

Université de Montréal

**Effet du bosentan sur les niveaux d'inflammation systémique et rénale chez des patients avec néphropathie diabétique traités par bloqueurs de récepteurs de l'angiotensine II.**

Par

Zead Tubail

Département de Sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de  
M.Sc. en Sciences Biomédicales, option recherche clinique.

Mars 2011

© Zead Tubail, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

**Effet du bosentan sur les niveaux d'inflammation systémique et rénale chez des patients avec néphropathie diabétique traités par bloqueurs de récepteurs de l'angiotensine II**

Présenté par :  
Zead Tubail

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Sophie Vallette, Président-rapporteur  
Dr Geneviève Renier, Directeur de recherche  
Dr Maryse Courteau, Co-directeur de recherche  
Dr François Madore, Membre du jury

## Résumé

Outre les facteurs métaboliques et hémodynamiques, l'inflammation est actuellement considérée comme un facteur pathogénique potentiel de la néphropathie diabétique (ND), pouvant contribuer à l'initiation et à la progression de la maladie. Les mécanismes menant au développement de l'inflammation rénale dans la ND sont encore peu connus, bien qu'une augmentation d'activité des systèmes rénine angiotensine (RAS) et de l'endothéline (ET) semble y contribuer. L'objectif général de cette étude mono-centre, à double aveugle, randomisée et incluant un groupe placebo était de démontrer que l'inhibition simultanée du RAS et du système de l'ET chez des patients avec ND induisait des effets néphroprotecteurs et anti-inflammatoires supérieurs à ceux observés par blocage du RAS seul. L'objectif spécifique de notre étude était d'évaluer la possibilité que l'administration d'un bloqueur des récepteurs de l'ET-1, le bosentan, à des patients atteints de ND et traités par bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II (BRA), réduisait, chez ces derniers, la protéinurie et les marqueurs inflammatoires systémiques et rénaux. Ce travail constitue un rapport d'un cas clinique et illustre les résultats obtenus suite à l'administration pendant 16 semaines du bosentan chez un patient diabétique de type 2 avec néphropathie clinique traité au long cours par BRA. Le protocole de recherche comprenait 6 visites médicales à 4 semaines d'intervalle, la première visite (V1) correspondant au recrutement du patient, la deuxième visite (V2) constituant le temps 0 de l'étude et la dernière visite (V6) représentant la fin de l'étude. Des échantillons de sang et d'urine étaient prélevés à 3 reprises soit à V2, V4 c'est-à-dire 8 semaines après le début du traitement et à V6 soit 16 semaines après le début du traitement pour mesure des taux sériques et urinaires de divers facteurs pro-inflammatoires incluant l'ET-1, le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine-6 (IL-6), le facteur chémoattractant des monocytes-1 (MCP-1), la molécule d'adhésion intracellulaire-1 (ICAM-1), la molécule d'adhésion vasculaire-1 (VCAM-1) et la protéine C-réactive (CRP). Un profil lipidique était aussi déterminé au début et à la fin de l'étude. La fonction rénale était mesurée aux visites V1, V2, V4 et V6 par détermination du taux de filtration glomérulaire (TFG) et de

l'excrétion urinaire d'albumine (UAE). Des tests biochimiques de routine étaient aussi faits à chaque visite. La corrélation entre les paramètres inflammatoires et rénaux sous étude et la filtration glomérulaire était enfin déterminée. Nos résultats chez ce sujet ont démontré que le bosentan réduisait l'UAE de 32 % et 35% aux semaines 8 et 16, et ce, sans affecter la pression artérielle ou la filtration glomérulaire. L'effet anti-protéïnurique du bosentan était associé à une réduction des concentrations urinaires de VCAM-1, ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$  et d'ET-1 ainsi qu'à une diminution des concentrations sériques de TNF- $\alpha$ . Le changement dans la protéïnurie était corrélé de manière positive avec les changements des niveaux urinaires de VCAM-1 ( $r=0.86$ ), ICAM-1 ( $r=0.88$ ), ET-1 ( $r=0.94$ ), et du TNF- $\alpha$  ( $r=0.96$ ) ainsi qu'avec les changements des niveaux sériques de TNF- $\alpha$  ( $r=0.98$ ). Ces données suggèrent que l'inhibition du système de l'ET induit dans la ND des effets rénoprotecteurs additifs à ceux observés par blocage du RAS seul. Ils supportent le concept que l'activation du système de l'ET au niveau rénal, par ses effets inflammatoires, puisse jouer un rôle important dans la pathogenèse de la ND. L'effet anti-inflammatoire et anti-protéïnurique du bosentan constitue une découverte intéressante susceptible d'engendrer dans le futur une alternative thérapeutique et préventive dans la prise en charge de la ND.

**Mots-clés :** Bosentan, protéïnurie, endothéline, système rénine angiotensine, néphropathie diabétique, inflammation.

## Abstract

Apart from metabolic and hemodynamic factors, inflammation has recently been introduced as a potential key pathogenic mechanism involved in the development and progression of diabetic nephropathy (DN). The mechanisms by which renal inflammation occurs in DN are still poorly understood, yet increased renal activity of the renin-angiotensin system (RAS) and endothelin (ET) system may play a key role. The main objective of this mono-centre, double blind, randomized, placebo-controlled study was to demonstrate that concomitant blockade of the RAS and ET system in patients with DN produces greater renal protective effects and exerts greater anti-inflammatory changes than those seen with blockade of the RAS system alone. The specific aim of the study was to evaluate whether administration of bosentan to patients with DN on angiotensin II receptor blockers (ARB) reduces systemic and renal inflammation and improves glomerular filtration. The work presented herein illustrates the results obtained in one type 2 diabetic patient with clinical DN and treated with ARB following the administration of bosentan for 16 weeks. The study protocol included 6 medical visits at 4 weeks interval, with the first visit (V1) being the screening visit and the second visit (V2) being the baseline and randomization visit. Blood and urine samples were taken at V2, after 8 weeks of treatment (V4), and at the end of the study (V6) for determination of serum and urinary inflammatory markers including ET-1, tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and C-reactive protein (CRP). Lipid profile was done at the beginning and end of the study. Renal function was assessed at V1, V2, V4 and V6 by determination of glomerular filtration rate and urinary albumin excretion (UAE). Routine biochemical analyses were done at each visit. Correlation between serum and urinary inflammatory markers and UAE was determined. Our results demonstrated that bosentan administration to this patient reduced UAE by 32% and 35% at weeks 8 and 16, respectively, without affecting blood pressure and glomerular filtration. The anti-proteinuric effect of bosentan was associated with a reduction in urinary levels of VCAM-

1, ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and ET-1 and a reduction in serum TNF- $\alpha$  levels. Change in UAE was positively correlated with changes in urinary levels of VCAM-1 ( $r=0.86$ ), ICAM-1 ( $r=0.88$ ), ET-1 ( $r=0.94$ ), and TNF- $\alpha$  ( $r=0.96$ ) and with change in serum TNF- $\alpha$  levels ( $r=0.98$ ). Our data suggest that blockade of the ET system in top of RAS inhibition exerts additive renoprotective effects in DN. They support the notion that activation of the ET system, by promoting renal inflammation, may play a role in the pathogenesis of DN. The anti-inflammatory and anti-proteinuric effect of bosentan represents an interesting finding which may leads in the future to an alternate therapeutic and preventive for the treatment of DN.

Keywords: Bosentan, proteinuria, endothelin, renin angiotensin system, diabetic nephropathy, inflammation.

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	x
Dédicace.....	xiii
Remerciements.....	xiv
I. INTRODUCTION.....	1
1.1 Introduction générale.....	2
II. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	4
1.1 La néphropathie diabétique (ND).....	5
1.1.1 Définition.....	5
1.1.2 Données statistiques de la ND.....	5
1.1.3 Aspect clinique de la ND.....	6
2.1 Facteurs de risque et mécanismes impliqués dans le développement et la progression de la ND.....	6
2.1.1 Facteurs de risques classiques.....	8
2.1.1.1 La protéinurie.....	8
2.1.1.2 L'hypertension.....	8
2.1.1.3 L'hyperglycémie.....	9
2.1.1.4 Les facteurs génétiques.....	10
2.1.1.5 Les facteurs constitutionnels.....	10
2.1.1.6 L'obésité.....	10
2.1.1.7 Le tabagisme.....	11
2. 1. 2 Nouveaux facteurs de risque.....	11

2. 1.2.1 La dysfonction endothéliale (DE) .....	11
2. 1.2.2 La rigidité artérielle.....	12
2.1.2.3 Stress oxydatif et facteurs de croissance.....	12
2. 1.2.4 L'altération de la coagulation.....	13
3.1 Nouveaux mécanismes pathogéniques de la ND .....	14
3.1.1 L'inflammation .....	14
3.1.1.1 Marqueurs inflammatoires de la phase aiguë.....	14
3.1.1.2 Molécules d'adhésion et chémokines.....	15
3.1.1.3 Cytokines pro-inflammatoires.....	16
3.1.1.4 Facteur de transcription NF- $\kappa$ B .....	18
3.1.2 Activation des systèmes RAS et ET et inflammation rénale .....	20
3.1.2.1 Biosynthèse de l'ET .....	20
3.1.2.2 Effets biologiques de l'ET au niveau vasculaire et rénal.....	22
3.1.2.3 Rôle de l'ET-1 dans la pathophysiologie rénale .....	24
3.1.2.4 L'inflammation comme médiateur des effets néfastes de l'Ang II et de l'ET sur la fonction rénale.....	25
4.1 Stratégie thérapeutique existante de la ND .....	27
5.1 Nouvelle stratégie thérapeutique de la ND .....	30
5.1.1 Antagonistes des récepteurs ETA / ETB.....	30
5.1.2 Antagonistes sélectifs des récepteurs de l'ETA.....	31
III. JUSTIFICATION DE L'ÉTUDE .....	32
1.1 Modèle conceptuel et hypothèses de recherche .....	33
1.1.1 Modèle conceptuel .....	33
1.1.2 Hypothèses de recherche.....	34
1.1.2.1 Hypothèse principale:.....	34
1.1.2.2 Hypothèses spécifiques:.....	34
1.2 Stratégie de recherche .....	34
1.2.1 Devis de recherche .....	34
1.2.2 Validité de la stratégie de recherche .....	36

1.2.2.1 Biais liés à la validité interne : .....	36
1.2.2.2 Biais liés à la validité externe : .....	36
1.3 Planification opérationnelle de la recherche .....	36
1.3.1 Définition et sélection de la population à l'étude.....	36
1.3.1.1 Population cible.....	36
1.3.1.3 Critères d'exclusion .....	37
1.3.1.4 Échantillon .....	38
1.3.1.5 Méthode de collecte des données.....	38
1.3.1.6 Analyse initialement projetée des données .....	40
IV. RÉSULTATS DE L'ÉTUDE.....	42
1.1 Présentation du cas clinique.....	43
1.2 Évolution des paramètres cliniques et biologiques du patient au cours de l'étude....	44
1.3 Évolution des marqueurs inflammatoires sériques et urinaires au cours de l'étude ..	46
V. DISCUSSION .....	51
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	68

## Liste des tableaux

Tableau I : Effets de l'ET-1 au niveau rénal chez l'animal .....	23
Tableau II : La distribution des tests au cours de l'étude.....	40
Tableau III : Évolution des paramètres cliniques et biologiques du patient au cours de l'étude.....	46
Tableau IV : Protéinurie et marqueurs inflammatoires urinaires.....	48
Tableau V : Protéinurie et marqueurs inflammatoires sériques.....	48

## Liste des figures

Figure 1: Facteurs de risque et de progression de la néphropathie diabétique.....	7
Figure 2: Biosynthèse de l'ET-1 .....	21
Figure 3 : Effets néphroprotecteurs des BRA dans le diabète type 2.....	29
Figure 4 : Modèle conceptuel de l'étude.....	33
Figure 5: Le devis de recherche. ....	35
Figure 6 : Niveaux des marqueurs inflammatoires urinaires au cours de l'étude.....	47
Figure 7 : Niveaux des marqueurs inflammatoires sériques au cours de l'étude.....	47
Figure 8 : Corrélation entre la protéinurie et les niveaux urinaires de VCAM-1 et d'ICAM-1 .....	48
Figure 9: Corrélation entre la protéinurie et les niveaux urinaires de TNF- $\alpha$ et d'IL-6 .....	49
Figure 10: Corrélation entre la protéinurie et les niveaux urinaires et sériques de l'ET-1 ..	49
Figure 11: Corrélation entre la protéinurie et les niveaux sériques de TNF- $\alpha$ et d'ICAM-150	

## Liste des sigles et abréviations

**Angiotensine II**

**ALP:** Phosphatase alcaline

**ALT:** Alanine aminotransférase

**ARB:** Angiotensin 2 receptor blockers

**ARNm:** Acide ribonucléique messenger

**AST:** Aspartate aminotransférase

**AT-1:** Récepteur de type 1 de l'angiotensine II

**AT-2:** Récepteur de type 2 de l'angiotensine II

**BRA:** Bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II

**BSA:** Albumine bovine sérique

**CHUM:** Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

**CRP:** Protéine C-réactive

**CTGF:** Facteur de croissance tissulaire conjonctif

**DCCT/EDIC:** "Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Intervention and Complication"

**DE:** Dysfonction endothéliale

**DNA:** Acide deoxyribonucléique

**ECE:** Enzyme de conversion de l'endothéline

**ELISA:** "Enzyme linked immunosorbent assay"

**ET:** Endothéline

**ETA/ETB:** Récepteurs de type A/B de l'endothéline

**GB:** Globules blancs

**GR:** Globules rouges

**cGMP:** Guanosine monophosphate cyclique

**Hb:** Hémoglobine

**HbA1C:** Hémoglobine glyquée

**HTA:** Hypertension artérielle

**ICAM-1:** Molécule d'adhésion intracellulaire-1

**IDNT:** "Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial"

**IECA:** Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

**IL-1:** Interleukine-1.

**IL-6:** Interleukine-6

**IRMA:** "Irbesartan in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria"

**IRT:** Insuffisance rénale terminale

**LDL:** Lipoprotéines de faible densité

**MAPK:** "Mitogen-activated protein kinase"

**MARVAL:** "Microalbuminuria Reduction with Valsartan"

**MBG:** Membrane basale glomérulaire

**MCP-1:** Protéine-1 chémoattractante des monocytes

**MCV:** Maladies cardiovasculaires

**ND:** Néphropathie diabétique

**NHANES:** "National Health and Nutrition examination surveys"

**NF- $\kappa$ B:** Facteur de transcription nucléaire-kappa B

**NO:** Oxyde nitrique

**iNOS:** Synthase de l'oxyde nitrique inductible

**ONTARGET:** "Ongoing Telmisartan Alone and in Combination with Ramipril Global Endpoint Trial"

**PDGF:** Facteur de croissance dérivé des plaquettes

**PG:** Prostaglandine

**PKC:** Protéine kinase C

**PRIME:** "The Program for Irbesartan Mortality and Morbidity Evaluation"

**RANTES:** "Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted chemokine"

**RAS:** Système rénine-angiotensine

**RENAAL:** "Reduction of End-points in NIDDM with Angiotensin II Antagonist Losartan"

**Rho:** Protéine "Ras homology"

**RIA:** "Assay radioimmunologique"

**ROS:** Espèces réactives oxygénées

**SAA:** Amyloïde A sérique

**STZ:** Streptozotocine

**TA:** Tension artérielle

**TFG:** Taux de filtration glomérulaire

**TGF- $\beta$ :** Facteur de croissance de transformation-bêta

**TNF- $\alpha$ :** Facteur de nécrose tumorale-alpha

**UAE:** Excrétion urinaire d'albumine

**UKPDS:** "United Kingdom Prevention Diabetes Study"

**VCAM-1:** Molécule d'adhésion vasculaire-1

**VEGF:** Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

**vWF:** Facteur Von Willebrand

## Dédicace

*À ma chère épouse Nadia et mes filles; Sarah et Jade*

## Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement ma directrice de recherche Dr. Geneviève Renier pour avoir accepté de diriger ma maîtrise et m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche. Merci Geneviève pour ton aide et ton soutien au long de la réalisation de ce travail.

