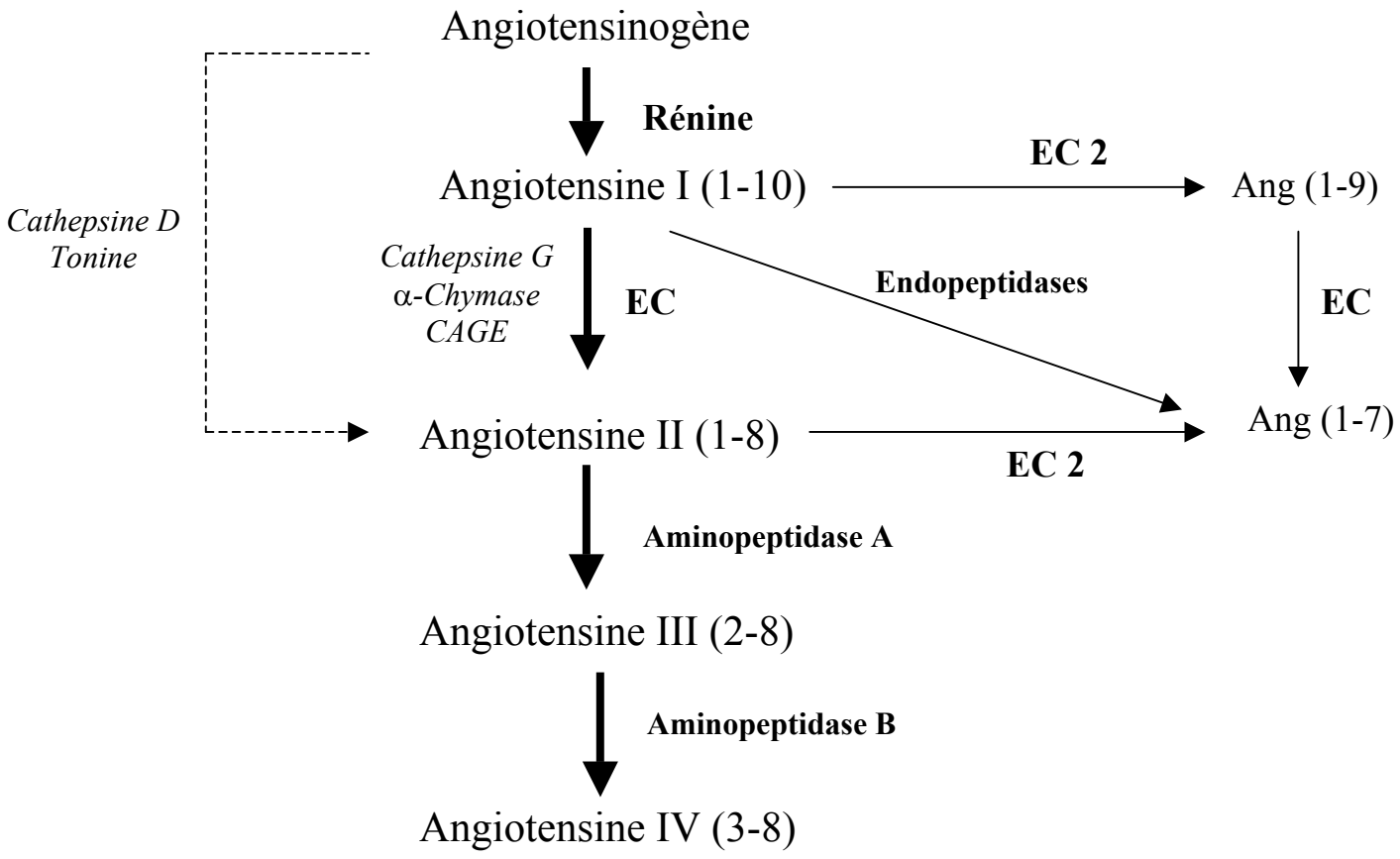

Figure 4. Voie de synthèse classique de l'angiotensine II et voies de synthèse alternatives. EC : enzyme de conversion, Ang : angiotensine, CAGE : chymostatin-sensitive angiotensine II-generating enzyme

E RECEPTEURS DES ANGIOTENSINES

1 Récepteurs de l'angiotensine II

Comme pour les autres hormones peptidiques il a été proposé que l'Ang II agisse sur ses tissus-cibles via des récepteurs situés dans la membrane plasmique des cellules. Les travaux de Peach et de Devynk et Meyer ont montré que des tissus-cible tels que la glande surrénale ou les artères avaient des affinités différentes pour les trois peptides Ang I, Ang II et Ang III. Les études menées pour connaître la structure de ces récepteurs se sont basées sur la spécificité de liaison des récepteurs, et ont testé un grand nombre d'agonistes et d'antagonistes synthétiques. A la fin des années 1980, les travaux menés en parallèle par trois laboratoires aboutirent à une première nomenclature où les récepteurs sensibles au Losartan (DuP753) étaient nommés 1, B ou α alors que les récepteurs qui ne présentaient aucune affinité pour cette molécule étaient nommés 2, A ou β (*de Gasparo et al, 2000*). Dans un but de simplification une seule nomenclature fut proposée en 1991 (*Bumpus et al, 1991*) et mise à jour en 1995 (*de Gasparo et al, 1995b*) ne gardant que l'appellation AT1 et AT2 pour les récepteurs à l'angiotensine II de type 1 et 2, respectivement. Ces récepteurs, aujourd'hui connus pour médier les principaux effets de l'Ang II, appartiennent à la super famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, couplés à une protéine G.

1.1 Récepteurs AT1

Chez l'homme il n'existe qu'un seul type de récepteur AT1, contrairement aux rongeurs chez qui il existe des récepteurs AT_{1a} et AT_{1b}. Ces récepteurs AT1 présentent un intérêt tout particulier et ont été les plus largement étudiés, dans la mesure où il a été montré qu'ils médient la plus grande partie des effets physiologiques de l'Ang II, principalement sur le système cardiovasculaire (*Matsusaka et al, 1997*).

Les récepteurs AT1 sont présents à la surface des cellules de nombreux tissus, les principaux étant le rein, le cœur, les vaisseaux, le cerveau.

Les récepteurs AT1 sont couplés à différentes isoformes de protéines G telles que Gq/11,Gi,Gα12 et Gα13, qui ont en commun d'être activées par la liaison du ligand sur le récepteur. Les cascades de réactions cellulaires déclenchées par la liaison du ligand sont variées et sont notamment différentes selon l'isoforme de la protéine G à laquelle le récepteur AT1 est couplé.

a) Voie de signalisation des phospholipases

La liaison de l'Ang II sur les récepteurs AT1 peut activer trois phospholipases : C, D ou A_2 (Fig. 5).

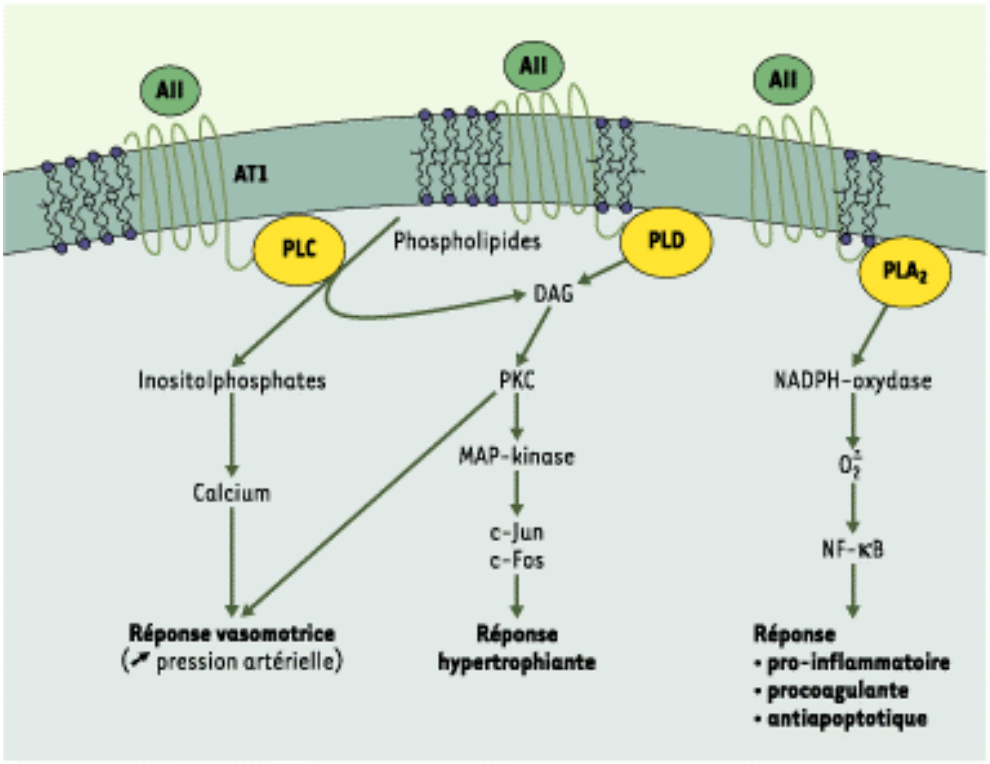

Figure 5. Schématisation des voies de signalisation activées par la liaison de l'angiotensine II (AII) sur ses récepteurs de type 1 (AT1) et des effets engendrés. PLC : phospholipase C, PLD : phospholipase D, PLA_2 : phospholipase A_2. DAG : diacylglycérol. PKC : protéine kinase C. MAP : *mitogen activated protein.* (*Michel, 2004*)

- *phospholipase C*

La réponse la plus rapide à la liaison de l'Ang II sur le récepteur AT1 est une hydrolyse du phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate, qui aboutit à la production de 1,4,5-inositol triphosphate (IP_3) et de diacylglycerol (DAG) (*Alexander et al, 1985*). L'IP_3 est un second messager connu pour induire une mobilisation du calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique et donc une augmentation du calcium intracellulaire. De son côté le DAG active la protéine kinase C (PKC) qui elle-même active l'échangeur Na+-H+ et induit ainsi une alcalinisation du pH intracellulaire (*Touyz et al, 1997*). Cette voie de signalisation est notamment impliquée dans la réponse contractile des cellules musculaires lisses à l'Ang II.

L'activation de la PKC induit par ailleurs d'autres réactions intracellulaires, notamment la phosphorylation des mitogen activated protein kinases (MAPKs).

- *phospholipase D*

La phospholipase D hydrolyse les phospholipides membranaires qui contiennent de la phosphaditylcholine, réaction qui libère de l'acide phosphatidique, source de DAG. Cette voie de signalisation cellulaire semble particulièrement impliquée dans la médiation des effets trophiques (prolifération de cellules musculaires lisses, hypertrophie cardiaque) de l'Ang II, mais elle concourt également à la transduction de ses effets vasoconstricteurs (*Dhalla et al, 1997*).

- *phospholipase A_2*

L'activation de cette enzyme provoque la libération d'acide arachidonique, qui est métabolisé en différents eicosanoides dans les tissus rénaux et vasculaires, sous l'effet d'enzymes telles que les cyclooxygénases, les lipoxygénases et les cytochromes P_{450} oxygénases. Ainsi l'activation de la phospholipase A_2 aboutit à la formation de prostaglandines, de thromboxane, de prostacycline ou encore de leucotriènes (*Bonventre, 1992*). Ces molécules influencent les mécanismes de régulation de la pression artérielle, au niveau rénal et vasculaire, principalement en agissant sur la contractilité des cellules musculaires lisses (*Nasjletti, 1998*).

b) Voie des protéines kinases

La liaison de l'Ang II sur les récepteurs AT1 déclenche de nombreuses cascades de phosphorylation de protéines, impliquant diverses protéines kinases. Les protéines kinases activées par l'Ang II sont tellement nombreuses, qu'il semble difficile de trouver une protéine kinase qui ne soit pas activée par l'Ang II, directement ou indirectement !

Les protéines kinases sont impliquées dans les voies de transduction qui médient les effets de l'Ang II sur l'expression génique et la synthèse protéique. Parmi toutes les protéines kinases activées par l'Ang II, on peut isoler les familles de Src, des JAK, des STAT et des MAP kinases.

i) Src kinases

La famille des Src kinases regroupe des kinases qui sont activées par de nombreux signaux cellulaires, dans différents types de cellules et qui seraient largement impliquées dans les voies de signalisation contrôlant la croissance cellulaire (*Touyz et al, 2000*).
Les Src kinases sont activées dans la première minute qui suit la liaison de l'Ang II sur le récepteur AT1. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires Src joue un rôle dans la phosphorylation d'une isoforme de PLC, et dans la formation d' IP3. Touiz et coll. ont ainsi suggéré que la réponse contractile des CML vasculaires à l'Ang II était en partie médiée par l'activation de ces kinases (*Touyz et al, 1999*).

ii) Janus family kinases (JAK)

Cette famille de protéines kinases rassemble 4 protéines Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2 décrites au début des années 1990 (*Ihle, 1995* ; *Silvennoinen et al, 1993* ; *Wilks et al, 1991*). L'Ang II en se fixant sur son récepteur AT1 active les protéines JAK qui à leur tour phosphorylent des protéines STAT (*signal transducers and activators of transcription*). Les STAT (1α, 1β, 2-6) forment une famille de facteurs de transcription qui, une fois phosphorylés, subissent une translocation du cytosol vers le noyau, où ils interagissent avec des séquences de régulation pour stimuler la transcription de certains gènes, dont *c-fos, c-myc* et *c-jun* (*Dostal et al, 1997*). Via l'activation des JAK, l'Ang II permettrait la phosphorylation des STAT 1α/β, 2 et 3. Cette voie de signalisation serait particulièrement impliquée dans la médiation des effets hypertrophiques de l'Ang II, dans le cœur et les vaisseaux (*Touyz et al, 2002*).

iii) Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs)

Les MAPKs constituent une super famille de sérine/thréonine kinases subdivisée en 6 groupes : ERK-1/ERK-2 ; JNK/stress activated protein kinases (SAPK) ; p38 ; ERK-6 p38-like MAP kinase ; ERK-3 ; ERK-5 (*Robinson et al, 1997*). Ces MAPKs sont le point de convergence de nombreuses voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la différentiation et la prolifération cellulaire. Les MAPKs sont des messagers qui relaient l'information reçue à la surface des cellules jusqu'au noyau, où elles interagissent entre autres avec les oncogènes *c-fos, c-myc, c-jun* pour stimuler leur expression. Les MAPks sont

activées après phosphorylation par une MAPK kinase (MAPKK). L'Ang II favoriserait la phosphorylation des MAPKK en activant, via la protéine kinase C, une autre kinase : la *Raf* kinase. Les MAPKs activées par l'Ang II sont ERK 1/2, JNKs et p38 MAPK, qui joueraient un rôle majeur dans la médiation de certains effets délétères de l'Ang II, notamment les effets profibrotiques et hypertrophiques (*Touyz et al, 2002*).

1.2 Récepteurs AT2

Cette forme de récepteur à l'Ang II est particulièrement exprimée dans les tissus fœtaux et son expression décroît assez rapidement après la naissance. Cependant chez l'adulte des récepteurs AT2 sont encore détectés dans de nombreux tissus tels que le pancréas, le cœur, les reins, les glandes surrénales, le myomètre, les ovaires, le cerveau et également les vaisseaux (*Nahmias et al, 1995*). Ces récepteurs sont réexprimés dans certaines conditions pathologiques et notamment lors des processus de remodelage cardiovasculaire (*Touyz et al, 2002*). Le rôle fonctionnel ainsi que les signaux de transduction cellulaire qui sont associés à ces récepteurs AT2 restent pour beaucoup à explorer. Il semble cependant qu'en conditions physiologiques les effets médiés par ces récepteurs, tendent à contrebalancer ceux médiés par les récepteurs AT1 (*Horiuchi et al, 1997*) (*de Gasparo et al, 1995a*). Parmi ces effets on peut citer l'inhibition de la croissance cellulaire, l'induction de l'apoptose et la synthèse de monoxyde d'azote (NO) (*Blume et al, 2001*). La production de NO, induite par l'Ang II via les récepteurs AT2, a pour conséquence une augmentation de la concentration cellulaire de GMPc (guanosine monophosphate cyclique), second messager dont les principaux effets sont la vasodilatation, la natriurèse et l'inhibition de la croissance cellulaire.

Les récepteurs AT2 pourraient être impliqués dans les processus de remodelage cardiaque post-infarctus mais leur rôle exact reste encore controversé. Cependant des résultats récents montrent que ces récepteurs seraient activement impliqués dans la prévention de l'hypertrophie cardiaque (*Collidge et al, 2004* ; *Metcalfe et al, 2004*).

1.3 Récepteurs aux angiotensines III, IV, et (1-7)

Les actions de l'Ang III semblent principalement médiées par les récepteurs AT1 et AT2, sur lesquels elle se fixe avec une affinité cependant moindre que l'Ang II. L'existence

d'un récepteur spécifique AT3 a également été suggérée, il n'a cependant pas encore été cloné et son rôle fonctionnel reste encore à déterminer (*de Gasparo et al, 2000*).

Les récepteurs AT1 et AT2 n'ont que très peu d'affinité pour l'Ang IV. Des sites de fixation spécifiques pour ce peptide ont été mis en évidence dans différents tissus, et principalement dans le cerveau. Ce site de liaison spécifique a été nommé AT4, et récemment identifié par Albiston et coll. comme un *insulin-regulated membrane aminopeptidase* (IRAP) (*Albiston et al, 2003* ; *Thomas et al, 2003*). La liaison de l'Ang IV sur son récepteur AT4 serait impliquée dans certains processus mnésiques, cognitifs, ainsi que dans des fonctions motrices et sensorielles (*Bohlen und, 2003*). L'Ang IV agirait également au niveau du cœur et du rein, en favorisant l'hypertrophie cardiaque et l'inhibition de la réabsorption tubulaire de sodium (*Carey et al, 2003b*).

Il semble que l'Ang (1-7) agisse, pour une part, via les récepteurs AT1 et AT2, mais l'existence d'un site de liaison spécifique est probable, bien que pour l'instant aucun récepteur n'ait été cloné (*Carey et al, 2003a* ; *Santos et al, 2000*). Récemment, il a été suggéré que l'Ang (1-7) puisse se lier à un récepteur *Mas* couplé à une protéine G, mais les voies de signalisation déclenchées par l'Ang (1-7) restent à clarifier (*Pinheiro et al, 2004* ; *Santos et al, 2000*).

F EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE L'ANGIOTENSINE II

Il paraît assez difficile d'identifier clairement tous les effets de l'Ang II, du fait des nombreuses voies de transduction cellulaires activées par l'Ang II, et de l'existence des deux types de récepteurs AT1 et AT2, antagonistes. Par ses différentes actions, l'Ang II permet une réponse intégrée à une baisse de pression artérielle, grâce à son action vasoconstrictrice et à son action sur le métabolisme hydrosodé. L'Ang II agissant à la fois sur la volémie et les résistances périphériques, il est souvent dit que « l'Ang II agit sur le contenu et sur le contenant » (Fig. 6). Ces effets correspondent à la réponse rapide à l'Ang II. Les principales cibles d'action de l'Ang II sont les cellules musculaires lisses, le cortex des glandes surrénales et le rein. Elle joue également un rôle dans l'activation du système nerveux

sympathique et agit directement sur des zones spécifiques situées dans le cerveau (*Goodfriend et al, 1996*).

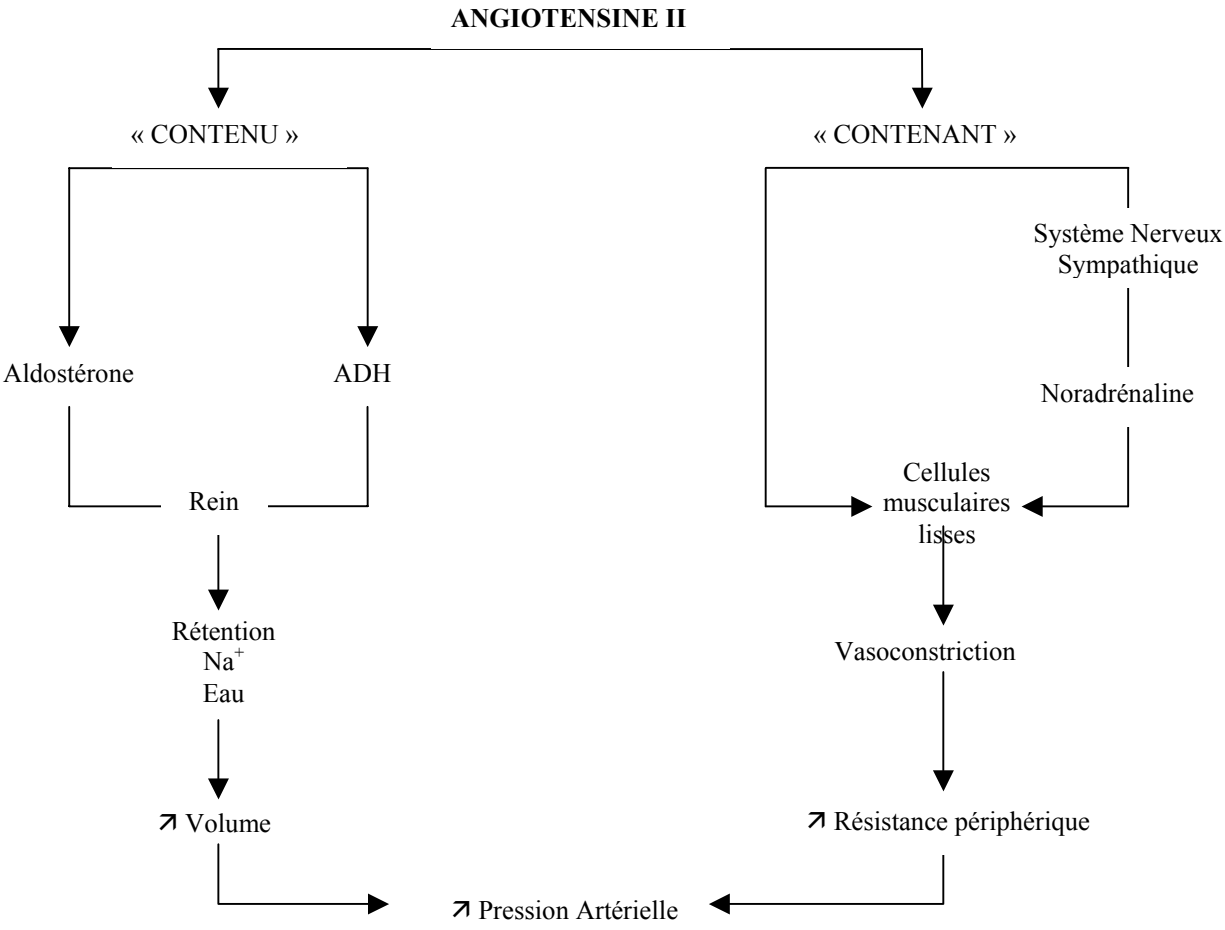

Figure 6. Représentation schématique des actions de l'Ang II responsables d'une augmentation de la pression artérielle. ADH : hormone anti-diurétique, Na+ : sodium. D'après (*de Gasparo et al, 1995a*)

1.1 Actions sur le métabolisme hydrosodé

Un des effets majeurs de l'Ang II est d'induire une rétention d'eau et de sodium en réponse à une déplétion en sodium ou à une baisse du volume plasmatique. Cette rétention hydrosodée est stimulée par des actions directes de l'Ang II sur le rein, mais surtout par ses effets sur la zone glomérulée du cortex surrénalien, où elle stimule la sécrétion d'aldostérone, hormone qui joue un rôle majeur sur le métabolisme hydrosodé.

a) Stimulation de la sécrétion d'aldostérone

Les processus cellulaires mis en jeu seront décrits au chapitre « Régulation de la sécrétion d'aldostérone ».

b) Actions rénales

L'Ang II favorise la rétention hydrosodée au niveau du rein en agissant à la fois sur les vaisseaux sanguins et sur différents transporteurs ioniques des tubules rénaux.

D'un point de vue hémodynamique, l'Ang II provoque une constriction de l'artériole efférente qui réduit le flux sanguin rénal et augmente la pression capillaire glomérulaire, aboutissant à la majoration de la filtration glomérulaire. La fraction de filtration étant augmentée, la pression oncotique dans les vaisseaux péritubulaires augmente également, alors que la pression hydrostatique diminue. Ces modifications de pression dans les vaisseaux péritubulaires favorisent les mouvements de sodium et d'eau depuis les tubules proximaux vers l'interstitium, puis la circulation générale. Par ailleurs l'Ang II diminue le flux sanguin médullaire et donc la pression hydrostatique interstitielle rénale, ce qui réduit l'excrétion de sodium et d'eau (*Brewster et al, 2004*).

An niveau cellulaire , l'Ang II favorise la réabsorption de sodium en agissant sur la membrane luminale des cellules du tubule proximal où elle stimule l'activité du transporteur anti-port Na^+/H^+ (*Garvin, 1991* ; *Liu et al, 1989*). La réabsorption sodée est également favorisée par l'augmentation de l'activité de la pompe Na^+/K^+ et du co-transporteur Na^+/HCO_3^- sur la membrane basolatérale des cellules du tubule proximal (*Garvin, 1991* ; *Wang et al, 1996*). L'angiotensine II agit également sur la pompe Na^+/K^+ dans les cellules de la branche ascendante de Henlé et sur les canaux sodium amiloride-sensibles (ENaC) dans les tubules collecteurs corticaux (*Wang et al, 1996*) (*Peti-Peterdi et al, 2002*).

c) Actions sur le système nerveux central

- *Stimulation de la sécrétion d'hormone anti-diurétique (ADH)*

L'hormone anti-diurétique (ADH) ou vasopressine est produite dans l'hypothalamus, principalement dans les noyaux supraoptiques et en moindre quantité dans les noyaux paraventriculaires. Sous l'influence d'un stimulus l'ADH est libérée par des neurones

sécréteurs hypothalamiques, dans la neurohypophyse, d'où elle diffuse jusque dans le sang. La sécrétion d'ADH est stimulée par l'Ang II circulante, qui agit dans le cerveau sur des zones où la barrière hématoencéphalique (BHE) est réduite, ce qui est notamment le cas de l'organe subfornical (OSF). Les cellules de cet organe se projettent dans l'hypothalamus où elles activent les cellules neurosécrétrices contenant l'ADH, en réponse à la détection d'Ang II (Fig. 7). Après avoir été prise en charge par la circulation systémique, l'ADH atteint son organe cible, le rein, où elle agit sur les cellules des tubes contournés distaux et des tubes collecteurs, qu'elle rend perméables à l'eau, permettant sa réabsorption.

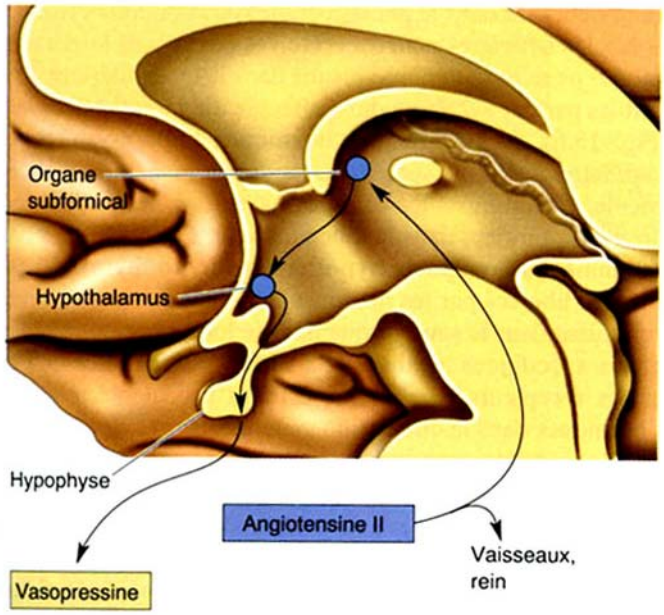

Figure 7. Action de l'angiotensine II sur la sécrétion de vasopressine, via son effet sur les neurones de l'organe subfornical. {Bear, Connors, et al. 1997 588 /id}

- *action dipsogénique*

L'Ang II agit également sur le système nerveux central pour déclencher la sensation de soif. Il existe dans le cerveau un « centre de la soif », composé de plusieurs petites zones situées dans la région préoptique antérolatérale de l'hypothalamus. Les neurones de cette zone sont en fait des osmorécepteurs qui peuvent déclencher la sensation de soif lorsque l'osmolalité du liquide extra-cellulaire est trop élevée. L'OSF et l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) ont de multiples connexions nerveuses avec ce centre. Comme l'OSF, l'OVLT n'est pas protégé par la BHE, et l'Ang II en agissant sur ces deux zones peut moduler l'activité des neurones du « centre de la soif » et induire la sensation de soif.

1.2 Action vasoconstrictrice

La vasoconstriction induite par l'Ang II est rapide et médiée par les récepteurs AT1. Elle est principalement due aux actions directes exercées par l'Ang II circulante sur les vaisseaux, mais aussi pour une part aux actions pressives centrales de l'Ang II.

L'Ang II agit sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux, via l'activation de la PLC, qui agit sur le réticulum sarcoplasmique et les canaux calciques membranaires pour induire une augmentation du calcium intracellulaire. La légère alcalinisation du milieu intracellulaire produite par l'activation des échangeurs Na^+-H^+ par la PKC est un élément important de la réponse vasoconstrictrice des CML vasculaires. Il est possible que les Src kinases jouent aussi un rôle important dans la réponse contractile des cellules musculaires lisses à l'Ang II, mais cette voie reste encore pour beaucoup à explorer (Fig. 8) (*Touyz et al, 2000*).

Au niveau périphérique, l'Ang II agit aussi comme un neuromodulateur : elle favorise la transmission ganglionnaire sympathique et au niveau des terminaisons nerveuses, augmente la libération de noradréanaline tout en diminuant son recaptage.

L'Ang II exerce également des actions pressives centrales, particulièrement en agissant sur l'*area postrema* et l'organe subfornical, qui ne sont pas protégés par la BHE. Ces actions centrales sont modulées par le régime sodé, et notamment augmentées par un régime pauvre en sel.

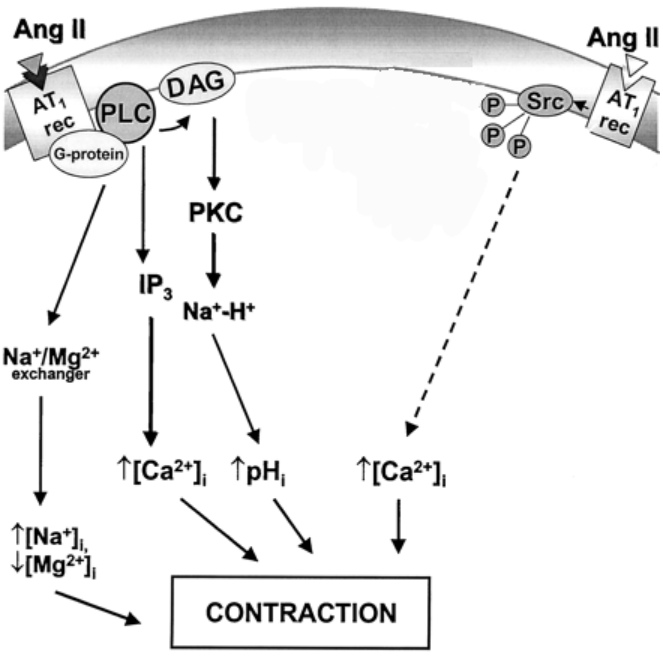

Figure 8. Voies de signalisation cellulaire impliquées dans la réponse contractile des cellules musculaires lisses à l'angiotensine II (Ang II). PLC : phospholipase C ; IP3 : inositol triphosphate ; PKC : protéine kinase C. (*Touyz et al,2000*).

G L'ALDOSTERONE

1 Synthèse

L'aldostérone est un minéralocorticoïde, dérivé du cholestérol (Fig. 9), dont la synthèse a longtemps été considérée comme étant limitée à la zone glomérulée du cortex surrénalien. 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'aldostérone, notamment dans le cerveau, le cœur et les vaisseaux (*Funder, 2001*). Il semblerait que les processus de régulation et les étapes de biosynthèse de l'aldostérone soient comparables dans la glande surrénale et dans les tissus périphériques. Nous reviendrons sur la sécrétion d'aldostérone locale au chapitre II.

Les trois dernières étapes de la synthèse de l'aldostérone sont catalysées par l'aldostérone synthase, une enzyme qui appartient à la famille des cytochromes P_{450}. Cette enzyme a la particularité de posséder trois activités enzymatiques : 11β-hydroxylase, 18-hydroxylase et 18-oxydase qui lui permettent de transformer la déoxycorticostérone en aldostérone**.**

2 Régulation de la synthèse et de la sécrétion

La régulation de la synthèse d'aldostérone dépend principalement du taux d'expression du gène codant pour l'aldostérone synthase, CYP11B2, situé chez l'homme sur le chromosome 8q24.3 (*Taymans et al, 1998*). Classiquement cette sécrétion est contrôlée par la concentration plasmatique d'Ang II, et de potassium (*Aguilera, 1993*). L'hormone adénocorticotrope (ACTH) joue également un rôle sur la synthèse d'aldostérone, bien que celui-ci soit encore mal défini.

Il est possible de diviser en deux phases, aiguë et chronique. De quelques minutes à quelques heures après un stimulus, la synthèse d'aldostérone reflète les mouvements du cholestérol qui se déplace dans les mitochondries pour être métabolisé. Ce processus est en partie médié par les protéines *steroidogenic acute regulatory* (StAR). A plus long terme (quelques heures à quelques jours) la production d'aldostérone est régulée par le niveau d'expression du gène CYP11B2 (*Quinn et al, 1988*).

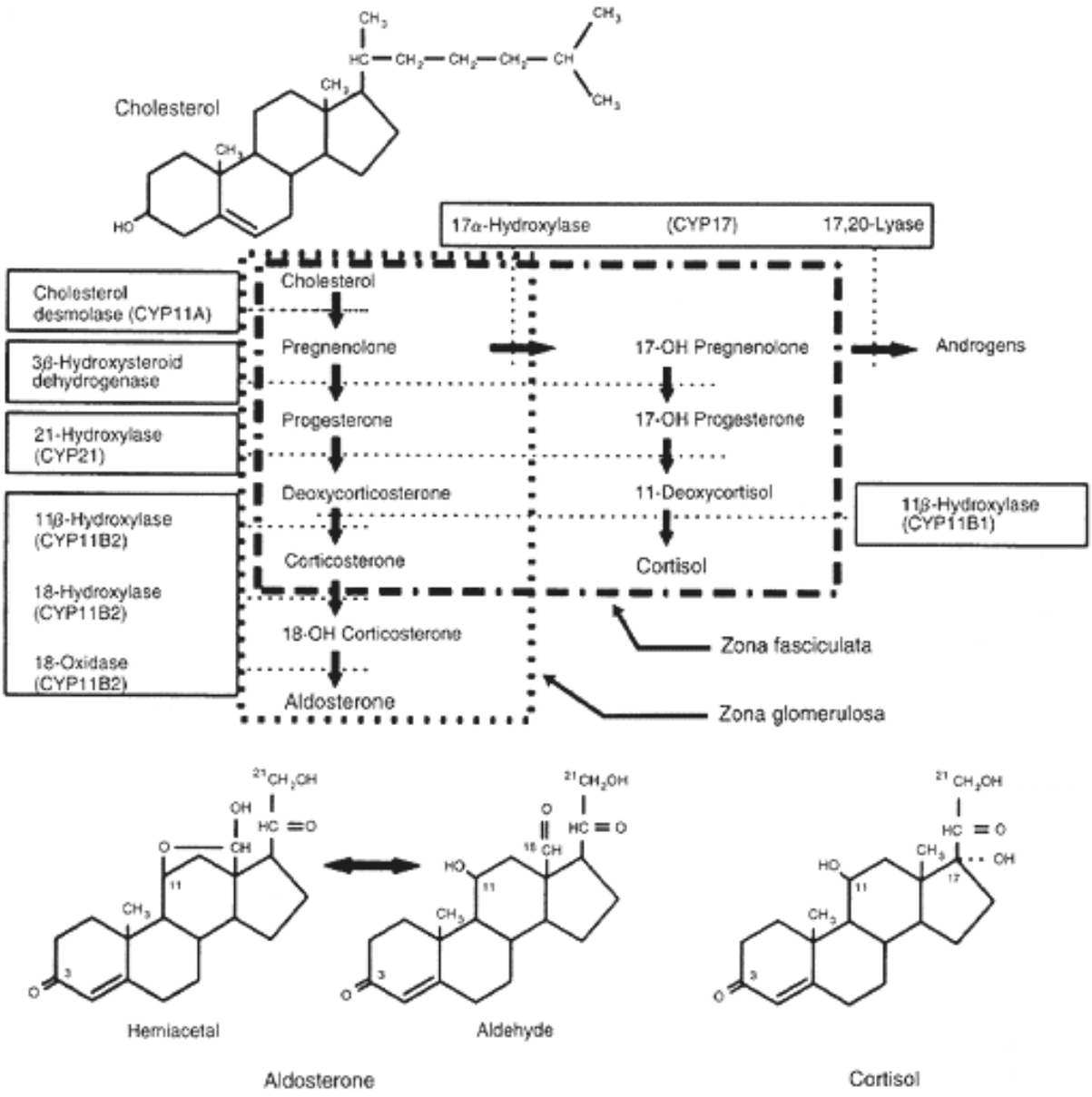

Figure 9. Synthèse des stéroïdes dans la glande surrénale.