Je remercie, également Dr. Maryse Courteau, qui m'a supervisé et a co-dirigé ce travail. Merci Dr. Courteau pour votre confiance.

Je remercie Dr. Catherine Beauregard et Dr. Catherine Girardin pour leur implication dans l'élaboration du protocole de recherche.

Je remercie Dr. Sophie Vallette et Dr. François Madore pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Un grand merci au Dr. Dr Neeraj Dhaun, de l'Université d'Edinburgh en Grand Bretagne et au Dr Juan F. Navarro-González, de l'Université de Nuestra Señora de Candelaria en Espagne pour leur collaboration.

Je tiens à remercier spécialement Nadia Ouamara et Chahrazed Belabani, de l'"Experimental Therapeutics Program" de l'Université de McGill, pour leur aide technique.

Finalement, je remercie Actelion Canada pour avoir subventionné ce projet de recherche.

# **I. INTRODUCTION**

## 1.1 Introduction générale

La néphropathie diabétique (ND) est actuellement la première cause d'insuffisance rénale terminale (IRT) dans la plupart des pays occidentaux. En effet, environ 20% à 40% des sujets diabétiques développent une néphropathie après 10 à 15 ans de diabète. À l'heure actuelle, les patients avec ND sont exposés à deux risques principaux: d'une part, l'IRT nécessitant la dialyse chronique ou la transplantation rénale; d'autre part, un pronostic vital défavorable par mortalité cardiovasculaire précoce dû au développement d'une microalbuminurie, un facteur prédictif important de la mortalité cardiovasculaire (American Diabetes Association 2010; Rossing 2005).

Outre les facteurs métaboliques et hémodynamiques, l'inflammation a récemment été introduite comme un mécanisme pathogénique potentiel de la ND. Diverses observations récentes appuient cette hypothèse: Tout d'abord, les marqueurs sériques pro-inflammatoires sont plus élevés chez les sujets diabétiques de type 2 avec protéinurie comparativement à ceux observés chez des sujets diabétiques normoalbuminuriques (Navarro 2003). En second lieu, ces marqueurs sont associés de manière indépendante à la protéinurie de 24h (Dalla 2005; Lee 2005; Mezzano 2004; Kalantarinia 2003) et sont des facteurs de prédiction de l'excrétion urinaire d'albumine (UAE) chez les sujets diabétiques de type 2 (Navarro 2003; Dalla Vestra 2005). En troisième lieu, des polymorphismes dans des gènes codants pour des cytokines inflammatoires et des chémokines ont été associés à un risque accru d'insuffisance rénale. (Lee 1994; Mezzano 2004; Morii 2003; Ruiz-Ortega 2006). Enfin, dans la ND, les systèmes rénine-angiotensine (RAS) et de l'endotheline (ET) sont activés (Mezzano 2003; Lee 1994), avec augmentation de la production locale d'angiotensine II (AII) et d'ET-1 et induction de facteurs pro-inflammatoires (Ruiz-Ortega 2000, 2001, 2003, 2006; Sasser 2007; Edwards 1990; Richter 2003). L'activation des voies de signalisation des systèmes RAS et de l'ET induit l'expression de facteurs inflammatoires par les cellules rénales (Gomez-Garre 1997; Dhaun 2005; Simonson 1993) et le blocage pharmacologique de ces systèmes réduit l'inflammation rénale et la protéinurie chez l'animal (Sasser 2007;

Muller 2000; Richter 2003; Rossing K 2003; Benigni 1996) et chez les patients avec ND. (Andress 2009; Dhaun 2009; Wenzel 2009).

L'objectif général de ce projet est de démontrer que l'inhibition simultanée du RAS et du système de l'ET chez des patients avec ND induit des effets rénoprotecteurs et anti-inflammatoires supérieurs à ceux observés par blocage du RAS seul.

De manière spécifique, ce projet vise à évaluer l'effet modulateur d'un bloqueur non spécifique des récepteurs de l'ET-1, le bosentan, sur les niveaux sériques et urinaires de marqueurs inflammatoires et la fonction rénale de sujets diabétiques de type 2 atteints de néphropathie clinique et traités par bloqueurs des récepteurs de l'AII (BRA). Les résultats obtenus chez un patient, démontrant l'effet anti-inflammatoire et anti-protéinurique du bosentan et établissant une corrélation entre marqueurs inflammatoires et UAE supportent le rôle de l'inflammation comme médiateur des effets rénoprotecteurs de cette molécule.

## **II. REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## **1.1 La néphropathie diabétique (ND)**

### **1.1.1 Définition**

La ND se caractérise par la présence d'une augmentation de l'UAE chez un patient atteint de diabète, suivie par un déclin de la fonction rénale (Williams 2005). La néphropathie clinique est caractérisée par une albuminurie persistante ( $> 300$  mg/24 h ou  $200$   $\mu$ g/min), une élévation précoce de la tension artérielle, une diminution de la fonction rénale, et une augmentation de la morbidité et la mortalité cardio-vasculaires (Rossing 2005). L'hypertension dans la ND est fréquente et considérée comme un signe précoce de la protéinurie persistante, même si la fonction rénale est normale ou légèrement altérée.

### **1.1.2 Données statistiques de la ND**

La ND terminale se développe chez environ 10 à 20 % des sujets diabétiques de type 2 et se retrouve, selon les pays, chez 25% à 50% des patients avec IRT. L'incidence de la ND chez ces patients est supérieure à celle observée chez les patients diabétiques de type 1. Cependant, il a été démontré que le risque de développer une néphropathie avec IRT est semblable dans les deux types du diabète (Remuzzi 2006; Hasslacher 1989).

Selon Statistique Canada, le nombre de patients atteints de ND a augmenté au pays ces dix dernières années de 114 %, cette augmentation étant liée à l'augmentation marquée de l'incidence du diabète dans la population canadienne. À noter que la prévalence de la ND est beaucoup plus élevée dans les populations des premières nations que dans la population canadienne globale. On estime qu'elle se situe entre 25 à 60 % chez les personnes atteintes de diabète depuis 15 à 20 ans (Association Canadienne du Diabète 2003).

Selon un rapport de Diabète Québec publié en 2009, le nombre des personnes diabétiques et pré-diabétiques avoisine 15 % de la population québécoise et la prévalence du diabète est de 7 % chez les 20 ans et plus.

### **1.1.3 Aspect clinique de la ND**

La ND évolue comme suit : l'initiation de la ND se définit par le passage d'un état normoalbuminurique vers un état microalbuminurique. La microalbuminurie constitue une augmentation du taux d'UAE entre 30 et 300 mg/24h, en l'absence d'altération clinique de la fonction rénale. Elle se développe après 5 à 10 ans de diabète, d'abord de manière intermittente puis persistante. La microalbuminurie est un marqueur de dysfonction endothéliale (DE) et un facteur de risque de maladies cardio-vasculaires (MCV).

Au cours de la phase précoce du diabète, la filtration glomérulaire et le volume des reins augmentent parallèlement menant à l'hypertrophie des glomérules et des tubules, notamment proximaux (Dalla Vestra. 2000). La progression de la ND se caractérise par l'apparition d'une macroalbuminurie (>300 mg/24h) (Mathiesen 1995, Warram 1996, Lemley 2000) avec détérioration de la fonction rénale. La protéinurie est un facteur de risque important de progression de la ND et détermine le taux de progression de perte de la fonction rénale. Les patients diabétiques avec protéinurie persistante ont un risque élevé de développer une rétinopathie proliférative (Williams 2005). Dans la ND, l'hypertension est un facteur majeur de progression de l'IR contribuant à l'excès de morbidité-mortalité cardiovasculaire. D'une façon générale, la fréquence et la sévérité de l'HTA augmentent parallèlement avec la détérioration de la fonction rénale (Chantrel 2000). À noter que les patients atteints de ND sont souvent asymptomatiques jusqu'à la perte de 70 à 90 % de leur filtration glomérulaire.

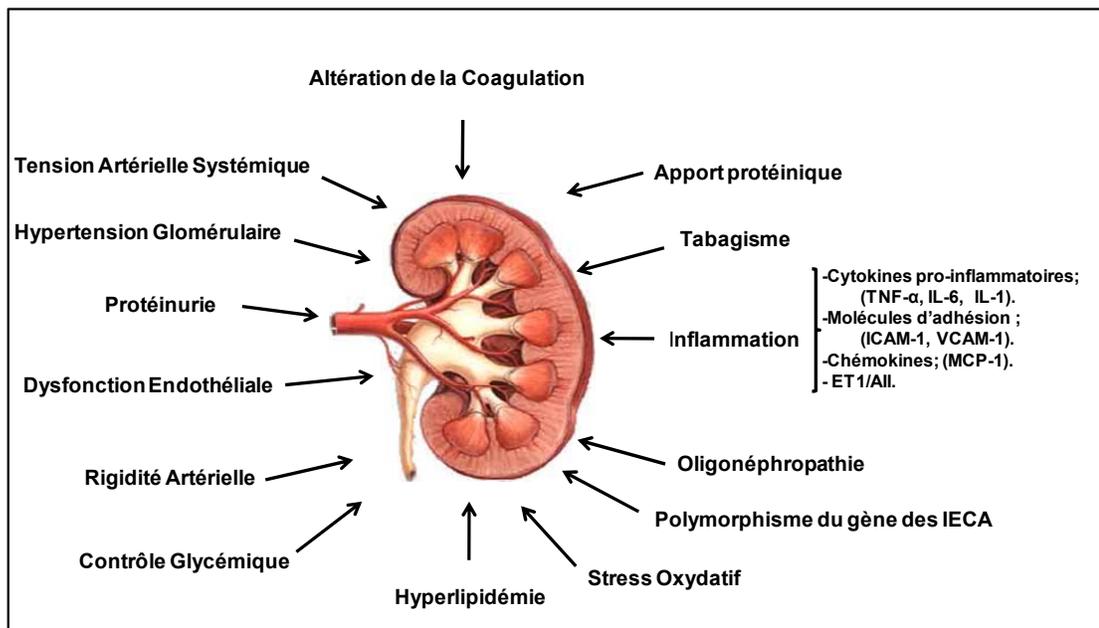
## **2.1 Facteurs de risque et mécanismes impliqués dans le développement et la progression de la ND**

Afin de prévenir le développement et la progression de la ND, il est indispensable d'identifier les facteurs de risques impliqués dans la pathogenèse de cette maladie. Nous distinguerons 2 types de facteurs de risque : les facteurs de risque classiques et les nouveaux facteurs de risque.

Les facteurs de risque classiques incluent la protéinurie et le développement d'une microalbuminurie, les facteurs génétiques et divers facteurs modifiables ou constitutionnels, des facteurs hémodynamiques tels l'hypertension, des facteurs métaboliques comme la glycémie et l'obésité et d'autres facteurs supplémentaires tels que le tabagisme.

Parmi les possibles nouveaux facteurs de risque de la progression de la ND se retrouvent la DE, l'altération de la coagulation, la rigidité artérielle, le stress oxydatif, l'inflammation et les facteurs de croissance. L'utilisation de ces nouveaux marqueurs de risque pourrait améliorer l'évaluation des risques de développement et de progression de la ND et pourrait dans le futur identifier de nouveaux traitements pouvant améliorer la prise en charge thérapeutique (Rossing 2006).

Figure 1: Facteurs de risque et de progression de la néphropathie diabétique



Adapté de Rossing P. *Diabetologia* 2006; 49:11-19

## **2.1.1 Facteurs de risques classiques**

### **2.1.1.1 La protéinurie**

La protéinurie est considérée comme un promoteur non hémodynamique de la progression de la ND, traduisant l'augmentation de risque de progression de la néphropathie. La protéinurie reflétant les dommages glomérulaires, elle peut aussi constituer un index de la gravité de la ND. Diverses études expérimentales et cliniques ont investigué le rôle de la protéinurie comme facteur de risque et de progression de la ND. À ce titre, il a été rapporté que la protéinurie massive est fortement associée à la glomérulosclérose diabétique diffuse et, moins fréquemment, à la glomérulosclérose nodulaire (Myers 1982). Actuellement, le contrôle strict de la protéinurie est considéré comme crucial pour retarder la progression de l'insuffisance rénale chronique. Chez les patients avec ND, la protéinurie est généralement sous-néphrotique. Comme mentionné précédemment, l'hypertension artérielle constitue un signe précoce de la protéinurie persistante et se développe même si la fonction rénale est normale ou légèrement altérée. Un risque élevé de développer une rétinopathie proliférative est enfin observé chez les patients diabétiques avec protéinurie persistante (Williams 2005).

Une étude d'observation menée sur 10 ans a montré que 25% des patients diabétiques normoalbuminuriques vont développer une microalbuminurie. Ce risque atteint 70% si le patient est exposé à une combinaison de quatre facteurs de risque: une rétinopathie, une UAE >10 mg/24 h, des niveaux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) > 8.6% et un tabagisme (Rossing 2002).