2.1 Angiotensine II

L'Ang II est connue pour être le principal régulateur de la synthèse d'aldostérone. Cette fonction majeure de l'Ang II est médiée 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. Comme nous l'avons vu précédemment l'IP3 permet

de mobiliser les stocks de calcium intracellulaire, qui joue un rôle majeur dans la stimulation de la synthèse d'aldostérone, via sa protéine de liaison, la calmoduline (CaM), et les CaM kinases (CaMKs). Parmi les CaMKs connues il semble que celles impliquées dans la stimulation de la production d'aldostérone soient la CaMK I et/ou la CaMK IV (*Condon et al, 2002*). Ces protéines kinases activent des récepteurs nucléaires et d'autres facteurs de transcription qui se lient ensuite sur des séquences spécifiques du promoteur de CYP11B2 pour en induire la transcription (Fig. 10) (*Condon et al, 2002*) ((*Bassett et al, 2004b*). La phospholipase C induit aussi la libération de DAG, qui permet lui-aussi d'augmenter la synthèse d'aldostérone, non pas en activant l'expression de *CYP11B2*, mais vraisemblablement en diminuant l'activité de l'enzyme CYP17, ce qui augmente la biodisponibilité des précurseurs de l'aldostérone. Le fait que des inhibiteurs des CaM et CaMKs diminuent de manière seulement partielle la production d'aldostérone induite par l'Ang II a suggéré que cette voie de signalisation intracellulaire, bien que fondamentale, n'est pas unique (*Pezzi et al, 1996*).

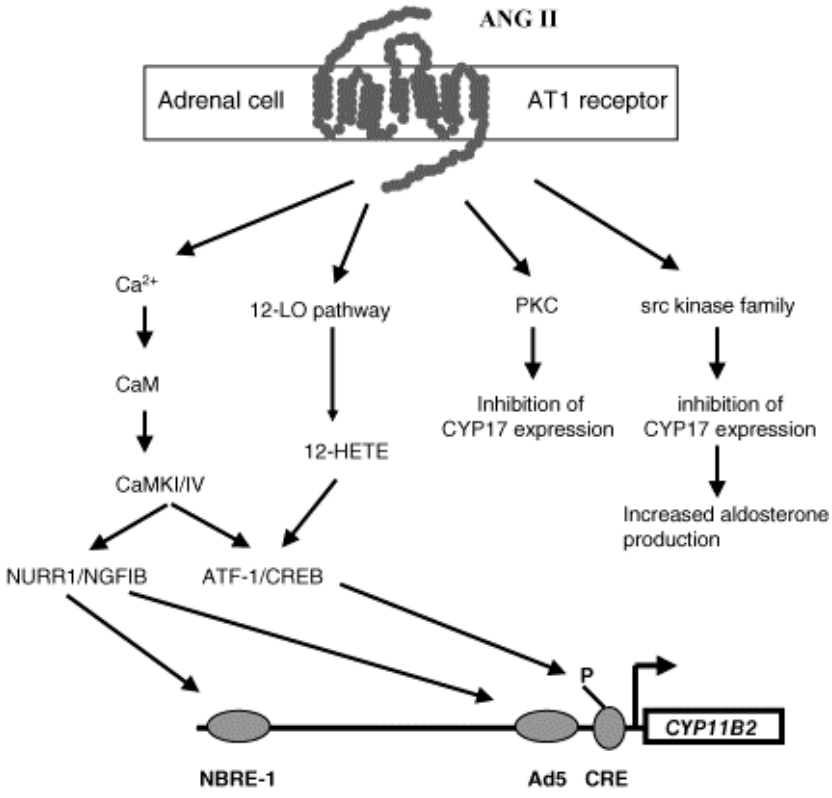

Figure 10. **Voies de signalisation intracellulaire médiant les effets de l'angiotensine II (ANG II) sur l'expression de *CYP11B2* et sur la synthèse d'aldostérone**. Le complexe calcium (Ca2+)-calmoduline (CaM) active les calmoduline kinases (CaMKs) I et/ou IV, qui phosphorylent des récepteurs nucléaires NURR1(Nur-related factor 1) et NGFIB (nerve growth factor-induced clone B), ainsi que d'autres facteurs de transcription tels que les ATF-1 ou les CREB (cAMP response element binding protein). Les récepteurs nucléaires induisent la transcription du gène *CYP11B2* en se fixant sur des éléments-*cis* de transcription NBRE-1 (NGFIB response element) et Ad5, alors que les autres facteurs de transcription se fixent sur un CRE (cAMP response element). La voies des Src kinases permet de diminuer l'expression de *CYP17*. (*Bassett et al, 2004b*)

Parmi les autres voies de signalisation, celle des Src kinases semble jouer un rôle important. De même que le DAG, les Src kinases augmenteraient la synthèse de l'aldostérone en diminuant l'activité de CYP17 (*Bassett et al, 2004b*). Gu et coll. ont également mis en évidence l'implication de la 12-lipoxygénase (12-LO) dans la production d'aldostérone induite par l'Ang II. Cette enzyme présente dans les cellules glomérulées est stimulée par l'Ang II, et pourrait augmenter la synthèse d'ARNm de CYP11B2 (*Gu et al, 2003* ; *Gu et al, 1994*).

2.2 Potassium

L'activation de la synthèse d'aldostérone par le potassium implique une dépolarisation de la membrane des cellules de la zone glomérulée, qui induit un influx de calcium dans les cellules de la zone glomérulée, via l'ouverture de canaux calciques voltage dépendants de type L et T (Fig. 11). L'équipe de White a récemment montré que le potassium empruntait une voie de transduction cellulaire semblable à celle de l'Ang II, utilisant le calcium comme second messager et activant les mêmes éléments-*cis* de transduction, NBRE-1 et Ad5 (Fig. 12) (*Bassett et al, 2004a* ; *Clyne et al, 1997a*).

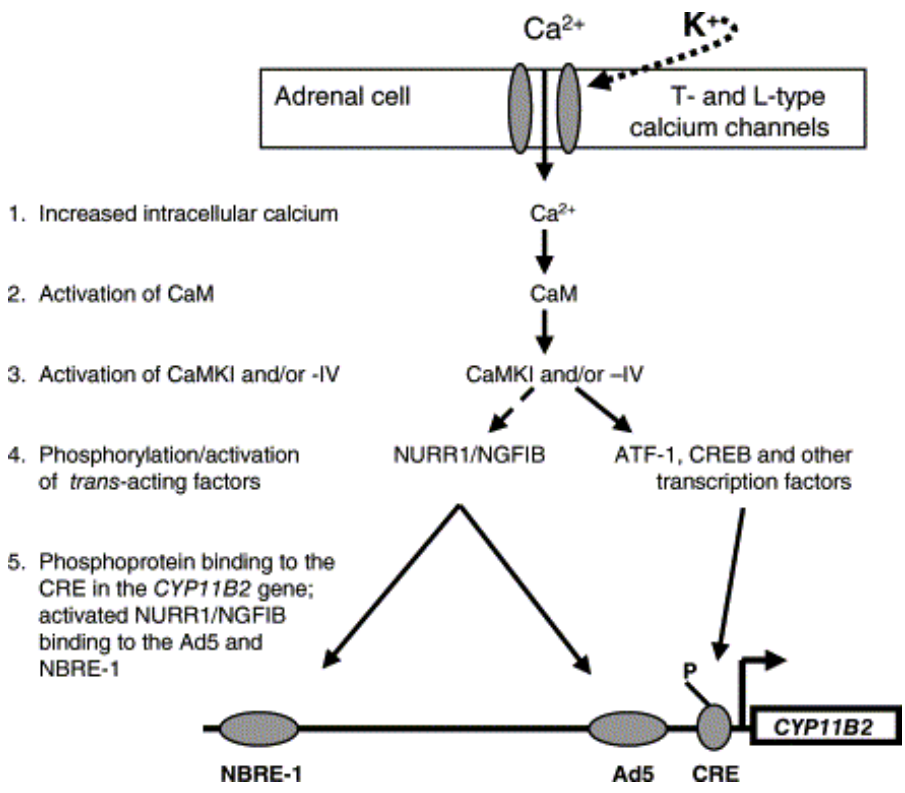

Figure 11. **Voie de signalisation intracellulaire activée par le potassium et agissant sur l'expression de CYP11B2**. Le complexe calcium (Ca2+)-calmoduline (CaM) active les calmoduline kinases (CaMKs) I et/ou IV qui phosphorylent des récepteurs nucléaires NURR1(Nur-related factor 1) et NGFIB (nerve growth factor-induced clone B), ainsi que d'autres facteurs de transcription tels que les ATF-1 ou les CREB (cAMP response element binding protein). Les récepteurs nucléaires induisent la transcription du gène CYP11B2 en se fixant sur les éléments-*cis* de transcription NBRE-1 (NGFIB response element) et Ad5, alors que les autres facteurs de transcription se fixent sur un CRE (cAMP response element). (*Bassett et al, 2004b*)

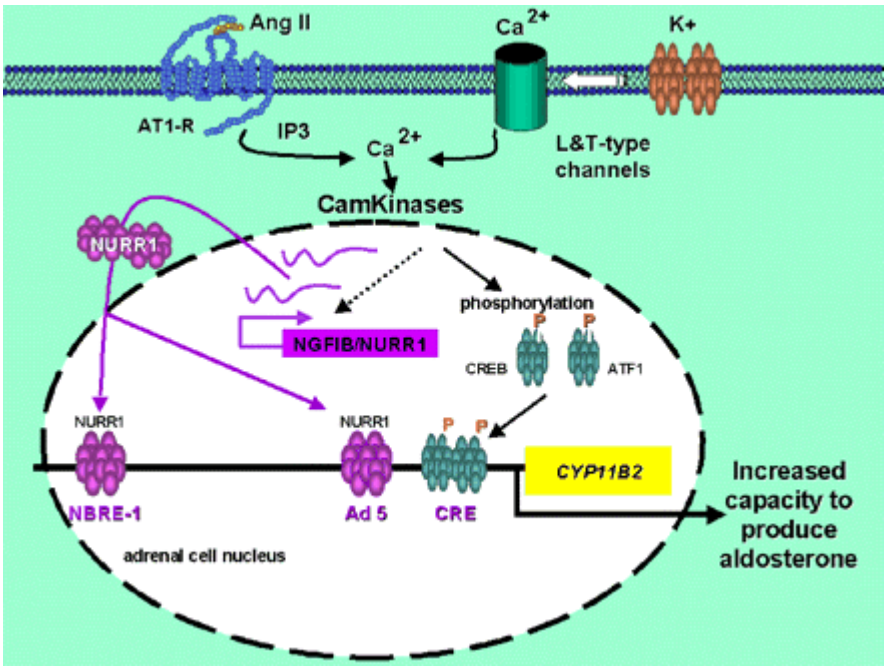

Figure 12. Voie de signalisation commune à l'angiotensine II (Ang II) et au potassium (K^+), utilisant le calcium (Ca^{2+}) comme second messager et aboutissant à la stimulation de l'expression du gène *CYP11B2 (Bassett et al,2004a)*.

2.3 Hormone adénocorticotrope (ACTH)

L'ACTH est sécrétée par l'adénohypophyse et principalement connue pour contrôler la synthèse du cortisol dans la zone fasciculée du cortex surrénalien. Cette hormone agit sur l'expression du gène *CYP11B1*, codant pour la 11β-hydroxylase, enzyme qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse du cortisol (Fig. 9). Ce gène présente une grande homologie de séquence avec le gène *CYP11B2*, et n'est distant que de 40 kilobases (*Lifton et al, 1992b*). L'ACTH agit également dans les cellules de la zone glomérulée qui possèdent également des récepteurs spécifiques. Des études in vivo et sur des cellules isolées ont montré que lors d'une stimulation aiguë l'ACTH augmente la production d'aldostérone alors qu'une perfusion chronique inhibe la synthèse d'aldostérone. Il est généralement admis que l'ACTH est responsable de la pulsatilité et du rythme nychtéméral de la sécrétion d'aldostérone. Cependant, les mécanismes exacts à l'origine des effets de l'ACTH ne sont encore pas totalement connus. L'ACTH induit la production d'AMP cyclique qui, en se liant sur un élément-cis de transcription du gène *CYP11B2* pourrait expliquer l'effet stimulateur sur la synthèse d'aldostérone (*Bassett et al, 2004b*). Cependant l'AMPc est un second messager dont il a été montré qu'il inhibait l'expression des récepteurs AT1 (*Andoka et al, 1984* ; *Yoshida et al, 1991*). L'ACTH serait donc à l'origine d'une diminution du nombre de récepteurs AT1, ce qui provoquerait une désensibilisation des cellules de la zone glomérulée à l'Ang II. Une autre hypothèse proposée est la diminution de la synthèse d'aldostérone par

réduction de la biodisponibilité des précurseurs. En effet la voie de synthèse de l'aldostérone est commune avec d'autres stéroïdes notamment le cortisol. L'ACTH stimulerait l'activité des enzymes CYP11B1 et CYP17 impliqués dans la synthèse du cortisol (*Bird et al, 1996* ; *McAllister et al, 1988*). Cependant des études (*Begeot et al, 1988* ; *Hausdorff et al, 1987*) ont montré que dans des cellules isolées de la zone glomérulée, l'Ang II via l'activation d'une protéine G inhibitrice, inhiberait la production d'AMPc induite par l'ACTH. Cet « échappement » permettrait de maintenir l'expression du gène *CYP11B2*, malgré le taux d'ACTH circulant, en conditions physiologiques.

3 Actions physiologiques de l'aldostérone

Classiquement l'aldostérone 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. Les cibles principales de l'aldostérone 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. Les trois effecteurs de l'action de l'aldostérone sont les canaux sodiques épithéliaux amilorides sensibles (ENaC), les canaux potassiques situés à la face luminale des cellules et les pompes Na^+K^+-ATPase sur la face séreuse.

Dans la phase précoce de réponse à l'aldostérone, celle-ci induit l'activation des canaux ioniques déjà présents à la surface des cellules, et favorise le déplacement de ceux présents dans le cytosol jusqu'à la membrane plasmique des cellules. Ces effets rapides de l'aldostérone sont dits « non-génomiques » car il n'implique pas de transcription de gènes. Dans la phase plus tardive les effets de l'aldostérone passent par une modification de l'expression de gènes cibles ; on parle alors des effets génomiques, qui correspondent aux effets « classiques » de l'aldostérone et n'apparaissent qu'au bout de 30 minutes à une heure.

3.1 Effets génomiques et récepteurs aux minéralocorticoïdes

L'aldostérone, 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). Ces récepteurs font partie d'une grande famille de récepteurs nucléaires, qui inclut les récepteurs aux glucocorticoïdes, aux androgènes et aux oestrogènes. Les MR cytosoliques sont maintenus dans une conformation inactive par un complexe de protéines chaperonnes, qui ne se dissocie qu'après liaison du ligand sur le récepteur. Dans les cellules épithéliales les MR lient principalement l'aldostérone, grâce à la présence de la 11β-hydroxysteroid deshydrogenase 2 (11β-HSD2) qui inactive l'autre ligand des MR : le cortisol. Une fois l'aldostérone liée au MR, le complexe est transporté, via les pores nucléaires, jusqu'à la chromatine. Le complexe aldostérone/MR interagit avec l'ADN en se fixant sur un site de liaison spécifique *steroid response element* (SRE). Cette liaison aboutit soit à une trans-activation soit à une trans-inhibition de l'expression du gène cible (Fig. 13). Un autre mode d'action de l'aldostérone sur l'expression génique a été proposé plus récemment. Des études ont en effet montré que la fixation sur l'ADN des récepteurs aux glucocorticoïdes n'était pas essentielle pour que l'expression des gènes cibles soit modifiée. Par analogie, il a été suggéré que le complexe aldostérone/MR pouvait agir selon le même modèle, c'est à dire par le biais d'une interaction protéine/protéine (*Booth et al, 2002*) (Fig. 13).

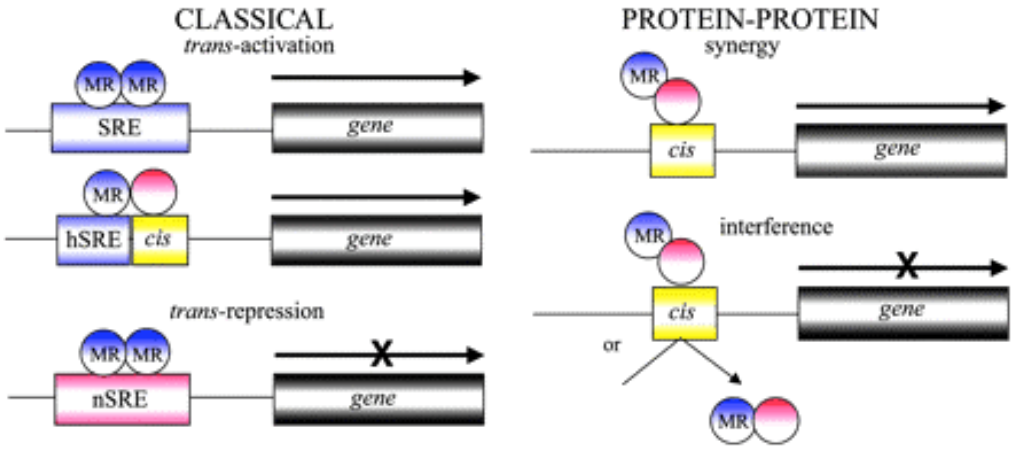

Figure 13. Les deux modes d'actions du complexe aldostérone/MR (noté MR) sur l'expression des gènes cibles. A gauche le modèle classique représentant l'interaction directe des complexe aldostérone/MR avec les éléments de liaison spécifique aux stéroïdes (steroid response element-SRE) de l'ADN. A droite, la voie d'action passant par une interaction protéines/protéines, où le complexe aldostérone/MR interagit avec un facteur de transcirption déjà lié à l'ADN. (*Booth et al, 2002*).

L'expression de plusieurs gènes est modulée par ce complexe aldostérone-MR dont les gènes codant pour les sous-unités protéiques des ENaC et celles des pompes Na+K+-

ATPase. La synthèse des protéines *serum and glucocorticoid inducible kinase* (SGK) et *Kirsten kinase* (K ras-2) semble également stimulée par l'aldostérone (*Chen et al, 1999*) (*Garty, 2000* ; *Verrey et al, 2000*). Les protéines SGK sont présentes dans la quasi totalité des tissus humains, notamment dans le rein où des ARNm de SGK1 ont été mis en évidence à la fois dans les cellules glomérulaires et dans les cellules tubulaires (*Waldegger et al, 1997*) (*Lang et al, 2000*). Cette protéine SGK1 a été identifiée comme une molécule capable de stimuler les canaux ENaC rénaux, et jouerait donc un rôle important dans l'action antinatriurétique de l'aldostérone (*Bohmer et al, 2000* ; *Chen et al, 1999* ; *Naray-Fejes-Toth et al, 1999* ; *Shigaev et al, 2000*). Deux autres isoformes SGK2 et SGK3, décrites plus récemment (*Kobayashi et al, 1999*), auraient une fonction similaire à celle de SGK1 et seraient également impliquées dans la régulation de l'activité des canaux ENaC (*Friedrich et al, 2003*). Les protéines SGK et Ki-ras auraient donc des effets cellulaires contribuant à augmenter la réabsorption hydrosodée et l'excrétion potassique, mais les voies de signalisation impliquées, encore imparfaitement connues, nécessitent des études complémentaires. La figure 14 schématise les différentes voies de signalisation de l'aldostérone dans les cellules épithéliales.

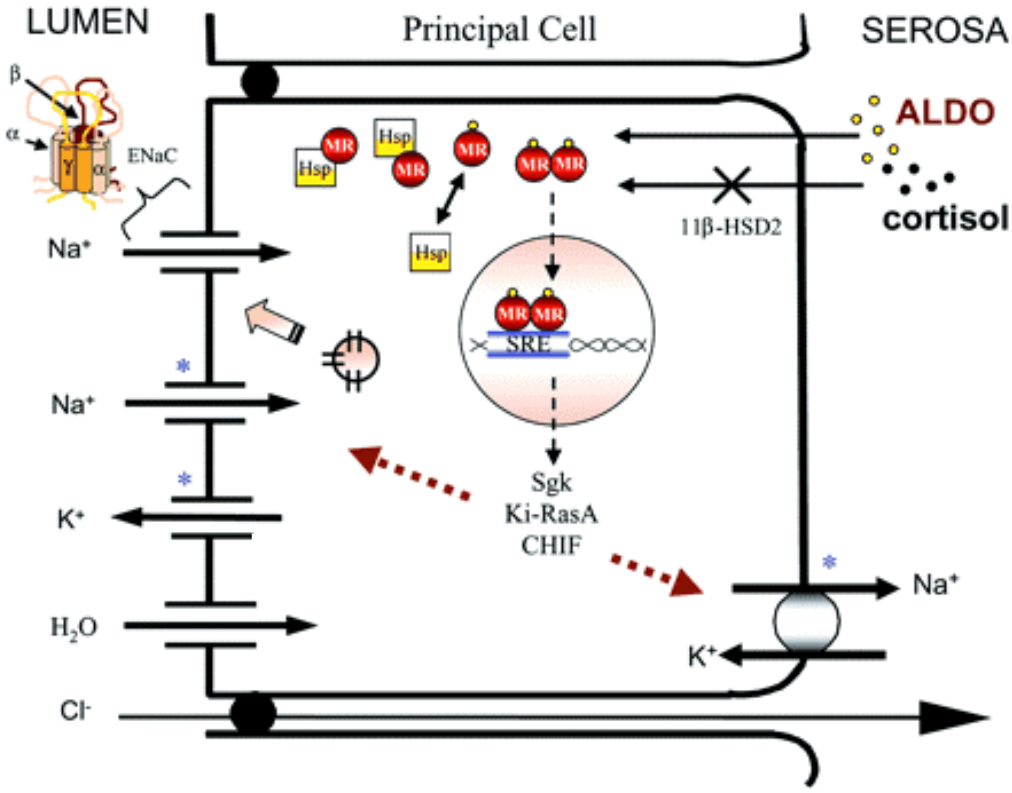

Figure 14. Schématisation des réactions cellulaires impliquées dans la transduction des effets classiques de l'aldostérone sur les canaux des cellules épithéliales. MR : mineralocorticoid, Hsp : heat shock protein, ENac : canal sodium amiloride sensible. (*Booth et al, 2002*).

Il paraît probable que la réponse cellulaire à l'aldostérone intègre à la fois des stimulations et des inhibitions de gènes, mais les gènes-cibles inhibés par l'aldostérone ont très peu été étudiés jusqu'ici.

La réabsorption de sodium induite par l'aldostérone est accompagnée par un mouvement d'eau. En favorisant cette rétention hydrosodée l'aldostérone entraîne une augmentation de la volémie. Cette variation de volume sanguin est détectée par les volorécepteurs situés dans les oreillettes et entraîne une diminution de la stimulation du système nerveux orthosympathique, ce qui conduit à une réduction de la sécrétion de rénine. Cette freination du système rénine-angiotensine diminue la sécrétion d'aldostérone qui est donc régulée par une boucle de rétrocontrôle négatif.

Nous verrons dans le chapitre III que les réponses à l'aldostérone médiées par les MR peuvent être à l'origine de processus fibrotiques et inflammatoires, notamment dans le cœur.

3.2 Effets non-génomiques

Des effets dits « rapides » de l'aldostérone ont été observés très tôt après la découverte de la molécule. Mais il aura fallu attendre les travaux réalisés durant la dernière décennie, notamment par le groupe de Wehling, pour mieux comprendre les mécanismes responsables de ces effets.

Le caractère « non-génomique » de ces effets de l'aldostérone a été mis en évidence par le fait qu'ils ne sont pas inhibés par l'actinomycine, un inhibiteur de la transcription et de la traduction. La question majeure soulevée par ces effets non-génomiques est la voie de transduction qui les médie. Plusieurs hypothèses existent, mais aujourd'hui encore certaines sont sujettes à polémique. Il a ainsi été proposé que ces actions rapides seraient médiées par un récepteur membranaire de l'aldostérone différent des MR. La voie de signalisation déclenchée par la liaison de l'aldostérone sur ce récepteur impliquerait l'AMPc et le calcium comme seconds messagers. Cependant, plus récemment il a été proposé que ces effets non-génomiques seraient, au moins en partie, médiés par les MR classiques. Mais des différences fonctionnelles ont été mises en évidence concernant les MR selon leur localisation, notamment ceux des cellules du tissu nerveux ou des cardiomyocytes et ceux sur les CML vasculaires (*Funder, 2001*).

Il est donc probable qu'il n'y ait pas une mais plusieurs voie de transduction de ces effets rapides de l'aldotérone, impliquant potentiellement plusieurs types de récepteurs membranaires, et qui différeraient selon les cellules-cibles (Fig. 15).

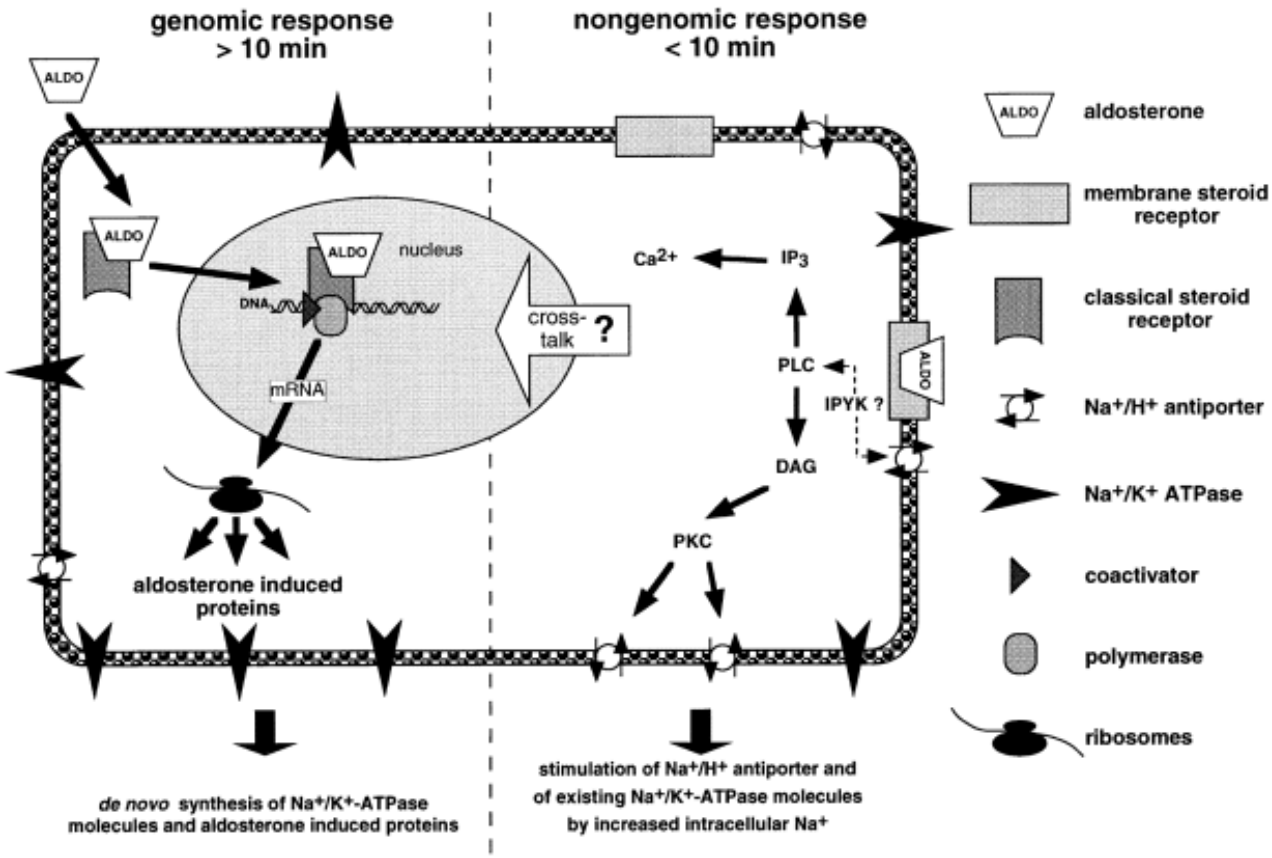

Figure 15. Résumé des effets génomiques de l'aldostérone, et des effets non-génomiques, prenant en compte l'hypothèse de l'activation d'un récepteur autre que MR par l'aldostérone et l'activation de MR classiques (*Falkenstein et al, 2000*).

II LES SYSTEMES RENINE-ANGIOTENSINE ALDOSTERONE TISSULAIRES

Le SRA classiquement décrit est le SRA circulant, connu, comme nous venons de le voir, pour sa fonction de régulation du tonus vasculaire et du volume intravasculaire. Cependant la possibilité de l'existence de SRA locaux a émergé dès la fin des années 1960 avec la mise en évidence de rénine dans le cerveau et les glandes surrénales. Par la suite, les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARAs) observés sur le rein, le cœur et les vaisseaux, indépendants, au moins en partie, de leur effet anti-hypertenseur, a soulevé la possibilité d'une synthèse locale de l'Ang II aux côtés de la forme circulante. Les SRA locaux attirent de plus en plus l'attention et de nombreux résultats publiés dans les dix dernières années ont permis de mettre en évidence différents composants du SRA dans de nombreux tissus (Fig. 16), notamment le rein, le cœur, les vaisseaux, le cerveau et plus récemment dans le tissu adipeux (*Engeli et al, 2003*).

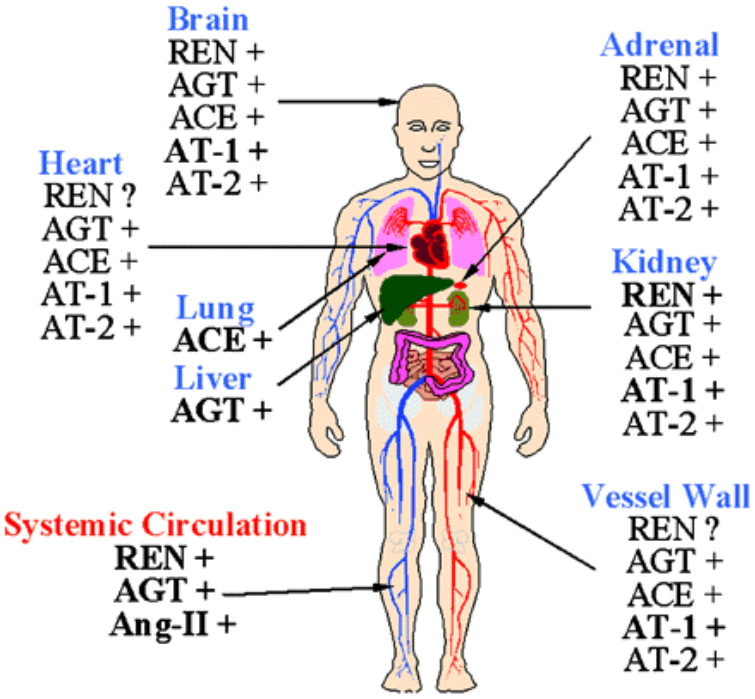

Figure 16. Principales localisations de formes tissulaires des systèmes rénine-angiotensine. REN : rénine, AGT : angiotensinogène, ACE : enzyme de conversion, Ang-II : angiotensine II, AT-1/2 : récepteur à l'angiotensine II de type 1/2. (d'après{Lavoie & Sigmund 2003 452 /id})

Un SRA local à proprement parler nécessite que plusieurs conditions soient réunies (Tableau 1). Si tous les éléments impliqués dans la voie de synthèse de l'Ang II

(AGT, rénine, EC principalement) ne sont pas produits dans le tissu, ils peuvent être captés dans la circulation. Dans ce cas il serait plus exact de parler de « systèmes locaux de synthèse d'Ang II » plutôt que des systèmes rénine-angiotensine locaux » (*Danser, 2003*).

Les systèmes locaux sont régulés à différents niveaux, depuis la synthèse de rénine jusqu'à la densité de récepteurs à l'Ang II. En conséquence la concentration des composants de ces systèmes tissulaires peut largement différer des concentrations plasmatiques.
Par ailleurs, comme nous l'avons vu au chapitre précédent, il existe dans certains tissus des voies de synthèse et de dégradation des angiotensines qui n'existent pas dans le SRA « classique » circulant.

- les ARNm de tous les composants du système nécessaire à la synthèse de peptides biologiquement actifs doivent être présents dans le tissu
- un produit biologiquement actif est synthétisé dans le tissu
- les récepteurs à ce produit biologiquement actif sont présents dans le tissu
- le produit biologiquement actif est régulé dans le tissu, indépendamment de la régulation du système circulant
- la diminution ou la suppression de l'activité du produit induit une réponse physiologique

Tableau 1. Conditions nécessaires pour l'existence d'un SRA local. (d'après (*Carey et al, 2003a*))

Il existe également des systèmes tissulaires de synthèse de stéroïdes, et notamment d'aldostérone, qui peuvent se présenter sous des formes plus ou moins complètes, selon que le tissu possède ou non à la fois toutes les enzymes requises,et le produit final de la synthèse.

A SRA INTRARENAL

Historiquement, le SRA intrarénal est le premier à avoir été décrit, à la fin des années 70 par l'équipe de Carey et coll. (*Kimbrough, Jr. et al, 1977* ; *Levens et al, 1981* ; *Levens et al, 1983*). Il a été montré que tous les éléments nécessaires à la synthèse d'Ang II sont présents dans le rein. L'angiotensinogène synthétisé localement serait ainsi transformé en Ang I et/ou en Ang II, grâce à l'action de la rénine et des enzymes alternatives. L'EC,

présente sur la bordure en brosse des cellules du tubule proximal, permet la transformation de l'Ang I en Ang II. La large distribution des récepteurs de l'Ang II, notamment dans les artérioles rénales, les cellules mésangiales glomérulaires, et le tubule proximal, suggère que l'Ang II joue un rôle paracrine très important dans la régulation de la fonction rénale (*Carey et al, 2003b*).