### **2.1.1.2 L'hypertension**

L'hypertension est une complication fréquente du diabète de type 2. Outre l'augmentation de risque cardiovasculaire général qui lui est associé, l'hypertension artérielle exerce plusieurs impacts délétères sur le rein: elle favorise la survenue d'une néphropathie, la progression de la microalbuminurie vers la néphropathie clinique, et la

progression de la ND vers l'IRT. Chez les sujets diabétiques de type 2, l'hypertension artérielle précède souvent la survenue du diabète et constitue un risque indépendant de développement de la protéinurie (Chantrel 2000). Avec la protéinurie, le ciblage de l'hypertension constitue le traitement de néprotection le plus efficace dans la ND. L'étude "Reduction of End-points in NIDDM with Angiotensin II Antagonist Losartan" (Renaal) a été la première à démontrer que l'augmentation de la tension artérielle (TA) systolique au-delà de 140 mmHg était un facteur de risque majeur de la progression de la ND, augmentant le risque d'IRT et de mort, chaque augmentation de 10mmHg étant associée à un risque accru de 6.7% (Brenner 2001). À l'inverse, diverses études ont démontré qu'un contrôle serré de la TA réduisait la microalbuminurie et la protéinurie et, ralentissait la progression de la maladie rénale, tel que mesuré par le TFG (Evans 2000). L'hypertension est en outre associée à une dysfonction vasculaire, à une production importante de radicaux libres et de cytokines pro-inflammatoires, ce qui favorise la progression de l'athérosclérose (Reaven 1996).

### **2.1.1.3 L'hyperglycémie**

La relation entre hyperglycémie et développement de complications microvasculaires a été bien décrite (Pirart 1977). Le glucose induit des dommages vasculaires par divers mécanismes dont l'activation de la voie des polyols, la formation des produits terminaux de glycation, l'activation de la voie de la protéine kinase C (PKC) et de celle des hexosamines (Du 2000). L'étude "United Kingdom Prevention Diabetes Study" (UKPDS) a bien démontré qu'un contrôle glycémique strict permettait de réduire de manière significative le risque de développement de complications microvasculaires, incluant la ND (Stratton IM 2000).

#### **2.1.1.4 Les facteurs génétiques**

L'implication des facteurs génétiques dans l'étiologie de la ND a été suggérée par des études épidémiologiques et familiales. Les gènes étudiés incluaient des gènes de susceptibilité du diabète, des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et de la régulation de la TA et des gènes codants pour des facteurs de croissance (Tarnow 2002). Les résultats générés par ces études supportent un rôle des gènes impliqués dans le RAS dans le risque de développement de la ND (Korlewski 2001).

#### **2.1.1.5 Les facteurs constitutionnels**

Le retard de croissance intra-utérin et un petit poids de naissance (inférieur au 10<sup>ème</sup> percentile) sont associés à un risque accru de développement de la ND (Rossing 2005; Luyckx 2005; Zohdi 2007) et une association entre petite stature et ND a été rapportée (Hovind 2004).

#### **2.1.1.6 L'obésité**

L'obésité est associée à un risque accru de MCV et de complications microvasculaires telles la rétinopathie et la néphropathie. Ceci est explicable par l'association de l'obésité à une constellation d'anomalies métaboliques, incluant l'hypertension artérielle et la dyslipidémie, que l'on appelle communément le syndrome métabolique (De Jongh 2004). À noter que la glomérulopathie liée à l'obésité se manifeste souvent cliniquement par une albuminurie (Stengel 2003). Ferris et coll. ont démontré qu'il y avait une association significative entre albuminurie et obésité chez les jeunes adultes. Ces données identifient l'obésité comme une cible dans la prévention primaire des maladies rénales et cardiovasculaires (Ferris 2007).

### **2.1.1.7 Le tabagisme**

Le tabagisme, par ses effets stimulants sur la production d'espèces réactives oxygénées (ROS), est impliqué dans le développement de la DE. Il est en outre postulé que le tabagisme puisse exercer un effet délétère sur le contrôle glycémique (Scott 2001). D'après Evans, le risque de ND est augmenté de 1.6 fois chez les sujets fumeurs (Evans 2000). Cependant, l'impact du tabagisme sur la baisse de la filtration glomérulaire n'a pas été prouvé (Hovind 2003).

## **2. 1. 2 Nouveaux facteurs de risque**

### **2. 1.2.1 La dysfonction endothéliale (DE)**

L'endothélium est un régulateur crucial du tonus vasculaire (Endemann 2004). L'altération de la fonction endothéliale ou DE est caractérisée par une perte des propriétés vasodilatatrices endothélium-dépendantes ainsi qu'à des altérations endothéliales de type pro-inflammatoires et pro-thrombotiques. Chez les patients diabétiques de type 2, l'hyperglycémie, un élément central du spectre des anomalies métaboliques présentes dans le diabète, constitue un facteur causal majeur de la DE. La DE est communément retrouvée chez les sujets avec ND et il a été démontré que les sujets diabétiques atteints de maladies rénales présentaient souvent une altération de la production d'oxyde nitrique (NO). Cette altération de la fonction vasodilatatrice de l'endothélium représente un mécanisme susceptible d'augmenter la pression artérielle et semble précéder le développement de la microalbuminurie (Chan 2006; Cosentino 1997; Stehouwer 1995). Des études expérimentales supportent un rôle des récepteurs de type A de l'endothéline (ETA) dans la pathogénèse de la DE et dès lors l'efficacité des antagonistes de l'ET pour accroître la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO) au niveau endothélial. (Bauersachs 2000). À ce titre, il a été documenté qu'un traitement par bloqueurs des ETA améliorerait la fonction endothéliale dans les vaisseaux coronariens de patients atteints d'athérosclérose (Halcox 2001).

### **2.1.2.2 La rigidité artérielle**

La rigidité artérielle est un marqueur de risque cardiovasculaire indépendant chez les patients hypertendus et chez les sujets avec IRT. La rigidité artérielle est un facteur favorisant l'hypertrophie cardiaque, l'augmentation de la TA systolique, la réduction de la tension artérielle diastolique, la diminution de la pression de perfusion coronarienne et l'ischémie myocardique (Oliver 2003). Des études récentes ont démontré que l'ET-1 augmentait la rigidité artérielle, un effet bloqué par l'administration concomitante d'un antagoniste des récepteurs de l'ET (Vuurmans 2003). Une augmentation de rigidité artérielle est associée à la DE, situation où le NO est inhibé et l'ET-1 est activée (McEniery 2003).

### **2.1.2.3 Stress oxydatif et facteurs de croissance**

Le stress oxydatif est associé aux maladies rénales terminales (Stenvinkel 2003; Arici 2001) et est aussi communément documenté chez les sujets présentant une atteinte rénale modérée (Oberg 2004). Le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur dégradation et résulte soit d'une augmentation de production de ces radicaux, soit d'un déficit extra et/ou intracellulaire en antioxydants au niveau de l'organisme soit encore de la combinaison de ces deux processus. L'hyperglycémie semble induire la production de radicaux libres par différentes voies, incluant la voie de l'autoxydation du glucose, la voie des polyols, la synthèse de diacylglycérol et l'activation de la PKC, la formation de produits terminaux de glycation, et la peroxydation lipidique. Le stress oxydatif est associé à un état de DE ainsi qu'à une augmentation d'évènements cardiovasculaires (Heitzer 2001). À noter que dans certains modèles expérimentaux d'hypertension artérielle (HTA), tel celui induit par l'acétate de désoxycorticostérone, l'ET est considérée comme le médiateur principal du stress oxydatif et son blocage normalise la DE, indépendamment de changements dans la TA (Callera 2003).

Plusieurs facteurs de croissance, tels le facteur de croissance de transformation bêta (TGF- $\beta$ ), le facteur de croissance tissulaire conjonctif (CTGF) et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) semblent jouer un rôle pathologique dans le développement de la ND.

Le TGF- $\beta$  et le CTGF sont des cytokines proscélrotiques et le TGF- $\beta$  est considéré comme un médiateur principal de la formation du collagène au niveau rénal. Le VEGF est pour sa part une cytokine angiogénique (Barton 2008) qui accroît la perméabilité vasculaire et dont le niveau plasmatique s'élève de manière précoce au début de la ND (Hovind 2000). Bien que la valeur prédictive de ces bio-marqueurs ne soit pas encore clairement définie, ces paramètres pourraient représenter de nouvelles cibles thérapeutiques dans la ND (Rossing 2005).

#### **2.1.2.4 L'altération de la coagulation**

Le diabète de type 2 est associé à un état d'hypercoagulabilité, avec une élévation des niveaux plasmatiques de divers facteurs de coagulation (Erema 2005). Asakawa et al. ont montré que le niveau de fibrinogène est significativement élevé chez les patients diabétiques atteints de rétinopathie ou de néphropathie comparativement aux patients dénués de ces complications (Asakawa 2000). À noter que l'hyperfibrinogénémie est également associée à la DE, la résistance à l'insuline, l'hypercoagulabilité, l'augmentation de la viscosité sanguine et représente un marqueur d'instabilité des lésions athérosclérotiques (Klein 2003). Il a été démontré que la microalbuminurie est corrélée de manière significative avec diverses variables hémostatiques (Aso 2002). Des niveaux circulants élevés du facteur V et du facteur VII ont été documentés chez les patients diabétiques avec complications vasculaires et avec ND, respectivement (Asakawa 2000). Chez les sujets diabétiques de type 2, des niveaux élevés du facteur von Willebrand (vWF) sont aussi associés à un risque accru de mortalité macrovasculaire (Standl 1996), une altération corrigée par un bon contrôle glycémique (Erema 2005).

## **3.1 Nouveaux mécanismes pathogéniques de la ND**

### **3.1.1 L'inflammation**

Les patients avec insuffisance rénale, en plus de présenter divers facteurs classiques de risque de MCV, présentent aussi des altérations reliées à l'urémie et à la dialyse qui peuvent générer une réponse inflammatoire. Si l'inflammation est associée aux maladies rénales terminales (Stenvinkel 2003; Arici 2001), elle est aussi communément documentée chez les sujets présentant une atteinte rénale modérée (Oberg 2004). L'athérosclérose étant un processus inflammatoire, l'inflammation pourrait contribuer à l'augmentation de risque cardiovasculaire observé chez les patients atteints de maladies rénales chroniques et la mesure des marqueurs inflammatoires pourrait constituer, chez ces sujets, un facteur de prédiction utile des MCV.

Outre les facteurs métaboliques et hémodynamiques, il a été récemment proposé que l'inflammation puisse représenter un important mécanisme pathogénique de la ND (Mora 2004, 2005; Navarro 2005; Festa 2000; Rivero 2009).

#### **3.1.1.1 Marqueurs inflammatoires de la phase aiguë**

Les patients diabétiques de type 2 souffrant de néphropathie présentent une élévation sérique importante de divers marqueurs inflammatoires de la phase aiguë tel que le fibrinogène, la protéine C-réactive (CRP) et l'amyloïde A sérique (SAA) (Dalla Vestra 2005). Une augmentation des niveaux de ces marqueurs est aussi notée chez les sujets ayant un épaissement de la membrane basale glomérulaire (MBG), une altération étroitement associée aux lésions de glomérulopathie diabétique (Dalla Vestra 2005).

L'étude "Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Intervention and Complication" (DCCT/EDIC) a enfin rapporté une association entre les niveaux plasmatiques de fibrinogène et l'albuminurie (Klein 2003) et le fibrinogène a été identifié comme un facteur de prédiction de la progression de la ND (Bruno 2003).

Vingt à 65% des patients avec IR ont des niveaux élevés de CRP. Diverses études ont examiné l'association entre CRP, microalbuminurie et fonction rénale. En 2003, Stuveling et coll. ont pu établir chez 7,300 sujets sans néphropathie clinique ni diabète, une association entre les niveaux sériques de CRP et le risque de détérioration de la fonction rénale, tel que mesuré par la mesure de clairance de la créatinine. Cette association restait significative après ajustement pour divers facteurs confondants. L'association entre CRP et microalbuminurie a été récemment confirmée chez 12,800 hommes et femmes participants à l'étude "National Health and Nutrition examination surveys" (NHANES). Fait intéressant, cette étude démontre une augmentation de prévalence de la microalbuminurie chez les sujets avec CRP élevée. Comme cette étude est transversale, elle ne permet cependant pas d'établir une relation de cause à effet. (Kshirsagar 2008). Une association indépendante entre albuminurie et CRP a aussi été mise en évidence chez les patients diabétiques de type 2 (Navarro 2003).

### **3.1.1.2 Molécules d'adhésion et chémokines**

L'implication pathogénique de diverses molécules d'adhésion, comme ICAM-1 et VCAM-1, dans le développement de la ND est suggérée par divers travaux. Ainsi, Chow a documenté dans un modèle de souris diabétiques db/db avec atteinte rénale, une augmentation d'expression rénale d'ICAM-1 et a montré le rôle de cette molécule d'adhésion dans l'infiltration et l'adhésion leucocytaire aux glomérules et tubules rénaux ainsi que dans l'infiltration macrophagique (Chow 2005). D'un point de vue clinique, il a été démontré que les patients diabétiques et atteints de ND avaient une augmentation des niveaux d'ICAM-1 comparativement aux sujets sans atteinte rénale (Clausen 2000; Guler 2002). Enfin, une étude récente a démontré que l'ICAM-1 était un marqueur de déclin de la fonction rénale chez les patients diabétiques avec protéinurie (Camilla 2010). VCAM-1, un marqueur de DE, montre pour sa part une augmentation de ses niveaux d'expression rénale dans l'interstitium rénal de souris diabétiques (Ina 1999) et a une valeur prédictive de progression de la ND (Goldberg 2009). Des études cliniques ont documenté une élévation

des niveaux sériques de VCAM-1 chez les sujets avec ND (Lim 1999, Schmidt 1996, Stehouwer 2002) et l'étude prospective menée sur une période de 10 ans par Stehouwer a documenté chez des patients diabétiques de type 2 une forte association entre VCAM-1 et l'UAE, avec une augmentation de risque de décès chez les sujets présentant des niveaux élevés de VCAM-1 et de CRP.

Des études faites sur l'animal ont en outre démontré que l'accumulation et l'activation macrophagique médiée par la protéine chémoattractante des monocytes-1 (MCP-1) sont des mécanismes critiques dans le développement précoce de la ND. Chez l'humain, la lésion rénale associée au diabète de type 2 est caractérisée par une augmentation d'expression rénale de MCP-1 et cette altération est elle-même associée au recrutement macrophagique, à l'UAE et aux lésions tubulointerstitielles. Ces données suggèrent que la production locale de MCP-1 pourrait-être impliquée dans le développement de ND (Banba 2000). Indépendamment des facteurs de risques traditionnels de la ND, le MCP-1 apparaît comme un facteur de prédiction précoce de la ND (Goldberg 2009).