B SRAA CARDIAQUE

Il a été montré que le cœur possède un SRA quasi complet. L'angiotensinogène semble synthétisé dans l'ensemble du cœur et des résultats expérimentaux ont montré que des cardiomyocytes et des fibroblastes en culture avaient également la capacité de sécréter cette molécule. L'EC serait principalement synthétisée dans les fibroblastes et l'endothélium cardiaque (*Bader, 2002*). Si la synthèse cardiaque d'Ang II est maintenant avérée, l'existence d'une véritable sécrétion de rénine dans le cœur reste débattue. Certains considèrent que la rénine est le seul composant manquant du SRA cardiaque, alors que d'autres ont mis en évidence des ARNm de rénine dans le coeur, mais en quantités très limitées. Finalement, la rénine sécrétée localement, si elle existe, ne serait pas la source principale de rénine cardiaque. En effet, des études ont montré que le cœur est capable de capter la rénine et la pro-rénine circulantes et il a été proposé que la synthèse cardiaque d'Ang II serait donc rendue possible par l'activation locale de pro-rénine et le captage de rénine circulante. La synthèse cardiaque d'Ang II est également en partie indépendante des composants « classiques » du SRA. Il a été mis en évidence dans le cœur une enzyme, l'α-chymase, qui permet de convertir l'Ang I en Ang II, sans avoir recours à l'EC. Cette enzyme serait particulièrement active dans les ventricules et serait responsable de 90 % de la conversion de l'Ang I en Ang II (*Balcells et al, 1997* ; *Swynghedauw, 1999b*). D'autres enzymes, telles que les cathepsines et la tonine, sont également présentes dans le cœur ; elles permettent de produire de l'Ang II directement à partir de l'angiotensinogène, mais leur rôle semble néanmoins limité dans le coeur (*Bader, 2002*).

Les deux types de récepteurs AT1 et AT2 sont présents dans le coeur, où ils interagissent et/ou opposent leurs effets. Les proportions des deux types de récepteurs peuvent être modifiées, notamment dans certaines conditions pathologiques (*Blume et al, 2001*). Ainsi les fibroblastes, dans lesquels seuls les récepteurs AT1 sont présents, réexpriment des récepteurs AT2 dans l'insuffisance cardiaque (*Ohkubo et al, 1997* ; *Wharton et al, 1998*).

Au niveau cardiaque, des récepteurs MR ont également été identifiés, suggérant que le coeur est une cible pour l'aldostérone (*Lombes et al, 1992*). Il a aussi été montré que l'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse d'aldostérone était présent dans le coeur, et qu'une synthèse d'aldostérone cardiaque existait chez le Rat (*Fardella et al, 1996* ; *Funder et al, 1973* ; *Lombes et al, 1992* ; *Silvestre et al, 1998*). Des études complémentaires ont apporté des arguments tendant à montrer que la régulation de la synthèse locale d'aldostérone serait identique à celle observée dans la glande surrénale (*Delcayre et al, 2000*). Chez l'Homme des résultats récents montrent qu'il existe une synthèse d'aldostérone cardiaque dans l'insuffisance cardiaque et l'hypertension artérielle (HTA) (*Mizuno et al, 2001* ; *Yamamoto et al, 2002* ; *Yoshimura et al, 2002*).

C SRAA VASCULAIRE

Alors que de petites quantités d'angiotensinogène sont synthétisées dans la paroi artérielle, il n'existe pas de quantité détectable d'ARNm de la rénine dans la paroi vasculaire, ce qui n'est pas en faveur d'une production de rénine à ce niveau. Il est probable que celle-ci soit prélevée dans la circulation par les cellules endothéliales (*Hilgers et al, 2001*). L'Ang I, mise en évidence dans les vaisseaux, serait donc produite à partir de l'angiotensinogène vasculaire grâce à l'action de la rénine captée dans la circulation, puis transformée en Ang II grâce à l'EC ou la CAGE, présentes dans les vaisseaux (Fig. 4). Cependant ces deux enzymes n'ont pas la même localisation, ce qui pourrait refléter des différences fonctionnelles. Dans l'endothélium la synthèse d'Ang II semble être principalement liée à l'EC, alors que la CAGE pourrait être prédominante dans l'adventice (*Okunishi et al, 1987*).

Bien que chez l'homme des récepteurs MR aient été mis en évidence dans les cellules endothéliales, la présence d'aldostérone dans le compartiment vasculaire reste controversée. Des résultats expérimentaux obtenus par l'équipe de Takeda et coll. ont montré, d'une part que des ARNm de l'aldostérone et des récepteurs MR sont présents dans des vaiseaux de Rat, et d'autre part qu'il existe une synthèse locale d'aldostérone vasculaire (*Hatakeyama et al, 1994* ; *Takeda et al, 1995* ; *Takeda, 2004*). Ces résultats sont contradictoires avec ceux de Ahmad et coll, publiés récemment (*Ahmad et al, 2004*). En effet, les expériences menées sur des cellules endothéliales humaines n'ont pas permis de mettre en évidence des ARNm, ou

une synthèse locale de l'aldostérone (*Ahmad et al, 2004*). Le sujet nécessite donc des études complémentaires.

D SRA SURRENALIEN

Des cultures de cellules de la zone glomérulée de la glande surrénale ont permis de mettre en évidence une synthèse locale d'ARNm de rénine et d'angiotensinogène, ainsi que la production d'Ang II (*Mulrow et al, 1996*). La synthèse surrénalienne de rénine est localisée à 90 % dans la zone glomérulée, et peut être stimulée par des modifications du régime sodé, indépendamment des fluctuations de la concentration de la rénine circulante (*Rubattu et al, 1994*). A l'heure actuelle, le rôle du SRA surrénalien reste à définir.

E SRA CEREBRAL

Nous avons vu au chapitre précédent que l'Ang II exerce des actions centrales qui peuvent être attribuées à l'Ang II circulante puisque des récepteurs AT1 et AT2 sont localisés dans des zones où la barrière hémato-encéphalique (BHE) est interrompue, principalement dans les organes circumventriculaires. Mais des récepteurs AT1 et AT2 ont également été mis en évidence dans des structures possédant une BHE intègre. Ces récepteurs sont responsables de la médiation des effets paracrines ou autocrines de l'Ang II produite localement. De plus, comme mentionné précédemment, l'Ang IV agit dans le cerveau et serait notamment impliquée dans des processus mnésiques (*Wright et al, 2004b*).

III ANGIOTENSINE II, ALDOSTERONE ET RETENTISSEMENT CARDIOVASCULAIRE

L'Ang II et l'aldostérone, dont les actions premières sont de maintenir une pression de perfusion adaptée aux besoins des différents organes, possèdent également des propriétés trophiques, hyperplasiques, pro-fibrosantes et pro-inflammatoires. Ces propriétés sont initialement mise en jeu lorsque le système cardiovasculaire doit faire face à une situation nécessitant des adaptations fonctionnelles et/ou structurales, définissant un processus de remodelage. Cependant lorsque ces actions dépassent le stade adaptatif, elles peuvent être à l'origine d'altérations du système cardiovasculaire, faisant de l'Ang II et de l'aldostérone de véritables facteurs de risque cardiovasculaire. Il semblerait que les formes locales des composants du SRAA soient particulièrement impliquées dans ce retentissement cardiovasculaire.

A ANGIOTENSINE II ET RETENTISSEMENT CARDIOVASCULAIRE

Les effets de l'Ang II sur la croissance et la prolifération cellulaire, sur la fibrose et l'hypertrophie de certains organes ont été mise en évidence par l'utilisation de substances bloquant la formation d'Ang II (IEC) ou bloquant l'activation de ses récepteurs (ARA). Des résultats expérimentaux et cliniques ont montré que ces substances permettent de retarder, ou de faire régresser, l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) et la rigidification artérielle induite par l'hypertension artérielle.

1 Angiotensine II et retentissement cardiaque

Chez l'homme le remodelage cardiaque est caractérisé par une augmentation du dépôt des composants de la matrice extra-cellulaire, une prolifération des fibroblastes, une hypertrophie des myocytes cardiaques, et une altération de l'expression des gènes cardiaques (*Manabe et al, 2002*) (*Swynghedauw, 1999a*) (*Sugden et al, 1998*). Ces modifications, qui

ont pour but de préserver la fonction systolique, induisent à long terme une diminution de la compliance du ventricule gauche et favorisent la dysfonction diastolique.

L'Ang II possède d'importantes propriétés profibrosantes, liées en grande partie à une altération du métabolisme du collagène. La fibrose se définit par un excès de fibres de collagène pouvant être dû à une augmentation de synthèse ou à une dégradation insuffisante du collagène. Une collagénase importante dans le cœur est la métalloprotéinase 1 (MMP-1), dont l'activité est régulée par une enzyme appelée TIMP-1 (*tissue inhibitors of metalloproteinases*-1). In vitro il a été montré que l'Ang II augmente la synthèse du collagène par les cardiofibroblastes et diminue sa dégradation en inhibant les MMP-1 et en augmentant la concentration de TIMP-1 (*Border et al, 1994* ; *Edwards et al, 1987*). Il est intéressant de noter qu'un déséquilibre semblable entre l'activité des MMP-1 et celle des TIMP-1 a été mis en évidence dans l'HTA essentielle, l'utilisation de losartan permet de rétablir une dégradation correcte du collagène de type I (*Laviades et al, 1998*).

L'Ang II, qui a un rôle de facteur de croissance sur les cardiomyocytes foetaux, n'agit pas directement sur la croissance des cardiomyocytes adultes mais la favorise en activant des facteurs de croissance. Nous avons vu que la liaison de l'Ang II sur ses récepteurs AT1 déclenche des voies de signalisation impliquant notamment les familles des MAPKs et des JAK/STAT. Entre autres conséquences, ces voies de transduction cellulaire aboutissent à l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, les plus connus étant *c-fos, c-jun.* L'Ang II agit également en activant le *transforming growth factor bêta* (TGFβ) (*Wenzel et al, 2001*) (*Schultz et al, 2002*). Le TGFβ est une cytokine largement impliquée dans les processus inflammatoires, et mise en cause dans l'hypertrophie et la fibrose cardiaque (*Border et al, 1994*). Des expériences *in vitro*, menées sur des cardiofibroblastes, ont montré que le TGFβ induit la production de composants de la matrice extra-cellulaire tels que le collagène, la fibronectine et le protéoglycane. Il stimule également la prolifération des fibroblastes. Par ailleurs, la production de TGFβ serait augmentée de manière significative quand il y a transition de l'hypertrophie vers l'insuffisance cardiaque (*Boluyt et al, 1994*). Plusieurs études ont suggéré qu'il existerait un lien fonctionnel entre l'Ang II et le TGFβ dans le cœur. Le TGFβ semble notamment médier les effets de l'Ang II sur le métabolisme du collagène (*Muiesan, 2002*) (*Border et al, 1994*). L'importance du rôle joué par le TGFβ a également été confirmé dans l'hypertophie cardiaque induite par l'Ang II, un modèle d'animaux K.O pour le gène du $TGF\beta_1$ ayant montré que l'absence de ce gène prévient le développement de l'hypertrophie cardiaque et de la dysfonction diastolique

(*Schultz et al, 2002*). Wensel et coll. ont montré que l'Ang II activerait le TGFβ via l'activation d'une enzyme impliquée dans le stress oxydatif, la NADH/NADPH oxydase, et de la protéine kinase C (*Wenzel et al, 2001*).

Si le TGFβ médie, au moins en partie, les effets délétères de l'Ang II sur le coeur, une autre cytokine, le TNFα (*tumor necrosis factor alpha*), joue également un rôle important dans l'activité du SRA cardiaque. En effet, il a été montré que le TNFα stimule l'activité du SRA au niveau cardiaque de différentes manières puisqu'il augmenterait la sensibilité des fibroblastes cardiaques à l'Ang II, ainsi que la densité des récepteurs AT1 sur ces mêmes cellules (*Gurantz et al, 1999* ; *Peng et al, 2002*). Il favoriserait également la synthèse locale d'Ang II en augmentant l'activité de l'EC (*Sekiguchi et al, 2004*). Des résultats obtenus sur des souris surexprimant le gène du TNFα ont confirmé que cette cytokine augmente la production cardiaque d'Ang II et l'activité de l'EC, mais n'a pas d'action sur les niveaux d'angiotensinogène ou de rénine (*Flesch et al, 2003*). L'Ang II agit via l'activation du NF-κB (nuclear factor-kappa B) pour augmenter la production de TNFα et induit donc une sorte d'« auto-stimulation » (Fig. 17). Le TNFα active les mêmes voies de signalisation cellulaire que l'Ang II, impliquant les MAPKs ERK, JNK et p38, dans les cardiomyocytes. En potentialisant l'effet de l'Ang II sur l'expression génique, le TNFα contribue aux effets hypertrophique, hyperplasique et profibrosant de l'ANG II sur le cœur (*Sekiguchi et al, 2004*).

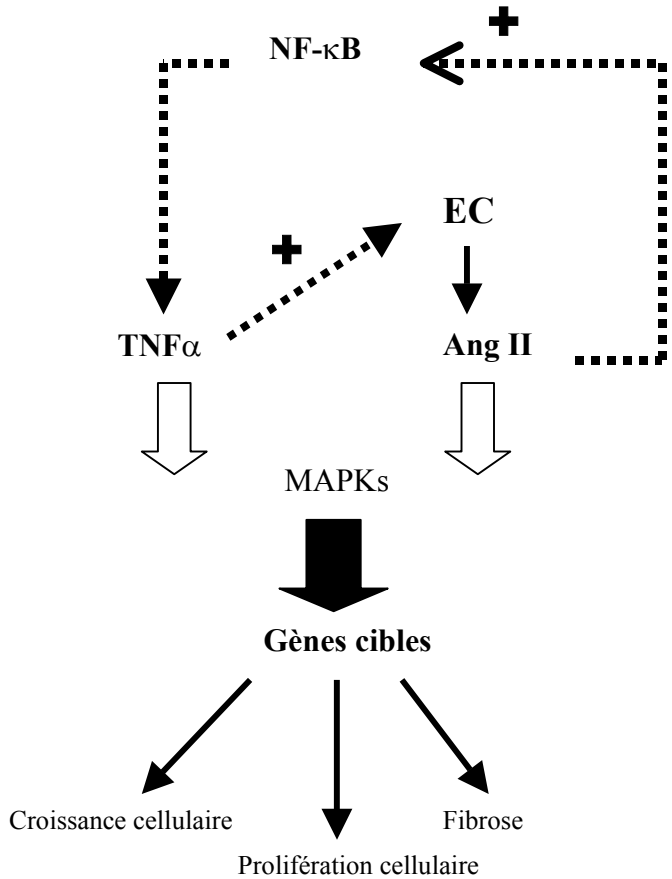

Figure 17. Inter-relation entre le système rénine-angiotensine cardiaque et les métiateurs de l'inflammation TNFα (tumor necrosis factor-alpha) et NF-kB (nuclear factor-kappa B). EC : enzyme de conversion, Ang II : angiotensine II, MAPKs : mitogen activated proteins kinases. D'après {Sekiguchi, Li, et al. 2004 436 /id}

2 Angiotensine II et vaisseaux

Les substances vasoactives, telles que l'Ang II et le monoxyde d'azote (NO), sont d'importants déterminants de la structure et de la fonction vasculaire. En effet, ces substances interagissent en permanence pour moduler la prolifération et la mort cellulaires. L'intégrité de la structure et de la fonction vasculaire repose sur un équilibre entre les substances vasoconstrictrices et les substances vasodilatatrices. Une perturbation de cette balance contribue à une dysfonction endothéliale, et à des modifications structurales de la paroi vasculaire (remodelage) (*Dzau, 2001* ; *Gibbons, 1997* ; *Neutel, 2004*). L'Ang II altère la structure et la fonction cardiovasculaire par ses effets délétères sur l'endothélium, principalement en diminuant la biodisponibilité du NO (*Irani, 2001*). L'Ang II agit en augmentant le stress oxydatif dans l'endothelium, via l'activation des NADH/NADPH oxydases, enzymes qui jouent un rôle majeur dans la production de formes réactives de l'oxygène (*Griendling et al, 1994*) (Fig. 18). Ces formes réactives, notamment l'anion superoxyde, réagissent avec le NO et le rendent inactif. Cette augmentation du stress oxydatif dans l'endothelium vasculaire est pathogène et favorise l'HTA, l'insuffisance cardiaque et l'athérosclérose (*Gibbons, 1997*) (*Ruiz-Ortega et al, 2001b*).

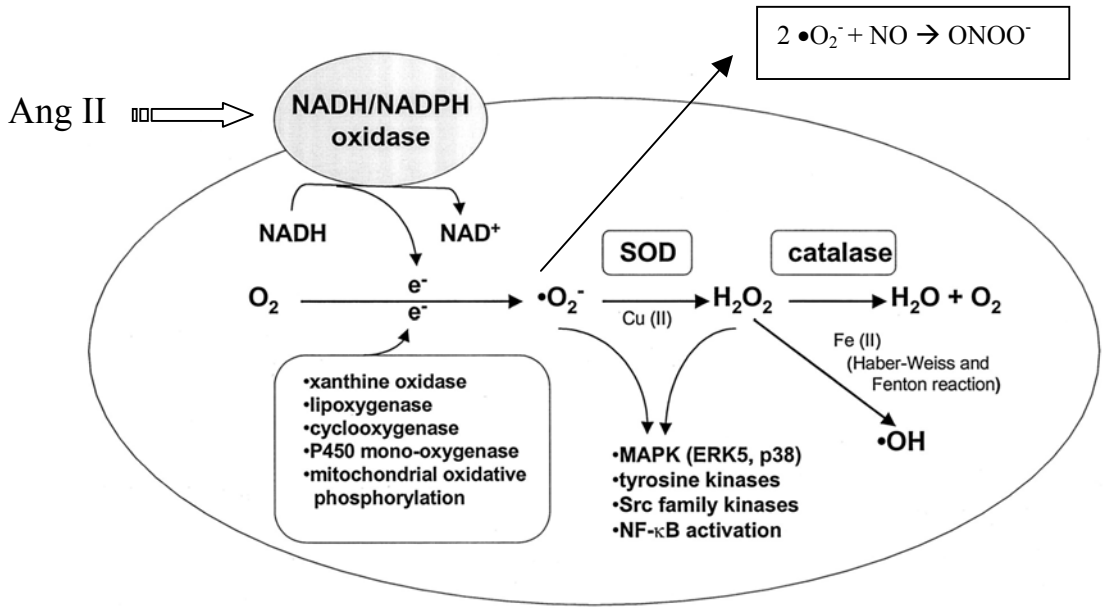

Figure 18. Effets de l'angiotensine II (Ang II) sur la dégradation du monoxyde d'azote (NO), via l'action de la NADH/NADPH oxydase, et l'augmentation du stress oxydatif. La forme réactive de l'oxygène $\bullet O_2^-$ réagit avec le NO pour donner une forme inactive $ONOO^-$. D'après (*Touyz, 2003*)

De récentes études ont suggéré un rôle du NF-κB dans les processus inflammatoires médiés par l'Ang II dans les vaisseaux. Elle activerait le NF-κB dans plusieurs types de cellules, dont les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules endothéliales (*Ruiz-Ortega et al, 2001b*). Bien que les récepteurs AT1 et AT2 ont des voies de signalisation intracellulaire différentes et des effets physiologiques généralement opposés (voir chapitre I), les deux types de récepteurs induiraient la transcription du NF-κB (*Ruiz-Ortega et al, 2001a* ; *Ruiz-Ortega et al, 2001c*). Dans les vaisseaux, comme dans le coeur, le TNFα et le TGFβ agissent également comme médiateur des effets fibrosant et hypertrophiant de l'Ang II dans le vaisseau, l'augmentation du dépot des composants de la MEC, dont le collagène, étant majoritairement liés au TGFβ (Fig. 19).

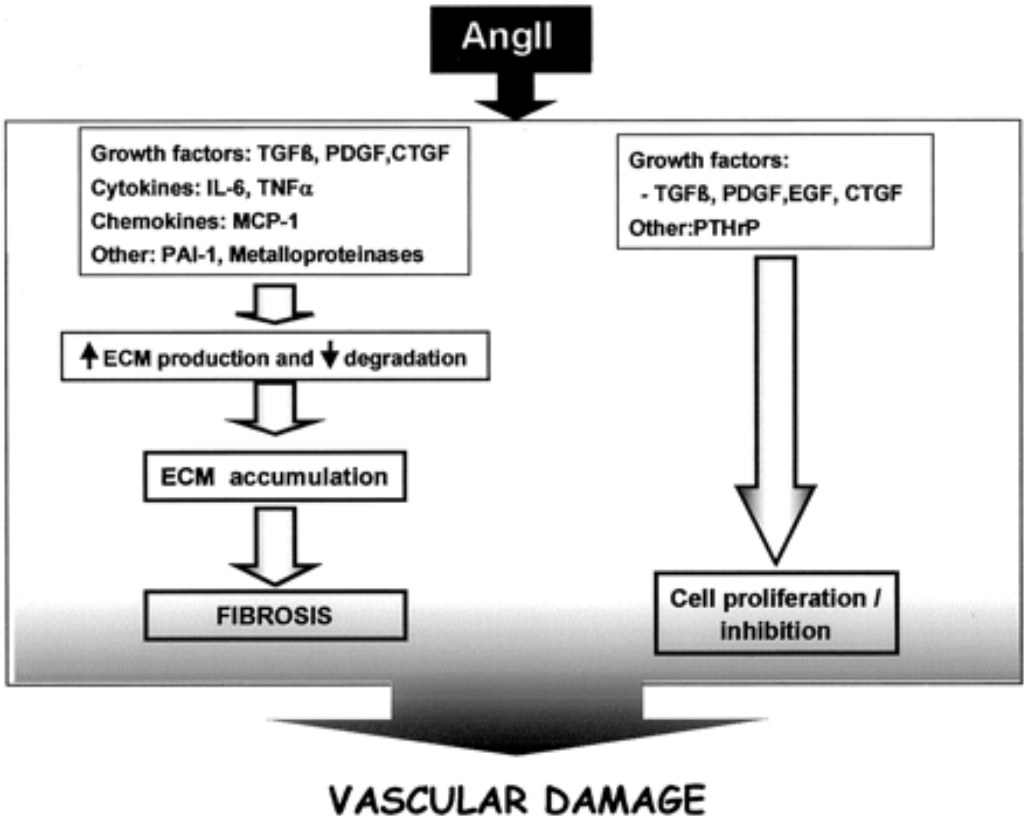

Figure 19. Effets délétères de l'angiotensine II (Ang II) sur les vaisseaux. L'angiotensine II induit la croissance cellulaire et la fibrose via la production de plusieurs médiateurs tels que des facteurs de croissance, des cytokines, des chemokines, connus pour participer à la prolifération cellulaire et à l'accumulation de composants de la matrice extra-cellulaire.

B ALDOSTERONE ET RETENTISSEMENT CARDIOVASCULAIRE

1 Effets de l'aldostérone sur la structure et la fonction cardiaque

Il est maintenant acquis que l'aldostérone constitue un facteur de risque cardiovasculaire à part entière (*Heymes et al, 2004*), et possède des effets délétères indépendants de ceux de l'angiotensine II. Il a notamment été montré, chez des patients insuffisants cardiaques, que la mortalité était liée au niveau d'aldostérone plasmatique et que ce dernier était corrélé avec la masse du ventricule gauche. Les travaux de Weber et coll. ont également mis l'accent sur l'implication de l'aldostérone et du régime sodé dans les processus de fibrose cardiaque (*Weber et al, 1995* ; *Weber, 2000*).

D'autres arguments en faveur des effets de l'aldostérone sur la fonction et la structure cardiaque ont été apportés par des données cliniques. Ainsi, l'étude RALES (Randomized Aldactone Evaluation Study), qui avait pour but de tester les effets d'un anti-aldostérone, l'aldactone, chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque, a montré que le groupe traité présentait une diminution du risque de décès par cause cardiovasculaire de 31 %.

Des travaux expérimentaux ont montré qu'une perfusion chronique d'aldostérone induit chez le Rat une hypertrophie cardiaque sévère associée à une importante fibrose, qui sont inhibées par la spironolactone administrée à des doses ne permettant pas une amélioration de l'hypertension. Les atteintes cardiaques observées pourraient donc être le reflet d'une stimulation par l'aldostérone de la prolifération des myocytes et des fibroblastes cardiaques (*Rocha et al, 2002a*). L'aldostérone est responsable d'une augmentation du collagène cardiaque, mais n'activerait pas les collagénases (*Silvestre, 2002*). La fibrose cardiaque induite par l'aldostérone serait également favorisée par l'augmentation du stress oxydatif dans les cellules cardiaques, via une augmentation de l'activité des enzymes NADPH-oxydases (*Rocha et al, 2002b*), (*Iglarz et al, 2004*). Il est probable qu'une partie des effets de l'aldostérone sur le cœur soit médiée par l'Ang II. En effet il a été montré que l'aldostérone est capable d'augmenter l'expression des récepteurs AT1 dans le cœur et pourrait donc augmenter la sensibilité des cellules cardiaques aux effets de l'Ang II *(Robert,1999)*. Par ailleurs, l'aldostérone pourrait stimuler la synthèse locale d'Ang II en augmentant la synthèse et l'activité d'EC (*Wang et al, 2002*). Enfin, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs AT1 inhibe certains effets délétères de l'aldostérone sur le

cœur (*Robert et al, 1999* ; *Takeda et al, 2002*). Une étude récente a montré que les effets profibrotiques induits par l'aldostérone seraient médiés par l'activation des protéines Ki-Ras A et de la cascade cellulaire des MAPK1/2 (*Stockand et al, 2003*).

2 Effets de l'aldostérone sur les vaisseaux

L'aldostérone induit également des altérations vasculaires, tant structurales que fonctionnelles. Elle agit sur les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules endothéliales et la matrice extra-cellulaire (*Struthers et al, 2004*) (*Oberleithner et al, 2004*) (*Struthers, 2004*). Il a ainsi été montré chez le lapin que l'augmentation de l'épaisseur de l'aorte, induite par l'aldostérone, était totalement inhibée par l'utilisation d'un anti-aldostérone spécifique : l'éplérénone (*Van Belle et al, 1995*). Une autre substance anti-aldostérone, la spironolactone, utilisée chez des rats SHRSP (spontaneous hypertensive rats stroke-prone), inhibe les effets pro-thrombiques et prolifératifs de l'aldostérone sur les artérioles (*Rocha et al, 1998* ; *Rocha et al, 1999*) . Il semble que les effets délétères de l'aldostérone sur les vaisseaux, soient en partie dus à des actions sur le métabolisme du NO (*Duprez et al, 2000*). En effet, l'aldostérone stimulerait la production d'anion superoxyde, via l'activation de la NADH/NADPH oxydase. Cette augmentation du stress oxydatif, selon un mécanisme comparable à celui de l'Ang II, augmenterait de manière importante la dégradation du NO endogène (*Struthers, 2004*) (*Rajagopalan et al, 2002*). Cette action semble confirmée par une étude, où l'utilisation de spironolactone a permis d'augmenter la biodisponibilité du NO de plus de 90 % (*Farquharson et al, 2000*). Par ailleurs, l'aldostérone joue un rôle important dans le métabolisme du collagène, dont elle augmente la synthèse (*Duprez et al, 2000*). Il est également probable que certains effets de l'aldostérone soient liés à l'Ang II. De récents résultats montrent en effet que l'aldostérone potentialise les effets de l'Ang II sur la phosphorylation de certaines MAPKs dans les cellules musculaires lisses vasculaires (*Mazak et al, 2004*). Etant donné le rôle de ces MAPKs dans l'activation de la fibrose et de l'hypertrophie, il est envisageable qu'elles médient en partie les altérations vasculaires induites par l'aldostérone.

3 Facteurs influençant l'impact cardiovasculaire de l'aldostérone

Les effets de l'aldostérone sur le retentissement cardiovasculaire ne semblent pas s'exercer dans des conditions physiologiques. Par ailleurs, le sodium est un élément important qui potentialiserait les effets directs de l'aldostérone sur les organes cibles. Le sodium est impliqué dans les processus de remodelage vasculaire, et certains résultats expérimentaux, utilisant des perfusions d'aldostérone, montrent que l'épaississement de la paroi vasculaire induit par l'aldostérone ne se produit que lorsqu'il y a une charge sodée associé (*Lacolley et al, 2002*) . Takeda et coll. ont montré qu'une augmentation modérée de sodium, diminue la sécrétion d'aldostérone plasmatique, alors qu'elle est responsable d'une augmentation de la synthèse cardiaque d'aldostérone et d'une hypertrophie cardiaque (*Takeda et al, 2000*). Cependant les résultats d'Iglarz et coll. publiés récemment sont plus contrastés. Ils suggèrent en effet que l'aldostérone auraient des effets délétères modérés sur les organes cibles même en absence de sodium. Ces effets seraient néanmoins majorés par l'augmentation de la prise de sel (*Iglarz et al, 2004*).

Les effets de l'aldostérone sur la structure et la fonction cardiovasculaire sont résumés dans la figure 20.

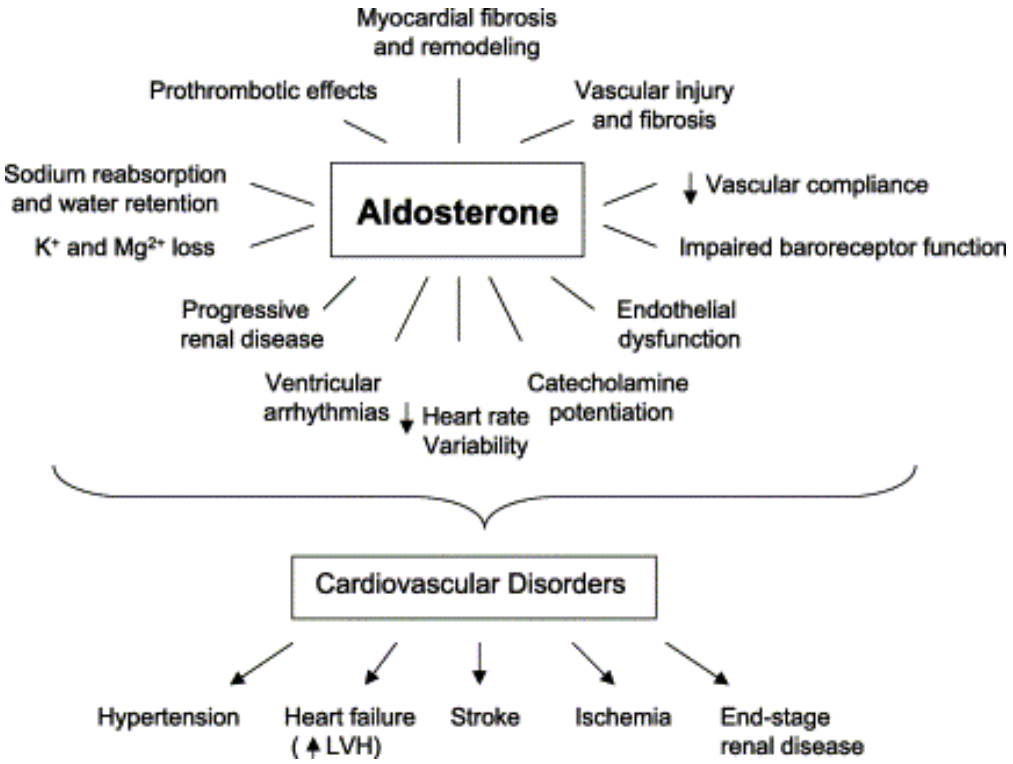

Figure 20. Synthèse des mécanismes pouvant expliquer comment un dérèglement des actions de l'aldostérone peut contribuer au développement de pathologies cardiovasculaires. (*Struthers et al, 2004*)

IV GENETIQUE DU SRAA ET SYSTEME CARDIOVASCULAIRE

A GENETIQUE ET HYPERTENSION ARTERIELLE

De nombreux travaux ont montré que le niveau de pression artérielle est lié à la fois à des facteurs génétiques et à des facteurs environnementaux.
Il a été démontré que l'agrégation de la pression artérielle dans les familles, est un phénomène qui se produit pour tout le spectre des pressions, dans virtuellement toutes les populations (*Ward, 1995*).

La preuve et la quantification du déterminisme génétique du niveau de la pression artérielle ont été apportées par les études conduites chez des jumeaux monozygotes et dizygotes, et dans des familles comportant des enfants naturels et adoptés. A partir de ces données il a été établi qu'environ 30 % de la variance de la pression dans la population pouvaient être attribués à des facteurs génétiques (*Ward, 1995*).

A l'heure actuelle, il est admis qu'il existe une composante héréditaire à l'HTA essentielle. Cependant les gènes de susceptibilité et/ou de résistance à l'HTA restent inconnus. Par contre l'identification des mutations génétiques mises en cause dans les quelques formes rares d'HTA monogénique, a permis de faire de grands progrès vers l'identification de gènes candidats.

Plusieurs de ces gènes candidats codent pour des protéines impliquées dans le SRAA et ont fait l'objet de nombreuses études d'association, visant à mettre en évidence un lien entre des polymorphismes de ces gènes et le niveau de pression artérielle. Puis ces recherches se sont orientées vers l'étude de phénotypes, dit intermédiaires, moins complexes que la pression artérielle et permettant de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la pathogénèse de l'HTA.

B FORMES MONOGENIQUES D'HTA

Les formes monogéniques d'HTA sont rares et pour trois d'entres elles liées à des anomalies de biosynthèse ou d'action de l'aldostérone (*Lifton, 1996* ; *Luft, 1998*).

1 Hyperaldostéronisme sensible à la dexaméthasone (HSD)

Le HSD a été décrit la première fois par Sutherland et coll. chez deux patients père et fils (*Sutherland et al, 1966*). Cette étude a fourni une bonne description clinique et biologique de la maladie. Les deux patients présentaient un tableau clinique d'hyperaldostéronisme primaire (HAP) classique. Le fait marquant mis en évidence par Sutherland était la régression du tableau clinique et biologique après traitement des sujets à la dexaméthasone, glucocorticoïde synthétique dont l'action est 20 fois plus puissante que celle du cortisol. Etant donné le lien de parenté des deux sujets étudiés, Sutherland avait également émis l'hypothèse du caractère familial de la maladie.

Une trentaine d'années plus tard, le défaut génétique responsable de la maladie a été découvert (*Lifton et al, 1992a* ; *Lifton et al, 1992b* ; *Pascoe et al, 1992*). Il s'agit d'une mutation, à transmission autosomale dominante, qui permet d'expliquer la physiopathologie de l'HSD. Cette avancée a permis également de disposer de méthodes diagnostiques et de s'orienter vers le dépistage génétique de la maladie.

- Physiopathologie du HSD

La mutation responsable de la maladie concerne les gènes *CYP11B1* et *CYP11B2*, impliqués, comme nous l'avons déjà vu, dans les étapes terminales de la biosynthèse du cortisol et de l'aldostérone, respectivement (*Lifton et al, 1992a*). Les gènes *CYP11B1* et *CYP11B2* sont localisés sur le chromosome 8, ne sont distants que d'environ 40 kilobases, et sont constitués tous les deux de 9 exons et de 8 introns (*Mornet et al, 1989*). Ils partagent de plus une grande homologie de séquence : 95 % pour les exons et environ 90 % pour les introns. Les deux gènes codent ainsi pour des enzymes dont les séquences d'acides aminés ne diffèrent que par 35 résidus. Les activités 18-hydroxylase et 18-oxydase de l'aldostérone synthase reposent sur 2 de ces 35 aminés. La glycine, située en position 288 de l'aldostérone synthase, détermine l'activité 18-hydroxylase, et l'alanine, en position 320, est responsable de l'activité 18-oxydase. Ces deux acides aminés codés dans les exons 5 et 6 de *CYP11B2,* sont remplacés dans la 11β-hydroxylase respectivement par un résidu sérine et un résidu valine (*Curnow et al, 1997*).