### **3.1.1.3 Cytokines pro-inflammatoires**

Les cytokines pro-inflammatoires peuvent être synthétisées dans le rein par les cellules endothéliales, mésangiales, glomérulaires et tubulaires épithéliales et sont impliquées dans le développement et la progression de la ND. Le TNF- $\alpha$  est cytotoxique au niveau glomérulaire et mésangial ainsi qu'au niveau des cellules épithéliales. Il exerce des effets nocifs directs sur la perméabilité de la barrière glomérulaire (MaCarthy 1998), contribue à deux modifications importantes au cours de la phase initiale de ND, soit la rétention sodique et l'hypertrophie rénale (Dipetrillo 2003), favorise la production rénale de ROS et induit des altérations hémodynamiques. L'interleukine-1 (IL-1) est pour sa part impliqué dans la prolifération des cellules mésangiales et la synthèse de la matrice, ainsi que dans le développement d'anomalies hémodynamiques intraglomérulaires, liées à la

synthèse des prostaglandines (PG) par les cellules mésangiales (Royall 1989). L'IL-1 stimule aussi la synthèse d'ICAM-1 et de VCAM-1 par les cellules endothéliales et induit la synthèse et l'expression d'ICAM-1 par des cellules mésangiales et tubulaires (Park 2000). Des études *in vitro*, démontrent enfin que l'IL-1 augmente, de façon directe, la perméabilité vasculaire des cellules endothéliales. L'IL-6 stimule pour sa part la prolifération cellulaire au niveau mésangial, augmente l'expression de la fibronectine, altère la synthèse de la matrice extracellulaire au niveau mésangial et au niveau des podocytes, et augmente la perméabilité endothéliale (Dalla Vestra 2005). Cette dernière cytokine active aussi localement le système RAS. L'essentiel de la recherche effectuée sur le rôle des cytokines pro-inflammatoires dans la ND a été mené sur le TNF- $\alpha$ . Des études expérimentales ont montré que les macrophages incubés avec des MBG de rats diabétiques sécrétaient plus de TNF- $\alpha$  que des macrophages incubés avec des MBG isolés de rats normaux (Navarro 2006) et que l'expression rénale du TNF- $\alpha$  était augmentée chez les rats diabétiques par rapport aux rats contrôles (Nakamura 1993; Navarro 2005). Une corrélation entre UAE, expression rénale du TNF- $\alpha$  et niveaux urinaires du TNF- $\alpha$  a aussi été rapportée dans des modèles expérimentaux de ND (Navarro 2005, 2006). Enfin, il a été démontré que l'augmentation d'excrétion urinaire du TNF- $\alpha$  chez le rat diabétique précédait le développement de l'albuminurie (Kalantarinia 2003). D'un point de vue clinique, un certain nombre d'études ont documenté une relation entre TNF- $\alpha$  et ND (Navarro. 1999, 2003, 2006, 2008). Dans une étude clinique visant à évaluer le rôle du TNF- $\alpha$  dans la progression de la ND, Navarro et coll. ont documenté une augmentation des niveaux urinaires de TNF- $\alpha$  chez les sujets diabétiques par rapport aux sujets non diabétiques avec augmentation de ce paramètre au cours de la progression de la ND (Navarro 2006). Fait intéressant, ce chercheur a pu établir chez ces patients une relation indépendante entre l'excrétion urinaire de TNF- $\alpha$  et l'UAE. Récemment, Navarro et coll. ont aussi documenté chez les patients avec ND une relation entre l'expression mononucléée du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 et l'albuminurie (Navarro 2008).

Quant à d'autres cytokines pro-inflammatoires, notons que Navarro et son équipe ont aussi démontré, chez le rat avec DN, une expression importante d'IL-6 dans le cortex rénal, expression associée à une augmentation urinaire d'IL-6 (Navarro 2006). Suzuki a pour sa part rapporté chez les patients avec ND une expression génique accrue d'IL-6 au niveau glomérulaire et interstitiel et a documenté une association entre l'expression rénale de cette cytokine et les altérations de prolifération et d'expansion au niveau mésangial (Suzuki 1995). Navarro a finalement aussi récemment démontré que l'IL-6 était un facteur de prédiction puissant de la progression de la ND et qu'il y avait une association significative entre les niveaux d'IL-6 et l'épaississement de la MBG (Navarro 2008).

À noter que dans des modèles expérimentaux de ND, la production rénale élevée d'IL-1 a été reliée à l'expression subséquente des facteurs chimiotactiques et de molécules d'adhésion.

#### **3.1.1.4 Facteur de transcription NF- $\kappa$ B**

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B régule de nombreux gènes potentiellement impliqués dans la progression de la maladie rénale, dont les gènes codants pour les cytokines, les chémokines comme le MCP-1 et le "Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted chemokine" (RANTES). (Guijarro 2001; Wang 1999; Zoja 1998) Ainsi que d'autres effecteurs de la réponse immunitaire innée. Mezzano et coll. ont montré que, chez les sujets avec ND, le NF- $\kappa$ B est activé dans les cellules tubulaires, glomérulaires et interstitielles, une forte augmentation d'expression de MCP-1 et de RANTES étant observée principalement dans les cellules tubulaires (Mezzano 2004). La protéinurie et l'AII ont toutes deux été impliquées dans l'activation du NF- $\kappa$ B (Mezzano 2004). Gómez-Garre et coll. ont, pour leur part, étudié l'activation rénale du NF- $\kappa$ B chez des rats chez qui une protéinurie était induite par administration d'albumine bovine sérique (BSA) et la modulation de cette protéinurie par administration d'inhibiteurs de l'AII et de l'ET-1. Ils ont pu observer au niveau rénal une atrophie tubulaire avec infiltration de cellules

mononuclées et une augmentation de l'activation du NF- $\kappa$ B, la forme active du NF- $\kappa$ B étant principalement localisée dans les tubules proximaux et les cellules interstitielles mononuclées, et moins exprimée dans les glomérules (Gómez-Garre 2001). L'administration d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'AII et/ou d'un bloqueur des récepteurs A et B de l'ET (ETA/ETB) a permis de réduire la protéinurie et les lésions rénales et a induit une diminution marquée de l'activité du NF- $\kappa$ B. Fait intéressant, cet effet était nettement plus important lors de l'administration simultanée des deux médicaments que lors de l'administration d'un seul médicament (Gómez-Garre 2001).

En conclusion, trois observations majeures supportent le concept que l'inflammation puisse être un facteur impliqué dans le développement et l'évolution de la ND:

- 1) Les niveaux sériques et urinaires de divers marqueurs inflammatoires sont plus élevés chez les sujets atteints de ND de type 2 avec protéinurie par rapport aux sujets normoprotéïniques (Navarro 2003).
- 2) Les marqueurs inflammatoires sont associés de manière indépendante à la protéinurie de 24h (Dalla 2005; Lee 2005) et les niveaux urinaires de ces marqueurs constituent des facteurs de prédiction de la protéinurie de 24h chez les patients atteints de ND (Mezzano 2004; Kalantarinia 2003; Hartner 2005).
- 3) Des polymorphismes au niveau de gènes codant pour des cytokines inflammatoires et des chémokines ont été détectés chez les sujets atteints de ND et, chez ces derniers, l'expression rénale de chémokines a été corrélée avec la protéinurie (Mezzano 2004; Morii 2003; Ruiz-Ortega 2006).

La corrélation entre marqueurs inflammatoires urinaires, l'activation rénale du NF- $\kappa$ B et l'augmentation d'expression rénale de molécules pro-inflammatoires chez les patients atteints de ND sont autant de données suggérant fortement un rôle pathogénique de l'inflammation rénale dans la ND.

### **3.1.2 Activation des systèmes RAS et ET et inflammation rénale**

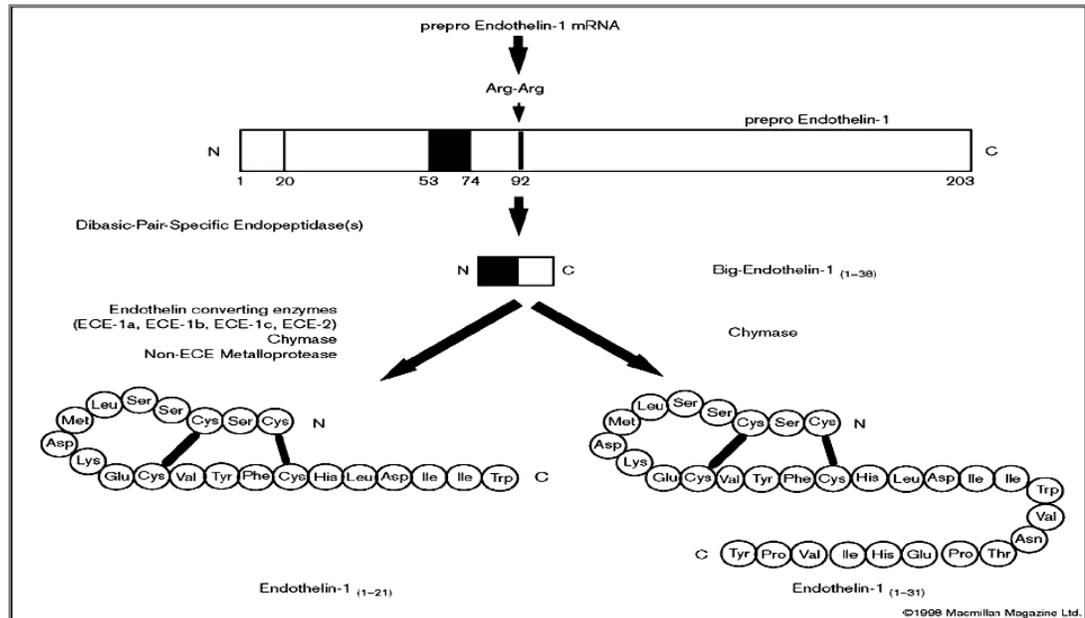
#### **3.1.2.1 Biosynthèse de l'ET**

Le système de l'ET consiste en une famille de peptides de 21 acides aminés possédant des propriétés vasoconstrictives. Il existe 3 isopeptides, soit ET-1, 2, et 3, chacun étant codé par un gène distinct et ayant des distributions tissulaires spécifiques. Des 3, ET-1 est l'isoforme endothélial majeur et le seul à être exprimé en tant que protéine dans le rein humain. L'ET-2 et l'ET-3 diffèrent de l'ET-1 respectivement par 2 et 6 acides aminés (Simonson 1993). L'ET-1 est localisé majoritairement au niveau vasculaire et rénal.

Outre les cellules endothéliales, plusieurs autres types cellulaires au niveau vasculaire et rénal synthétisent ce peptide, incluant les cellules musculaires lisses, mésangiales, épithéliales glomérulaires et tubulaires (Simonson 1993; Edwards 1990; Sorokin 2003).

Le produit du gène codant pour l'ET-1 est la pré-proendothéline constituée de 212 acides aminés. Celle-ci est clivée en BIG ET-1 de 38 acides aminés qui est en large parts inactive biologiquement. L'ET-1 active, de 21 acides aminés, est formée par clivage enzymatique de la BIG ET-1 par les enzymes de conversion de l'ET (ECE) dont existent sept isoformes à savoir : ECE-1a,-1b,-1c,-1d,-2a, 2b- et -3. Une autre voie de biosynthèse implique des chymases dérivées des mastocytes et des cellules musculaires lisses et génère un peptide de 31 acides aminés (Figure 2).

Figure 2: Biosynthèse de l'ET-1



*Barton M. Curr Opin Nephrol Hypertension 8:549-556, 1999*

La synthèse d'ET-1 sous forme active est contrôlée à plusieurs niveaux. Les mécanismes impliqués dans cette régulation sont la transcription génique, la stabilisation de l'acide ribonucléique messager (ARNm) et l'activité de l'ECE. La transcription du gène codant pour l'ET-1 est induite par de nombreux stimuli tels les substances vasoactives, les facteurs de croissance, les cytokines, les agonistes des récepteurs couplés à la protéine G et les ROS (Sorokin 2003). La libération d'ET-1 est stimulée sous l'action de vasoconstricteurs tels l'Angiotensin II (Ang II) et la vasopressine, de la thrombine, de cytokines incluant l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et le TGF- $\beta$ , de divers facteurs physico-chimiques comme le "shear stress" et l'hypoxie, ainsi que par des médicaments comme la cyclosporine. La production d'ET-1 est régulée négativement par les vasodilatateurs et les œstrogènes (Hochoer 1997). L'ET-1 exerce ses effets biologiques en se liant à deux types distincts de récepteurs soit les récepteurs de type A (ETA) et les récepteurs de type B (ETB). Ces récepteurs sont couplés à des protéines G et leur distribution tissulaire, particulièrement au niveau rénal est connue grâce à l'utilisation d'antagonistes spécifiques. L'ETA et l'ETB co-existent en abondance

dans les artérioles du cortex rénal, les glomérules, les vasa recta et les tubes collecteurs de la couche profonde de la médullaire (Dhaun 2006). L'affinité du récepteur ETA est plus élevée pour ET-1 et ET-2 que pour ET-3, et il est surexprimé par les cellules musculaires lisses. L'affinité du récepteur ETB, préférentiellement exprimé par les cellules endothéliales, est identique pour les différentes isoformes de l'ET (Simonson 1993; Dhaun 2006). Classiquement, la liaison de l'ET-1 au récepteur ETA du muscle lisse vasculaire explique les effets vasoconstricteurs et mitogéniques du peptide tandis que sa liaison à l'ETB endothélial est à l'origine d'un effet vasodilatateur transitoire par libération de NO et de prostacycline. L'activation des récepteurs ETB médie aussi l'inhibition de la croissance et de l'inflammation et à ce titre antagonise de manière efficace les effets des récepteurs ETA.

### **3.1.2.2 Effets biologiques de l'ET au niveau vasculaire et rénal**

Au niveau vasculaire, l'ET exerce ses effets biologiques en se liant aux ETA exprimés à la surface des cellules musculaires lisses et aux ETB principalement exprimés par les cellules endothéliales et les macrophages. L'activation d'ETA induit une augmentation de calcium intracellulaire et la vasoconstriction, stimule la prolifération et la migration cellulaire. L'activation d'ET-B au niveau endothélial induit un état de vasodilatation par libération de NO, de prostacycline et d'adrénomédulline. Au niveau vasculaire, l'ET-1 stimule aussi l'expression d'interleukines par les monocytes, augmente l'agrégation plaquettaire, stimule et potentialise l'effet de divers facteurs de croissance tel le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance de transformation (TGF), accroit la synthèse d'acide deoxyribonucléique (DNA) et de protéines et favorise la progression du cycle cellulaire (Nord 1996; Sasser 2007).

Au niveau du système rénal, l'ET exerce ses effets biologiques en se liant aux ETA exprimés à la surface des cellules mésangiales glomérulaires et aux ETB principalement exprimés au niveau du système collecteur. L'activation des ETA par l'ET induit au niveau rénal une réduction du flux sanguin et de la perfusion rénale et une réduction du TFG par

contraction mésangiale. L'activation de l'ETA au niveau rénal stimule en outre l'accumulation de protéines de la matrice et la prolifération des cellules mésangiales et induit dès lors la fibrose interstitielle. L'activation d'ETB semble pour sa part induire un effet de vasodilatation rénale et de stimulation de la natriurèse (Ono 1998; Dhaun 2006; Feldstein 2007). La signalisation intracellulaire dépend des types cellulaires exprimant ces récepteurs. Au niveau des cellules musculaires lisses, l'activation d'ETA induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. L'ETA stimule la phospholipase A2, la phospholipase D et la PKC (Nord 1996). L'effet mitogénique et de remodelage vasculaire induit par l'ET-1 implique l'activation de la PKC et aussi des "mitogen-activated protein kinase" (MAPK) (Simonson 1992). Ces voies de signalisation favorisent également la transcription de gènes codants pour des protéines de la matrice extracellulaire, notamment par les cellules mésangiales et musculaires lisses (Gomez-Garre 1996). L'activation de l'ETB favorise l'augmentation de la "guanosine monophosphate cyclique" (cGMP) par l'induction du NO, qui dépend pour sa part de la libération de  $Ca^{2+}$  intracellulaire (Owada 1994). En revanche, l'activation de l'ETA, inhibe l'induction de la synthase inductible de l'oxyde nitrique (iNOS) et par la suite la synthèse du NO (Beck 1995; Hirahashi 1996). Les effets biologiques de l'ET-1 au niveau rénal sont résumés dans le tableau I.

Tableau I : Effets de l'ET-1 au niveau rénal chez l'animal

<b><u>Action de l'ET-1 dans le rein-études animales</u></b>	
<b>Récepteur ET-A</b>	<b>Récepteur ET-B</b>
Vasoconstriction rénale.....	Vasodilatation rénale
Vasoconstriction corticale.....	Vasodilatation médullaire
Constriction de l'artériole afférente .....	Constriction de l'artériole afférente
Dilatation de l'artériole efférente.....	Dilatation de l'artériole efférente
Contraction des cellules mésangiales.....	Natriurèse
Prolifération des cellules mésangiales	
Accumulation de matrice extracellulaire	
Fibrose interstitielle	

*Dhaun N et al. J Am Soc Nephrol 17:943-955, 2006.*

### 3.1.2.3 Rôle de l'ET-1 dans la pathophysiologie rénale

La libération rénale de l'ET-1 peut occasionner des altérations par deux mécanismes. Premièrement, l'ET-1 peut induire une constriction au niveau des capillaires péri-tubulaires, responsables de dommages hypoxiques dans les tubules proximaux. À son tour, l'hypoxie stimule l'expression d'ET-1 et favorise la production d'ET-1 par les cellules épithéliales tubulaires. Ensuite, l'ET-1 peut favoriser l'accumulation de cellules inflammatoires et stimuler la synthèse de la matrice extracellulaire (Gomez-Garre 2001). L'étude approfondie de l'effet vasoconstricteur de l'ET au niveau rénal a démontré si l'ET-1 contracte les artérioles afférentes et efférentes, l'effet vasoconstricteur de l'ET est plus important dans les artérioles afférentes que dans les artérioles efférentes (Edwards 1990). Les études menées avec des antagonistes des récepteurs de l'ET ont pour leur part montré que la vasoconstriction au niveau cortical est médiée par l'ETA, alors que la vasodilatation au niveau médullaire est médiée par l'ETB (Dhaun 2006). D'autre part, des études *in vitro* ont montré que l'antagonisme combiné des récepteurs ETA/ETB est nécessaire pour abolir complètement les effets vasoconstricteurs d'ET-1 sur l'artériole afférente, suggérant que l'implication des deux types de récepteurs, soit ETA et l'ETB, dans cette effet. Par contre, il semble que l'antagonisme des récepteurs ETA puisse induire, à lui seul, un effet vasodilatateur de l'artériole efférente, un effet renforcé par le blocage des récepteurs ETB. Ces données suggèrent que l'ET-1 puisse moduler le tonus de l'artériole efférente via le récepteur ETA et induire ses effets vasodilatateurs via le récepteur ETB (Inscho 2005).

Les études cliniques supportent le rôle du système de l'ET dans le développement de la protéinurie chez les patients avec atteintes rénales. Ainsi, un niveau élevé d'ET-1 au niveau rénal a été associé à la protéinurie (Lehrke 2001) et un effet anti-protéinurique des antagonistes sélectifs des ETA a été rapporté (Benigni 1995). Wenzel a pour sa part démontré que l'administration pendant 12 semaines d'avosentan, un bloqueur non sélectif des récepteurs de l'ET, induisait une réduction dose-dépendante de la protéinurie chez des sujets diabétiques (Wenzel 2009). Ces résultats ont récemment été confirmés par Mann dans un large échantillon comprenant 1392 participants avec ND (Mann 2010).

Les mécanismes par lesquels une production accrue d'ET-1 au niveau rénal induit une augmentation de la protéinurie incluent une augmentation de la pression capillaire glomérulaire et de la perméabilité glomérulaire avec filtration excessive des protéines (Benigni 1995). À ce titre, il a été postulé par certains qu'un des mécanismes responsables de l'effet antiprotéinurique des bloqueurs des récepteurs de l'ETA puisse être relié à des modifications hémodynamiques glomérulaires avec une diminution de la pression capillaire glomérulaire (Jafar 2003). Des dommages au niveau des podocytes dans le rein sous l'action de l'ET-1 sont aussi incriminés dans le développement de la protéinurie en réponse à une production accrue d'ET-1 dans le rein (Morigi 2005).

La filtration excessive des protéines au niveau glomérulaire induit une réabsorption massive des protéines au niveau des cellules tubulaires proximales, un stimulus important de la production d'ET-1 (Zoja 1995). Par ses effets inflammatoires et profibrotiques, l'ET-1 apparaît comme un facteur clé de la progression des maladies rénales chroniques (Remuzzi 1998). L'activation de l'ET-1 au niveau de l'interstitium favorise la prolifération des fibroblastes, stimule la production de la matrice extracellulaire, stimule l'attraction monocytaire, induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance et enfin contribue au remodelage et à la fibrose interstitielle (Dhaun 2006). Les études faites dans des modèles animaux démontrent que les antagonistes des récepteurs de l'ET-1, indépendamment de tout effet sur la tension artérielle, ralentissent la progression de la maladie rénale, diminuent l'accumulation de collagène et les dépôts de la matrice extracellulaire, et réduisent la progression de l'insuffisance rénale Cet effet semble plus marqué avec les bloqueurs spécifiques de l'ET-1 qu'avec les bloqueurs non spécifiques (Dhaun 2006).

#### **3.1.2.4 L'inflammation comme médiateur des effets néfastes de l'Ang II et de l'ET sur la fonction rénale**

L'Ang II, le principal peptide du RAS, joue un rôle important dans la pathogenèse des maladies rénales reliées au diabète (Ruiz-Ortega 2001, 2003). Ce peptide, dont la synthèse

est stimulée par l'hyperglycémie, exerce en effet de multiples effets hémodynamiques, mais aussi trophiques, inflammatoires et profibrotiques sur les cellules rénales (Hernandez-Presa 1997). Ainsi, il induit l'activation des cellules endothéliales glomérulaires et des cellules mésangiales et la migration des cellules inflammatoires dans le rein, un processus médié par l'augmentation d'expression des molécules d'adhésion, des cytokines et des chémokines (Ruiz-Ortega 2001). Il augmente aussi, via le récepteur de type 1 de l'angiotensine (AT-1), l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires, tel que VCAM-1, ICAM-1, IL-6 et MCP-1, effet impliquant l'activation de plusieurs systèmes de signalisation intracellulaire, tel que le NF- $\kappa$ B, les MAPK, les protéines "Ras homology" (Rho) et les voies sensibles au stress oxydatif (Ruiz-Ortega 2006). Par son effet vasoconstricteur sur l'artère efférente, l'AII entraîne une élévation de la pression capillaire glomérulaire avec augmentation de la perméabilité de la membrane glomérulaire et fuite de protéines (Imanishi 1999).

Dans la néphropathie diabétique, la synthèse accrue d'AII est associée à la présence des cellules inflammatoires infiltrées, l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et la surexpression de gènes pro-inflammatoires (Mezzano 2004). Les premiers travaux reliant l'activation du NF- $\kappa$ B au RAS ont montré en fait une activation du gène de l'angiotensinogène par NF- $\kappa$ B et non pas l'inverse. Arendshorst et Lee ont étudié cette activation dans des études de liaison *in vitro* et des études de transcription *in vivo* (Arendshorst 1999; Lee 1994). Leurs résultats ont permis de classer l'angiotensinogène comme un élément de réponse inflammatoire dans la phase aiguë régulée par le facteur NF- $\kappa$ B. *In vivo*, l'AII active le NF- $\kappa$ B rénal, un effet partiellement diminué par les antagonistes AT1 ou AT2 et totalement supprimé par la combinaison des 2 antagonistes des récepteurs ou par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IECA). À noter que l'activation du NF- $\kappa$ B est médiée par les récepteurs AT-1 et AT-2 dans les cellules mésangiales, par AT1 dans les cellules tubulo-épithéliales, et enfin, par AT2 dans les cellules endothéliales (Ruiz-Ortega 2001; Wolf 2002).

Une interaction asymétrique existe entre l'AII et l'ET-1. En effet, l'ET-1 inhibe la production de rénine et donc indirectement celle d'AII, alors qu'au contraire, l'AII stimule

la production d'ET-1 au niveau endothélial ou des cellules mésenchymateuses (Spatz 1994). À noter que l'AII et l'ET-1 partagent certains effets hémodynamiques rénaux et stimulent tous deux la prolifération cellulaire et la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire. Il a été démontré que la perfusion prolongée d'AII chez le rat augmente la concentration rénale d'ET-1 (Rajagopalan 1997) et que la perfusion d'AII chez des sujets sains augmente la concentration plasmatique d'ET-1 (Jilma 1997). Ces données suggèrent une implication de l'ET-1 dans les effets de l'AII, un postulat supporté par l'effet inhibiteur des IECA sur la production rénale d'ET-1 (Largo 1997).

Diverses données supportent donc un rôle pathogénique de l'activation du système RAS et de l'ET dans l'inflammation rénale associée à la ND (Mezzano 2003; Lee 1994).

1) dans la ND, les composantes des systèmes RAS et de l'ET sont modifiées avec production rénale élevée d'AII et d'ET-1 et induction de facteurs pro-inflammatoires (Ruiz-Ortega 2000, 2001, 2003, 2006; Sasser 2007; Edwards 1990).

2) l'activation des voies de signalisation des systèmes RAS et ET induit l'expression rénale de diverses molécules inflammatoires (Gomez-Garre 1997; Dhaun 2005; Simonson 1993).

3) le blocage pharmacologique des systèmes RAS et de l'ET réduit efficacement l'inflammation rénale et la protéinurie chez l'animal (Sasser 2007; Muller 2000; Rossing 2003; Benigni 1996) et chez les patients avec ND (Andress 2009; Dhaun 2009; Wenzel 2009). Dans la ND de type 2, il a aussi été démontré que les bloqueurs des récepteurs de l'AII réduisaient l'induction du NF- $\kappa$ B et de certains facteurs inflammatoires.

#### **4.1 Stratégie thérapeutique existante de la ND**

Le blocage du système RAS constitue l'approche thérapeutique majeure dans la ND. Plusieurs études cliniques ont documenté de manière extensive les effets néphroprotecteurs des IECA et des BRA dans la ND (Figure 3). Ainsi, l'étude RENAAL a démontré une diminution de la protéinurie de 50% chez des patients diabétiques de type 2 suite à l'administration d'un BRA (Brenner 2001). Les effets rénaux et cardiovasculaires des BRA

chez les patients diabétiques et hypertendus ont aussi été évalués dans l'étude "The Program for Irbesartan Mortality and Morbidity Evaluation" (PRIME), elle-même se composant de deux larges études : l'étude "Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial" (IDNT) et "Irbesartan in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria" (IRMA). L'étude IDNT avait pour but d'évaluer l'efficacité d'un BRA, l'irbesartan, à ralentir la progression de la ND. Le critère principal de jugement était le délai de survenue d'un évènement combiné, le doublement de la créatinine plasmatique, l'insuffisance rénale terminale et le décès de toutes causes. Les résultats de cette étude ont montré que l'irbesartan réduisait le délai de survenue du doublement de la créatinine plasmatique et de l'insuffisance rénale terminale de 23%. Il réduisait en outre de 50% la protéinurie par rapport au placebo. L'étude IRMA a pour sa part démontré l'efficacité de l'irbesartan à prévenir de manière efficace le développement de la protéinurie clinique chez les patients diabétiques de type 2, hypertendus et micro-albuminuriques.

L'effet néphroprotecteur des IECA dans la ND a également été bien documenté. À titre d'exemple, l'étude de Ravid et coll. a démontré que l'enalapril réduisait l'UAE, le risque de détérioration de la fonction rénale et diminuait de 42 % le risque de progression vers la protéinurie (Ravid 1996).

Figure 3 : Effets néphroprotecteurs des BRA dans le diabète type 2

Étude	Type	Médicament <sup>1</sup>	Durée	Cible TA (mmHg)	Résultats
IRMA (n=590)	R.DA.PC	Irbesartan 150 mg Irbesartan 300 mg Placebo	2 ans	135/85	Protéinurie clinique : Placebo 14.9%, Irbesartan 150 mg 9.67%, Irbesartan 300 mg 5.2%. (p<0.001 pour Irbesartan 300 mg vs Placebo, p=0.08 pour Irbesartan 150 mg vs Placebo).
MARVAL (n=332)	R.DA.AC	Valsartan 80-160 mg Amlodipine 5-10 mg	0.5 ans	135/85	UAE réduite de 44% par Valsartan et 8% par Amlodipine (p<0.001).
IDNT (n=1715)	R.DA.PC	Irbesartan 75-300 mg Amlodipine 2.5-10 mg Placebo	2.6 ans	135/85	Irbesartan réduit le risque du critère principal de jugement <sup>2</sup> vs Placebo (RR=0.81.95% CI 0.67-0.99) et Amlodipine (RR=0.76. 95% CI 0.63-0.92). Amlodipine ne diffère pas de Placebo (RR=1.07. 95% CI 0.89-1.29).
RENAAL (n=1513)	R.DA.PC	Losartan 50-100 mg Placebo	3.4 ans	140/90	Losartan réduit le risque du critère principal de jugement <sup>3</sup> vs Placebo (p<0.02).
AC=active-contrôlée, DA=double aveugle, PC=placebo-contrôlée, Randomisé.					
<sup>1</sup> Agents antihypertenseurs additionnels; a part les IECA, les BRA et les bloqueurs de canaux calciques peuvent-être inclus.					
<sup>2</sup> Doublement de la créatinine plasmatique basale, survenue de l'insuffisance rénale terminale ou décès de toutes causes					
<sup>3</sup> Doublement de la créatinine plasmatique sérique, survenue de l'insuffisance rénale terminale ou décès.					