Dans les conditions physiologiques, des recombinaisons homologues se produisent durant la phase méiotique du cycle cellulaire. Ces remaniements sont à la base du brassage allélique et n'entraînent aucune conséquence délétère sur le génome. A l'inverse, dans le cas

du HSD, c'est une recombinaison non-homologue qui se produit. Un crossing-over a lieu non pas entre deux allèles d'un même gène, mais entre deux gènes différents : *CYP11B1* et *CYP11B2* (Fig. 21). Cette recombinaison est rendue possible par la colocalisation des deux gènes sur le même chromosome, par la faible distance qui les sépare et par le fort pourcentage d'homologie qui existe entre leurs séquences d'acides nucléiques.

Le gène chimère *CYP11B1/B2* issu de cette recombinaison est constitué de la région régulatrice de *CYP11B1* et de la région codante de *CYP11B2*. Les sites de crossing-over identifiés jusque là ont montré que la zone de recombinaison est située entre l'intron 2 et l'intron 4 (*Lifton et al, 1992b*).

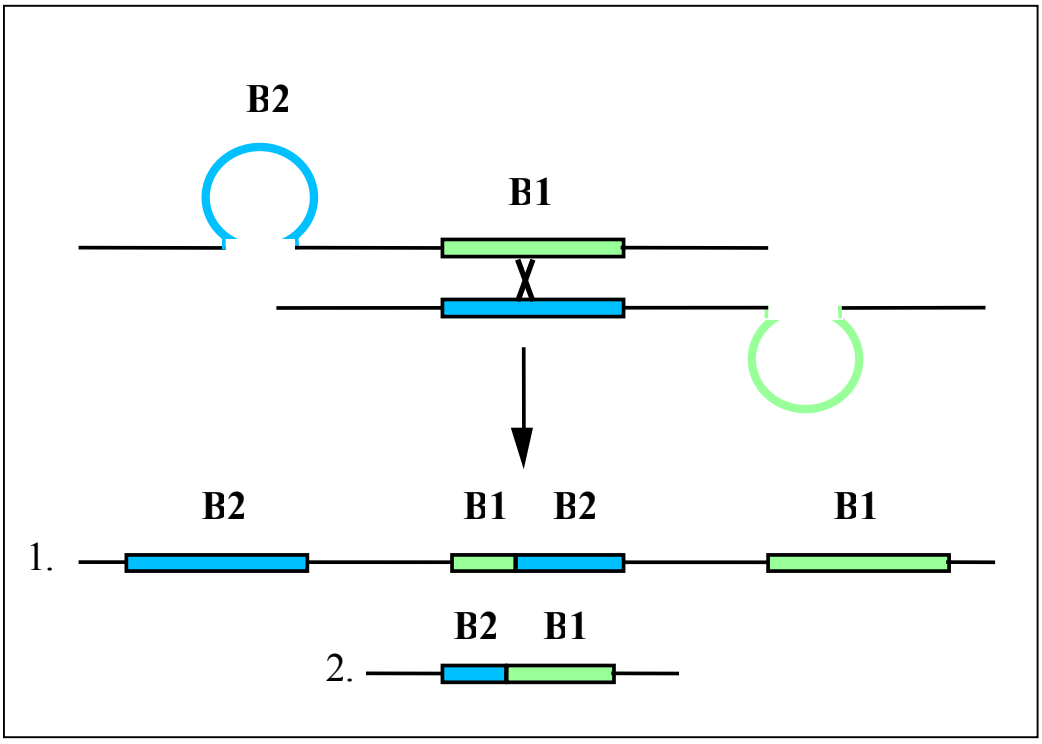

Figure 21. Recombinaison non-homologue responsable de la formation du gène chimère *CYP11B1/B2*. B1 : gène *CYP11B1* ; B2 : gène *CYP11B2*.
1 : gamète ayant reçu le gène *CYP11B1/B2*
2 : gamète ayant reçu le gène chimère complémentaire

- Conséquences physiopathologiques de la mutation

La structure même du gène chimère permet d'expliquer la physiopathologie de l'HSD. En effet, le gène chimère code pour une aldostérone synthase mais son expression est régulée par l'ACTH. La zone fasciculée acquiert ainsi une activité aldostérone synthase qui provoque une synthèse ectopique d'aldostérone. Les glucocorticoïdes, en freinant l'axe hypothalamo-hypophysaire, diminuent la sécrétion d'ACTH et de ce fait la sécrétion ectopique d'aldostérone. Ceci explique la suppression de l'hyperldostéronisme après traitement par la dexaméthasone. L'aldostérone n'exerçant pas de régulation négative sur l'ACTH, la sécrétion d'aldostérone n'est donc pas régulée, ce qui explique l'hyperaldostéronisme observé dans les cas d'HSD. La rétention hydrosodée induite par la forte concentration d'aldostérone plasmatique freine le SRA. Ceci a pour conséquence d'inhiber la sécrétion physiologique d'aldostérone par la zone glomérulée du cortex surrénalien. L'existence d'une activité aldostérone synthase, dans la zone fasciculée de la corticosurrénale, conduit également à la production de dérivés 18-hydroxylés du cortisol : 18-hydroxycortisol et 18-oxocortisol (*Mulatero et al, 1998*) (Fig. 22). Ces deux stéroïdes ne sont pas présents dans les conditions physiologiques et constituent un bon marqueur de l'HSD. Néanmoins, la difficulté du dosage de ces deux substances et surtout le fait qu'ils sont présents (à des taux plus faibles cependant) dans le syndrome de Conn ne permet pas d'utiliser les dérivés hydroxylés du cortisol comme méthode de diagnostic spécifique de l'HSD.

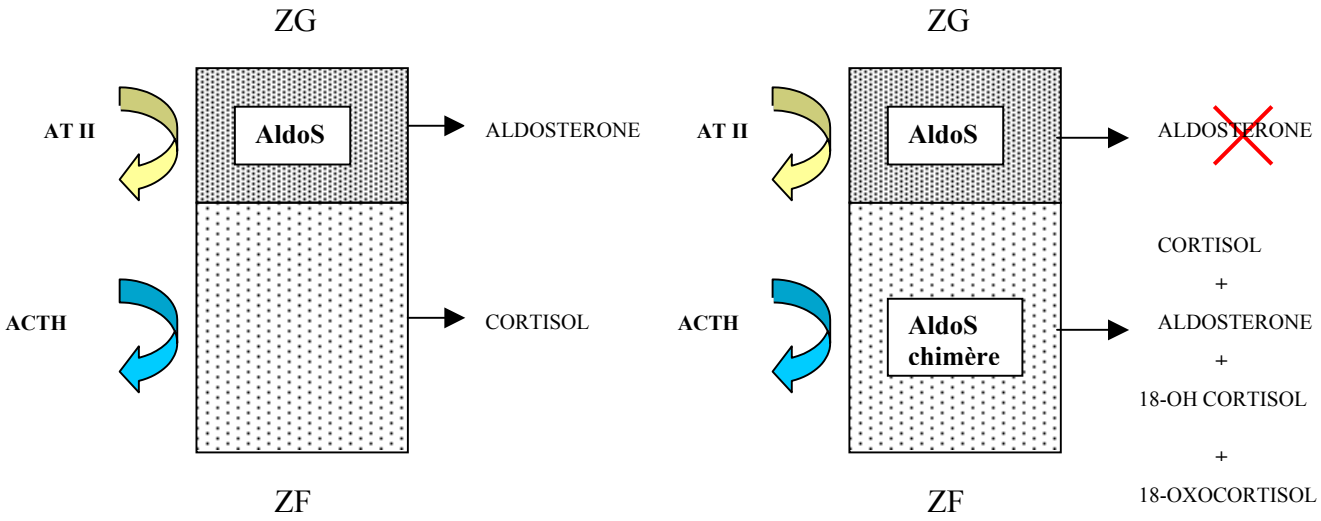

Figure 22. Biosynthèse des corticostéroïdes dans la zone glomérulée (ZG) et fasciculée (ZF) d'un sujet normal à gauche et d'un sujet HSD à droite. D'après (*Lifton et al, 1992b*)

Si les premières études concernant le HSD ont confirmé les tableaux clinique et biologique décrits initialement par Sutherland, il est très rapidement apparu qu'une importante variabilité phénotypique existait dans cette maladie. Cette variabilité, qui concerne principalement le niveau de pression artérielle et la kaliémie, se retrouve à la fois entre les familles décrites, mais également à l'intérieur d'une même famille (*Dluhy et al, 1995 ; Gordon, 1995 ; Gates et al, 1996* ; *Fallo et al, 2004)*. Etant donné cette importante diversité phénotypique, il est difficile d'identifier les patients pouvant porter la mutation du HSD sur de simples critères biologiques et/ou cliniques, et seul un test moléculaire peut confirmer la présence du gène chimère.

2 Autres formes monogéniques d'hypertension

Trois autres formes monogéniques d'hypertension artérielle pour lesquelles les défauts moléculaires ont été identifiés sont les syndromes de Liddle, de Ulick, et le pseudo-hyperaldostéronisme familial aggravé pendant la grossesse. Plus récemment une autre forme familiale d'HTA a été décrite : le syndrome de Gordon ou pseudohyperaldostéronisme de type 2 (PHA2). Comme pour l'HSD, ces formes d'HTA monogénique sont dues à des mutations touchant des gènes qui codent pour des protéines (enzymes, canaux, récepteurs…) jouant un rôle dans le métabolisme hydroélectrolytique (Tableau 2).

- Syndrome de Liddle

Ce syndrome est dû à des mutations concernant deux des trois sous-unités des ENaC, les sous-unités β et γ (*Hansson et al, 1995* ; *Shimkets et al, 1994*). Il en résulte une activation basale des ENaC aboutissant à une réabsorption de sel, non régulée et expliquant l'hypervolémie caractéristique du syndrome. Les patients atteints répondent bien à l'amiloride, antagoniste spécifique des ENaC (*Jeunemaitre et al, 2002*).

- Syndrome d'Ulick

Il s'agit d'une d'HTA monogénique autosomale dans laquelle il existe des mutations, à l'état homozygote ou hétérozygote combiné, du gène codant pour la 11β-hydroxystéroïde-deshydrogénase rénale (11β-HSD2) (*Li et al, 1997* ; *Mune et al, 1995*). Cette enzyme, qui transforme le cortisol en cortisone, est colocalisée dans le tubule rénal, au niveau des

récepteurs MR. Ces récepteurs présentant une affinité similaire pour les minéralo- et les glucocorticoïdes, la 11β-HSD2 contribue donc à la spécificité de liaison des MR pour l'aldostérone. Les mutations présentes sur ce gène entraînent l'inactivation de l'enzyme, et permettent alors au cortisol de se fixer sur les MR et de mimer les effets d'un puissant minéralocorticoïde. Il s'en suit une rétention hydrosodée qui freine le SRAA, comme lors d' un excès de minéralocorticoïdes, d'où l'autre nom donné à ce syndrome AME ou *Apparent Mineralocorticoids Excess*.

Un mécanisme identique explique l'HTA liée à l'absorption de réglisse, mais dans ce cas il s'agit d'une inactivation pharmacologique de la 11β-HSD2.

- Syndrome de Gordon ou pseudohypoaldostéronisme type II (PHA2)

Ce syndrome, décrit par Gordon en 1970, se transmet selon le mode autosomal dominant (*Gordon et al, 1970*). En 1997 deux loci, PHAIIA (1q32-q41) et PHAIIB (17q11-q21) ont été identifiés (*Mansfield et al, 1997*). Plus tard, un troisième (PHAIIC, 12q13.3) puis un quatrième locus ont été identifiés par l'équipe de X. Jeunemaître *(Disse-Nicodeme et al, 2000 ; Disse-Nicodeme et al, 2001)*. Cette même équipe, en collaboration avec F. Wilson, a identifié deux gènes impliqués directement dans le PHAII (*Wilson et al, 2001*). Ces gènes, WNK1 et WNK4, codent pour des *with no lysine* sérine-thréonine kinases présentes dans la partie distale du néphron. Des résultats récents suggèrent que WNK4 inhibe les cotransporteurs sodium-chlore sensibles au thiazide alors que WNK1 empêcherait cette action de WNK4 (*Wilson et al, 2003* ; *Yang et al, 2003*). Les kinases WNK semblent donc impliquées dans la voie de régulation des mouvements du sodium au niveau du rein, et pourraient représenter dans l'avenir d'intéressantes cibles pharmacologiques (*Luft, 2004*).

- Pseudo-hyperaldostéronisme familial aggravé pendant la grossesse

Il s'agit d'une forme d'HTA monogénique, due à une mutation sur le gène du récepteur MR (*Geller et al, 2000*). Cette mutation est une substitution leucine → sérine, située sur le codon 810, et a pour conséquence fonctionnelle une modification structurale du site de liaison du récepteur, altérant la spécificité de la liaison ligant-récepteur. Chez les patients porteurs de cette mutation, le récepteur est activé de manière constitutive, en

l'absence d'aldostérone. Et alors que physiologiquement, la progestérone est un antagoniste des MR, elle devient chez ces patients un agoniste. Ceci explique que cette forme familiale d'HTA soit particulièrement exacerbée pendant la grossesse, au cours de laquelle le taux de progestérone est nettement augmenté.

Forme monogénique d'HTA	Mode de Transmission	Localisation	Gène	Mutation
Hyperaldostéronisme sensible à la Dxm	Autosomique dominante	8q	CYP11B1 CYP11B2	Gène chimère avec expression ectopique et excès d'activité de l'aldostérone synthase
Syndrome de Liddle	Autosomique dominante	16p	SCNN1B SCNN1G	Mutations avec gain de fonction des sous-unités β et γ des ENaC
Syndrome de Ulick	Autosomique récessif	16q	HSD11B2	Mutation avec perte de fonction de la 11β-HSD2
Syndrome de Gordon	Autosomique dominante	17q 12p	WNK4 WNK1	Mutation avec gain de fonction sur des sérine-thréonine-kinases
Pseudo-hyperaldostéronisme aggravé pendant la grossesse	Autosomique dominante	4q	MLR	Mutation faux-sens activatrice du récepteur minéralocorticoïde

Tableau 2. Formes d'HTA monogénique. ENaC : canal sodium épithélial ; 11β-HSD2 : 11β- hydroxydeshydrogénase type 2. (d'après *Jeunemaître et al, 2002*)

C PRINCIPAUX POLYMORPHISMES DES GENES DU SRAA

1 Gène de la rénine *REN*

Le gène de la rénine (*REN*) a été le premier gène du SRA étudié. Bien que plusieurs polymorphismes aient été identifiés, aucune liaison ou association n'a été mise en évidence entre le locus de la rénine et l'HTA, chez l'homme (*Naftilan et al, 1989 ; Jeunemaitre et al, 1992*).

2 Gène de l'angiotensinogène *AGT*

L'implication de ce gène, situé que le chromosome 1, dans l'HTA a été suggérée par l'observation du lien entre la concentration plasmatique en angiotensinogène et le niveau de pression. En effet, cette concentration a été trouvée plus élevée chez des hypertendus et des enfants d'hypertendus que chez des normotendus. Il a été montré que le polymorphisme M235T, responsable de la substitution d'une méthionine en thréonine, est associé au niveau d'angiotensinogène circulant, l'allèle T étant liée à une augmentation de 10 à 20% de la concentration plasmatique en angiotensinogène (*Jeunemaitre et al, 1993*). Par ailleurs, différents travaux ont montré que ce polymorphisme était associé avec l'HTA (*Caulfield et al, 1994; Kim et al, 1995*; *Kiema et al, 1996*; *Jeunemaitre et al, 1997*; *Borecki et al, 1997*). Il a également été montré que le polymorphisme M235T est en complet déséquilibre de liaison avec un autre variant, A-6G, situé dans la région promotrice du gène *AGT*. Ce polymorphisme influencerait le taux basal de transcription du gène et a été associé avec l'HTA humaine (*Carluccioet al, 2001*).

L'augmentation de la production d'angiotensinogène pourrait être à l'origine d'une augmentation de la production d'Ang II chez les porteurs d'allèle 235T. Cependant, les concentrations plasmatiques en Ang II ne sont pas différentes entre les trois génotypes MM, MT, et TT (*Hopkins et al, 1996*). La diminution de la production de rénine, observée chez les porteurs d'allèle 235T, ainsi que chez des souris surexprimant le gène AGT, expliquerait que l'excès d'angiotensinogène n'ait pas de conséquence sur la production d'Ang II (*Danser et al, 1998* ; *Kim et al, 2002*).

3 Gène de l'enzyme de conversion *ACE*

Plusieurs sites polymorphes ont été identifiés dans le gène de l'EC, situé sur le chromosome 17q23. Parmi ces variants le plus étudié est le polymorphisme insertion/délétion qui correspond à la présence (insertion-I) ou à l'absence (délétion-D) d'une séquence *Alu* de 287 pb dans l'intron 16 du gène (*Rigat et al, 1992*). Ce polymorphisme expliquerait entre 30 et 40 % de la variabilité de la concentration plasmatique de l'EC (*Rigat et al, 1990 ;* T*iret et al, 1992*; *Jeunemaitre et al, 2002*). Les allèles I et D sont codominants : les homozygotes DD et II ont respectivement les niveaux d'EC les plus élévés et les plus bas, alors que les hétérozygotes ID ont un niveau intermédiaire. Dans la mesure où ce polymorphisme intervient dans une séquence intronique, la manière dont il peut influencer la biosynthèse de l'EC reste inconnue. Il a été proposé que ce polymorphisme pourrait être en déséquilibre de liaison avec un locus, situé à proximité, et fortement impliqué dans la régulation du niveau d'EC (*Cambien et al, 1992*). Mais ce locus n'a pas encore été identifié.

Bien qu'une étude ait initialement mis en évidence une plus forte fréquence d'allèle I chez des hypertendus, ce résultat n'a jamais été confirmé, et il paraît peut probable que le polymorphisme I/D soit associé à l'HTA (*Zee et al, 1992*; *Carluccio et al, 2001*). De même, les résultats de Castellano et coll., montrant une association entre le génotype DD et une augmentation de l'épaisseur intima-média de la carotide, n'ont pas été confirmés par des études ultérieures, ce qui n'est pas en faveur pour un rôle du polymorphisme I/D dans l'altération de la structure artérielle (*Castellano et al, 1996* ; *Girerd et al, 1998* ; *Zannad et al, 1998*). Des études montrent que l'allèle D serait associé avec l'athérosclérose et qu'il constituerait un facteur prédictif indépendant de l'hypertrophie ventriculaire gauche (*Iwai et al, 1994* ; *Ruiz et al, 1994*).

4 Gène du récepteur de type 1 à l'angiotensine II *AGTR1*

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, le récepteur de type 1 à l'Ang II est un maillon essentiel dans la transduction du signal de l'Ang II dans la cellule, puisqu'il est responsable de la médiation de la plupart des effets de cette hormone. Un polymorphisme qui modifierait la structure du récepteur, la régulation de son expression ou la transduction du signal lié à ce récepteur, pourrait aboutir à des modifications du niveau de pression artérielle et/ou provoquer des altérations des tissus cibles de l'Ang II, tels que les vaisseaux,

le cœur ou le rein. De nombreuses études ont donc été menées afin de rechercher une association entre le gène *AGTR1*, le niveau de pression artérielle, l'HTA et différents phénotypes intermédiaires.

Le gène *AGTR1* situé sur le chromosome 3 (3q21-q25), s'étend sur environ 60 kb et est composé de 5 exons. Les quatre premiers exons codent pour des séquences 5' non-traduites, et l'exon 5 contient donc toute la séquence codant pour le récepteur (Guo et al, 1994). En 1994, Bonnardeaux et coll. ont étudié la partie 3'UTR du gène *AGTR1*, ainsi qu'à l'exon 5. Ils ont identifié cinq sites polymorphes, deux dans la partie codante et trois dans la région 3' non-codante (Tableau 3) (*Bonnardeaux et al, 1994*). Par la suite, plusieurs autres polymorphismes ont été identifiés dans la partie promotrice du gène, ainsi que dans l'exon 4 (Tableau 3). Neuf de ces polymorphismes situés dans la partie promotrice de *AGTR1*, ont été montrés comme étant en complet déséquilibre de liaison (*Poirier et al, 1998 ; Erdmann et al, 1999)*. Plus récemment, Antonellis et coll. ont mis au point une nouvelle méthode d'étude des *single nucleotide polymorphisms* qu'ils ont appliquée au gène *AGTR1* dans sa totalité. Ils ont ainsi mis en évidence 18 nouveaux polymorphismes (*Antonellis et al, 2002*).

Parmi les nombreux sites polymorphes décrits dans *AGTR1*, la substitution A→ C située à la position 1166, est sans doute celle qui est le plus largement étudiée. Ce polymorphisme, localisé dans la partie 5' de la région 3' non-codante du gène (Fig. 23), n'a pas de conséquence fonctionnelle sur la protéine codée (*Bonnardeaux, et al. 1994*).

Dans leur publication princeps, Bonnardeaux et coll. ont montré que la fréquence de l'allèle 1166 C était plus élevée chez des hypertendus, en comparaison avec des sujets contrôles normotendus. Au sein du groupe de patients hypertendus, ils notaient également une augmentation de la fréquence de cet allèle dans les cas les plus sévères et/ou précoces d'HTA (*Bonnardeaux et al, 1994*). Cette association a par la suite été confirmée chez des hypertendus japonais (*Miyamoto et al, 1996*), dans une population caucasienne d'hypertendus avec antécédents familiaux d'HTA (*Wang et al, 1997*), ainsi que dans une population d'hypertendus finlandais (*Kainulainen et al, 1999*). Dans l'étude française PEGASE il a été montré que l'allèle C n'était associée à l'HTA que chez les femmes (*Tiret et al, 1998*). Plusieurs autres études contredisent pourtant ces résultats. Une étude cas-contrôle réalisée au Japon ne montre pas d'association entre le polymorphisme A1166C et l'HTA. Ce résultat est confirmé dans une population allemande (*Schmidt et al, 1997*) et dans

un groupe important de patients issus de la Cohorte MONICA (*Zhang et al, 2000*). Enfin plus récemment, dans le cadre du projet GENIPER il a été montré chez des sujets issus de différentes régions de l'Italie, que l'allèle 1166 A était plus fréquent chez les hypertendus (*Castellano et al, 2003*).

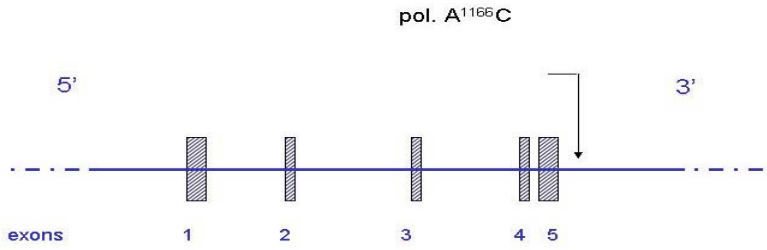

Figure 23. Schématisation de la structure du gène *AGTR1* situé sur le chromosome (3q21-q25) et localisation du polymorphisme A1166C, situé dans la partie 3' non-codante du gène.

Localisation	Position	Substitution
5' UTR	-2228*	G→ A
	-1424	C→G
	-1138*	A→ T
	-810*	T→ A
	-713*	T→ G
	-521	C→ T
	-214*	A→C
	-213*	G→ C
	-153*	A→G
Exon 4	55	T→ C
Exon 5	573	T→ C
	1062	A→ G
3' UTR	1166	A→ C
	1517	G→ T
	1878	A→G

Tableau 3. Principaux polymorphismes identifiés dans le gène AGTR1. * polymorphismes en déséquilibre de liaison (d'après *Bonnardeaux et al, 1994 ; Poirier et al 1998, ; Erdmann et al, 1999*).

Le niveau de pression, pris comme variable continue, a également été considéré comme un phénotype pouvant être associé au polymorphisme A1166C. Il a notamment été montré chez des hypertendus italiens que la PAS et la PAD étaient corrélées significativement avec le nombre d'allèles C (*Hingorani et al, 1995*). Plus récemment une étude américaine a montré que la PAS était liée à l'allèle 1166C, mais uniquement chez les Américains de type caucasiens, et non chez les Afro-américains (*Hindorff et al, 2002*). Cependant un nombre important d'études apportent des résultats contradictoires. Une étude menée chez 212 patients italiens issus de la population générale montre que les PAS et les PAD conventionnelles étaient plus basses chez les homozygotes CC (vs AA+AC), alors qu'aucune différence n'était mise en évidence lorsque les chiffres de pression obtenus par MAPA étaient considérés (*Castellano et al, 1996*). Les autres travaux menés également dans des populations caucasiennes européennes n'ont pas permis de mettre en évidence une association entre le polymorphisme A1166C et la pression artérielle (*Hingorani et al, 1995 ; Benetos et al, 1995* ; *Benetos et al, 1996a* ; *Benetos et al, 1996b ; Castellano et al, 1996* ; *Girerd et al, 1998* ; *Miller et al, 1999* ; *Hilgers et al, 1999* ; *van Geel et al, 2000* ; *Zhang et al, 2000* ; *Pontremoli et al, 2000 ; Lajemi et al, 2001* ; *Henskens et al, 2003*).

Bien que le polymorphisme A1166C ne soit pas fonctionnel, plusieurs travaux ont été consacrés à sa possible association avec la réponse à l'Ang II. Il a été montré qu'une augmentation de la contractilité de fragments d'artères humaines isolés, en réponse à une infusion d'Ang II, était associée à l'allèle C (*Henrion et al, 1998* ; *van Geel et al, 2000*). Miller et coll. ont observé une augmentation de l'activité de l'Ang II au niveau rénal significativement associée à l'allèle 1166C (*Miller et al, 1999*). Il a également été mis en évidence, chez 42 patients avec une HTA essentielle, une association entre l' augmentation de la sensibilité mais pas de la réactivité à l'Ang II et l'allèle 1166C (*Spiering et al, 2000*). Cependant, chez de jeunes hommes normotendus, aucune différence de réponse à l'Ang II n' a pu être observée en fonction du génotype des sujets (*Hilgers et al, 1999*). Par ailleurs le polymorphisme A1166C n'a pas été associé avec une modification de la réponse, en terme de sécrétion d'aldostérone, à l'Ang II (*Hilgers et al, 1999 ; Miller et al, 1999* ; *Spiering et al, 2000*). Alors qu' une diminution de la concentration plasmatique basale avait été observée chez les homozygotes CC (vs AC+AA) (*Spiering et al, 2000*), aucune différence significative n'a été montrée dans deux autres études (*Hilgers et al, 1999 ; Miller et al, 1999*).

Par ses actions profibrosantes, et ses effets sur le collagène, l'Ang II pourrait jouer un rôle non-négligeable dans les processus de rigidification des artères. L'équipe de A. Benetos a étudié le lien entre le polymorphisme A1166C et un index de la rigidité artérielle, la vitesse d'onde de pouls (VOP) (*Asmar et al, 1995 ; Benetos et al, 1995* ; *Benetos et al, 1996a* ; *Benetos et al, 1996b* ; *Lajemi et al, 2001*). Leurs résultats montrent une nette association de l'allèle C avec une augmentation de la VOP, le polymorphisme pouvant expliquer entre 4 et 11 % de la variance de la VOP. Ils ont, par ailleurs, montré que le génotype influençait la réponse (en terme de diminution de la VOP) des patients au traitement, les porteurs d'allèle C répondant au perindopril, alors que les homozygotes AA répondent uniquement à la nitrendipine (*Benetos et al, 1996a*). Une autre approche de l'atteinte vasculaire est la mesure par echo-tracking de l'épaisseur intima-média, mais il n'a pas été mis en évidence de relation entre ce phénotype et le polymorphisme A1166C (*Castellano et al, 1996* ; *Girerd et al, 1998* ; *Balkestein et al, 2002*).

Enfin, récemment l'équipe de J. Diez a publié des résultats concernant l'association du polymorphisme A1166C avec la rigidité myocardique, chez des sujets normotendus et des hypertendus non-traités. Leurs résultats montrent que, chez les hypertendus, le polymorphisme est lié à un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation du collagène. Les homozygotes AA présentent une augmentation de synthèse du collagène de type I, en comparaison avec les porteurs d'allèles C. Par ailleurs, cet allèle 1166A est également associé significativement à une augmentation de la rigidité de la chambre ventriculaire gauche, estimée à partir de mesures échocardiographiques. Une diminution de la synthèse du collagène et de la rigidité ventriculaire sont observées en réponse à l'administration de losartan uniquement chez les homozygotes AA (*Diez et al, 2003*).

5 Gène de l'aldostérone synthase *CYP11B2*

Par ses effets sur le métabolisme hydrosodé, la structure et la fonction cardiovasculaire, l'aldostérone est un élément clé du SRAA. Le gène *CYP11B2*, qui code pour l'aldostérone synthase, est donc apparu comme un gène candidat de tout premier intérêt, d'autant plus qu'il est impliqué dans une des formes d'HTA monogénique, l'HSD.

Localisé sur le chromosome 8q24, le gène CYP11B2 s'étend sur environ 9kb et compte neuf exons (*Taymans et al, 1998*). Plusieurs polymorphismes ont été décrits dans ce gène dont plus d'une dizaine se situent dans la partie promotrice du gène *(White et al, 1995 ; Hampf et al, 1998)*. Les polymorphismes les plus étudiés sont les –344C/T, 173G/A ($R^{173}K$), et une conversion localisée dans l'intron 2. Les deux premiers polymorphismes (situés respectivement dans la partie promotrice et dans l'exon 3 du gène) sont en complet déséquilibre de liaison, alors que –344C/T et la conversion de l'intron 2 sont en déséquilibre de liaison incomplet. La substitution C→ T est localisée dans la zone promotrice du gène, dans un site de liaison pour le facteur de transcription SF-1 (*Stereodogenic factor 1*) (Fig.24). Bien que l'allèle C lie le SF-1 avec une affinité quatre fois plus importante que l'allèle T, il a été montré que SF-1 n'intervient pas dans le taux d'expression basale du gène CYP11B2, suggérant que le polymorphisme n'a pas de conséquence fonctionnelle au niveau transcriptionnel (*Clyne et al, 1997 ; Bassett et al, 2002*).

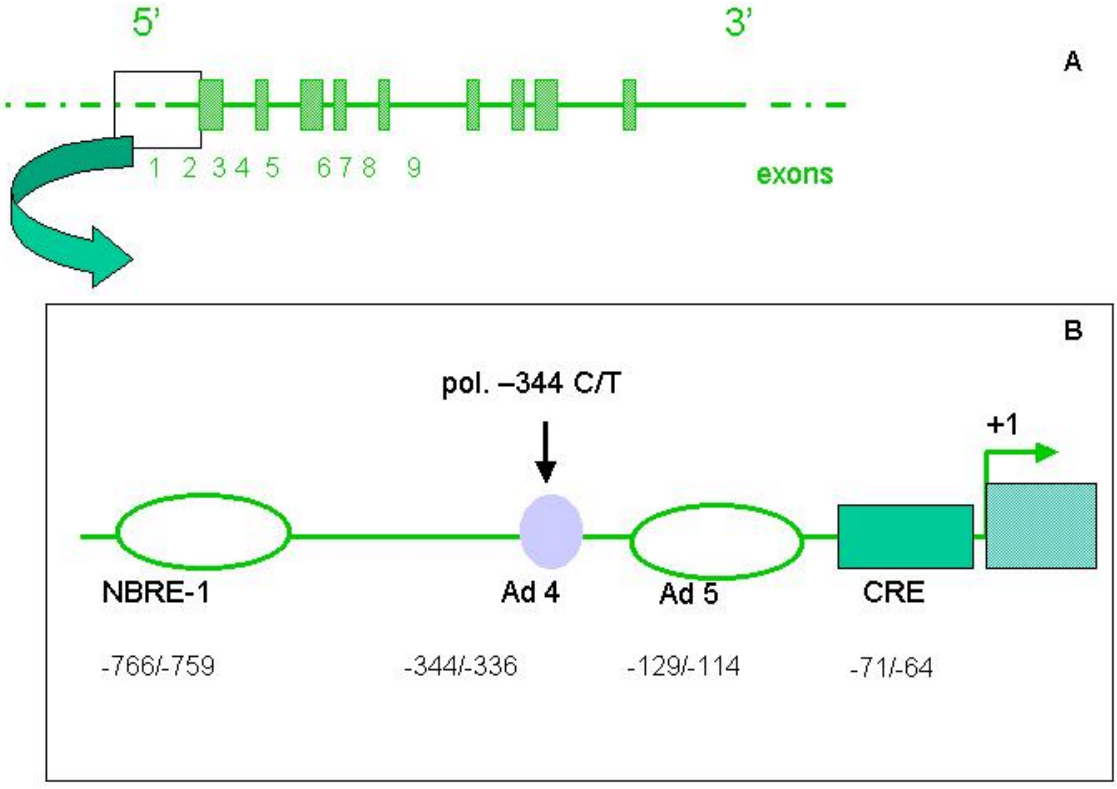

Figure 24. **A**: Représentation schématique de la structure du gène *CYP11B2*, localisé sur le chromosome 8q24. **B**: Détail de la partie promotrice du gène *CYP11B2*, comprenant le polymorphisme –344C/T. Celui-ci est localisé dans un site de liaison spécifique pour le facteur de transcription *stereodogenic factor 1* (SF-1). NBRE-1, Ad 4, Ad 5, CRE : site de liaison des facteurs de transcription. (adapté d'après *Basset et al, 2002*)

Le polymorphisme –344C/T a largement été étudié afin de déterminer s'il était associé avec la sécrétion d'aldostérone. Plusieurs études ont ainsi mis en évidence une association entre l'allèle T et une augmentation de la concentration plasmatique en aldostérone (*Brand et al, 1999* ; *Davies et al, 1999* ; *Paillard et al, 1999*). Cependant d'autres travaux ne confirment pas ces résultats, montrant que la concentration plasmatique d'aldostérone est augmentée chez les homozygotes CC (*Pojoga et al, 1998*), ou n'est pas associée au polymorphisme (*Connell et al, 2004* ; *Schunkert et al, 1999*). Il a été suggéré qu'un biais méthodologique pourrait expliquer, au moins en partie, la discordance des résultats, le régime sodé des sujets n'ayant pas toujours été pris en compte (*Brand et al, 1999*). Les résultats obtenus concernant l'excrétion urinaire d'aldostérone sont en faveur d'une augmentation de cette excrétion chez les porteurs de l'allèle T (*Brand et al, 1999* ; *Davies et al, 1999*).