*Coyle JD et al Ann Pharmacother 38, 1731-1738, 2004.*

Il a été suggéré par certains chercheurs que le double blocage du système RAS par un BRA et un IECA puisse exercer, chez les patients avec ND, un effet néphroprotecteur et anti-protéinurique supérieur à celui exercé par un seul agent (Rossing 2003). L'étude ONTARGET "Ongoing Telmisartan Alone and in Combination with Ramipril Global Endpoint Trial" a évalué l'impact du telmisartan et de la combinaison telmisartan/ramipril par rapport au ramipril seul dans une population à haut risque de maladie vasculaire. Les résultats de cette étude ont démontré que l'effet du telmisartan est équivalent, comparativement au ramipril et qu'il n'y a pas de bénéfice à combiner les deux classes thérapeutiques en raison d'une majoration des effets indésirables (Liebson 2009).

## **5.1 Nouvelle stratégie thérapeutique de la ND**

### **5.1.1 Antagonistes des récepteurs ETA / ETB**

L'efficacité des antagonistes des récepteurs de l'ET a été testée dans des modèles expérimentaux de ND. Plusieurs études précliniques et cliniques indiquent que les antagonistes des récepteurs de l'ET exercent des effets anti-protéinuriques et néphroprotecteurs. Ces effets semblent impliquer une restauration de la structure et fonction podocytaire et capillaire et une stimulation de l'angiogenèse, effets vasculaires semblant impliquer l'activation du VEGF par le NO (Barton 2008).

Chez le rat diabétique, il a été démontré que les antagonistes sélectifs des récepteurs de l'ETA, ainsi que les antagonistes combinés des récepteurs ETA/ETB inhibaient la vasoconstriction rénale et réduisaient de manière significative la protéinurie, l'augmentation d'expression des protéines de la matrice et la glomérulosclérose (Sasser 2007). Dans un modèle expérimental de rejet chronique en post transplantation rénale, Braun a pu montrer que l'administration d'un antagoniste sélectif des récepteurs de l'ET-1, le LU135252, induisait une diminution de la protéinurie ainsi qu'une amélioration de la filtration glomérulaire et de la survie. Ces résultats encourageants pourraient déboucher sur une nouvelle option thérapeutique dans le contexte de rejet rénal (Braun 1999).

Testé dans un modèle expérimental de néphrite proliférative chez le rat, le bosentan réduit le développement de la protéinurie, améliore la fonction rénale, normalise le profil lipidique (cholestérol et triglycérides) et diminue significativement l'atteinte structurale glomérulaire (Gomez Garre 1996). Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle expérimental de néphrite à complexes immuns où le quinapril, un IECA, réduit la protéinurie et les lésions morphologiques et améliore la fonction rénale. Cet effet bénéfique des IECA pourrait être un résultat de la modulation de la production locale d'Ang II et ET-1 (Ortega 1997). Récemment, une étude expérimentale menée chez des souris avec ND accélérée a évalué les effets anti-protéinurique et rénoprotecteur de l'avosentan un antagoniste non sélectif des récepteurs de l'ET. Les résultats de cette étude ont démontré

une réduction significative de la protéinurie avec amélioration de la fonction rénale et réduction de l'expression génique des récepteurs ETA et ETB (Watson. 2010). Enfin, une étude réalisée par Wenzel et coll. sur 286 sujets atteints de ND et traités par BRA ou IECA a démontré que l'administration pendant 12 semaines de l'avosentan, induisait une réduction dose-dépendante de la protéinurie chez ces sujets (Wenzel 2009). Ces résultats ont récemment été confirmés par Mann et coll. dans une large étude comprenant 1392 participants avec ND (Mann 2010).

### **5.1.2 Antagonistes sélectifs des récepteurs de l'ETA**

Dhaun et coll. ont testé l'effet anti-protéinique aigu de bloqueurs sélectifs des récepteurs ETA par infusion de BQ-123 à des sujets atteints des maladies rénales chroniques, non diabétiques. Ces chercheurs ont montré une réduction de 30% de l'excrétion urinaire des protéines après 240 min d'infusion (Dhaun 2009).

Une étude clinique randomisée a enfin évalué l'effet anti-protéinurique de l'atrasentan, un bloqueur sélectif des récepteurs ETA, chez 11 sujets diabétiques de type 1 avec néphropathie clinique. Les résultats de cette étude ont eux aussi démontré que l'atrasentan réduisait significativement l'albuminurie par rapport au placebo. Ce résultat était indépendant du flux sanguin rénal et du TFG (Andress 2009).

À noter que certaines études sont actuellement en cours sur l'effet anti-protéinurique de certains bloqueurs sélectifs des récepteurs ETA. Ces études incluent l'étude NCT00920764 qui teste l'effet anti-protéinurique de l'atrasentan chez des patients avec ND traités par les inhibiteurs du système rénine angiotensine et l'étude NCT00817037 portant sur l'effet du sitaxentan sur la réduction de la protéinurie, de la TA et la progression des maladies rénales chroniques.

### **III. JUSTIFICATION DE L'ÉTUDE**

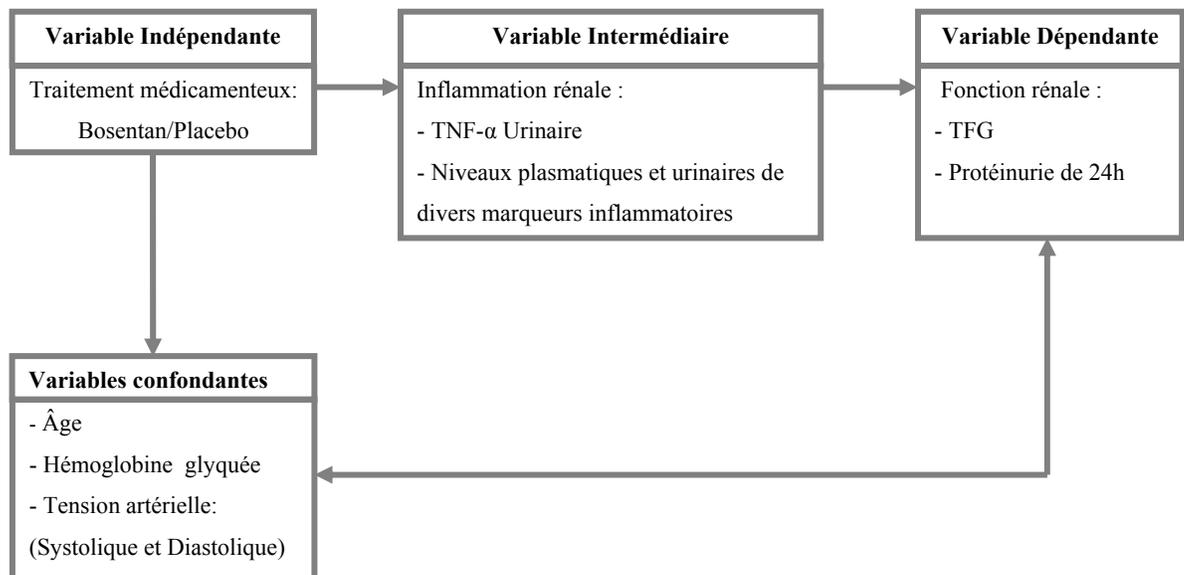
## 1.1 Modèle conceptuel et hypothèses de recherche

### 1.1.1 Modèle conceptuel

Le projet, tel qu'initialement proposé, avait pour but d'évaluer l'effet de l'administration simultanée du BRA et du bosentan, un bloqueur non spécifique des récepteurs de l'ET, sur l'inflammation et la fonction rénale chez des sujets diabétiques de type 2 avec ND.

Dans ce projet, la variable indépendante principale étudiée était le traitement médicamenteux c'est-à-dire bosentan/placebo et la variable intermédiaire était l'inflammation rénale représentée par a) le TNF- $\alpha$  urinaire et b) les niveaux plasmatiques et urinaires de divers marqueurs inflammatoires. La variable dépendante était pour sa part la fonction rénale représentée par la protéinurie de 24h et le TFG. L'âge, l'hémoglobine glyquée (HbA1C) et la tension artérielle (TA), pouvaient constituer des variables confondantes.

Figure 4 : Modèle conceptuel de l'étude



## **1.1.2 Hypothèses de recherche**

Les hypothèses de recherche formulées initialement étaient les suivantes.

### **1.1.2.1 Hypothèse principale:**

Les patients atteints de ND sous traitement combiné par BRA et bosentan ont une réduction plus forte de l'inflammation rénale et une amélioration plus importante de la fonction rénale par rapport à ceux traités uniquement par BRA.

### **1.1.2.2 Hypothèses spécifiques:**

**H1-** Les patients atteints de ND recevant un traitement conjoint par le bosentan et les BRA ont un niveau de TNF- $\alpha$  urinaire inférieur à celui des patients traités uniquement par BRA.

**H2-** Les patients atteints de ND recevant un traitement conjoint par le bosentan et les BRA ont des niveaux plasmatiques et urinaires de facteurs inflammatoires inférieurs à ceux des patients traités uniquement par des BRA.

**H3-** Les patients atteints de ND recevant un traitement conjoint par le bosentan et les BRA ont un taux de protéinurie de 24h inférieur à celui des patients traités uniquement par BRA.

**H4-** Les patients atteints de ND recevant un traitement conjoint par le bosentan et les BRA ont un TFG supérieur à celui des patients traités uniquement par BRA

## **1.2 Stratégie de recherche**

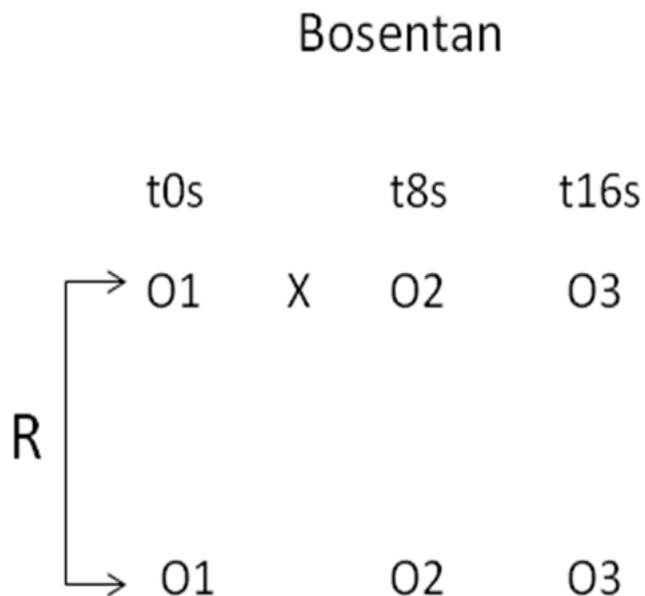
### **1.2.1 Devis de recherche**

La stratégie choisie est l'expérimentation provoquée. Le devis est de type pré-test, post-test avec groupe témoin aléatoire. L'étude vise à étudier l'effet d'une variable indépendante, le bosentan, sur la réduction de l'inflammation rénale (variable intermédiaire) et sur l'amélioration de la fonction rénale (variable dépendante).

Trente-six patients diabétiques de type 2 atteints de néphropathie clinique traités par les BRA seront recrutés et randomisés en double aveugle: le groupe expérimental recevra le bosentan pendant 16 semaines à la dose de 62.5 mg (2 fois par jour, matin et soir) pendant 4 semaines suivi par une dose de 125 mg (2 fois par jour, matin et soir) pendant 12 semaines. Le groupe contrôle recevra pour sa part un placebo.

Les patients éligibles auront une protéinurie de 24h d'au moins 300 mg/24h et un niveau de clairance de la créatinine  $\geq 30$ ml/min.

Figure 5: Le devis de recherche.



O1 : représente l'évaluation pré-test à 0 semaines.

O2 : représente la première évaluation post-test à 8 semaines.

O3 : représente la deuxième évaluation post-test à 16 semaines.

R : représente la randomisation.

X : représente l'intervention à l'étude, (le traitement par le bosentan).

## **1.2.2 Validité de la stratégie de recherche**

### **1.2.2.1 Biais liés à la validité interne :**

- Biais de mortalité expérimentale : biais occasionné par des taux d'abandon différents. Application du principe de "l'intention-to-treat" signifiant que tous les participants de l'étude seront inclus dans l'analyse finale comme faisant partie du groupe auquel ils ont été randomisés.

### **1.2.2.2 Biais liés à la validité externe :**

- Biais d'interaction entre les différentes composantes d'une intervention : ce biais a été éliminé par l'introduction du placebo.

## **1.3 Planification opérationnelle de la recherche**

### **1.3.1 Définition et sélection de la population à l'étude**

#### **1.3.1.1 Population cible**

La population à l'étude est constituée de patients diabétiques de type 2 atteints de néphropathie clinique traités par BRA. Après recrutement, ces sujets sont randomisés en double aveugle pour recevoir soit un placebo soit le bosentan. Il est prévu que le recrutement des sujets se fasse principalement via les cliniques de protection rénale du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). La participation d'autres cliniques comme celles d'endocrinologie du CHUM sera sollicitée. Les patients éligibles présentant les critères d'inclusion et ne démontrant aucun critère d'exclusion seront inclus dans l'étude.

### 1.3.1.2 Critères d'inclusion

- Hommes et femmes dont l'âge est  $\geq 18$  ans ayant un poids corporel  $\geq 40$  kg,
- Femmes non enceintes, stérilisées chirurgicalement, post-ménopausées ou avec infertilité documentée, ou femmes à potentiel de procréation utilisant des dispositifs contraceptifs intra-utérins,
- Patients diagnostiqués diabétiques de type 2 atteints de néphropathie clinique documentée ayant une protéinurie de 24h d'au moins 300mg/24h et traités par BRA,
- Patients dont la clairance de créatinine est  $\geq 30$ ml/min,
- Patients présentant un état médical stable durant une période de 3 mois précédant le recrutement et n'ayant subi aucune modification de leur thérapeutique médicamenteuse depuis ce temps,
- Patients chez qui un consentement écrit et éclairé a été obtenu.