Plusieurs études ont montré un excès d'allèle T chez les patients hypertendus en comparaison avec des sujets normotendus (*Davies et al, 1999* ; *Brand et al, 1999* ; *Paillard et al, 1999* ; *Staessen et al, 2001* ; *Castellano et al, 2003* ; *Connell et al, 2004*), cependant l'allèle C a également été associée à l'HTA (*Tamaki et al, 1999 ; Kumar et al, 2003*). Des résultats obtenus dans le cadre de l'étude SUITA au Japon, n' ont pas mis en évidence de relation entre le polymorphisme et l'HTA (*Tsujita et al, 2001*). Ce résultat a été confirmé dans une étude française (*Pojoga et al, 1998*). Par ailleurs, le niveau de pression artérielle, systolique et/ou diastolique, apparaît non lié au polymorphisme dans différentes populations, et notamment dans un échantillon de taille importante de la cohorte MONICA, et dans l'étude SUITA (*Hautanen et al, 1998* ; *Kupari et al, 1998 ; Tamaki et al, 1999 ; Schunkert et al, 1999 ; Hengstenberg et al, 2000 ; Tsujita et al, 2001*). De manière intéressante, il a été montré que l'allèle T était présent en excès chez les patients avec une HTA à rénine basse, celle-ci étant définie par un rapport aldostérone/activité rénine élevé (*ARR : aldosterone renin ratio)*. Ce résultat se retrouve tant chez des patients japonais, que dans plusieurs populations européennes (*Komiya et al, 2000 ; Rossi et al, 2001 ; Lim et al, 2002 ; Connell et al, 2004*). Une étude comparant des patients avec un adénome de Conn et des contrôles issus de la cohorte MONICA a mis en évidence une différence significative entre les cas et les contrôles concernant les fréquences alléliques et la distribution des génotypes du polymorphisme –344C/T. Dans le groupe de patients avec adénome, la proportion d' d'homozygotes TT était augmentée, et celle des porteurs d'allèles C (CT et CC) diminuée en comparaison avec les fréquences dans le groupe contrôle *(Inglis et al, 2001*). Par ailleurs, il

semble exister un déséquilibre de liaison entre la mutation responsable de l'HSD et le polymorphisme, les patients porteurs de la mutation étant toujours porteurs de l'allèle C, et le plus souvent homozygotes CC (*Jamieson et al, 1995*).

L'aldostérone exerce des effets délétères importants sur le cœur et est notamment impliquée dans les processus de fibrose cardiaque. De ce fait plusieurs équipes ont étudié l'association du polymorphisme –344C/T avec des phénotypes concernant la structure et la fonction cardiaque. Un groupe finlandais a ainsi montré dans différentes études une association significative de l'allèle avec une augmentation de la masse ventriculaire gauche (MVG) et la dysfonction diastolique, chez des patients normotendus (*Kupari et al. 1998 ; White et al, 1999* ; *Hautanen et al, 1999*) . White et coll. ont estimé que le polymorphisme –344C/T expliquait environ 16% de la variance de la MVG (*White et al, 1999*). Des résultats similaires ont été retrouvés dans une population japonaise (*Tamaki et al, 1999*), mais une étude menée chez des patients européens avec infarctus du myocarde avant l'âge de soixante ans n' a cependant pas montré d'association du polymorphisme –344C/T avec les paramètres échocardiographiques de structure cardiaque (*Hengstenberg et al, 2000*). Cette absence d'association avait été également observée dans un échantillon de la cohorte MONICA, amenant Schunkert et coll. à conclure que ce polymorphisme ne jouait sans doute pas de rôle majeur dans la structure et la fonction du ventricule gauche, au sein de la population européenne (*Schunkert et al, 1999*).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'aldostérone agit également sur les vaisseaux où elle peut contribuer à augmenter la rigidité artérielle. Cependant, l'implication du polymorphisme –344C/T dans des processus de remodelage de la paroi artérielle n'a pu être démontrée. Bien que Pojoga et coll. aient mis en évidence une association entre la vitesse d'onde de pouls (VOP) et l'allèle C du polymorphisme, ce résultat n'a pas été confirmé quelques années plus tard, par la même équipe, sur une plus large population (*Pojoga et al, 1998 ; Lajemi et al, 2001*). De même, des études réalisées sur l'épaisseur intima-média de l'aorte n'ont pas mis en évidence d'association, ce qui suggère que ce polymorphisme n'est que peu ou pas associé à la rigidité artérielle (*Girerd et al, 1998 ; Balkestein et al, 2001*).

Les études d'association concernant les gènes du SRAA ont apporté de nombreux résultats quant à l'implication de ces gènes dans la physiopathologie cardiovasculaire.

Cependant ces résultats sont pour beaucoup contradictoires. Ceci est en partie dû à la méthodologie en elle-même qui comporte un certain nombre de limites, sur lesquelles nous reviendrons dans le chapitre Discussion. De manière générale, la diversité des populations étudiées (ethnie, âge, sexe, statut HTA ou normotendu, présence ou non de traitement…) rend très difficile la comparaison des résultats entre les études. Par ailleurs, les effectifs utilisés ne sont pas toujours adéquats pour permettre de mettre en évidence des différences significatives entre les différents génotypes étudiés. Enfin, le choix de phénotypes trop intégratifs et/ou le recueil des phénotypes dans des conditions peu standardisées peuvent limiter de manière importante la portée de ce type d'études.

Il est intéressant de noter que de plus en plus d'études, montrent la diversité d'expression d'une association entre un phénotype et un génotype en fonction notamment de l'âge et/ou du sexe des sujets, ou de leur régime sodé (*Ylitalo et al, 2000* ; *Lajemi et al, 2001* ; *Reich et al, 2003* ; *Kumar et al, 2003* ; *Rudnichi et al, 2004 ; Kuznetsova et al, 2004*). Ces résultats soulignent l'influence des facteurs environnementaux sur la relation génotype-phénotype, celle-ci s'exprimant probablement de manière différente selon le contexte. Ceci rappelle donc l'intérêt de l'étude des interactions gènes-environnement, et une approche proposée récemment par Montgomery et coll. « stress-the-genotype-« paraît particulièrement prometteuse pour étudier ce type d'interactions et peut-être à terme mieux comprendre les effets complexes des polymorphismes des gènes du SRAA (*Montgomery et al, 2002*).

Objectifs

L'hypertension artérielle humaine (HTA) est une pathologie complexe, multifactorielle dont le déterminisme associe des facteurs environnementaux et génétiques. Si de nombreux progrès ont été faits dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'HTA et particulièrement dans ceux conduisant à des altérations structurales au niveau du système cardiovasculaire, les gènes de susceptibilité et/ou de résistance de l'HTA humaine ne sont toujours pas connus.

Ces gènes sont probablement nombreux, comme le suggèrent en particulier les études génétiques conduites dans les différents modèles de rats hypertendus, chacun d'entre eux contribuant pour une modification modeste au niveau tensionnel. Plusieurs stratégies existent pour tenter d'identifier ces gènes : l'étude de gènes dits "candidats", le criblage complet du génome et l'étude de formes rares d'HTA monogénique. Bien que ces dernières ne concernent qu'un tout petit nombre de patients hypertendus, il est néanmoins important de les étudier, pour déterminer des gènes candidats permettant de mieux comprendre, sur un modèle génétique simple, les mécanismes en relation avec le phénotype hypertensif. Elles peuvent également permettre la mise en évidence des phénotypes intermédiaires informatifs. Cette stratégie a d'ores et déjà permis d'isoler des gènes candidats, dont plusieurs codent pour des protéines du système rénine-angiotensine aldostérone (SRAA), de démontrer le rôle primordial de ce système dans la régulation de la PA et de mettre au premier plan l'importance de l'homéostasie du bilan sodé dans la régulation de la PA. Elle a ainsi renforcé l'importance de ce SRAA et en a fait une des cibles majeures de la recherche génétique sur l'HTA.

Au cours des dix dernières années, le nombre d'études d'association n'a cessé de croître et les résultats obtenus, sont pour beaucoup contradictoires. La diversité des populations et/ou des variables étudiées est sans doute pour une part responsable de ces discordances. Cependant, ces études d'association, si elles sont réalisées dans de bonnes conditions, peuvent représenter un outil puissant, qui laisse entrevoir des retombées pharmacogénétiques à moyen ou à long terme. Il paraît donc important de pouvoir obtenir des résultats au sein de populations de terrain, afin de cerner le véritable apport de telles études.

Nos objectifs dans ce travail étaient donc d'étudier une population de patients hypertendus hospitalisés et de se focaliser sur les gènes du SRAA, selon deux approches : l'étude d'une forme rare d'HTA monogénique, l'hyperaldostéronisme sensible à la

dexaméthasone (HSD), et les études d'association phénotypes-génotypes en privilégiant les phénotypes intermédiaires plus informatifs que le niveau de PA, phénotype beaucoup trop intégratif. Nous avons ainsi exploré les relations existant entre d'une part les polymorphismes A1166C et –344 C/T des gènes *AGTR1* et *CYP11B2*, respectivement, et d'autre part le niveau tensionnel et des marqueurs d'atteinte cardiaque et artérielle. Nous avons par ailleurs cherché à établir la fréquence de l'hyperaldostéronisme sensible à la dexaméthasone (HSD) dans notre population d'étude, puis nous nous sommes intéressés aux caractères phénotypiques présentés par deux patients identifiés comme porteurs de la mutation.

PARTIE 2 : Méthodes

I POPULATION D'ETUDE ET BILAN STANDARDISE

A POPULATION D'ETUDE

La population d'étude est constituée de patients hospitalisés pour bilan étiologique de leur hypertension artérielle (HTA) dans le Service de Cardiologie de l'hôpital de la Croix-Rousse, dirigé par le Pr. Hugues Milon. Le motif habituel de ce bilan hospitalier était classique, représenté soit par la résistance au traitement, soit par une orientation étiologique forte. Ceci explique qu'un nombre important de patients ait déjà été traité avec au moins un anti-hypertenseur avant l'hospitalisation. Lorsque cela était possible, tous les médicaments anti-hypertenseurs étaient arrêtés avant l'hospitalisation pendant une durée suffisante (2 à 4 semaines pour les diurétiques, 6 semaines pour la spironolactone, 2 semaines pour les IEC, 1 semaine pour les bêta-bloquants et 2 semaines pour les inhibiteurs calciques de type dihydropyridiniques). Si un traitement était indispensable en raison de la sévérité de l'HTA, un anti-hypertenseur central et/ou un inhibiteur calcique non-dihydropyridinique (vérapamil, diltiazem) était présent.

B BILAN STANDARDISE

Tous les patients hospitalisés dans le service pour bilan d'HTA, ont un bilan identique programmé sur deux jours, permettant d'obtenir des données cliniques et biologiques dans des conditions très standardisées. Tous les résultats ainsi obtenus sont stockés dans une base de données, qui aujourd'hui comprend environ un millier de patients. Seules les variables considérées dans ce travail seront détaillées dans ce chapitre.

1 Données cliniques et variables de retentissement cardiovasculaire utilisées dans ce travail.

a) Auto-questionnaire

Un auto-questionnaire, visant notamment à évaluer les habitudes de vie des patients, est rempli par chaque patient au cours de l'hospitalisation. Ils sont libres de ne pas répondre aux questions qu'ils trouveraient gênantes et un médecin reprend ensuite ce questionnaire

avec eux afin d'éliminer les éventuelles erreurs ou incompréhensions. A l'usage il s'avère que les patients remplissent ce questionnaire très scrupuleusement et il est rare que des items ne soient pas remplis.

b) Mesure de la pression artérielle

- Mesure conventionnelle et Dinamap

La pression artérielle (PA) est mesurée matin et soir, en position debout et couché, par l'infirmière. Elle également mesurée par le médecin dans les mêmes conditions. Par ailleurs, le soir du premier jour d'hospitalisation une mesure est également réalisée avec un Dinamap, durant une heure.

- Mesure ambulatoire de la pression artérielle (MAPA)

Une MAPA de 24 heures est réalisée pour chaque patient, le début de l'enregistrement se situant environ trois heures après l'hospitalisation. Cet enregistrement est réalisé avec un moniteur Diasys (modèle 200 RS ; Novacor, Rueil-Malmaison) ou avec un appareil Spacelabs (modèle 90207 ; Spacelabs, Redmond, Washington, USA). Le brassard est placé sur le bras non-dominant et la validité des mesures est systématiquement vérifiée par une mesure conventionnelle sur l'autre bras. Le logiciel est réglé pour effectuer une mesure de pression artérielle toutes les 15 minutes durant la période diurne (6 h-22 h) et toutes les 30 minutes durant la nuit (22 h-6 h).

c) Vitesse d'onde de pouls

La vitesse d'onde de pouls (VOP) est mesurée dans une pièce calme, climatisée, après 15 minutes de repos en position couchée et à distance (2 à 3 heures) des repas. Il est demandé aux patients de restreindre leur consommation de café et de tabac durant leur hospitalisation.

La VOP est mésurée par un Complior (Colson, Garges-les Gonesse, France) suivant les recommandations du constructeur. Cet appareil a été validé et fournit une mesure automatique et fiable de la VOP (*Asmar et al, 1995*). Deux capteurs sont placés à la base du cou pour l'artère carotide commune et au pli de l'aine pour l'artère fémorale commune gauche. La position des capteurs est ajustée afin d'obtenir des enregistrements de bonne

qualité, ce qui est vérifié visuellement par l'opérateur. Pour chaque patient, 25 ondes de pouls sont enregistrées. Le décalage entre les ondes de pouls carotidienne et fémorale est mesuré automatiquement par le logiciel. Cette durée est assimilée au temps nécessaire pour parcourir une distance équivalente à celle comprise entre la carotide et la fémorale. La VOP est exprimée par le rapport de la distance entre les deux sites d'enregistrement, mesurée directement sur le patient (exprimée en mètre), et l'intervalle de temps (mesuré par le logiciel en seconde).

La figure 25 montre un enregistrement de VOP-type.

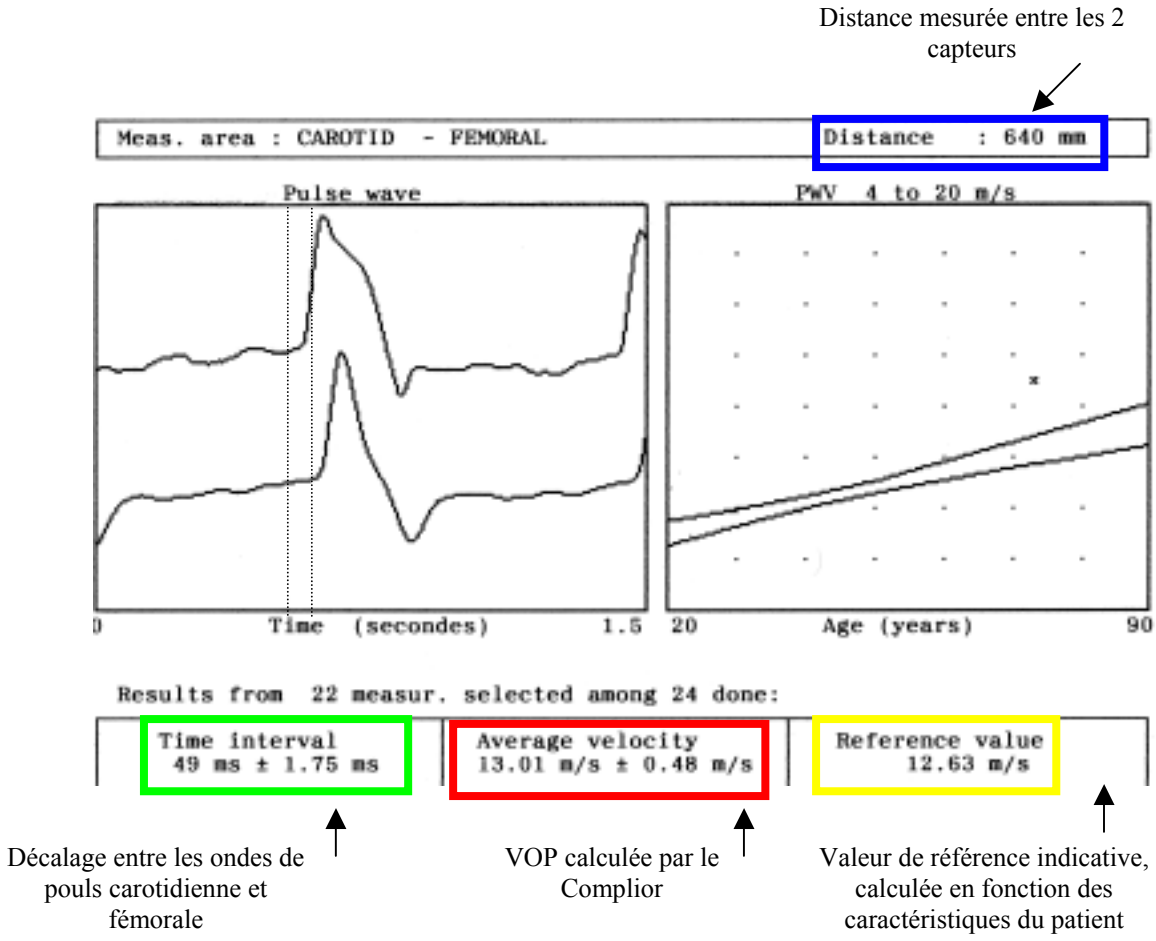

Figure 25. Exemple d'un enregistrement de vitesse d'onde de pouls (VOP) réalisé avec un Complior chez un patient hypertendu. La VOP est obtenue en faisant le rapport de la distance entre les deux sites d'enregistrement, mesurée par l'opérateur, et l'intervalle de temps entre les deux ondes de pouls, mesuré par le Complior. Cet intervalle est représenté sur la figure par les lignes en pointillés. La valeur moyenne est obtenue sur 25 enregistrements consécutifs, et peut être comparée à la valeur de référence donnée par le logiciel.

d) Echocardiographie trans-thoracique

L'échocardiographie cardiaque trans-thoracique a été réalisée sur un appareil *GE Vingmed Ultrasound, Vivid Five* permettant d'obtenir des images en mode M, en mode bidimensionnel et des enregistrements en doppler continu, doppler pulsé et doppler couleur des flux sanguins. L'examen des patients est réalisé en décubitus latéral gauche.

L'obtention des images en mode bidimensionnel est effectuée selon la méthode usuelle par des coupes parasternales grand et petit axe. Les mesures des diamètres télédiastoliques (VGtd) et télésystoliques (VGts) du ventricule gauche (VG) en mode TM sont faites en coupes parasternales grand axe et petit axe.

Les mesures de l'épaisseur de la paroi postérieure du VG (PPtd) et du septum interventriculaire (SIVtd) sont faites en télédiastole en coupe parasternale selon la convention de Penn.

La MVG (en gramme) est calculée d'après l'équation de Devereux et Reichek (*Devereux et al, 1977*) :

$$\mathbf{MVG = 1{,}04 \times [(SIVtd + VGtd + PPtd)^3 - (VGtd)^3] - 13{,}6}$$

L'index de MVG (IMVG) est obtenu en divisant la MVG par la surface corporelle en m^2. La limite supérieure des valeurs normales et de 111 g/m^2 pour les hommes et 106 g/m^2 pour les femmes.

La MVG peut être difficile à estimer de manière correcte, notamment en présence d'une désaxation aorto-septale (coupe non perpendiculaire au septum interventriculaire → surestimation de l'épaisseur des parois), ou d'un bourrelet septal (l'augmentation de l'épaisseur du septum fausse le calcul) ou simplement quand l'échogénicité est insuffisante. Dans notre étude nous n'avons conservé que les patients pour lesquels les conditions techniques étaient remplies pour réaliser cette mesure.

L'échocardiographie permet également l'évaluation de la fonction diastolique du VG par l'étude du flux mitral et du flux veineux pulmonaire en mode doppler pulsé. Nous n'avons cependant pas utilisé ce type de données dans le travail présenté ici.

2 Dosages Biologiques

Lors du bilan deux ionogrammes sanguins sont réalisés, l'un lors du premier jour d'hospitalisation du patient et le second 24 heures plus tard. Des précautions particulières sont prises pour obtenir une kaliémie dans de bonnes conditions (éviter que le patient fasse un effort musculaire soutenu avant le prélèvement, la contraction du poing). Un bilan lipidique est également pratiqué avec dosage du cholestérol total, du HDL-cholestérol et du LDL-cholestérol ainsi que des triglycérides.

Une diurèse de 24 heures permet de mesurer l'excrétion sodée et potassique, et de rechercher une protéinurie ou une microalbuminurie.

Un bilan hormonal est également réalisé, au cours duquel l'aldostérone plasmatique et la rénine active sont mesurées. Les prélèvements sanguins sont réalisés après une nuit de décubitus, puis après une heure d'orthostatisme. La rénine a été dosée par méthode immunoradiométrique (Cis Bio International-Schering, Gif sur Yvette) et l'aldostérone par méthode radioimmunologique (Immunotech, Marseille).

II DETERMINATION DES GENOTYPES

A PRINCIPES DU GENOTYPAGE

Pour les deux polymorphismes étudiés nous avons utilisé des protocoles similaires : amplification par PCR (*polymerase chain reaction*) d'un fragment d'ADN génomique contenant le polymorphisme d'intérêt, suivie d'une digestion par une enzyme de restriction, choisie en fonction du site polymorphe. L'ADN génomique utilisé pour les génotypages suivants a été extrait suivant le protocole détaillé en annexe I. Pour chaque génotypage nous avons utilisé un contrôle sans ADN, afin de nous assurer de l'absence de contamination, ainsi qu'un contrôle contenant l'ADN d'un sujet hétérozygote, préalablement séquencé. Toutes les amplifications par PCR ont été réalisées avec un thermocycleur PT 100 MJ Research.

B POLYMORPHISME A 1166 C DU RECEPTEUR DE TYPE 1 DE L'ANGIOTENSINE (*AGTR1*)

1 Le polymorphisme

Le polymorphisme considéré est situé dans la zone proche du +1 de transcription du gène AGTR1. L'allèle C fait apparaître un site de restriction reconnu par l'enzyme *Dde I* :

5'-C↓TNAG-3'

3'-GANT↑C-5'

2 Les amorces

Les amorces utilisées (Tableau 4), publiées précédemment (*Hilgers et al, 1999*), permettent l'obtention d'un fragment de 428 pb qui contient en plus du site polymorphe, un autre site de restriction reconnu par *Dde I* (Fig. 26).

Amorce	Séquence	Tm	(G+C)	(A+T)
AT sens	TTCCCCCAAAAGCCAAATCCCAC	78°C	12	11
AT antisens	CAGGCTAGGGAGATTGCATTTCTGTCAG	74°C	14	14

Tableau 4. Séquence et caractéristiques des amorces. Tm : melting temperature.

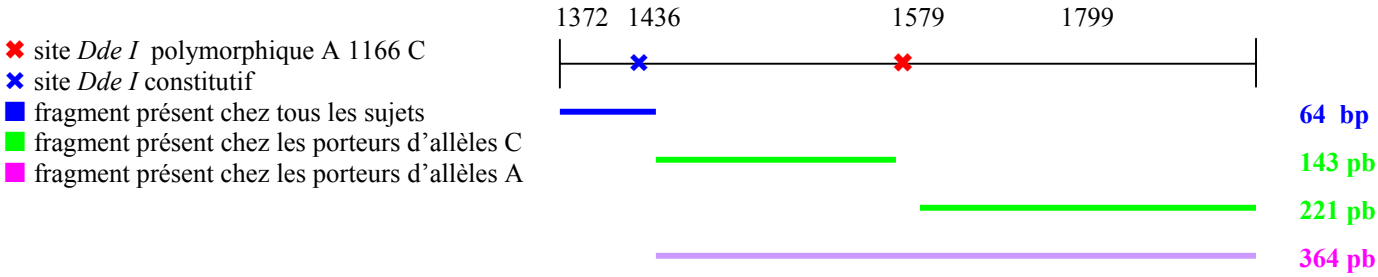

Figure 26. Schéma du fragment de 428 paires de bases (pb) amplifié par PCR et des fragments de restriction obtenus après digestion par *DdeI*. (les chiffres indiqués renvoient à la numérotation des bases de la séquence NM_000685.2 du gène *AGTR1*, référencée dans Gen Bank.)

3 Conditions expérimentales

Le profil thermique retenu a été adapté à partir de la littérature (*Hilgers et al, 1999*). Il s'agit d'un protocole *touch down* qui utilise une température d'hybridation supérieure de 5°C à la Tm des amorces. Cette température est ensuite diminuée d'1°C par cycle jusqu'à atteindre une température optimum. Cette technique permet d'augmenter la spécificité de la PCR.

pré-dénaturation	2' à 94°C	
dénaturation	40'' à 94°C	37 cycles
hybridation	1' à 72°C (-1°C jusqu'à 64°C)	
élongation	1' à 72°C	
élongation terminale	5' à 72°C	

Le milieu réactionnel utilisé est détaillé dans le tableau 5.

Réactif	Volume	Concentration/quantité finale
Tampon de PCR 10X	2,5µL	1X
$MgCl_2$	0 ,75 µL	1.5mM
dNTP 10 mM	0,5µL	200 mM
Amorce sens 10 µM	0,5µL	0,2 µM
Amorce anti-sens 10 µM	0,5 µL	0,2 µM
ADN génomique 200µg/mL	2, 5µL	500ng
Euro Blue Taq (Eurobio) 5U/µL	0.125 µL	
H_2O stérile	qsp 25 µl	

Tableau 5. Milieu réactionnel de la PCR.

Après vérification de la bonne qualité de l'amplification par migration des amplicons sur gel d'agarose, les produits de PCR ont été digérés par *Dde I* (10 unités d'enzyme pour 15µL de produits de PCR) à 37°C, pendant 5 heures.

4 Electrophorèse et lecture des génotypes

Après la digestion par l'enzyme de restriction, les fragments obtenus ont été déposés dans un gel d'agarose à 2 %, dans lequel était ajouté du BET à 0,1%, dilué au 1/1000. La solution de charge utilisée était composée d'orange G dissout dans un mélange eau + Ficol. Ce colorant possède la particularité d'indiquer le front de migration, ce qui est particulièrement intéressant pour vérifier la progression des plus petits fragments de restriction, et ainsi éviter leur fuite dans la cuve d'électrophorèse. Pour bien évaluer la taille des fragments obtenus nous avons utilisé un marqueur de taille 50 bp (Invitrogen).
Le générateur était réglé à 85 V, 45 mA pour une durée de migration de 2 h.
Après la migration le gel était lu directement sur une table à UV. A la longueur d'onde λ = 435 nm le BET, qui s'intercale entre les bases de l'ADN, devient fluorescent et permet de visualiser directement les fragments de restriction, et l'obtention les génotypes (Fig. 27).

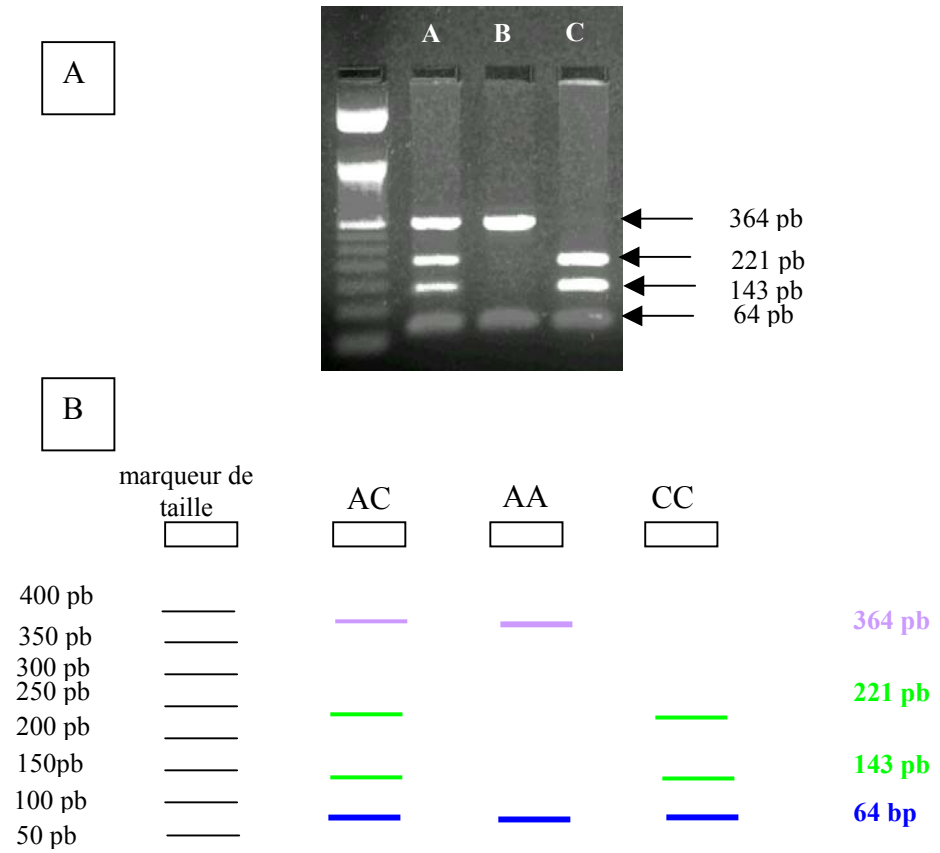

Figure 27. Photographie (A) et schéma (B) d'un gel d'agarose contenant les fragments de restriction obtenus après digestion des produits de PCR par *Dde I*. Les puits A, B, et C contiennent les ADN de patients respectivement AC, AA, et CC.

C POLYMORPHISME –344 C/T DE L'ALDOSTERONE SYNTHASE *(CYP11B2)*

1 Le polymorphisme

Le polymorphisme étudié est situé dans la région 5'UTR du gène *CYP11B2*, dans une zone connue pour être un site de liaison pour un facteur de transcription, SF-1. La présence de l'allèle C conduit à la création d'une séquence spécifique reconnue par l'enzyme de restriction *Hae III* :

5 '-GG↓CC-3'

3'-CC↑GG-5'

2 Les amorces

La séquence où est située le polymorphisme est une région très riche en GC (environ 50 %), ce qui complique la mise au point d'amorces optimum. Nous avons finalement choisi des amorces de petite taille et riches en GC, mais présentant l'avantage d'avoir des Tm proches et un pourcentage de GC identique (Tableau 6).

Amorce	Séquence	Tm	(G+C)	(A+T)
CYP sens	GTTGACCACCAGGAGGA	54°C	10	7
CYP antisens	TCTGGACCTGCCTGAGA	54°C	10	7

Tableau 6. Séquences et caractéristiques des amorces choisies. Tm : *melting temperature*.

Ces amorces permettent l'amplification d'un fragment de 466 paires de bases (Fig. 28), contenant, en plus du site polymorphe –344 C/T, deux autres sites constitutifs reconnus par *Hae III*. Le nombre de fragments obtenus après digestion par *Hae III* est donc de 4 pour les homozygotes CC, 3 pour les homozygotes TT et de 5 pour les hétérozygotes CT.

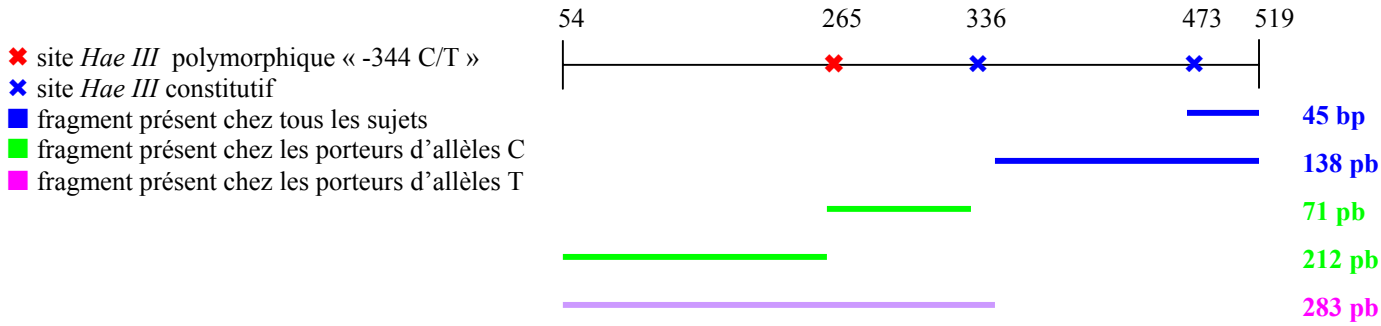

Figure 28. Schéma du fragment de 466 paires de bases (pb) amplifié par PCR et des fragments de restriction obtenus après digestion par *Hae III*. (les chiffres indiqués renvoient à la numérotation des bases de la séquence D13752.1 du gène *CYP11B2,* référencée dans Gen Bank.)

3 Conditions Expérimentales

Le milieu réactionnel utilisé pour cette amplification est identique à celui utilisé pour l'amplification du fragment d'intérêt du gène *AGTR1* (Tableau 3).

Pour choisir le profil thermique le plus adapté nous avons testé plusieurs protocoles, pour finalement choisir un protocole *Touch Down* permettant d'obtenir une bonne spécificité et un bon rendement d'amplification malgré la Tm basse de nos amorces. Après mise au point, le profil thermique retenu est le suivant :

pré-dénaturation	3' à 94°C	
dénaturation	1' à 94°C	30 cycles
hybridation	1' à 62°C (-0.5°C jusqu'à 57°C)	
élongation	1' à 72°C	
élongation terminale	5' à 72°C	

Après vérification de la bonne qualité de l'amplification par migration des amplicons sur gel d'agarose, les produits de PCR ont été digérés par *Hae III* (10 unités d'enzyme pour 15 µL de produits de PCR) à 37°C, pendant 5 heures.

4 Electrophorèse et lecture des génotypes

Après la digestion par *Hae III*, les fragments obtenus ont été déposés dans un gel d'agarose à 2 %, dans lequel était ajouté du BET à 0,1 %, dilué au 1/1000. Comme pour le polymorphisme précédent le colorant utilisé dans la solution de charge était de l'orange G. Le marqueur de taille était également de 50 bp (Invitrogen).
Le générateur était réglée à 85 V, 45 mA pour une durée d'environ 2 h.
Après la migration, le gel était lu directement sur une table à UV (λ = 435 nm) pour obtenir les génotypes (Fig. 29).

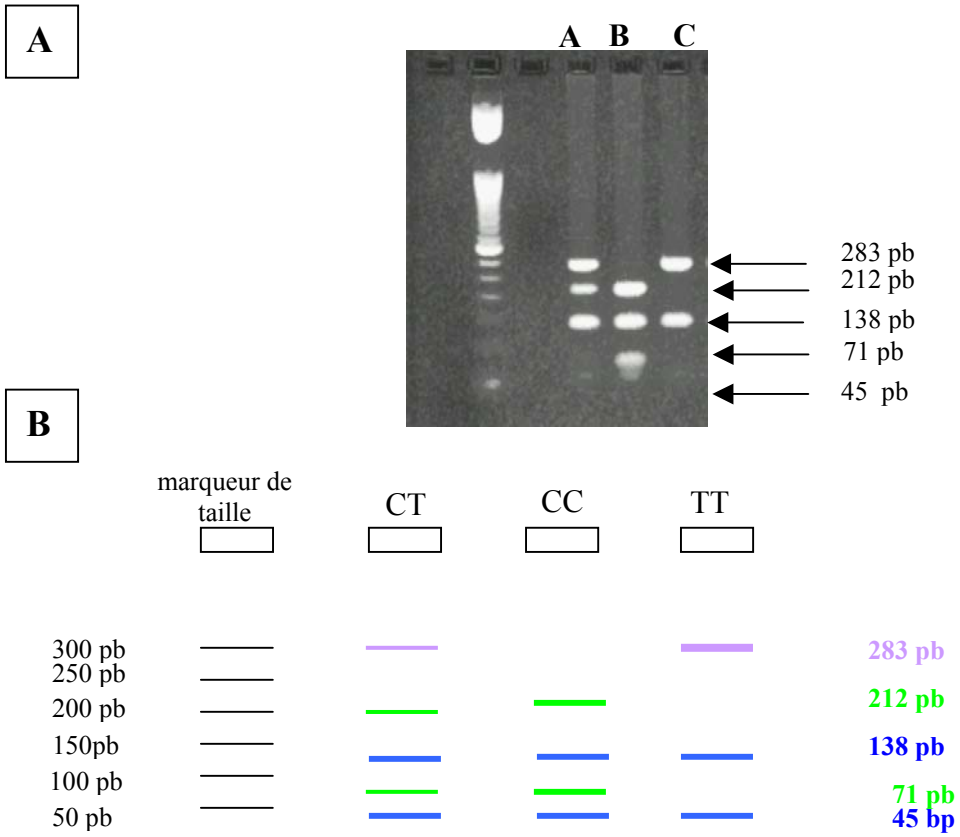

Figure 29. Photographie (A) et schéma (B) d'un gel d'agarose contenant les fragments de restriction obtenus après digestion des produits de PCR par *Hae III*. Les puits A, B, et C contiennent les ADN de patients respectivement CT, CC, et TT.

III DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DE L'HSD

La taille des fragments d'ADN à amplifier pour diagnostiquer le HSD est de 3900 paires de bases, et de ce fait le protocole d'amplification utilisé a nécessité certaines adaptations. En effet, un protocole standard de PCR permet l'amplification de séquences de l'ordre de quelques centaines de paires de bases, alors que les protocoles de *long PCR* s'adressent à des fragments supérieurs à 5000 pb (*Cheng et al, 1994* ; *Maga et al, 1991* ; *Ponce et al, 1992*). Par ailleurs, la méthode mise au point comporte deux particularités par rapport aux protocoles habituels :

- pour chaque échantillon testé, 2 amplifications sont réalisées. Elles sont menées simultanément mais dans 2 tubes distincts. Une réaction vise à amplifier le gène *CYP11B2* (présent chez tout individu) et sert de réaction témoin. L'autre réaction correspond à l'amplification du gène chimère *CYP11B1/B2*. Cette réaction n'est positive que chez les patients porteurs de la mutation et donc atteints par le HSD.
- dans la mesure où les régions codantes des 2 gènes *CYP11B2* et *CYP11B1/B2* sont identiques, l'amorce antisens utilisée est la même pour les 2 réactions. Les amorces *sens* de chacune des 2 réactions sont différentes l'une de l'autre ; elles sont complémentaires de régions non homologues de *CYP11B1* et *CYP11B2*, ce qui confère sa spécificité à la méthode (Fig. 30).

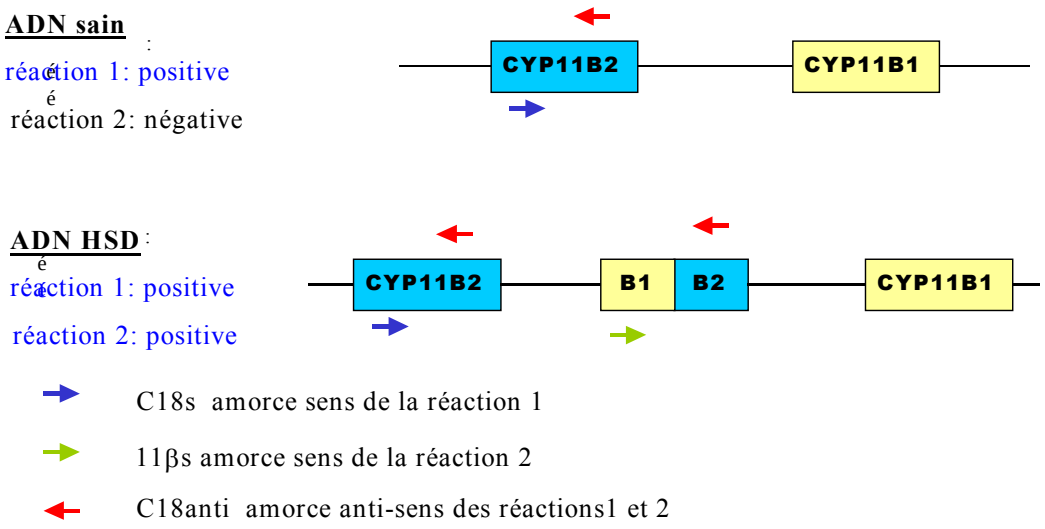

Figure 30. Principe du diagnostic de l'HSD par PCR : la réaction 1, positive chez tous les sujets, sert de témoin pour vérifier le bon déroulement de la PCR. Les réactions 1 et 2 sont réalisées simultanément mais dans 2 tubes distincts.

Les amorces utilisées (Tableau 7) permettent d'amplifier un large fragment allant de la région 5'-non traduite (5' UTR) à l'intron 5 de chacun des gènes *CYP11B2* et *CYP11B1/B2* (*Jonsson et al, 1995*). Ceci permet de couvrir entièrement la région comprise entre l'extrémité 5' de l'intron 2 et l'intron 4, où se situent tous les sites possibles de crossing-over décrits jusqu'ici. Ces amorces présentent des Tm élevées, telles que l'étape d'hybridation devrait se dérouler à une température théoriquement comprise entre 60°C et 70°C, alors que la température moyenne est de 55°C. Les températures des étapes d'hybridation et d'élongation étant donc très proches, nous avons choisi de regrouper ces deux étapes en une seule : le cycle de PCR se déroule donc en deux phases au lieu de trois.

Amorce	Séquence	Tm	(G+C)	(A+T)
C18s	TCCTTCATCTACCTTTGGCTGGGG	75°C	13	13
11bs	TCATGCACCCCCAATGAGTCCCTG	77°C	14	10
C18a	GAGTCCTCCAGCTGCCTCTCAACC	78°C	15	9

Tableau 7. Séquences et caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des fragments d'intérêt pour le diagnostic de l'hyperaldostéronisme sensible à la dexaméthasone.

De nombreuses étapes de mise au point ont permis de sélectionner les conditions expérimentales suivantes :

- milieu réactionnel

Réactif	Volume	Concentration/quantité finale
Tampon de PCR 10X	5µL	1X
$MgCl_2$	1,5 µL	1,5 mM
dNTP 10 mM	1 µL	200 mM
Amorce sens 5µM	2 µL	0,2 µM
Amorce anti-sens 5µM	2 µL	0,2 µM
ADN génomique 200µg/mL	2,5 µL	500 ng
Platinum Taq Polymerase (Invitrogen) 5U/µL	0,5 µL	2,5 U
H_2O stérile	qsp 50 µl	

- profil thermique

pré-dénaturation	3' à 94°C	
dénaturation	1' à 94°C	12 cycles
hybridation-élongation	5' à 71°C	
dénaturation	1' à 94°C	23 cycles
hybridation-élongation	5' à 71°C + *30s/cycle*	
élongation terminale	5' à 72°C	

Après chaque amplification une électrophorèse était réalisée sur gel d'agarose (0,7%-TBE), contenant du bromure d'ethidium (BET) à 0,1 %, dilué au 1/1000. La solution de charge utilisée était composée de Ficol (50 %), de bleu de bromophénol (12,5 %), de xylène cyanol (12,5 %) et d'eau (25 %). Ce mélange présente l'avantage de donner des indications à la fois sur l'avancée du front de migration et sur l'avancée des fragments d'environ 4000 pb, ce qui correspondait à notre fragment d'intérêt. Nous avons utilisé le marqueur de taille de 1 Kb de GIBCO BRL, pour estimer la taille des fragments amplifiés.

La lecture des gels sur une table à UV (λ = 435 nm), permet la visualisation directe des fragments amplifiés et l'identification des patients porteurs et non-porteurs de la mutation responsable du HSD (Fig. 31).

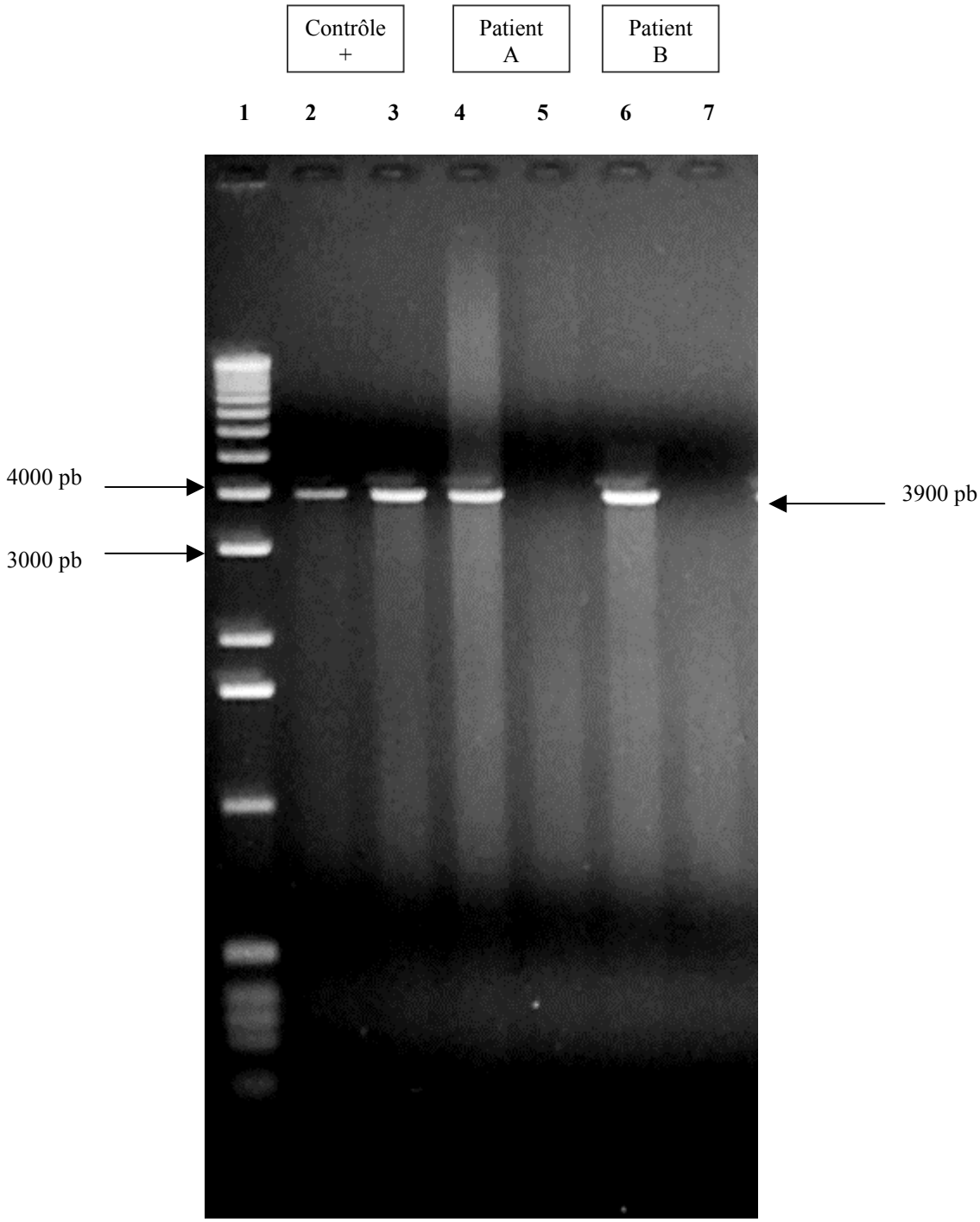

Figure 31 : **Amplification du gène *CYP11B2* et du gène chimère *CYP11B1/B2* par méthode PCR.**
Les puits 2, 4 et 6 contiennent les produits d'amplification du gène *CYP11B2* et les puits 3, 5 et 7 ceux du gène chimère *CYP11B1/B2*. Le puits 1 contient le marqueur de taille.
Pour le contrôle positif, le gène chimère est amplifié (puits n°3). Pour les patients A et B, le gène chimère est absent (puits n° 5 et 7, respectivement).

PARTIE 3 : Résultats

I POLYMORPHISME DU GENE DU RECEPTEUR DE TYPE 1 A L'ANGIOTENSINE II (*AGTR1*), PRESSION ARTERIELLE ET RIGIDITE ARTERIELLE CHEZ L'HYPERTENDU.

Article : ***A[1166]C polymorphism of Angiotensin II Type 1 Receptor, Blood Pressure and Arterial Stiffness in Hypertension***

S. Gardier, M. Vincent, P. Lantelme, M.O. Rial, G. Bricca, H. Milon

J Hypertens 2004, 22 :

A BUTS DE L'ETUDE

L'HTA et le vieillissement sont deux causes majeures de la rigidité artérielle. Il a été montré que les propriétés pro-inflammatoire et pro-fibrosante de l'Ang II, jouent un rôle important dans le processus de remodelage de la paroi artérielle. Ces actions étant médiées par le récepteur de type 1 à l'Ang II (AT1), nous nous sommes intéressés aux relations possibles entre un polymorphisme du gène *AGTR1* codant pour ce récepteur, la pression artérielle et la rigidité artérielle. Parmi les nombreux polymorphismes du gène *AGTR1*, nous avons choisi d'étudier le polymorphisme $A^{1166}C$, qui est le plus connu et pour lequel des études antérieures avaient montré des associations avec la pression artérielle et la rigidité artérielle. Les objectifs de cette étude étaient donc i) de rechercher l'existence de telles associations dans une population d'hypertendus sévères hospitalisés ii) d'utiliser la réponse de la sécrétion de l'aldostérone lors du passage de la position couchée à la position debout comme un index de la sensibilité à l'Ang II .

B SUJETS ET METHODES

Cent quatre-vingt cinq patients hypertendus hospitalisés entre Octobre 1998 et Février 2002 et ayant fourni un consentement éclairé, ont été inclus dans cette étude. Cinquante huit d'entre eux n'avaient jamais été traités ou avaient arrêté leur traitement deux semaines avant leur hospitalisation. Les autres patients, pour lesquels un arrêt du traitement n'était pas

envisageable, ont été placés sous antagonistes calciques et/ou antihypertenseurs centraux. Tous les patients ont eu un bilan standardisé comme décrit précédemment (*Sujets et Méthodes-chapitre I*)

La rigidité artérielle a été estimée par la mesure de la vitesse d'onde de pouls (VOP), méthode déjà utilisée et validée par notre équipe (*Lantelme et al, 2002*).

La réponse de l'aldostérone plasmatique à un test de posture (1 heure) a été utilisée comme index indirect de la sensibilité à l'Ang II.

Le génotypage des patients pour le polymorphisme a été réalisé par amplification PCR suivie d'une digestion par enzyme de restriction *DdeI*.

C RESULTATS

Dans notre population d'étude, comprenant plus de 50 % d'hypertendus « grade 3 » selon la classification de l'ESH/ESC (*Cifkova et al, 2003*), le polymorphisme $A^{1166}C$ n'est pas associé à la pression artérielle, quelle que soit la méthode de mesure utilisée. Par contre, il est significativement et indépendanmment associé à la VOP, la VOP étant augmentée chez les porteurs d'allèle A. Il existe un effet-dose de l'allèle A. La réponse de l'aldostérone au test de posture n'est pas différente selon le génotype de patients.

D CONCLUSIONS

Nous avons mis en évidence, chez des hypertendus hospitalisés, une association entre l'allèle A du polymorphisme $A^{1166}C$ du gène *AGTR1* et la rigidité artérielle, avec un effet dose-dépendant de cet allèle. Ce polymorphisme, bien que contribuant faiblement au déterminisme de la VOP, est le 3ème plus important déteminant après l'âge et la PA systolique de 24 h. Il ne semble pas exister de différence de sensibilité de la glande surrénale à l'Ang II en fonction des génotypes.

II INFLUENCES DU POLYMORPHISME -344 C/T DU GENE DE L'ALDOSTERONE SYNTHASE (*CYP11B2*) SUR LES DETERMINANTS DE L'HYPERTROPHIE VENTRICULAIRE GAUCHE ET DE LA RIGIDITE ARTERIELLE, CHEZ L'HYPERTENDU.

Article: ***Determinants of Cardiac and Vascular Damages in Hypertension: Differences according to CYP11B2 Gene Polymorphism***

S. Gardier, P. Lantelme, P. Champomier, G. Bricca, H. Milon, M. Vincent

American Journal of Hypertension (soumis)

A BUTS DE L'ETUDE

L'aldostérone agit de manière directe sur le myocarde et les vaisseaux, où elle active des processus d'hypertrophie et de fibrose. Par ailleurs, de plus en plus d'arguments suggèrent l'existence d'un déterminisme génétique à l'origine des altérations structurales du système cardiovasculaire. Nous nous sommes donc intéressés à l'influence possible du gène *CYP11B2* codant pour l'aldostérone-synthase dans le déterminisme du remodelage cardiovasculaire chez des patients hypertendus hospitalisés. Nous avons choisi d'étudier le polymorphisme -344C/T de *CYP11B2*, pour lequel il existe des résultats discordants dans la littérature.

B SUJETS ET METHODES

Les indices de remodelage cardiovasculaire choisis ont été l'index de masse venticulaire gauche (IMVG), mesuré par échocardiographie pour l'étude du retentissement cardiaque, et la vitesse de l'onde de pouls (VOP), comme index de la rigidité artérielle. Parmi les patients hospitalisés pour bilan d'HTA, nous n'avons inclus que ceux présentant des données échocardiographiques suffisamment robustes pour être exploitées et ayant fourni un consentement éclairé (n=93). Pour chaque patient, nous disposions également d'un enregistrement des 24 heures de la pression artérielle systolique (PAS) et diastolique (PAD). L'aldostérone plasmatique a été mesurée, en position couchée après une nuit d'alitement, puis

debout après une heure d'orthostatisme. Le génotypage des patients a été réalisé par amplification PCR suivie d'une digestion par l'enzyme de restriction *HaeIII*.

C RESULTATS

Nous n'avons mis en évidence aucune association entre les indices étudiés et le polymorphisme -344C/T de *CYP11B2*. Par contre, de façon intéressante, nos résultats montrent que la présence de l'allèle C ou la présence de l'allèle T influence les déterminants de l'IMVG. En effet, chez les porteurs de l'allèle C, l'IMVG est significativement corrélé à la PAS, alors qu'il est significativement corrélé à l'aldostérone plasmatique chez les porteurs de l'allèle T. Chez les hétérozygotes CT, il existe une corrélation significative à la fois entre IMVG et PAS et entre IMVG et aldostérone plasmatique. La VOP n'est pas associée au polymorphisme -344C/T. Elle est corrélée à la PAS, et non à l'aldostérone plasmatique, quel que soit le génotype considéré.

D CONCLUSIONS

Nos résultats ne mettent pas en évidence d'association entre le polymorphisme -344C/T et l'IMVG ou la VOP. Par contre, les déterminants de l'HVG pourraient être différents selon que les patients sont porteurs de l'allèle C ou de l'allèle T. Ces résultats peuvent suggérer un rôle autocrine ou paracrine, allèle-dépendant, du SRAA cardiaque.
Si ce résultat est retrouvé sur un échantillon plus grand de patients, et dans des populations indépendantes, le polymorphisme -344C/T pourrait permettre d'orienter le choix du traitement de l'HVG chez des patients hypertendus.

III HYPERALDOSTERONISME SENSIBLE A LA DEXAMETHASONE DANS UNE POPULATION D'HYPERTENDUS HOSPITALISES

Une partie de ce travail a donné lieu à :

- **une communication orale**

Hyperaldostéronisme Sensible à la Dexaméthasone dans une population d'Hypertendus Hospitalisés. Etude d'un cas index.

S. Gardier, P. Lantelme, H. Milon, M. Vincent

XXI^{es} Journées de l'Hypertension Artérielle. Paris-Décembre 2001

- **un poster**

Familial Hyperaldosteronism Type 1 in Hospitalized Hypertensive Patients

S. Gardier, P.Lantelme, H.Milon, M. Vincent

Joint Meeting. 19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension - 12th European Meeting on Hypertension. Prague-Juin 2002

Article en préparation.

A BUTS DE L'ETUDE

L'hyperaldostéronisme sensible à la dexaméthasone (HSD), comme les autres formes d'HTA monogénique, ne concerne qu'un tout petit nombre de patients hypertendus mais constitue un modèle d'étude de l'HTA très informatif. Bien qu'il existe une grande variabilité phénotypique dans l'HSD, allant en particulier de l'HTA sévère à la normotension, un tableau biologique d'hyperaldostéronisme primaire est souvent retrouvé mais, dans ce cas il est très souvent associé à une HTA sévère et précoce et à une fréquence élevée de complications type accident vasculaire cérébral (AVC).

Les objectifs de notre étude étaient i) de déterminer la fréquence de l'HSD dans une population de patients hypertendus hospitalisés, ii) d'étudier les profils cliniques et biologiques des patients porteurs de la mutation, iii) de tenter de préciser les conditions d'un traitement spécifique, efficace.

B SUJETS ET METHODES

Le dépistage de la mutation responsable de l'HSD a été effectué chez 500 patients ayant fourni un consentement éclairé. La plus grande majorité d'entre eux étaient des patients hypertendus hospitalisés dans le service de Cardiologie de l'Hôpital de la Croix-Rousse.

La méthode PCR utilisée pour le diagnostic moléculaire a été décrite dans le Chapitre "Méthodes". Chez les patients porteurs du gène chimère, le diagnostic a été confirmé par méthode Southern (Pr X. Jeunemaître).

Tous les patients hospitalisés dans le service de Cardiologie de l'Hôpital de la Croix-Rousse ont eu le bilan standard effectué dans le service et décrit précédemment. Un bilan complémentaire consistant en un test aigu à la dexaméthasone (Dxm) a été réalisé chez les sujets porteurs de la mutation.

Test à la Dexaméthasone (Dxm)

Un protocole a été établi afin de recueillir dans des conditions standardisées des données cliniques et biologiques chez le patient identifié comme porteur de la mutation (cas index).

Le test à la Dxm réalisé afin de confirmer le caractère ACTH-dépendant de la sécrétion d'aldostérone chez ce patient, a été un test aigu se déroulant sur 5 jours. Il a comporté un bilan sanguin et urinaire pour recueil des données électrolytiques et hormonales, un cycle de 24 heures de l'aldostérone et du cortisol et l'enregistrement de 24 h de la pression artérielle (MAPA). Ces différents tests ont été réalisés avant l'administration de la Dxm puis à la fin du test. Les doses de Dxm étaient de 0.5 mg/6 h.

Un protocole comportant un test à la Dxm plus court (48 h, 0.5 mg/6 h) a été proposé à un apparenté du cas index.

C RESULTATS

Un seul patient a été identifié comme porteur du gène chimère CYP11B1/CYP11B2 parmi les 500 sujets testés.

Ce patient était un homme âgé de 39 ans, présentant une HTA sévère, malgré un important traitement anti-hypertenseur, une insuffisance rénale et une dyslipidémie. Il avait fait deux AVC dans les 10 dernières années. Il était d'origine caucasienne mais ne parlant pas français, il a été difficile d'obtenir des renseignements sur ses antécédents familiaux : présence probable chez sa mère d'une HTA gravidique qui est décédée avant l'âge de 60 ans de cause cardiovasculaire, un frère et une nièce probablement hypertendus sévères.

1 Bilan complémentaire du cas index [1]

Le patient présentait un tableau clinique et biologique d'hyperaldostéronisme primaire, avec une hypertension artérielle sévère *(Fig. 3)*, associée à une rénine active effondrée et une aldostérone plasmatique élevée. La natrémie était à 129 mmol/l et la kaliémie à 3,6 mmol/l (*Tableau 3*). Le système rénine-angiotensine aldostérone n'était ni stimulé par l'orthostatisme, ni freiné par la charge sodée (*Tableau 2*). Un scanner surrénalien a mis en évidence une légère hyperplasie droite et des prélèvements veineux surrénaliens sélectifs ont permis d'éliminer la présence d'un adénome.

a) Test à la Dxm

Les résultats des études hormonales sur 24 heures montrent, avant Dxm, que la sécrétion d'aldostérone présente un rythme nycthéméral proche de celui du cortisol (*Fig. 1*). Cette sécrétion n'est pas stimulée par l'orthostatisme, la concentration plasmatique en aldostérone diminuant même au cours de cette épreuve. Une régression linéaire simple montre que chez ce patient la concentration plasmatique d'aldostérone est significativement corrélée à la concentration plasmatique de cortisol. Ces résultats confirment que dans cette pathologie la sécrétion d'aldostérone n'est pas sensible à l'Ang II mais sous le contrôle de l'ACTH (*Fig. 2*).

Après Dxm, l'effondrement des concentrations plasmatiques en cortisol, en dessous du seuil de détection, atteste de l'efficacité du blocage de l'axe corticotrope par la Dxm. Dans ces conditions, l'aldostérone plasmatique diminue en dessous du seuil de 110 pmol/L et une réponse à l'orthostatisme est observée (Fig. 1). Dans le même temps, la concentration plasmatique de rénine active est augmentée et la kaliémie se normalise. Cependant, ni la natrémie ni le niveau tensionnel n'ont été modifiés par la Dxm (*Tableau 3, Fig. 3*).

[1] Les tableaux et figures mentionnés en italique dans ce paragraphe renvoient au poster affiché en juin 2002 au Joint Meeting ISH/ESH de Prague, inclus dans le manuscrit.

b) Stéroïdes urinaires 18-hydroxy et 18- oxo dérivés du cortisol

Alors que classiquement, il existe dans l'HSD une production importante de 18-oxocortisol (18-oxoF) et 18-hydroxycortisol (18-OHF), dérivés non-physiologiques du cortisol, le dosage de ces stéroïdes urinaires met en évidence chez le patient des niveaux de 18-oxoF et 18-OHF, respectivement normaux ou légèrement élevés (Tableau 7). De même, l'aldostérone urinaire n'est pas très élevée. Tous ces stéroïdes sont néanmoins nettement diminués par l'administration de Dxm.

	Valeurs normales (µg/24h)	Conditions Basales (µg/24h)	Après Dxm (µg/24h)
Aldostérone	12.8 ± 6.0	7.5	4.4
Cortisol	34.1 ± 11.4	17.5	✕
18-oxoF	16.7 ± 4.5	19.4	8.7
18-OHF	58.7 ± 42.4	140	18.5

Tableau 7 . Dosages des stéroïdes urinaires du cas index, en conditions basales et après un test aigu à la Dxm (0.5 mg/6h - 5 j) . Les valeurs normales sont exprimées en moyenne ± DS.

.

2 Dépistage et étude des apparentés

Parmi les trois enfants du patient, âgés de 10 à 19 ans, deux sont porteurs du gène chimère CYP11B1/CYP11B2. Tous les deux étaient sous traitement anti-hypertenseur depuis plusieurs années. L'aîné avait une hypertension bien contrôlée par son traitement, alors que son jeune frère présentait encore des chiffres de pression élevés. Un bilan complémentaire n'a pu être réalisé que chez le plus jeune de ces deux garçons.

Cet enfant, âgé de 10 ans au moment du diagnostic, présentait une hémiplégie gauche consécutive à un AVC survenu à l'âge de 8 ans. Lors de son hospitalisation pour bilan complémentaire, ses chiffres de pression artérielle, étaient élevés malgré une plurithérapie (Tableau 8). D'un point de vue biologique, le patient présentait une natrémie élevée, une

kaliémie basse, associée à une aldostérone plasmatique très élevée et une rénine active effondrée (Tableau 8).

Après deux jours d'administration de Dxm (J4), la natrémie a diminué, le potassium augmenté et l'aldostérone plasmatique s'est normalisée. Cependant, les chiffres de pression artérielle, au cours du test aigu à la Dxm, ne montrent aucune amélioration, indiquant même une augmentation sous Dxm (Tableau 8).

Le patient, à qui une dose de 2 mg de Dxm par jour a été prescrite en plus de son traitement anti-hypertenseur habituel, a montré une nette amélioration des chiffres tensionnels très rapidement, se stabilisant à 110/70 mmHg deux semaines seulement après le bilan complémentaire. La dose journalière de Dxm a donc été ramenée à 0,5 mg.

		J0	J1	J2	J3	J4
MAPA						
PAS/PAD 24 heures			155/97			171/112
PAS/PAD 6h-22h			159/103			171/114
PAS/PAD 22h-6h			146/82			171/106
Dinamap						
PAS/PAD Dinamap		145/82	135/70		150/88	
Dosages plasmatiques						
Sodium mmol/L		143	143	147	137	
Potassium mmol/L		3.3	3.3	4.0	3.9	
Créatinine (µmol/L)		50	54	44	53	
Aldostérone pmol/L	Couché		1080	89		63
	Debout		965	97		51
Rénine Active	Couché		<1	<1		1.0
	Debout		<1	<1		1.5
Cortisol (nmol /L)	Couché		395	<43		<43
	Debout		361	<43		<43

Table 8. Données cliniques et biologiques obtenues chez l'enfant porteur de la mutation responsable du HSD. Les pressions artérielles systoliques (PAS) et diastoliques (PAD) sont exprimées en mmHg. Les valeurs de MAPA correspondent à la moyenne des valeurs enregistrées durant la période indiquée. Pour le Dinamap il s'agit de la moyenne des 6 dernières mesures obtenues durant une heure d'enregistrement. J0 correspond au premier jour d'hospitalisation et J4 au jour de sortie du patient. Le test aigu à la dexaméthasone (Dxm) a débuté à J2, la première prise de 0.5 mg ayant eu lieu à 0h00 et la dernière prise de Dxm à 12h00 à J4.

D CONCLUSION

Cette étude a permis de confirmer la fréquence très faible de l'HSD, même dans une population de patients hypertendus hospitalisés, le plus souvent sévères. Parmi les trois patients apparentés, identifiés comme porteurs du gène chimère CYP11B1/CYP11B2, deux présentaient des tableaux cliniques et biologiques classiquement décrits dans cette pathologie, évoquant un hyperaldostéronisme primaire associé à une hypertension précoce et particulièrement sévère, et à la survenue d'AVC. Seule la sécrétion urinaire des dérivés 18-oxo et 18-hydroxy du cortisol, marqueurs assez sensibles de l'HSD, semble atypique chez le cas index.

La Dxm, utilisée en test aigu pour confirmer le caractère ACTH-dépendant de la sécrétion d'aldostérone, a permis une amélioration rapide des paramètres hormonaux et électrolytiques chez les deux patients, alors qu'aucune amélioration du niveau tensionnel n'était observée.

L'administration chronique de Dxm au cas index n'a eu que peu ou pas d'effet sur la PA. Par contre, chez l'enfant, une dose de 2 mg/j, puis 0,5 mg/j, de Dxm associée à son traitement anti-hypertenseur habituel a permis la normalisation de la PAS et de la PAD.

Les différences de réponse à un traitement chronique à la Dxm, entre ces deux patients, sont au moins en partie imputables à la différence de durée de la maladie et du moindre retentissement cardiovasculaire chez l'enfant par rapport à son père. Cette étude confirme donc l'efficacité thérapeutique de la Dxm dans le traitement de l'HSD, même chez un patient dont les caractéristiques cliniques sont sévères. Ce traitement apparaît d'autant plus efficace qu'il est administré tôt dans le décours de la maladie. Ceci souligne l'importance de faire un dépistage précoce des patients porteurs du gène chimère pour instituer un traitement le plus rapidement possible.

PARTIE 4 : Discussion Perspectives Conclusions

I DISCUSSION

Afin d'évaluer le rôle du SRAA dans le déterminisme de l'HTA, et de son retentissement cardiovasculaire, deux approches ont été utilisées au cours de ce travail :
- l'étude d'une des formes d'HTA monogénique, l'hyperaldostéronisme sensible à la dexaméthasone
- l'étude de deux des gènes du SRAA, le gène codant pour le récepteur AT1 de l'Ang II et le gène codant pour l'aldostérone-synthase dans leurs relations avec la pression artérielle et le retentissement cardiovasculaire de l'HTA sur deux des principaux organes cibles, le cœur et les vaisseaux.

A HYPERALDOSTERONISME SENSIBLE A LA DEXAMETHASONE (HSD)

Bien que le tableau clinique et biologique de l'HSD et son caractère familial aient été décrits dès 1966 (Sutherland 1966), la découverte de la mutation responsable de cette forme d'HTA a fait de cette pathologie la première forme d'HTA monogénique décrite sur le plan moléculaire (*Lifton et al, 1992a* ; *Lifton et al, 1992b*). Plusieurs équipes sur différents continents s'intéressent à cette forme d'HTA mais le nombre de patients porteurs de la mutation reste assez faible, bien que tous les cas ne soient pas rapportés dans la littérature. A cette faible fréquence de la maladie, s'ajoute le manque de critères permettant d'orienter les patients vers un dépistage moléculaire. En effet, si le HSD est longtemps resté associé à un tableau clinique et biologique d'HAP, tel que Sutherland l'avait décrit, plusieurs études ont bien montré la diversité phénotypique de la maladie (*Gordon, 1995 ; Dluhy et al, 1995 ; Gates et al, 1996 ; Fallo et al, 2004*). Cette hétérogénéité phénotypique, probablement liée aux conditions environnementales et au background génétique dans lesquels s'exprime cette mutation, nous oblige à des efforts de description phénotypique des porteurs de la mutation et de leurs apparentés.

Dans notre travail, où près de 500 patients ont été testés, nous n'avons identifié qu'un seul patient porteur de la mutation. Mulatero et Fardella, qui ont travaillé sur des populations de patients hypertendus ont trouvé, respectivement, zéro porteur de la mutation sur 117

patients et deux porteurs de la mutation sur 205 patients, confirmant ainsi une très faible fréquence de la maladie (*Mulatero et al, 1998b ; Fardella et al, 2000*). Mulatero avait restreint sa population d'étude à des patients porteurs d'hyperaldostéronisme primaire (HAP) et Fardella à des patients présentant une hypertension essentielle. Dans une étude plus récente, Gates et coll. ont comparé les résultats obtenus lors d'un screening aléatoire de patients hypertendus hospitalisés, ou lors d'un recrutement sélectif de patients avec HAP (*Gates et al, 2001*). Ils n'ont trouvé aucun patient porteur de la mutation dans le premier cas, et deux avec le recrutement sélectif. Ces résultats, « en miroir » de ceux de Mulatero et Fardella montrent à quel point il est difficile de choisir une méthode de recrutement pour tenter d'augmenter la fréquence d'identification des patients porteurs de la mutation. Nous avions dans notre cas, fait le choix d'étudier des patients inclus consécutivement dans le service de Cardiologie (Hôpital de la Croix-Rousse).

Une étude plus approfondie a été conduite sur cette population "croix-roussienne" puisque nous possédions pour ces patients un bilan bien standardisé. Nous avons cherché si des caractéristiques cliniques et biologiques du patient atteint pouvaient être communes avec celles d'un ou de plusieurs sous-groupes de notre population, ce qui nous aurait permis de faire émerger, si ce n'est des critères, du moins des indices, pouvant faciliter l'orientation des patients vers un dépistage. Le niveau tensionnel, particulièrement élevé dans notre population d'hypertendus, n'a pas été un facteur discriminant. Concernant les paramètres biologiques, le patient cas index présentait un tableau classique d'HAP, sans adénome. La proportion de patients pour lesquels il existe une suspicion d'HAP dans notre population étant assez importante, ce caractère ne nous a pas paru particulièrement informatif. Une des caractéristiques importantes de notre cas index est la survenue de deux AVC, dont le premier aux alentours de 30 ans. Litchfield (1998), en étudiant les familles inscrites dans l'*International Registry for Glucocorticoid-remediable Aldosteronism*, a montré que des AVC s'étaient produits dans 48 % de ces familles, 70 % des cas étant des accidents hémorragiques et 61% ayant eu une issue fatale. Outre la fréquence élevée, l'autre fait marquant est l'âge du premier AVC chez ces patients (31,7 ± 11,3 ans), ce qui était également le cas pour notre patient. Il semble donc que les AVC soient particulièrement fréquents, précoces et surtout létaux chez les patients porteurs du gène chimère CYP11B1/CYP11B2. L'AVC survenu chez le fils de notre cas index à l'âge de huit ans, confirme très nettement ces observations. Par ailleurs, parmi notre sous-groupe de patients ayant eu un AVC avant l'âge de 60 ans, le cas index était celui chez qui le niveau tensionnel

était le plus élevé, et la survenue de l'AVC la plus précoce. Mais plus qu'un outil de diagnostic, ces résultats doivent attirer l'attention sur la nécessité de pratiquer une surveillance accrue chez les patients porteurs de la mutation.

Plusieurs études ont mis en évidence la diversité phénotypique de l'HSD. Le patient que nous avons identifié comme porteur de la mutation, de même que son fils, présentaient des caractéristiques cliniques et biologiques, correspondant bien à celles initialement décrites, particulièrement le caractère ACTH-dépendant de la sécrétion d'aldostérone. Par contre, la sécrétion de dérivés « hybrides » 18 oxo- et 18 hydroxy- du cortisol, bien moins marquée chez notre cas index, que ce à quoi nous pouvions nous attendre, constitue le seul élément atypique dans son bilan. Ces stéroïdes, qui seraient peut-être sécrétés en quantité très faible dans des conditions physiologiques, ont été mis en évidence dans certains cas d'hyperaldostéronisme primaire et mais surtout sont nettement augmentés chez les porteurs du gène chimère (*Chu et al, 1982 ; Ulick et al, 1982 ; Freel et al, 2004*). Le dosage urinaire de ces stéroïdes a même été utilisé comme test pour dépister les patients atteints d'HSD avant la découverte de la mutation et la mise au point d'un test moléculaire. Dans la plupart des cas décrits, l'augmentation la plus flagrante concerne le 18 oxo-cortisol qui peut être augmenté entre 10 à 40 fois, voire même plus, chez les patients atteints par rapport à des patients contrôles (*Stowasser et al, 1995*; *Jeunemaitre et al, 1995 ; Stowasser et al, 2000; Mulatero et al, 2002*). Dans notre étude, les concentrations de 18 oxo-cortisol sont dans la fourchette des valeurs normales, et le 18-hydroxycortisol est légèrement au-dessus de la limite supérieure des valeurs normales. Il serait cependant très intéressant d'obtenir les dosages de ces stéroïdes pour les autres membres de la famille, porteurs et non-porteurs de la mutation, ce qui nous permettrait notamment de comparer leurs valeurs, mais aussi le rapport 18-oxocortisol/cortisol.

Au total, notre étude confirme la faible fréquence de l'HSD, dans une population d'hypertendus sévères, ainsi que la possibilité d'un retentissement cardiovasculaire très sévère chez les patients porteurs du gène chimère CYP11B1/B2. Les bons résultats obtenus en terme de diminution des chiffres tensionnels chez le plus jeune patient, montre que l'efficacité de la Dxm est liée à la précocité de la mise en place du traitement et souligne la nécessité d'un dépistage des patients porteurs du gène chimère le plus tôt possible.

B APPORT DES ETUDES D'ASSOCIATION

1 SRAA, pression artérielle et HTA

De nombreuses études se sont intéressées aux associations des polymorphismes $A^{1166}C$ de *AGTR1* et –344C/T de *CYP11B2* mais elles ont abouti à des résultats discordants, ne permettant pas de conclure à un rôle de ces variants dans le déterminisme du niveau tensionnel, dans des populations témoins et/ou chez des patients hypertendus.

Dans notre population d'étude, où plus de la moitié des patients présentaient une HTA sévère (grade 3 défini selon les normes ESH/ESC), nous n'avons pas pu mettre en évidence d'association entre les polymorphismes étudiés et le niveau tensionnel obtenu par méthode conventionnelle. La variabilité de la pression artérielle pouvant masquer une différence, nous avons également utilisé des mesures ambulatoires de la pression artérielle réalisées sur 24 heures. Quelle que soit la période d'enregistrement considérée (diurne, nocturne, 24 h) aucune différence significative de pression artérielle n'a été observée en fonction des génotypes des patients, pour aucun des deux gènes étudiés.

Nous avons également stratifié notre population selon le grade d'HTA (< grade 3 vs grade 3), mais nous n'avons pu montrer aucune association significative entre les polymorphismes étudiés et la sévérité de l'HTA ainsi définie.

Ces résultats, concordants avec la plupart de ceux précédemment publiés, amènent à conclure que le rôle des polymorphismes $A^{1166}C$ de *AGTR1* et –344C/T de *CYP11B2* dans le déterminisme du niveau de pression artérielle est faible et/ou difficile à mettre en évidence, une des principales raisons étant liée au caractère complexe et plurifactoriel de la pression artérielle. Comme cela a été montré lors d'études génétiques utilisant des modèles animaux, les phénotypes intermédiaires s'avèrent être des phénotypes beaucoup plus informatifs que la pression artérielle elle-même (*Dubay et al, 1993*).

2 SRAA et rigidité artérielle

L'Ang II et l'aldostérone, par leurs actions sur la croissance et la prolifération cellulaires, ainsi que sur la matrice extra-cellulaire, ont des effets structuraux et fonctionnels sur la paroi artérielle.

Cependant, comparativement au nombre important et croissant des études d'association publiées ces dernières années, peu se sont intéressées aux relations existant entre d'une part les gènes *AGTR1* et *CYP11B2*, et d'autre part les modifications structurales de la paroi artérielle, et la VOP en particulier.

L'allèle C du polymorphisme du gène *CYP11B2* avait initialement été associé à une augmentation de la VOP, mais ce résultat n'a pas été confirmé, par la même équipe, dans une plus large population, (*Lajemi et al, 2001 ; Pojogaet al, 1998*). Dans notre travail, nous avons testé la relation VOP/–344C/T *CYP11B2*, sans pouvoir mettre en évidence d'association significative. Quelques études ont également été publiées, dans lesquelles la variable utilisée était la mesure de l'épaisseur intima-média. Les résultats n'ont pas montré d'association de cette variable avec –344 C/T *CYP11B2* (*Girerd et al, 1998 ; Balkestein et al, 2002*). Ces résultats ne permettent donc pas de penser que le polymorphisme –344 C/T puisse être un déterminant de la rigidité artérielle.

Les seules études publiées concernant le polymorphisme $A^{1166}C$ *AGTR1* et utilisant la VOP comme index de rigidité artérielle, émanent de l'équipe de A. Benetos, qui a mis en évidence une association significative avec le polymorphisme $A^{1166}C$ de *AGTR1* chez des patients hypertendus, mais pas chez des témoins normotendus (*Benetos et al, 1995* ; *Benetos et al, 1996b* ; *Benetos et al, 1996a* ; *Lajemi et al, 2001*). Comme cette équipe nous mettons en évidence une association entre ce polymorphisme et la VOP. Le pourcentage de variance de la VOP expliquée par ce polymorphisme est semblable dans la population de A. Benetos et dans la nôtre (*Lajemi et al, 2001*), ce qui tend à confirmer l'implication du locus étudié dans le déterminisme de la VOP.

Par contre, dans notre étude, nous avons montré que l'allèle A est associé à une augmentation de la VOP alors que c'est l'allèle C qui est associé à une augmentation de la rigidité artérielle dans leur travail. Si nous avons travaillé sur une population où le nombre de patients traités était important, cela n'explique pas la discordance de ces résultats (voir Discussion dans *J Hypertens* 2004, 22 : 2135-2142). En effet, nous observons sur le groupe de patients non-traités de notre population la même tendance, significative, que dans le

groupe total. De plus, une régression multiple prenant en compte des facteurs confondants, dont le statut traité/non-traité des patients, montre que le polymorphisme $A^{1166}C$ est un facteur prédictif et indépendant de la VOP.

Enfin, il est intéressant de noter, que récemment le groupe de J. Diez a publié une étude dans laquelle l'allèle A du polymorphisme $A^{1166}C$ est associé aux processus de fibrose myocardique (*Diez et al, 2003*). Ce groupe montre en effet qu'il existe, chez les porteurs de l'allèle A, un déséquilibre entre synthèse et dégradation du collagène et que cet allèle est lié à l'augmentation de synthèse du collagène de type I. L'Ang II agissant aussi sur le collagène au niveau vasculaire, un mécanisme similaire à celui décrit par Diez et coll. dans le cœur, pourrait être invoqué pour expliquer nos résultats, une fibrose vasculaire induite par l'Ang II pouvant être plus importante chez les porteurs d'allèle A que chez les porteurs d'allèle C. Ceci pourrait être dû à une différence de sensibilité des cellules cibles à l'Ang II en fonction du génotype, comme l'ont suggérée plusieurs études portant sur la réponse vasoconstrictrice (*Amant et al, 1997 ; Miller et al, 1999 ;* v*an Geel et al, 2000*). Cette différence de réponse à l'Ang II pourrait être expliquée par un accroissement du nombre de récepteurs AT1, un renforcement des signaux cellulaires impliqué dans la fibrose, notamment une augmentation du TGFβ, et/ou une augmentation du stress oxydatif diminuant la disponibilité en NO endogène.

N'ayant pas de moyen pour évaluer la sensibilité des cellules vasculaires à l'Ang II, nous avons utilisé dans notre étude les variations de l'aldostéronémie en réponse à la stimulation orthostatique comme index indirect de sensibilité à l'Ang II. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les trois génotypes. Néanmoins, la sensibilité à l'Ang II étant tissu-spécifique, on ne peut pas exclure une différence au niveau vasculaire. Enfin, il est possible que la relation génotype-phénotype soit en partie expliquée par des effets du SRAA vasculaire, dont l'activité n'est pas reflétée par l'activité de SRAA plasmatique.

3 SRAA et structure cardiaque

Les résultats obtenus lors d'études cliniques concernant des substances inhibitrices du SRAA, IEC ou plus récemment ARA, ont particulièrement attiré l'attention sur l'impact du SRAA dans la pathologie myocardique. Des nombreuses études se sont alors intéressées aux effets que pouvaient avoir l'Ang II et l'aldostérone sur le cœur, mettant en évidence

d'importantes actions de ces deux hormones sur le tissu cardiaque. Les gènes codant pour le récepteur AT1 et pour l'aldostérone synthase sont donc apparus comme des gènes candidats.

Les résultats de Takami et coll., qui montraient une association entre l'allèle C du polymorphisme $A^{1166}C$ de AGTR1, et une augmentation de la masse ventriculaire gauche (MVG), n'ont pas été confirmés par des études ultérieures (*Castellano et al, 1996 ; Takami et al, 1998*). Plus récemment, l'allèle C a également été mis en cause dans l'augmentation de la MVG mais ce résultat semble s'expliquer par une grande différence d'âge entre les différents génotypes (*Pontremoli et al, 2000*). Dans notre population d'étude, nous n'avons pas pu montrer d'association entre le polymorphisme et les mesures échocardio-graphiques réalisées. L'ensemble de ces résultats plaide en faveur de l'absence de rôle du polymorphisme $A^{1166}C$ de *AGTR1* dans les processus hypertrophiques au niveau du cœur. Néanmoins, il a récemment été montré que l'allèle A serait impliqué dans la rigidité du myocarde, et dans l'augmentation de la synthèse de collagène myocardique, suggérant un rôle pour ce polymorphisme dans la fibrose cardiaque (*Diez et al, 2003*). Il semble donc que des études complémentaires soient nécessaires pour clarifier le rôle de *AGTR1* dans le remodelage cardiaque.

L'étude du polymorphisme –344 C/T de *CYP11B2*, a également conduit à des résultats contradictoires. Une association forte entre le polymorphisme et la MVG a été mise en évidence, puis confirmée dans une population finlandaise (*Kupari et al, 1998* ; *White et al, 1999*). Cependant, cette relation n'est pas retrouvée chez des populations de l'Europe de l'Ouest (*Schunkert et al, 1999 ; Hengstenberg et al, 2000*). Il est à noter que l'étude finlandaise porte uniquement sur des hommes, jeunes et asymptomatiques, alors que l'étude conduite par Schunkert et coll. porte sur un échantillon de la cohorte Monica et que les résultats de cette dernière étude ont été confirmés, même après exclusion des patients hypertendus et/ou diabétiques. Plus récemment, il a été montré que concernant le polymorphisme –344 C/T et les paramètres de structure cardiaque, la relation pouvait être modulée par l'âge des patients, et donc par les modifications âge-dépendantes au niveau des organes-cibles (*Sarzani et al, 2003*). Ceci pourrait expliquer la discordance des résultats publiés, et le manque d'association existant dans notre étude entre le polymorphisme et la structure cardiaque.

Si nous n'avons pas pu montrer un effet du polymorphisme –344 C/T sur les paramètres structuraux, notre travail montre que ce polymorphisme pourrait moduler le

déterminisme de l'index de MVG. La pression artérielle systolique des 24 heures (PAS) est connue pour être un déterminant majeur de la MVG, et plusieurs études ont montré une corrélation entre ce paramètre et la concentration de l'aldostérone plasmatique. Nous nous sommes donc intéressés aux relations entre la MVG et ces 2 facteurs en fonction du génotype. Nous avons montré que le déterminant principal de la MVG n'est pas le même : les homozygotes CC sont sensibles à l'augmentation de PAS, les homozygotes TT à l'augmentation de l'aldostérone plasmatique, et les hétérozygotes CT présentent un phénotype intermédiaire, avec une sensibilité à la fois à la PAS et à l'aldostérone. Si ces résultats étaient confirmés dans une population indépendante, ils pourraient constituer un outil d'orientation thérapeutique particulièrement intéressant puisque ces résultats suggèrent que l'HVG pourrait régresser chez des patients hypertendus, homozygotes TT, avec l'utilisation d'anti-aldostérone. Il serait ainsi particulièrement intéressant d'étudier la réponse en terme de MVG, chez des patients hypertendus, en fonction du polymorphisme –344 C/T.

4 Limites de notre travail et des études d'association

Les limites de notre travail sont pour beaucoup celles des études d'association. Ce type d'étude constitue un outil puissant pour explorer les bases moléculaires d'un trait complexe tel que la pathologie hypertensive, et elles ont d'ores et déjà permis de faire émerger des mécanismes pathogénétiques liés à l'HTA. Cependant les très nombreux résultats contradictoires observés dans la littérature concernant les études génotype-phénotype, ont amené à considérer les limites de cette méthodologie et à établir des « guidelines » (*Little et al, 2002 ; Tabor et al, 2002 ; Huizinga et al, 2004*). Il en ressort notamment que quelques paramètres méritent une attention toute particulière :

- *Population*

Les études génétiques sont très sensibles au choix de la population étudiée et notamment à l'origine ethnique des sujets. En effet, plusieurs polymorphismes ont des fréquences alléliques différentes chez les Caucasiens, les Africains ou les Asiatiques (*Staessen et al, 1997*). Il a même été montré qu'à l'intérieur d'un même pays les fréquences pouvaient être différentes entres les régions du nord et du sud de l'Italie (*Castellano et al, 2003*). Ces différences ethniques peuvent d'ailleurs amener à considérer avec prudence toute comparaison de résultats avec d'autres obtenus dans des groupes ethniques différents.

La population étudiée dans ce travail correspond à un échantillon représentatif d'une population caucasienne en ce qui concerne la distribution des fréquences allélique et génotypique. En effet, quel que soit le polymorphisme étudié, les fréquences observées ne divergeaient pas de celles attendues par l'équilibre de Hardy-Weinberg. Par ailleurs, l'auto-questionnaire rempli par les patients au cours de leur bilan, nous a permis de vérifier directement leur l'origine ethnique, plus informative que la seule nationalité.

- *Phénotypes*

Pour qu'une étude d'association apporte des éléments informatifs de qualité il faut veiller à choisir le gène candidat et le polymorphisme avec soin. Mais le choix du phénotype étudié est tout autant, si ce n'est plus important.

Les premières études d'association se sont intéressées à la relation entre un gène candidat et le niveau de pression artérielle et/ou l'HTA. S'il s'avère que la pression artérielle est un phénotype incontournable lorsqu'on s'intéresse à l'HTA, elle est néanmoins une variable beaucoup trop intégrative pour être un bon phénotype d'étude. En effet, le niveau de pression est la résultante des complexes interactions entre des facteurs génétiques, des facteurs environnementaux et des caractéristiques intrinsèques au sujet (âge, sexe, ethnie…). Pour qu'une association soit la plus informative possible et qu'elle permette de progresser dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathophysiologie hypertensive, il faut que le phénotype étudié soit le plus « près » possible du gène étudié (Figure 32). Dans l'idéal, il faudrait aussi pouvoir travailler sur des phénotypes qui ne soient déterminés que par un seul gène. Cela paraît malheureusement difficile ! Il est cependant possible d'améliorer la pertinence des études en choisissant des phénotypes dits intermédiaires, moins complexes que le trait initial (Figure 32).

Alors que l'HTA concerne l'organisme entier, le phénotype intermédiaire se situe au niveau tissulaire, cellulaire, sub-cellulaire ou biochimique. Dans notre travail, nous avons choisi des index de retentissement cardiovasculaire (IMVG et VOP) correspondant à des phénotypes intermédiaires dont l'expression se situe au niveau du tissu cardiaque et artériel. Ces variables sont cependant encore très complexes, et il ne s'agit que d'une première étape. Afin de progresser dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'HVG et la rigidité artérielle, il serait intéressant de pouvoir accéder, chez l'Homme, à des phénotypes biochimiques qui, dans le cadre du travail présenté dans cette thèse, reflètent l'activité du

SRAA au niveau tissulaire. Dans un article associé à ce travail, P. Lantelme montre pour la première fois chez l'Homme l'intérêt de la détermination de l'angiotensinogène urinaire dans la stratification de la population hypertendue (*Lantelme et al, 2005*). L'angiotensinogène urinaire pourrait donc être un marqueur de l'activité du SRA intra-rénal, ce qui fait de cette variable un phénotype intermédiaire intéressant.

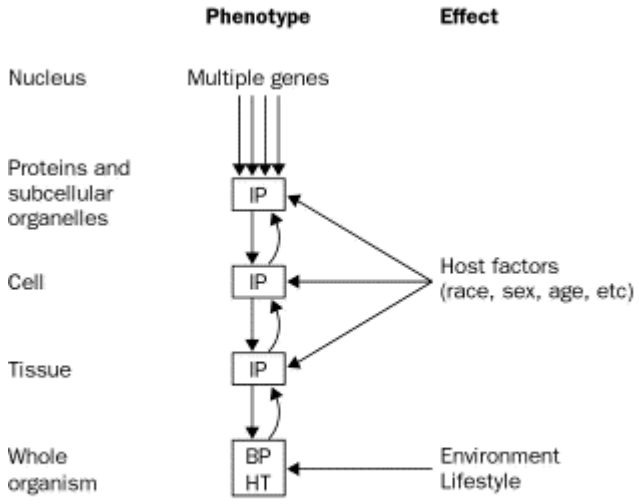

Figure 31. Représentation schématique du niveau de pression artérielle (BP) et de l'hypertension artérielle (HT) comme des traits complexes multigéniques et influencés par des facteurs environnementaux et propres à l'individu. IP : intermediate phenotype. Les flèches courbes représentent les feed-back. D'après (*Staessen et al, 2003*)

Dans l'étude de l'HTA, un point important à prendre en compte est le caractère âge-dépendant de la maladie et de certains des phénotypes qui lui sont associés. En effet, l'âge joue un rôle majeur notamment sur la sensibilité au sel, sur la sensibilité du baroréflexe, la perfusion rénale, et bien évidemment sur le niveau de pression lui-même. Etant donné les interactions complexes et les feed-back existant entre tous ces paramètres, il est envisageable qu'une relation génotype-phénotype puisse être affectée par l'âge. Cela a d'ailleurs été montré dans des études récentes chez l'Homme (*Hanon et al, 2001* ; *Russo et al, 2002 ; Safar et al, 2004 ; Rudnichi et al, 2004*) et chez le Rat (*Samani et al, 1996*). Dans ce travail, nous avons étudié des patients pour la grande majorité issus d'une même tranche d'âge, ce qui implique d'une certaine manière que les résultats obtenus soient représentatifs de ce qui se passe chez des patients hypertendus, «âgés en moyenne de 53 ans » ! Mais la question est

qu'en était-il ou qu'en serait-il des associations trouvées, chez ces mêmes patients il y 20 ans ou dans 10 ans ? Il paraît donc intéressant d'envisager à l'avenir en plus des études transversales des études d'association longitudinales.

Enfin rappelons, que quel que soit le phénotype étudié, un des biais le plus important peut venir du manque de standardisation dans le recueil des données. Dans notre étude, nous avons pu travailler sur des données recueillies dans le cadre d'un bilan standardisé, mis en place depuis plusieurs années et appliqué par un personnel compétent et particulièrement sensibilisé à la nécessité d'une grande rigueur.

- *Puissance statistique*

Les résultats négatifs obtenus dans notre travail concernant la pression artérielle et l'IMVG amènent à discuter un manque de puissance de nos études. Dans l'idéal, il faut avant de commencer ce type d'étude, prévoir le nombre de sujets nécessaires, notamment en fonction de la fréquence allélique attendue dans la population étudiée, pour permettre d'avoir une puissance suffisante. Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés *a posteriori*, ce qui exclut de faire un test de puissance. Cependant, il est possible de calculer la différence minimum que nous pouvions détecter entre les différents génotypes.

Dans notre travail concernant le polymorphisme A1166C du gène *AGTR1*, si l'on considère un risque alpha de 5 %, et une puissance de 80 %, il était possible de trouver une signification statistique pour une différence de 7 mmHg entre les homozygotes AA et les porteurs d'allèle C. La différence observée étant d'environ 3 mmHg, il est possible que notre résultat soit dû à un manque de puissance de l'étude. Dans les mêmes conditions (α=0,05, 1-β= 0,8), nos effectifs nous permettaient de mettre en évidence une différence d'IMVG de 28 g/m^2 entre les homozygotes TT et les porteurs d'allèle C. La différence observée étant d'environ 27 g/m^2, nous pouvons nous poser la question de savoir si notre résultat est vraiment dû à un manque de puissance ou s'il reflète effectivement une absence d'association.

II PERSPECTIVES - CONCLUSIONS

Les polymorphismes des gènes du SRAA que nous avons étudiés ne sont pas connus pour être fonctionnels. Ils pourraient cependant être des marqueurs d'autres mutations, situées à proximité, éventuellement causales, et pouvant affecter les composants tissulaires du SRAA. L'activité de ces systèmes locaux de synthèse de l'Ang II et de l'aldostérone n'est malheureusement pas reflétée par les concentrations circulantes de ces hormones. Il apparaît pourtant tout à fait probable que la mise en jeu de ces systèmes puisse participer aux associations génotype-phénotype que nous avons mises en évidence. S'il est difficile d'envisager de pouvoir estimer l'activité des SRAA cardiaque et vasculaire chez l'Homme, l'étude de modèles animaux pourrait s'avérer très utile.

D'autre part, il est important pour les travaux à venir d'envisager plusieurs points méthodologiques:

- étudier au sein d'un même gène, non pas un mais plusieurs sites polymorphes. En effet, l'étude de plusieurs locus d'un même gène, augmente les chances de mettre en évidence une relation entre le gène entier et le trait étudié (*Jeunemaitre, 2003*),
- s'orienter vers l'étude des interactions existant entre plusieurs gènes candidats. En effet, comme nous l'avons souligné, un phénotype n'est jamais dû à un gène mais résulte d'interactions complexes entre différents locus. Plusieurs études ont d'ores et déjà mis en évidence ce type de synergie, entre les gènes du SRAA (*Siani et al, 2004*) (*Balkestein et al, 2002*) (*Staessen et al, 2003*) (*Anvari et al, 1999*),
- augmenter la taille de la population étudiée ; ce projet étant en cours de réflexion au sein de notre groupe de recherche.

Bien que présentant des points faibles, notre travail a permis de confirmer l'implication du SRAA dans le déterminisme du retentissement cardiovasculaire de l'HTA, chez l'Homme. Nos résultats font en outre émerger un intérêt pharmacogénétique du polymorphisme –344 C/T dans le traitement de l'hypertrophie ventriculaire gauche chez l'hypertendu. Comme pour toute étude de ce type, nos résultats devront être confirmés, dans d'autres populations indépendantes.

Références Bibliographiques

Aguilera G. Factors controlling steroid biosynthesis in the zona glomerulosa of the adrenal. J Steroid Biochem Mol Biol 1993; 45: 147-151.

Ahmad N, Romero DG, Gomez-Sanchez EP, and Gomez-Sanchez CE. Do human vascular endothelial cells produce aldosterone? Endocrinology 2004; 145: 3626-3629.

Albiston AL, Mustafa T, McDowall SG, Mendelsohn FA et al. AT4 receptor is insulin-regulated membrane aminopeptidase: potential mechanisms of memory enhancement. Trends Endocrinol Metab 2003; 14: 72-77.

Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA, Jr., and Rittenhouse SE. Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. Hypertension 1985; 7: 447-451.

Amant C, Hamon M, Bauters C, Richard F et al. The angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. J Am Coll Cardiol 1997; 29: 486-490.

Andoka G, Chauvin MA, Marie J, Saez JM et al. Adrenocorticotropin regulates angiotensin II receptors in bovine adrenal cells in vitro. Biochem Biophys Res Commun 1984; 121: 441-447.

Antonellis A, Rogus JJ, Canani LH, Makita Y et al. A method for developing high-density SNP maps and its application at the type 1 angiotensin II receptor (AGTR1) locus. Genomics 2002; 79: 326-332.

Anvari A, Turel Z, Schmidt A, Yilmaz N et al. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphism in coronary disease and malignant ventricular arrhythmias. Cardiovasc Res 1999; 43: 879-883.

Asmar R, Benetos A, Topouchian J, Laurent P et al. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. Hypertension 1995; 26: 485-490.

Bader M. Role of the local renin-angiotensin system in cardiac damage: a minireview focussing on transgenic animal models. J Mol Cell Cardiol 2002; 34: 1455-1462.

Balcells E, Meng QC, Johnson WH, Jr., Oparil S et al. Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations. Am J Physiol 1997; 273: H1769-H1774.

Balkestein EJ, Staessen JA, Wang JG, van Der Heijden-Spek JJ et al. Carotid and femoral artery stiffness in relation to three candidate genes in a white population. Hypertension 2001; 38: 1190-1197.

Balkestein EJ, Wang JG, Struijker-Boudier HA, Barlassina C et al. Carotid and femoral intima-media thickness in relation to three candidate genes in a Caucasian population. J Hypertens 2002; 20: 1551-1561.

Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC et al. The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. Mol Endocrinol 2004a; 18: 279-290.

Bassett MH, White PC, and Rainey WE. The regulation of aldosterone synthase expression. Mol Cell Endocrinol 2004b; 217: 67-74.

Bassett MH, Zhang Y, Clyne C, White PC et al. Differential regulation of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. J Mol Endocrinol 2002; 28: 125-135.

Begeot M, Langlois D, Penhoat A, and Saez JM. Variations in guanine-binding proteins (Gs, Gi) in cultured bovine adrenal cells. Consequences on the effects of phorbol ester and angiotensin II on adrenocorticotropin-induced and cholera-toxin-induced cAMP production. Eur J Biochem 1988; 174: 317-321.

Benetos A, Cambien F, Gautier S, Ricard S et al. Influence of the angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism on the effects of perindopril and nitrendipine on arterial stiffness in hypertensive individuals. Hypertension 1996a; 28: 1081-1084.

Benetos A, Gautier S, Ricard S, Topouchian J et al. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. Circulation 1996b; 94: 698-703.

Benetos A, Topouchian J, Ricard S, Gautier S et al. Influence of angiotensin II type 1 receptor polymorphism on aortic stiffness in never-treated hypertensive patients. Hypertension 1995; 26: 44-47.

Bird IM, Pasquarette MM, Rainey WE, and Mason JI. Differential control of 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human adrenocortical H295R cells. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 2171-2178.

Blume A, Kaschina E, and Unger T. Angiotensin II type 2 receptors: signalling and pathophysiological role. Curr Opin Nephrol Hypertens 2001; 10: 239-246.

Bohlen und HO. Angiotensin IV in the central nervous system. Cell Tissue Res 2003; 311: 1-9.

Bohmer C, Wagner CA, Beck S, Moschen I et al. The shrinkage-activated Na(+) conductance of rat hepatocytes and its possible correlation to rENaC. Cell Physiol Biochem 2000; 10: 187-194.

Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OH et al. Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. Circ Res 1994; 75: 23-32.

Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. Hypertension 1994; 24: 63-69.

Bonventre JV. Phospholipase A2 and signal transduction. J Am Soc Nephrol 1992; 3: 128-150.

Booth RE, Johnson JP, and Stockand JD. Aldosterone. Adv Physiol Educ 2002; 26: 8-20.

Border WA and Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. N Engl J Med 1994; 331: 1286-1292.

Borecki IB, Province MA, Ludwig EH, Ellison RC et al. Associations of candidate loci angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme with severe hypertension: The NHLBI Family Heart Study. Ann Epidemiol 1997; 7: 13-21.

Brand E, Schorr U, Ringel J, Beige J et al. Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-344T polymorphism in Caucasians from the Berlin Salt-Sensitivity Trial (BeSST). J Hypertens 1999; 17: 1563-1567.

Brewster UC and Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. Am J Med 2004; 116: 263-272.

Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, DeGasparo M et al. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. Hypertension 1991; 17: 720-721.

Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. Nature 1992; 359: 641-644.

Carey RM and Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. Endocr Rev 2003a; 24: 261-271.

Carey RM and Siragy HM. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. Trends Endocrinol Metab 2003b; 14: 274-281.

Carluccio M, Soccio M, and De Caterina R. Aspects of gene polymorphisms in cardiovascular disease: the renin-angiotensin system. Eur J Clin Invest 2001; 31: 476-488.

Castellano M, Muiesan ML, Beschi M, Rizzoni D et al. Angiotensin II type 1 receptor A/C1166 polymorphism. Relationships with blood pressure and cardiovascular structure. Hypertension 1996; 28: 1076-1080.

Castellano M, Glorioso N, Cusi D, Sarzani R et al. Genetic polymorphism of the renin-angiotensin-aldosterone system and arterial hypertension in the Italian population: the GENIPER Project. J Hypertens 2003; 21: 1853-1860.

Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P et al. Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. N Engl J Med 1994; 330: 1629-1633.

Caulfield M, Lavender P, Newell-Price J, Kamdar S et al. Angiotensinogen in human essential hypertension. Hypertension 1996; 28: 1123-1125.

Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, and Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. Hypertension 1998; 31: 362-367.

Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC et al. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 2514-2519.

Cheng S, Chang Y, Gravitt P, and Respess R. Long PCR. Nature 1994; 369: 684-685.

Chu MD and Ulick S. Isolation and identification of 18-hydroxycortisol from the urine of patients with primary aldosteronism. J Biol Chem 1982; 257: 2218-2224.

Cifkova R, Erdine S, Fagard R, Farsang C et al. Practice guidelines for primary care physicians: 2003 ESH/ESC hypertension guidelines. J Hypertens 2003; 21: 1779-1786.

Clyne CD, Zhang Y, Slutsker L, Mathis JM et al. Angiotensin II and potassium regulate human CYP11B2 transcription through common cis-elements. Mol Endocrinol 1997a; 11: 638-649.

Collidge TA, Lammie GA, Fleming S, and Mullins JJ. The role of the renin-angiotensin system in malignant vascular injury affecting the systemic and cerebral circulations. Prog Biophys Mol Biol 2004; 84: 301-319.

Condon JC, Pezzi V, Drummond BM, Yin S et al. Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. Endocrinology 2002; 143: 3651-3657.

Connell JM, Fraser R, MacKenzie SM, Friel EC et al. The impact of polymorphisms in the gene encoding aldosterone synthase (CYP11B2) on steroid synthesis and blood pressure regulation. Mol Cell Endocrinol 2004; 217: 243-247.

Curnow KM, Mulatero P, Emeric-Blanchouin N, Aupetit-Faisant B et al. The amino acid substitutions Ser288Gly and Val320Ala convert the cortisol producing enzyme, CYP11B1, into an aldosterone producing enzyme. Nat Struct Biol 1997; 4: 32-35.

Danser AH. Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. Int J Biochem Cell Biol 2003; 35: 759-768.

Danser AH, Derkx FH, Hense HW, Jeunemaitre X et al. Angiotensinogen (M235T) and angiotensin-converting enzyme (I/D) polymorphisms in association with plasma renin and prorenin levels. J Hypertens 1998; 16: 1879-1883.

Davies E, Holloway CD, Ingram MC, Inglis GC et al. Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2. Hypertension 1999; 33: 703-707.

de Gasparo M, Bottari S, and Levens NR. Characteristics of Angiotensin II Receptors and Their Role in Cell and Organ Physiology. 1995a; 1695-1720.

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. Pharmacol Rev 2000; 52: 415-472.

de Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ et al. Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. Hypertension 1995b; 25: 924-927.

Delcayre C, Silvestre JS, Garnier A, Oubenaissa A et al. Cardiac aldosterone production and ventricular remodeling. Kidney Int 2000; 57: 1346-1351.

Devereux RB and Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. Circulation 1977; 55: 613-618.

Dhalla NS, Xu YJ, Sheu SS, Tappia PS et al. Phosphatidic acid: a potential signal transducer for cardiac hypertrophy. J Mol Cell Cardiol 1997; 29: 2865-2871.

DiBona GF and Kopp UC. Neural control of renal function. Physiol Rev 1997; 77: 75-197.

Diez J, Laviades C, Orbe J, Zalba G et al. The A1166C polymorphism of the AT1 receptor gene is associated with collagen type I synthesis and myocardial stiffness in hypertensives. J Hypertens 2003; 21: 2085-2092.

Disse-Nicodeme S, Achard JM, Desitter I, Houot AM et al. A new locus on chromosome 12p13.3 for pseudohypoaldosteronism type II, an autosomal dominant form of hypertension. Am J Hum Genet 2000; 67: 302-310.

Disse-Nicodeme S, Desitter I, Fiquet-Kempf B, Houot AM et al. Genetic heterogeneity of familial hyperkalaemic hypertension. J Hypertens 2001; 19: 1957-1964.

Dluhy RG and Lifton RP. Glucocorticoid-remediable aldosteronism (GRA): diagnosis, variability of phenotype and regulation of potassium homeostasis. Steroids 1995; 60: 48-51.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. Circ Res 2000; 87: E1-E9.

Doolittle RF. Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family. Science 1983; 222: 417-419.

Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, Bhat GJ et al. Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. J Mol Cell Cardiol 1997; 29: 2893-2902.

Dubay C, Vincent M, Samani NJ, Hilbert P et al. Genetic determinants of diastolic and pulse pressure map to different loci in Lyon hypertensive rats. Nat Genet 1993; 3: 354-357.

Duprez D, De Buyzere M, Rietzschel ER, and Clement DL. Aldosterone and vascular damage. Curr Hypertens Rep 2000; 2: 327-334.

Dzau VJ. Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. Hypertension 2001; 37: 1047-1052.

Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. EMBO J 1987; 6: 1899-1904.

Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? Int J Biochem Cell Biol 2003; 35: 807-825.

Erdmann J, Riedel K, Rohde K, Folgmann I et al. Characterization of polymorphisms in the promoter of the human angiotensin II subtype 1 (AT1) receptor gene. Ann Hum Genet 1999; 63: 369-374.

Falkenstein E, Christ M, Feuring M, and Wehling M. Specific nongenomic actions of aldosterone. Kidney Int 2000; 57: 1390-1394.

Fallo F, Pilon C, Williams TA, Sonino N et al. Coexistence of different phenotypes in a family with glucocorticoid-remediable aldosteronism. J Hum Hypertens 2004; 18: 47-51.

Fardella CE, Mosso L, Gomez-Sanchez C, Cortes P et al. Primary hyperaldosteronism in essential hypertensives: prevalence, biochemical profile, and molecular biology. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 1863-1867.

Fardella CE and Miller WL. Molecular biology of mineralocorticoid metabolism. Annu Rev Nutr 1996; 16: 443-470.

Farquharson CA and Struthers AD. Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. Circulation 2000; 101: 594-597.

Flesch M, Hoper A, Dell'Italia L, Evans K et al. Activation and functional significance of the renin-angiotensin system in mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. Circulation 2003; 108: 598-604.