### 1.3.1.3 Critères d'exclusion

- Patients ayant des antécédents médicaux de maladies pulmonaires obstructives chroniques sévères, d'insuffisance cardiaque ou présentant une maladie coronarienne instable dans les 12 derniers mois.
- Patients dont les taux d'hémoglobine (Hb) ou d'hématocrite sont inférieurs à 30% des valeurs normales.
- Patients présentant des désordres hépatiques ou des niveaux d'enzymes hépatiques (AST et/ou ALT) supérieurs à la limite normale,
- Patients dont la tension artérielle systolique est  $< 110$ mm Hg,
- Patients ayant des niveaux d'albumine plasmatique  $< 30$ g/L,
- Patients atteints de cancers, d'infections aiguës ou de maladies inflammatoires chroniques,
- Patients dont la clairance de la créatinine est  $< 30$ ml/min,

- Patients traités par anti-inflammatoires (excepté statines et faible dose (80mg) d'aspirine) ou par anticoagulants,
- Patientes enceintes ou qui allaitent,
- Patients traités par bloqueurs de récepteurs de l'ET, inhibiteurs de la phosphodiesterase type 5 ou inhibiteurs de la calcineurine dans les 2 mois précédant l'étude. Patients traités par des prostanoides, du fluconazole ou du glibenclamide,
- Patients ayant une hypersensibilité documentée au bosentan.

#### **1.3.1.4 Échantillon**

La taille de l'échantillon a été calculée pour fournir une puissance statistique suffisante lors du test des différences entre les 2 groupes (bosentan/placebo) à 0 et 16 semaines.

Les calculs de la taille d'échantillon ont été déterminés par les paramètres suivants :

1. Mise en évidence d'une différence cliniquement significative de 10% de la valeur moyenne à la base pour le TNF- $\alpha$  urinaire et de 15 % pour la protéinurie de 24h entre les 2 groupes (intervention et placebo). Ces données dérivent de résultats générés par Navarro (Navarro 2005).
2. Déviation standard pour le TNF- $\alpha$  de 1.8 et pour la protéinurie de 24h de 0.9.

À partir de ces paramètres, nous avons déterminé que la taille de l'échantillon total devait s'établir à 36 sujets, c'est-à-dire 18 sujets par groupe afin d'offrir une puissance statistique supérieure à 80% pour un niveau de signification  $\alpha$  de 0.05. Il s'agit d'un échantillon probabiliste de type aléatoire simple.

#### **1.3.1.5 Méthode de collecte des données**

Il avait été prévu que toutes les données recueillies auprès des patients éligibles seraient recueillies dans un formulaire de dépistage/visite initial afin de collecter l'ensemble des données principales (numéro d'identification du patient, âge, sexe, critères

d'inclusion et d'exclusion, données démographiques, cliniques, données de laboratoires, traitements suivis incluant le traitement par les BRA).

Pour les six visites subséquentes, des données concernant l'évolution clinique, biologique, la posologie du médicament administré ainsi que ses effets indésirables devaient être recueillies dans des formulaires de visites numérotés en fonction de l'ordre chronologique de chaque visite médicale pendant une période de 16 semaines.

Quant aux prélèvements sanguins et urinaires, ils seraient effectués de la manière suivante :

- Les tests biologiques et inflammatoires seraient effectués selon la distribution présentée dans le Tableau II, donc au cours des visites 2, 4 et 6.
- Les tests inflammatoires plasmatiques et urinaires seraient conservés à une température de -20°C jusqu'à la fin d'étude.
- Afin d'évaluer la fonction rénale, une collecte urinaire de 24h serait effectuée : pour tester la protéinurie de 24h et le TFG, et ce, à chaque visite.

Tableau II : La distribution des tests au cours de l'étude.

Semaines	-4	0	4	8	12	16
Visites	V1	V2	V3	V4	V5	V6
Consentement éclairé	X					
Critères de sélection/inclusion	X	X				
Histoire Médicale	X <sup>A</sup>	X <sup>A</sup>				
Examen Physique	X	X	X	X	X	X
Critères d'évaluation :						
-Marqueurs inflammatoires urinaires		X <sup>B+C</sup>		X <sup>B+C</sup>		X <sup>B+C</sup>
-Fonction Rénale <sup>C</sup>	X <sup>C</sup>					
-Marqueurs inflammatoires plasmatiques et stress oxydatif <sup>D</sup>		X		X		X
Effets Secondaires			X	X	X	X
Médications Concomitantes	X	X	X	X	X	X
Tests de Laboratoires						
-Profil lipidique	X	X	X	X	X	X
-Biochimie <sup>E</sup>						
-Hématologie <sup>F</sup>						

<sup>A</sup> Revue des événements médicaux durant la phase de sélection

<sup>B</sup> Niveaux urinaires d'ET1, AII, TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, 8- isoprostane.

<sup>C</sup> Urée, créatinine, 24h UAE, taux de filtration glomérulaire, électrolytes, bicarbonates.

<sup>D</sup> Niveaux plasmatiques d'ET1, AII, TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, CRP, 8-isoprostane.

<sup>E</sup> Glucose, créatinine, albumine, tests hépatiques.

<sup>F</sup> Formule numération sanguine (GB, GB, plaquettes, hémoglobine, hématocrite) et plaquette.

### 1.3.1.6 Analyse initialement projetée des données

Analyse descriptive: L'analyse principale des données devait initialement avoir pour but de comparer les changements observés au niveau des paramètres inflammatoires et de la fonction rénale entre le groupe bosentan et le groupe placebo. Les données continues devaient être exprimées en moyenne  $\pm$  déviation standard et leur analyse statistique devait être faite en utilisant soit un test de -t- pour 2 échantillons indépendants avec distribution normale des variables, soit un test de Wilcoxon non paramétrique au cas où la distribution des variables ne serait pas normale. La corrélation entre les changements dans les paramètres inflammatoires et rénaux devait être déterminée en utilisant le coefficient de

corrélation de Pearson et les tests de corrélation de Spearman. La régression linéaire multiple devait être effectuée pour tenir compte de l'impact possible de facteurs confondants potentiels tels l'âge, les niveaux d'HbA1C, la tension artérielle systolique et diastolique. Les analyses statistiques devaient être effectuées à l'aide du logiciel SPSS version 15.0 pour Windows; l'erreur de type I était fixée à 5% et un  $p < 0.05$  était considéré comme statistiquement significatif.

## **IV. RÉSULTATS DE L'ÉTUDE**

Les résultats de cette étude ont été présentés au 7<sup>ème</sup> congrès de la société Asie Pacifique d'athérosclérose et de maladies vasculaires, tenu à Cairns du 26 au 29 octobre 2010.

Suite à des difficultés majeures de recrutement, nous n'avons pu recruter dans notre étude qu'un seul patient au lieu des trente-six patients initialement prévus!! Cette impossibilité de procéder au recrutement de patients dérive probablement essentiellement du caractère rigide des critères d'inclusion et d'exclusion appliqués dans notre étude et de la difficulté à obtenir une collaboration enthousiaste de l'ensemble des collègues sollicités au CHUM pour effectuer le recrutement de patients.

Nous regrettons d'autant plus cette situation que notre étude était pionnière dans le domaine et se distinguait par le fait qu'elle constituait le seul essai contrôlé randomisé à double insu qui devait permettre de mieux connaître l'effet des bloqueurs des récepteurs de l'ET-1 sur l'inflammation rénale.

Heureusement, le seul patient randomisé dans l'étude a reçu le traitement expérimental, le bosentan, pendant 16 semaines. Nous présentons sous forme de rapport de cas clinique les résultats intéressants sur le plan anti-inflammatoire et néphroprotecteur obtenus chez ce sujet.

## **1.1 Présentation du cas clinique**

Il s'agit d'un patient, de sexe mâle âgé de 58 ans, présentant les antécédents médicaux suivants : Diabète de type 2 avec ND depuis 10 ans, hypertension artérielle ancienne et dyslipidémie sous traitement. La fonction rénale de ce patient est stable avec une créatinine plasmatique de 93 $\mu$ mol/ml, une clairance de la créatinine plasmatique de 80ml/min. Sa fonction cardiaque est normale avec une fraction d'éjection à 66%. Ce patient est traité par i) des antidiabétiques (Insuline Levemir 36 unit depuis 2008, glucophage 500 mg (Metformine) et gluconorm 2 mg (Répaglinide)), ii) des antihypertenseurs (Micardis<sup>+</sup> 80/12.5 mg (Telmisartan+Hydrochlorothiazide), Monacor 5 mg (Bisoprolol), Norvasc 10 mg (Amlodipine) et Hydrodiuril 12.5 mg (Hydrochlorothiazide) et iii) par un

hypolipémiant (Lipitor 40 mg (Atorvastatin)). À noter que le patient est sous BRA (Telmisartan 80 mg) depuis 2008.

## **1.2 Évolution des paramètres cliniques et biologiques du patient au cours de l'étude**

À son entrée dans l'étude (V1) le patient présente les paramètres cliniques et biologiques suivants : une TA à 146/68 mmHg avec un poids de 78.8 kg. Sa protéinurie est à 851.7 mg/jour, sa clairance de la créatinine est de 1.6 ml/sec avec une créatinine plasmatique à 102  $\mu$ mol/L et une natriurèse à 150 mmol/L. Son bilan hépatique est normal, son Hb est à 135 g/L (Tableau III).

Quatre semaines plus tard, soit à V2 (temps 0 de l'étude), il reçoit le bosentan à la dose de 62.5 mg, 2 fois par jour, et ce, pendant 4 semaines. Les données cliniques et biologiques du patient avant la prise du bosentan sont présentées dans le Tableau III. Ces données ne montrent pas de variations significatives d'un point de vue clinique par rapport à celles enregistrées lors de V1, à l'exception d'une diminution de la natriurèse. La protéinurie est stable à 906.8 mg/jour. On note un bilan lipidique et hépatique normal, une glycémie à 4.8 mmol/L avec un Hb1AC à 0.079%.

Quatre semaines plus tard, soit à la V3, le patient reçoit le bosentan à la dose maximale soit 125 mg, 2 fois par jour. Cette dose sera maintenue pendant les 12 semaines suivantes, soit jusqu'à la fin de l'étude. Ses paramètres cliniques et biologiques à V3, soit après 4 semaines de traitement par le bosentan à la dose de 62.5 mg, sont stables malgré une baisse du taux d'Hb à 125 g/L et une augmentation de la glycémie à 12.4 mmol/L (Tableau III).

Les paramètres cliniques et biologiques mesurés aux V4 et V5, soit quatre et huit semaines après la prise de bosentan à la dose de 125 mg sont présentés au tableau III. Parmi

les paramètres montrant des variations à V4 par rapport à V3, on note une baisse importante de la protéinurie de 24H à 615.6 mg/jour, un léger gain pondéral de 1.6 kg et une glycémie à 10.1 mmol/L. A V5, on observe une élévation du taux d'Hb, une réduction pondérale de 1kg et une baisse de la glycémie à 8.8 mmol/L.

Les paramètres cliniques et biologiques mesurés à la fin de l'étude (V6), soit 12 semaines après la prise de bosentan à la dose de 125 mg montrent une réduction de la protéinurie de 24h à 585 mg/jour, sans altération concomitante de la TA (142/70 mmHg) et de la filtration glomérulaire (clairance de la créatinine à 1.5 ml/sec). On note également un poids à 81 kg vs 78.4 kg à V1, une trace d'œdème aux membres inférieurs, une Hb à 126 g/L, un sodium urinaire à 108 mmol/L et une glycémie à 7 mmol/L. Le bilan glycémique (HbA1C= 0.076%) et hépatique est normal.

Au cours de l'étude, le patient a donc présenté une légère prise de poids, une élévation de sa glycémie sans élévation de l'HbA1C, une baisse de 0.9 g/dl de l'Hb probablement par dilution et enfin une congestion nasale transitoire dans les 6 premiers jours suivants l'administration du bosentan, avec possibilité d'infection des voies respiratoires supérieures. Ces événements pourraient être reliés à l'administration du bosentan. À noter qu'aucune complication clinique découlant de la rétention hydrique n'a été observée. Nous n'avons pas objectivé de baisse de la natriurèse ni d'altérations des enzymes hépatiques.

Tableau III : Évolution des paramètres cliniques et biologiques du patient au cours de l'étude

Paramètres Cliniques et Biologiques	Jan-09	Feb-09	Mar-09	Apr-09	May-09	Jun-09
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
TA (mmHg)	146/68	130/64	132/68	130/62	132/58	142/70
FC (Battements/minute)	60	58	58	56	60	58
Poids (Kg)	78.4	78.8	78.7	80.3	79.2	81
Volume urinaire (L/24H)	1.7	1.67		1.35		1.5
UAE (mg/d)	851.7	906.8		615.6		585
CrU (mmol/L)	13.5	12.4		12.3		12.3
Na Urinaire (mmol/L)	150	93		119		108
Cl de creatinine 24H (mL/s)	1.6	1.5		1.5		1.5
Hb (g/L)	135	133	125	128	136	126
Plaquettes X10 <sup>9</sup>	350	313	336	280	390	285
Créatinine (µmol/L)	102	91	103	99	99	94
Na (mmol/L)	141	141	143	141	135	138
Bicarbonate (mmol/L)	25	22		23		28
Albumine (g/L)	42	41	42		44	43
AST (UL)	20	21	26	21	26	27
ALT (UL)	23	23	32	25	41	38
Bil total (µmol/L)		9	10	8	7	13
ALP (UL)	90	82	71	66	84	68
Chol (mmol/L)		3.08				3.19
Trig (mmol/L)		1.8				1.52
LDL (mmol/L)		1.26				1.45
HDL (mmol/L)		3.1				3.1
Glucose (mmol/L)		4.8	12.4	10.1	8.8	7
Hb A1C (%)		0.079				0.076

TA : Tension artérielle; FC : Fréquence cardiaque; UAE : Excrétion urinaire d'albumine; CrU : Créatinine urinaire; Na : Sodium; AST : Aspartate aminotransférase; ALT : Alanine aminotransférase; Bil: Bilirubine; ALP : Phosphatase alcaline; Chol : Cholestérol; Trig : Triglycérides; LDL : Lipoprotéines de faible densité; HDL : Lipoprotéines de haute densité; HbA1C : Hémoglobine glyquée.