Freel EM, Shakerdi LA, Friel EC, Wallace AM et al. Studies on the origin of circulating 18-hydroxycortisol and 18-oxocortisol in normal human subjects. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 4628-4633.

Friedrich B, Feng Y, Cohen P, Risler T et al. The serine/threonine kinases SGK2 and SGK3 are potent stimulators of the epithelial Na+ channel alpha,beta,gamma-ENaC. Pflugers Arch 2003; 445: 693-696.

Funder J. Mineralocorticoids and cardiac fibrosis: the decade in review. Clin Exp Pharmacol Physiol 2001; 28: 1002-1006.

Funder JW, Duval D, and Meyer P. Cardiac glucocorticoid receptors: the binding of tritiated dexamethasone in rat and dog heart. Endocrinology 1973; 93: 1300-1308.

Garty H. Regulation of the epithelial Na+ channel by aldosterone: open questions and emerging answers. Kidney Int 2000; 57: 1270-1276.

Garvin JL. Angiotensin stimulates bicarbonate transport and Na+/K+ ATPase in rat proximal straight tubules. J Am Soc Nephrol 1991; 1: 1146-1152.

Gates LJ, Benjamin N, Haites NE, MacConnachie AA et al. Is random screening of value in detecting glucocorticoid-remediable aldosteronism within a hypertensive population? J Hum Hypertens 2001; 15: 173-176.

Gates LJ, MacConnachie AA, Lifton RP, Haites NE et al. Variation of phenotype in patients with glucocorticoid remediable aldosteronism. J Med Genet 1996; 33: 25-28.

Geller DS, Farhi A, Pinkerton N, Fradley M et al. Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. Science 2000; 289: 119-123.

Gibbons GH. Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: a new therapeutic target. Am J Cardiol 1997; 79: 3-8.

Girerd X, Hanon O, Mourad JJ, Boutouyrie P et al. Lack of association between renin-angiotensin system, gene polymorphisms, and wall thickness of the radial and carotid arteries. Hypertension 1998; 32: 579-583.

Goodfriend TL, Elliott ME, and Catt KJ. Angiotensin receptors and their antagonists. N Engl J Med 1996; 334: 1649-1654.

Gordon RD. Heterogeneous hypertension. Nat Genet 1995; 11: 6-9.

Gordon RD, Geddes RA, Pawsey CG, and O'Halloran MW. Hypertension and severe hyperkalaemia associated with suppression of renin and aldosterone and completely reversed by dietary sodium restriction. Australas Ann Med 1970; 19: 287-294.

Gould AB and Green D. Kinetics of the human renin and human substrate reaction. Cardiovasc Res 1971; 5: 86-89.

Grandjean B, Annat G, Vincent M, and Sassard J. Influence of renal nerves on renin secretion in the conscious dog. Pflugers Arch 1978; 373: 161-165.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, and Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. Circ Res 1994; 74: 1141-1148.

Gu J, Wen Y, Mison A, and Nadler JL. 12-lipoxygenase pathway increases aldosterone production, 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein phosphorylation, and p38 mitogen-activated protein kinase activation in H295R human adrenocortical cells. Endocrinology 2003; 144: 534-543.

Gu JL, Natarajan R, Ben Ezra J, Valente G et al. Evidence that a leukocyte type of 12-lipoxygenase is expressed and regulated by angiotensin II in human adrenal glomerulosa cells. Endocrinology 1994; 134: 70-77.

Guo DF, Furuta H, Mizukoshi M, and Inagami T. The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor. Biochem Biophys Res Commun 1994; 200: 313-319.

Gurantz D, Cowling RT, Villarreal FJ, and Greenberg BH. Tumor necrosis factor-alpha upregulates angiotensin II type 1 receptors on cardiac fibroblasts. Circ Res 1999; 85: 272-279.

Hampf M, Widimsky J, and Bernhardt R. aldosterone synthase gene in patients suffering from hyperaldosteronism. Endocr Res 1998; 24: 877-880.

Hanon O, Luong V, Mourad JJ, Bortolotto LA et al. Aging, carotid artery distensibility, and the Ser422Gly elastin gene polymorphism in humans. Hypertension 2001; 38: 1185-1189.

Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L et al. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. Nat Genet 1995; 11: 76-82.

Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y et al. Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 1994; 269: 24316-24320.

Hausdorff WP, Sekura RD, Aguilera G, and Catt KJ. Control of aldosterone production by angiotensin II is mediated by two guanine nucleotide regulatory proteins. Endocrinology 1987; 120: 1668-1678.

Hautanen A, Lankinen L, Kupari M, Janne OA et al. Associations between aldosterone synthase gene polymorphism and the adrenocortical function in males. J Intern Med 1998; 244: 11-18.

Hautanen A, Toivanen P, Manttari M, Tenkanen L et al. Joint effects of an aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism and classic risk factors on risk of myocardial infarction. Circulation 1999; 100: 2213-2218.

Hengstenberg C, Holmer SR, Mayer B, Lowel H et al. Evaluation of the aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism in patients with myocardial infarction. Hypertension 2000; 35: 704-709.

Henrion D, Amant C, Benessiano J, Philip I et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with an increased vascular reactivity in the human mammary artery in vitro. J Vasc Res 1998; 35: 356-362.

Henskens LH, Spiering W, Stoffers HE, Soomers FL et al. Effects of ACE I/D and AT1R-A1166C polymorphisms on blood pressure in a healthy normotensive primary care population: first results of the Hippocates study. J Hypertens 2003; 21: 81-86.

Heymes C, Garnier A, Fuchs S, Bendall JK et al. Aldosterone-synthase overexpression in heart: a tool to explore aldosterone's effects. Mol Cell Endocrinol 2004; 217: 213-219.

Hilgers KF, Langenfeld MR, Schlaich M, Veelken R et al. 1166 A/C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene and the response to short-term infusion of angiotensin II. Circulation 1999; 100: 1394-1399.

Hilgers KF, Veelken R, Muller DN, Kohler H et al. Renin uptake by the endothelium mediates vascular angiotensin formation. Hypertension 2001; 38: 243-248.

Hindorff LA, Heckbert SR, Tracy R, Tang Z et al. Angiotensin II type 1 receptor polymorphisms in the cardiovascular health study: relation to blood pressure, ethnicity, and cardiovascular events. Am J Hypertens 2002; 15: 1050-1056.

Hingorani AD, Jia H, Stevens PA, Hopper R et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms influence blood pressure and the response to angiotensin converting enzyme inhibition. J Hypertens 1995; 13: 1602-1609.

Hopkins PN, Lifton RP, Hollenberg NK, Jeunemaitre X et al. Blunted renal vascular response to angiotensin II is associated with a common variant of the angiotensinogen gene and obesity. J Hypertens 1996; 14: 199-207.

Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T et al. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. J Biol Chem 1997; 272: 19022-19026.

Huizinga TW, Pisetsky DS, and Kimberly RP. Associations, populations, and the truth: recommendations for genetic association studies in Arthritis & Rheumatism. Arthritis Rheum 2004; 50: 2066-2071.

Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Amiri F et al. Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone: interaction wtih the renin-angiotension system. Am J Hypertens 2004; 17: 597-603.

Ihle JN. Cytokine receptor signalling. Nature 1995; 377: 591-594.

Inglis GC, Plouin PF, Friel EC, Davies E et al. Polymorphic differences from normal in the aldosterone synthase gene (CYP11B2) in patients with primary hyperaldosteronism and adrenal tumour (Conn's syndrome). Clin Endocrinol (Oxf) 2001; 54: 725-730.

Irani K. Angiotensin II-stimulated vascular remodeling: the search for the culprit oxidase. Circ Res 2001; 88: 858-860.

Iwai N, Ohmichi N, Nakamura Y, and Kinoshita M. DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. Circulation 1994; 90: 2622-2628.

Jamieson A, Slutsker L, Inglis GC, Fraser R et al. Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism: effects of crossover site and parental origin of chimaeric gene on phenotypic expression. Clin Sci (Colch) 1995; 88: 563-570.

Jeunemaitre X. Renin-angiotensin-aldosterone system polymorphisms and essential hypertension: where are we? J Hypertens 2003; 21: 2219-2222.

Jeunemaitre X, Charru A, Chatellier G, Dumont C et al. M235T variant of the human angiotensinogen gene in unselected hypertensive patients. J Hypertens Suppl 1993; 11 Suppl 5: S80-S81.

Jeunemaitre X, Charru A, Pascoe L, Guyene TT et al. [Hyperaldosteronism sensitive to dexamethasone with adrenal adenoma. Clinical, biological and genetic study]. Presse Med 1995; 24: 1243-1248.

Jeunemaitre X and Gimenez-Roqueplo AP. [Genetics and arterial hypertension: 3 approaches to decode a complex disease]. Bull Acad Natl Med 2002; 186: 1595-1606.

Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, Charru A et al. Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension. Am J Hum Genet 1997; 60: 1448-1460.

Jeunemaitre X, Rigat B, Charru A, Houot AM et al. Sib pair linkage analysis of renin gene haplotypes in human essential hypertension. Hum Genet 1992; 88: 301-306.

Jonsson JR, Klemm SA, Tunny TJ, Stowasser M et al. A new genetic test for familial hyperaldosteronism type I aids in the detection of curable hypertension. Biochem Biophys Res Commun 1995; 207: 565-571.

Kainulainen K, Perola M, Terwilliger J, Kaprio J et al. Evidence for involvement of the type 1 angiotensin II receptor locus in essential hypertension. Hypertension 1999; 33: 844-849.

Kiema TR, Kauma H, Rantala AO, Lilja M et al. Variation at the angiotensin-converting enzyme gene and angiotensinogen gene loci in relation to blood pressure. Hypertension 1996; 28: 1070-1075.

Kim HS, Lee G, John SW, Maeda N et al. Molecular phenotyping for analyzing subtle genetic effects in mice: application to an angiotensinogen gene titration. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 4602-4607.

Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T et al. Angiotensin II type I receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats. J Pharmacol Exp Ther 1995; 273: 509-515.

Kimbrough HM, Jr., Vaughan ED, Jr., Carey RM, and Ayers CR. Effect of intrarenal angiotensin II blockade on renal function in conscious dogs. Circ Res 1977; 40: 174-178.

Kobayashi T, Deak M, Morrice N, and Cohen P. Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. Biochem J 1999; 344 Pt 1: 189-197.

Komiya I, Yamada T, Takara M, Asawa T et al. Lys(173)Arg and -344T/C variants of CYP11B2 in Japanese patients with low-renin hypertension. Hypertension 2000; 35: 699-703.

Kumar NN, Benjafield AV, Lin RC, Wang WY et al. Haplotype analysis of aldosterone synthase gene (CYP11B2) polymorphisms shows association with essential hypertension. J Hypertens 2003; 21: 1331-1337.

Kupari M, Hautanen A, Lankinen L, Koskinen P et al. Associations between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphisms and left ventricular size, mass, and function. Circulation 1998; 97: 569-575.

Kuznetsova T, Staessen JA, Stolarz K, Ryabikov A et al. Relationship between left ventricular mass and the ACE D/I polymorphism varies according to sodium intake. J Hypertens 2004; 22: 287-295.

Lacolley P, Labat C, Pujol A, Delcayre C et al. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone. Circulation 2002; 106: 2848-2853.

Lajemi M, Labat C, Gautier S, Lacolley P et al. Angiotensin II type 1 receptor-153A/G and 1166A/C gene polymorphisms and increase in aortic stiffness with age in hypertensive subjects. J Hypertens 2001; 19: 407-413.

Lang F, Klingel K, Wagner CA, Stegen C et al. Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 8157-8162.

Lantelme P, Mestre C, Lievre M, Gressard A et al. Heart rate: an important confounder of pulse wave velocity assessment. Hypertension 2002; 39: 1083-1087.

Laviades C, Varo N, Fernandez J, Mayor G et al. Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. Circulation 1998; 98: 535-540.

Lavoie JL and Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. Endocrinology 2003; 144: 2179-2183.

Levens NR, Freedlender AE, Peach MJ, and Carey RM. Control of renal function by intrarenal angiotensin II. Endocrinology 1983; 112: 43-49.

Levens NR, Peach MJ, and Carey RM. Role of the intrarenal renin-angiotensin system in the control of renal function. Circ Res 1981; 48: 157-167.

Li A, Li KX, Marui S, Krozowski ZS et al. Apparent mineralocorticoid excess in a Brazilian kindred: hypertension in the heterozygote state. J Hypertens 1997; 15: 1397-1402.

Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. Science 1996; 272: 676-680.

Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM et al. A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. Nature 1992a; 355: 262-265.

Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM et al. Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. Nat Genet 1992b; 2: 66-74.

Little J, Bradley L, Bray MS, Clyne M et al. Reporting, appraising, and integrating data on genotype prevalence and gene-disease associations. Am J Epidemiol 2002; 156: 300-310.

Lim PO, Macdonald TM, Holloway C, Friel E et al. Variation at the aldosterone synthase (CYP11B2) locus contributes to hypertension in subjects with a raised aldosterone-to-renin ratio. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 4398-4402.

Liu FY and Cogan MG. Angiotensin II stimulates early proximal bicarbonate absorption in the rat by decreasing cyclic adenosine monophosphate. J Clin Invest 1989; 84: 83-91.

Lombes M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE et al. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. Circ Res 1992; 71: 503-510.

Luft FC. Molecular genetics of human hypertension. J Hypertens 1998; 16: 1871-1878.

Luft FC. Present status of genetic mechanisms in hypertension. Med Clin North Am 2004; 88: 1-18, vii.

Maga EA and Richardson T. Amplification of a 9.0-kb Fragment using PCR. Biotechniques 1991; 11: 185-186.

Manabe I, Shindo T, and Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. Circ Res 2002; 91: 1103-1113.

Mansfield TA, Simon DB, Farfel Z, Bia M et al. Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31-42 and 17p11-q21. Nat Genet 1997; 16: 202-205.

Matsusaka T and Ichikawa I. Biological functions of angiotensin and its receptors. Annu Rev Physiol 1997; 59: 395-412.

Mattei MG, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Rohde K et al. Angiotensin-I converting enzymes gene is on chromosome 17. Cytogenet Cell Genet 1989; 51: 1041-

Mazak I, Fiebeler A, Muller DN, Park JK et al. Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. Circulation 2004; 109: 2792-2800.

McAllister JM and Hornsby PJ. Dual regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 17 alpha-hydroxylase, and dehydroepiandrosterone sulfotransferase by adenosine 3',5'-monophosphate and activators of protein kinase C in cultured human adrenocortical cells. Endocrinology 1988; 122: 2012-2018.

Metcalfe BL, Huentelman MJ, Parilak LD, Taylor DG et al. Prevention of Cardiac Hypertrophy by Angiotensin II Type 2 Receptor Gene Transfer. Hypertension 2004;

Michel JB. [Renin-angiotensin system and vascular remodelling]. Med Sci (Paris) 2004; 20: 409-413.

Miller JA, Thai K, and Scholey JW. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism predicts response to losartan and angiotensin II. Kidney Int 1999; 56: 2173-2180.

Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H, Sakamoto T et al. Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. Circulation 2001; 103: 72-77.

Miyamoto Y, Yoshimasa T, Itoh H, and Igaki T. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essentiel hypertension. J Hypertens 1996; 14: S29-

Montgomery H, Brull D, and Humphries SE. Analysis of gene-environment interactions by "stressing-the-genotype" studies: the angiotensin converting enzyme and exercise-induced left ventricular hypertrophy as an example. Ital Heart J 2002; 3: 10-14.

Mornet E, Dupont J, Vitek A, and White PC. Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta- hydroxylase (P-450(11) beta). J Biol Chem 1989; 264: 20961-20967.

Muiesan ML. Left ventricular hypertrophy: a new approach for fibrosis inhibition. J Hypertens 2002; 20: 611-613.

Mulatero P, Curnow KM, Aupetit-Faisant B, Foekling M et al. Recombinant CYP11B genes encode enzymes that can catalyze conversion of 11-deoxycortisol to cortisol, 18-hydroxycortisol, and 18-oxocortisol. J Clin Endocrinol Metab 1998a; 83: 3996-4001.

Mulatero P, di Cella SM, Williams TA, Milan A et al. Glucocorticoid remediable aldosteronism: low morbidity and mortality in a four-generation italian pedigree. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 3187-3191.

Mulatero P, Veglio F, Pilon C, Rabbia F et al. Diagnosis of glucocorticoid-remediable aldosteronism in primary aldosteronism: aldosterone response to dexamethasone and long polymerase chain reaction for chimeric gene. J Clin Endocrinol Metab 1998b; 83: 2573-2575.

Mulrow PJ and Franco-Saenz R. The adrenal renin-angiotensin system: a local hormonal regulator of aldosterone production. J Hypertens 1996; 14: 173-176.

Mune T, Rogerson FM, Nikkila H, Agarwal AK et al. Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Nat Genet 1995; 10: 394-399.

Naftilan AJ, Williams R, Burt D, Paul M et al. A lack of genetic linkage of renin gene restriction fragment length polymorphisms with human hypertension. Hypertension 1989; 14: 614-618.

Nahmias C and Strosberg AD. The angiotensin AT2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. Trends Pharmacol Sci 1995; 16: 223-225.

Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G et al. sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial na+ channels. J Biol Chem 1999; 274: 16973-16978.

Nasjletti A. Arthur C. Corcoran Memorial Lecture. The role of eicosanoids in angiotensin-dependent hypertension. Hypertension 1998; 31: 194-200.

Neutel JM. Effect of the renin--angiotensin system on the vessel wall: using ACE inhibition to improve endothelial function. J Hum Hypertens 2004; 18: 599-606.

Oberleithner H, Ludwig T, Riethmuller C, Hillebrand U et al. Human endothelium: target for aldosterone. Hypertension 2004; 43: 952-956.

Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y et al. Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. Circulation 1997; 96: 3954-3962.

Okunishi H, Miyazaki M, Okamura T, and Toda N. Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. Biochem Biophys Res Commun 1987; 149: 1186-1192.

Paillard F, Chansel D, Brand E, Benetos A et al. Genotype-phenotype relationships for the renin-angiotensin-aldosterone system in a normal population. Hypertension 1999; 34: 423-429.

Pascoe L, Curnow KM, Slutsker L, Connell JM et al. Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossovers between CYP11B1 and CYP11B2. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 8327-8331.

Peng J, Gurantz D, Tran V, Cowling RT et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced AT1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis. Circ Res 2002; 91: 1119-1126.

Peti-Peterdi J, Warnock DG, and Bell PD. Angiotensin II directly stimulates ENaC activity in the cortical collecting duct via AT(1) receptors. J Am Soc Nephrol 2002; 13: 1131-1135.

Pezzi V, Clark BJ, Ando S, Stocco DM et al. Role of calmodulin-dependent protein kinase II in the acute stimulation of aldosterone production. J Steroid Biochem Mol Biol 1996; 58: 417-424.

Pinheiro SV, Simoes e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD et al. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. Hypertension 2004; 44: 490-496.

Poirier O, Georges JL, Ricard S, Arveiler D et al. New polymorphisms of the angiotensin II type 1 receptor gene and their associations with myocardial infarction and blood pressure: the ECTIM study. Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde. J Hypertens 1998; 16: 1443-1447.

Pojoga L, Gautier S, Blanc H, Guyene TT et al. Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension. Am J Hypertens 1998; 11: 856-860.

Ponce MR and MICOL JL. PCR Amplification of Long DNA Fragments. Nucleic Acids Res 1992; 20: 623-

Pontremoli R, Ravera M, Viazzi F, Nicolella C et al. Genetic polymorphism of the renin-angiotensin system and organ damage in essential hypertension. Kidney Int 2000; 57: 561-569.

Quinn SJ and Williams GH. Regulation of aldosterone secretion. Annu Rev Physiol 1988; 50: 409-426.

Rajagopalan S, Duquaine D, King S, Pitt B et al. Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. Circulation 2002; 105: 2212-2216.

Reid I. The Renin-Angiotensin System: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. Advances in Physiology Education 1998; 20: S236-S245.

Reich H, Duncan JA, Weinstein J, Cattran DC et al. Interactions between gender and the angiotensin type 1 receptor gene polymorphism. Kidney Int 2003; 63: 1443-1449.

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. J Clin Invest 1990a; 86: 1343-1346.

Rigat B, Hubert C, Corvol P, and Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). Nucleic Acids Res 1992; 20: 1433-

Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A et al. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. Hypertension 1999; 33: 981-986.

Robinson MJ and Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. Curr Opin Cell Biol 1997; 9: 180-186.

Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A et al. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. Hypertension 1998; 31: 451-458.

Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, and Stier CT, Jr. Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. Hypertension 1999; 33: 232-237.

Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, Scherrer R et al. Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. Endocrinology 2002a; 143: 4828-4836.

Rocha R, Rudolph AE, Frierdich GE, Nachowiak DA et al. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002b; 283: H1802-H1810.

Rossi E, Regolisti G, Perazzoli F, Negro A et al. -344C/T polymorphism of CYP11B2 gene in Italian patients with idiopathic low renin hypertension. Am J Hypertens 2001; 14: 934-941.

Rubattu S, Enea I, Ganten D, Salvatore D et al. Enhanced adrenal renin and aldosterone biosynthesis during sodium restriction in TGR (mREN2)27. Am J Physiol 1994; 267: E515-E520.

Rudnichi A, Safar ME, Lajemi M, and Benetos A. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system and age-related changes in systolic and diastolic blood pressure in subjects with hypertension. Am J Hypertens 2004; 17: 321-327.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Blanco J et al. Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors. Am J Pathol 2001a; 158: 1743-1756.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V et al. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. Hypertension 2001b; 38: 1382-1387.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Suzuki Y et al. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT1 knockout mice. Nephrol Dial Transplant 2001c; 16 Suppl 1: 27-33.

Ruiz J, Blanche H, Cohen N, Velho G et al. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is strongly associated with coronary heart

disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91: 3662-3665.

Russo P, Siani A, Venezia A, Iacone R et al. Interaction between the C(-344)T polymorphism of CYP11B2 and age in the regulation of blood pressure and plasma aldosterone levels: cross- sectional and longitudinal findings of the Olivetti Prospective Heart Study. J Hypertens 2002; 20: 1785-1792.

Safar ME, Lajemi M, Rudnichi A, Asmar R et al. Angiotensin-converting enzyme D/I gene polymorphism and age-related changes in pulse pressure in subjects with hypertension. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 782-786.

Samani NJ, Gauguier D, Vincent M, Kaiser MA et al. Analysis of quantitative trait loci for blood pressure on rat chromosomes 2 and 13. Age-related differences in effect. Hypertension 1996; 28: 1118-1122.

Santos RA, Campagnole-Santos MJ, and Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. Regul Pept 2000; 91: 45-62.

Sarzani R, Salvi F, Dessi-Fulgheri P, Catalini R et al. Aldosterone synthase alleles and cardiovascular phenotype in young adults. J Hum Hypertens 2003; 17: 859-864.

Schmidt S, Beige J, Walla-Friedel M, Michel MC et al. A polymorphism in the gene for the angiotensin II type 1 receptor is not associated with hypertension. J Hypertens 1997; 15: 1385-1388.

Schnermann J. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. Am J Physiol 1998; 274: R263-R279.

Schultz JJ, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML et al. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. J Clin Invest 2002; 109: 787-796.

Schunkert H, Hengstenberg C, Holmer SR, Broeckel U et al. Lack of association between a polymorphism of the aldosterone synthase gene and left ventricular structure. Circulation 1999; 99: 2255-2260.

Sekiguchi K, Li X, Coker M, Flesch M et al. Cross-regulation between the renin-angiotensin system and inflammatory mediators in cardiac hypertrophy and failure. Cardiovasc Res 2004; 63: 433-442.

Shigaev A, Asher C, Latter H, Garty H et al. Regulation of sgk by aldosterone and its effects on the epithelial Na(+) channel. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 278: F613-F619.

Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C et al. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. Cell 1994; 79: 407-414.

Siani A, Russo P, Paolo CF, Iacone R et al. Combination of renin-angiotensin system polymorphisms is associated with altered renal sodium handling and hypertension. Hypertension 2004; 43: 598-602.

Silvennoinen O, Witthuhn BA, Quelle FW, Cleveland JL et al. Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90: 8429-8433.

Silvestre JS. Hormones, Fonction Endocrine du Coeur. 2002; 299-306.

Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B et al. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. J Biol Chem 1998; 273: 4883-4891.

Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, Neher R et al. [Constitution of aldosterone, a new mineralocorticoid.]. Experientia 1954; 10: 132-133.

Skeggs LT, Jr., Kahn JR, and Shumway NP. The purification of hypertensin II. J Exp Med 1956a; 103: 301-307.

Skeggs LT, Jr., Lentz KE, Kahn JR, Shumway NP et al. The amino acid sequence of hypertensin. II. J Exp Med 1956b; 104: 193-197.

Skeggs LT, Jr., Marsh WH, Kahn JR, and Shumway NP. The purification of hypertension I. J Exp Med 1954; 100: 363-370.

Skeggs LT, Jr., Marsh WH, Kahn JR, and Shumway NP. Amino acid composition and electrophoretic properties of hypertensin I. J Exp Med 1955; 102: 435-440.

Skott O and Briggs JP. Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. Science 1987; 237: 1618-1620.

Staessen JA, Ginocchio G, Wang JG, Saavedra AP et al. Genetic variability in the renin-angiotensin system: prevalence of alleles and genotypes. J Cardiovasc Risk 1997; 4: 401-422.

Staessen JA, Wang J, Bianchi G, and Birkenhager WH. Essential hypertension. Lancet 2003; 361: 1629-1641.

Stockand JD and Meszaros JG. Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating Ki-RasA and MAPK1/2 signaling. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 284: H176-H184.

Stowasser M, Bachmann AW, Huggard PR, Rossetti TR et al. Treatment of familial hyperaldosteronism type I: only partial suppression of adrenocorticotropin required to correct hypertension. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 3313-3318.

Stowasser M, Bachmann AW, Jonsson JR, Tunny TJ et al. Hybrid gene or hybrid steroids in the detection and screening for familial hyperaldosteronism type I. Clin Exp Pharmacol Physiol 1995; 22: 444-446.

Struthers AD. Aldosterone-induced vasculopathy. Mol Cell Endocrinol 2004; 217: 239-241.

Struthers AD and Macdonald TM. Review of aldosterone- and angiotensin II-induced target organ damage and prevention. Cardiovasc Res 2004; 61: 663-670.

Sugden PH and Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. J Mol Med 1998; 76: 725-746.

Sutherland DJA, Ruse JC, and Laidlaw JC. Hypertension increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. J Can Med assoc 1966; 95: 1109-1119.

Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. Physiol Rev 1999a; 79: 215-262.

Tabor HK, Risch NJ, and Myers RM. Opinion: Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. Nat Rev Genet 2002; 3: 391-397.

Takami S, Katsuya T, Rakugi H, Sato N et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with increase of left ventricular mass but not with hypertension. Am J Hypertens 1998; 11: 316-321.

Takeda R, Hatakeyama H, Takeda Y, Iki K et al. Aldosterone biosynthesis and action in vascular cells. Steroids 1995; 60: 120-124.

Takeda Y. Vascular synthesis of aldosterone: role in hypertension. Mol Cell Endocrinol 2004; 217: 75-79.

Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Miyamori I et al. Cardiac aldosterone production in genetically hypertensive rats. Hypertension 2000; 36: 495-500.

Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Usukura M et al. Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy. Circulation 2002; 105: 677-679.

Tamaki S, Iwai N, Tsujita Y, and Kinoshita M. Genetic polymorphism of CYP11B2 gene and hypertension in Japanese. Hypertension 1999; 33: 266-270.

Taymans SE, Pack S, Pak E, Torpy DJ et al. Human CYP11B2 (aldosterone synthase) maps to chromosome 8q24.3. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 1033-1036.

Thomas WG and Mendelsohn FA. Angiotensin receptors: form and function and distribution. Int J Biochem Cell Biol 2003; 35: 774-779.

Tigerstedt R and Bergman PG. Niere und Kreislauf. Skand Arch Physiol 1898; 7: 223-271.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. J Biol Chem 2000; 275: 33238-33243.

Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. Am J Hum Genet 1992; 51: 197-205.

Tiret L, Blanc H, Ruidavets JB, Arveiler D et al. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. Projet d'Etude des Genes de l'Hypertension Arterielle Severe a moderee Essentielle. J Hypertens 1998; 16: 37-44.

Toffelmire EB, Slater K, Corvol P, Menard J et al. Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans. Studies using a direct immunoradiometric assay. J Clin Invest 1989; 83: 679-687.

Touyz RM. Recent advances in intracellular signalling in hypertension. Curr Opin Nephrol Hypertens 2003; 12: 165-174.

Touyz RM and Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. Braz J Med Biol Res 2002; 35: 1001-1015.

Touyz RM, He G, Deng LY, and Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. Circulation 1999; 99: 392-399.

Touyz RM and Schiffrin EL. Role of calcium influx and intracellular calcium stores in angiotensin II-mediated calcium hyper-responsiveness in smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. J Hypertens 1997; 15: 1431-1439.

Touyz RM and Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Pharmacol Rev 2000; 52: 639-672.

Tsujita Y, Iwai N, Katsuya T, Higaki J et al. Lack of association between genetic polymorphism of CYP11B2 and hypertension in Japanese: the Suita Study. Hypertens Res 2001; 24: 105-109.

Ulick S and Chu MD. Hypersecretion of a new corticosteroid, 18-hydroxycortisol in two types of adrenocortical hypertension. Clin Exp Hypertens A 1982; 4: 1771-1777.

Urata H, Boehm KD, Philip A, Kinoshita A et al. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. J Clin Invest 1993; 91: 1269-1281.

van Belle E, Bauters C, Wernert N, Hamon M et al. Neointimal thickening after balloon denudation is enhanced by aldosterone and inhibited by spironolactone, and aldosterone antagonist. Cardiovasc Res 1995; 29: 27-32.

van Geel PP, Pinto YM, Voors AA, Buikema H et al. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries. Hypertension 2000; 35: 717-721.

Verrey F, Pearce D, Pfeiffer R, Spindler B et al. Pleiotropic action of aldosterone in epithelia mediated by transcription and post-transcription mechanisms. Kidney Int 2000; 57: 1277-1282.

Waldegger S, Barth P, Raber G, and Lang F. Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 4440-4445.

Wang J, Yu L, Solenberg PJ, Gelbert L et al. Aldosterone stimulates angiotensin-converting enzyme expression and activity in rat neonatal cardiac myocytes. J Card Fail 2002; 8: 167-174.

Wang T and Giebisch G. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. Am J Physiol 1996; 271: F143-F149.

Wang WY, Zee RY, and Morris BJ. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. Clin Genet 1997; 51: 31-34.

Ward R. Familial Aggregation and Genetic Epidemiology of Blood Pressure. 1995; 67-87.

Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. Curr Opin Cardiol 2000; 15: 264-272.

Weber KT, Sun Y, and Campbell SE. Structural remodelling of the heart by fibrous tissue: role of circulating hormones and locally produced peptides. Eur Heart J 1995; 16 Suppl N: 12-18.

Wenzel S, Taimor G, Piper HM, and Schluter KD. Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. FASEB J 2001; 15: 2291-2293.

Wharton J, Morgan K, Rutherford RA, Catravas JD et al. Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in the normal and failing human heart. J Pharmacol Exp Ther 1998; 284: 323-336.

White PC and Slutsker L. Haplotype analysis of CYP11B2. Endocr Res 1995; 21: 437-442.

White PC, Hautanen A, and Kupari M. Aldosterone synthase (CYP11B2) polymorphisms and cardiovascular function. J Steroid Biochem Mol Biol 1999; 69: 409-412.

Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR, Ralph SJ et al. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. Mol Cell Biol 1991; 11: 2057-2065.

Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K et al. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. Science 2001; 293: 1107-1112.

Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, Lalioti MD et al. Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 680-684.

Wright JW and Harding JW. The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. Prog Neurobiol 2004a; 72: 263-293.

Yamamoto N, Yasue H, Mizuno Y, Yoshimura M et al. Aldosterone is produced from ventricles in patients with essential hypertension. Hypertension 2002; 39: 958-962.

Yang CL, Angell J, Mitchell R, and Ellison DH. WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. J Clin Invest 2003; 111: 1039-1045.

Ylitalo A, Airaksinen KE, Hautanen A, Kupari M et al. Baroreflex sensitivity and variants of the renin angiotensin system genes. J Am Coll Cardiol 2000; 35: 194-200.

Yoshida A, Nishikawa T, Tamura Y, and Yoshida S. ACTH-induced inhibition of the action of angiotensin II in bovine zona glomerulosa cells. A modulatory effect of cyclic AMP on the angiotensin II receptor. J Biol Chem 1991; 266: 4288-4294.

Yoshimura M, Nakamura S, Ito T, Nakayama M et al. Expression of aldosterone synthase gene in failing human heart: quantitative analysis using modified real-time polymerase chain reaction. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 3936-3940.

Zannad F, Visvikis S, Gueguen R, Sass C et al. Genetics strongly determines the wall thickness of the left and right carotid arteries. Hum Genet 1998; 103: 183-188.

Zee RY, Lou YK, Griffiths LR, and Morris BJ. Association of a polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. Biochem Biophys Res Commun 1992; 184: 9-15.

Zhang X, Erdmann J, Regitz-Zagrosek V, Kurzinger S et al. Evaluation of three polymorphisms in the promoter region of the angiotensin II type I receptor gene. J Hypertens 2000; 18: 267-272.

Zhu X, Yan D, Cooper RS, Luke A et al. Linkage disequilibrium and haplotype diversity in the genes of the renin-angiotensin system: findings from the family blood pressure program. Genome Res 2003; 13: 173-181.

Article associé au travail

Annexes

I EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE

L'ADN génomique est extrait en utilisant un kit QIAamp Blood Maxi Kit (QUIAGEN), à partir du culot de globules blancs provenant de 20 mL de sang total prélevé sur EDTA. La première étape consiste à séparer par centrifugation les globules blancs de l'échantillon de sang. Une fois récupéré, le culot de leucocytes est congelé à –20°C.
Au moment de l'extraction de l'ADN, on remet ce culot en suspension et on lui ajoute une protéase et un tampon de lyse. Après incubation, on ajoute de l'éthanol froid afin de précipiter l'ADN puis on dépose la solution sur une membrane échangeuse d'anions, dans une colonne de centrifugation à usage unique. L'ADN se fixe spécifiquement sur la membrane et par lavages successifs, on élimine toutes les substances contaminantes (protéines, lipides membranaires, etc…). Une fois purifié, l'ADN est élué dans du tampon Tris-EDTA (TE) pH 8,0.

Quantification de l'ADN

La quantité d'ADN contenue dans cette solution est ensuite mesurée par absorptiométrie UV. Pour effectuer ce dosage, on utilise la longueur d'onde d'absorption spécifique des acides nucléiques: 260 nm. L'absorbance linéique massique est égale à 20 $mg^{-1}.ml.cm^{-1}$ pour l'ADN pur double brin, de sorte que, en cuve de quartz de trajet optique 1 cm, 1 unité d'absorbance correspond à 50 µg/ml. La concentration en ADN peut donc être calculée à partir de la relation suivante:

[ADN] en µg/mL = $A_{260\ nm}$ x 50 x facteur de dilution

Contrôle de la pureté de l'ADN extrait

On mesure également l'absorbance de la solution d'ADN à 280 nm, longueur d'onde correspondant à l'absorption spécifique des protéines.

Le rapport DO 260/ DO 280 permet de connaître la pureté de l'ADN extrait. Le rapport idéal se situe entre 1,8 et 2. Un rapport supérieur à 2 indique qu'il reste des ARN, une valeur inférieure à 1,7 révèle des contaminations protéiques.
Une fois dosé, l'ADN est dilué dans du TE pH 8,0 pour obtenir une solution de stockage à 200 µg/mL. La solution est stockée à –20°C.