### 1.3 Évolution des marqueurs inflammatoires sériques et urinaires au cours de l'étude

Les marqueurs inflammatoires sériques et urinaires ont été analysés dans notre laboratoire par technique "Enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA), ainsi que par méthodes radio-immunologiques (RIA) et Luminex. Pour la mesure de l'ET urinaire, nous avons fait appel à la collaboration de Dr Neeraj Dhaun, du "Queen's Medical Research Institute" de l'Université d'Edinburgh. L'analyse du TNF- $\alpha$  urinaire par ELISA ultra-

sensible a été pour sa part faite par le Dr Juan F. Navarro-González, néphrologue de l'Université de Nuestra Señora de Candelaria en Espagne.

Nos résultats démontrent une réduction des niveaux urinaires de VCAM-1, ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$  et ET-1 au cours de l'étude. (Figure 6, A et B). Une réduction des niveaux sériques de TNF- $\alpha$  et d'ICAM-1 est en outre observée (Figure 7, A et B).

Figure 6 : Niveaux des marqueurs inflammatoires urinaires au cours de l'étude

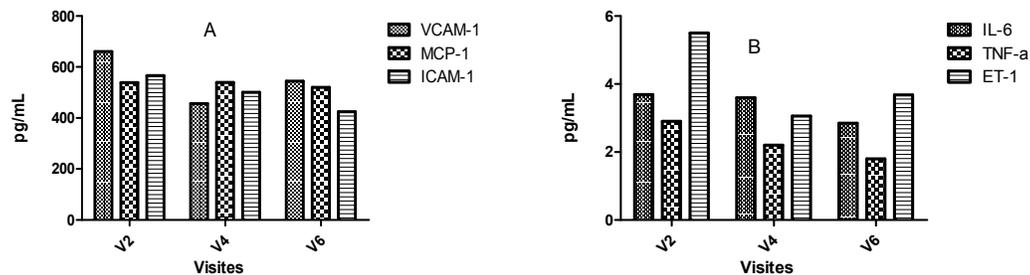
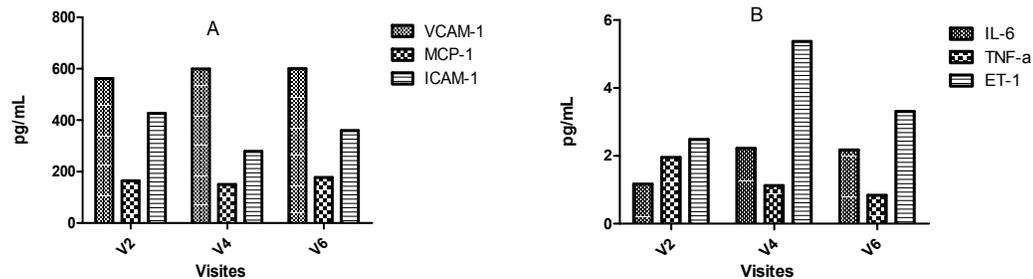


Figure 7 : Niveaux des marqueurs inflammatoires sériques au cours de l'étude



Chez notre sujet, l'administration du bosentan induit une réduction substantielle de l'ordre de 35% de la protéinurie. Les niveaux de protéinurie et des divers marqueurs inflammatoires urinaires et sériques au cours de l'étude sont présentés dans les tableaux ci-dessous (Tableau IV et V).

Tableau IV : Protéinurie et marqueurs inflammatoires urinaires.

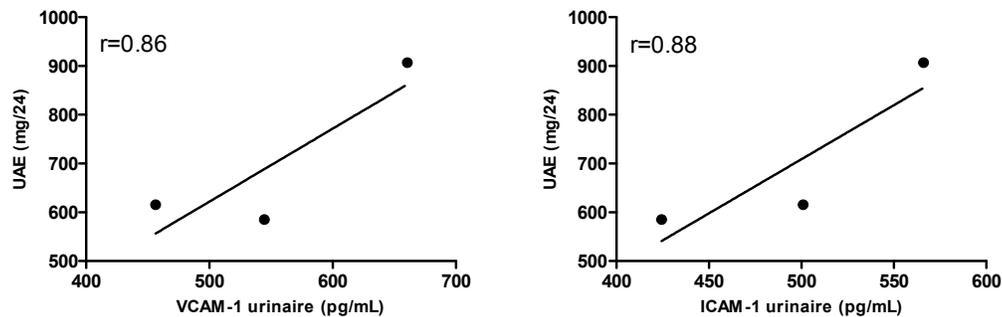
Urine (pg/mL)							
Visites	UAE (mg/24h)	VCAM-1	MCP-1	ICAM-1	IL-6	TNF- $\alpha$	ET-1
V2	906.80	660.51	539.14	566.08	3.69	2.90	5.50
V4	615.60	456.46	539.86	500.96	3.60	2.20	3.06
V6	585.00	544.60	520.57	424.41	2.85	1.80	3.68

Tableau V : Protéinurie et marqueurs inflammatoires sériques.

Sérum (pg/mL)							
Visites	UAE (mg/24h)	VCAM-1	MCP-1	ICAM-1	IL-6	TNF- $\alpha$	ET-1
V2	906.80	561.82	164.00	426.20	1.17	1.95	2.48
V4	615.60	599.09	149.45	278.30	2.22	1.12	5.37
V6	585.00	600.00	176.73	359.82	2.17	0.84	3.31

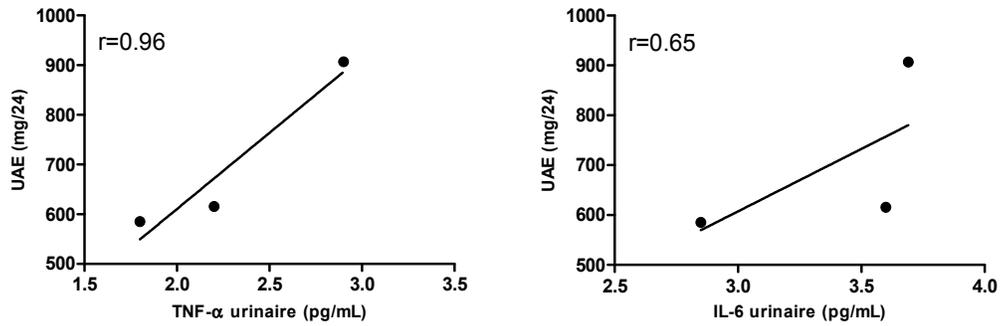
Nos résultats démontrent une corrélation positive entre la réduction de la protéinurie et les changements des niveaux urinaires de VCAM-1 ( $r=0.86$ ) et d'ICAM-1 ( $r=0.88$ ) (Figure 8).

Figure 8 : Corrélation entre la protéinurie et les niveaux urinaires de VCAM-1 et d'ICAM-1



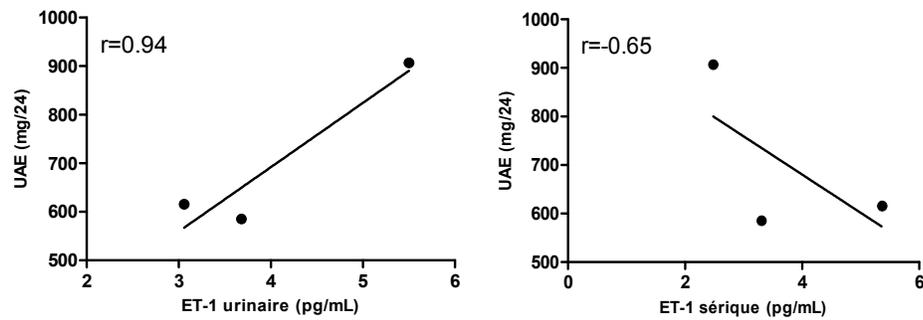
Une corrélation est aussi observée entre la réduction de la protéinurie et la diminution des niveaux urinaires de TNF- $\alpha$  ( $r=0.96$ ) et d'IL-6 ( $r=0.65$ ). (Figure 9).

Figure 9: Corrélation entre la protéinurie et les niveaux urinaires de TNF- $\alpha$  et d'IL-6



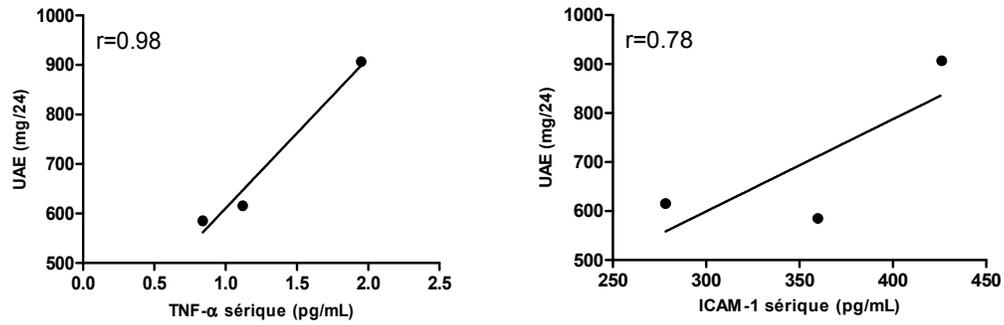
La réduction de la protéinurie est aussi positivement corrélée au changement des niveaux urinaires de l'ET-1 ( $r=0.94$ ) et négativement corrélée au changement des niveaux sériques de l'ET-1 ( $r=-0.65$ ) (Figure 10).

Figure 10: Corrélation entre la protéinurie et les niveaux urinaires et sériques de l'ET-1



La réduction de la protéinurie est enfin positivement corrélée au changement du niveau sérique de TNF- $\alpha$  ( $r=0.98$ ) et d'ICAM-1( $r=0.78$ ) (Figure 11).

Figure 11: Corrélation entre la protéinurie et les niveaux sériques de TNF- $\alpha$  et d'ICAM-1



## **V. DISCUSSION**

La reconnaissance du rôle joué par l'activation du système inné et l'inflammation chronique à bas bruit dans la pathogenèse du diabète de type 2 a profondément modifié notre regard sur cette maladie. Aujourd'hui, le diabète de type 2 est de plus en plus largement reconnu comme une maladie inflammatoire, et l'inflammation, par ses effets sur divers facteurs métaboliques et hémodynamiques tels l'insulinorésistance, l'hyperglycémie et la DE, a récemment été proposée comme mécanisme pathogénique de la ND. Supportant ce concept, de nombreuses études expérimentales et cliniques ont démontré le rôle de diverses molécules inflammatoires dans la pathogenèse de la ND et, de manière encore plus intéressante, des études menées chez l'animal ont permis de démontrer que l'effet bénéfique de diverses stratégies thérapeutiques sur la fonction rénale était associé à des effets anti-inflammatoires (Utimura 2003; Wu X 2006; Yozai 2005; Tone 2005).

Au cours des dernières années, il a été démontré que les patients avec ND de type 2 présentaient une élévation des niveaux sériques, urinaires ou de l'expression rénale de divers marqueurs inflammatoires incluant le TNF- $\alpha$  (Navarro 2003), l'IL-6 (Suzuki 1995), l'ICAM-1 (Clausen 2000; Guler 2002, Rubio-Vallera 2007), le VCAM-1 (Schmidt 1996; Stehouwer 2002; Rubio-Vallera 2007) et le MCP-1 (Morii 2003; Takebayashi 2006, Chiarelli 2002; Tashiro 2002). L'accroissement de ces facteurs était observé au cours de la phase précoce de la maladie et, fait intéressant, était associé de manière indépendante à la protéinurie (Navarro 2003; Wu 2010; Rubio-Guerra. 2009). Chez les sujets diabétiques de type 2, un rôle des marqueurs inflammatoires comme facteur de prédiction de la protéinurie (Hartner 2005) et de progression de la ND (Navarro 2006; Persson 2008; Tam 2009) a aussi été proposé. Prises dans leur ensemble, ces données identifient l'inflammation comme un élément clé du développement et de la progression de la ND. De manière encore plus spécifique, les données démontrant que l'accroissement de divers paramètres inflammatoires dans l'urine, tels le TNF- $\alpha$  et le MCP-1, prédit l'UAE chez les patients avec ND (Navarro 2003; Wu 2010) et que l'augmentation d'expression rénale du MCP-1 corrèle avec l'importance de la protéinurie chez ces sujets (Morii 2003) supportent un rôle de l'inflammation rénale dans la pathogenèse de la ND.

Parmi les mécanismes pouvant contribuer au développement de l'inflammation rénale, l'activation des systèmes RAS et de l'ET a reçu un intérêt particulier en raison i) de l'augmentation de production locale de l'Angiotensin II (AII) et de l'ET dans la ND (Mezzano 2003; Lee 1994); ii) des effets pro-inflammatoires de l'AII et de l'ET au niveau rénal (Ruiz-Ortega 2000, 2001, 2003, 2006; Sasser 2007; Edwards 1990); iii) de l'effet anti-inflammatoire exercé au niveau rénal par blocage pharmacologique de ces 2 systèmes chez l'animal (Wolf 1998; Chade 2003; Sasser 2007; Muller 2000; Benigni 1996) et enfin de la réduction des niveaux urinaires de MCP-1 et d'IL-6 lors de l'administration de BRA chez des sujets diabétiques de type 2 avec ND (Ogawa 2009). De manière importante, un effet anti-protéinurique cliniquement significatif des bloqueurs des récepteurs de l'ET a aussi été observé chez les patients avec ND traités par IECA ou BRA (Wenzel 2009; Mann 2010), indiquant un effet néphroprotecteur additif de ces médicaments par rapport au traitement standard. Les mécanismes responsables de cet effet sont inconnus, mais ne semblent pas impliquer de changements hémodynamiques ou glomérulaires (Wenzel 2009; Mann 2010). Au vu des propriétés pro-inflammatoires de l'AII et de l'ET-1 et du rôle pathogénique de l'inflammation dans les effets délétères exercés par ces peptides au niveau rénal, il est possible, sinon vraisemblable, que les effets néphroprotecteurs des bloqueurs de récepteurs de l'ET puissent être reliés à leur effet anti-inflammatoire au niveau rénal. Cette possibilité est appuyée par de récentes études démontrant que des bloqueurs de récepteurs A de l'ET, réduisent l'inflammation rénale chez l'animal (Sasser 2007) et exercent des effets anti-protéinuriques dans un modèle expérimental de néphrite proliférative caractérisée par des lésions inflammatoires au niveau glomérulaire (Gomez-Garre 1996).

Notre étude démontre pour la première fois que l'administration d'un bloqueur non spécifique des récepteurs de l'ET-1 à un sujet diabétique avec néphropathie clinique traité par BRA, réduit divers marqueurs inflammatoires sériques et urinaires. Cet effet anti-inflammatoire s'accompagne d'une réduction cliniquement significative de la protéinurie de l'ordre de 35%. Ces résultats confirment ceux de deux études antérieures démontrant que l'avosentan, un bloqueur non-sélectif des récepteurs de l'ET, réduit l'albuminurie de

l'ordre de 40% chez des sujets diabétiques avec néphropathie clinique traités par IECA ou BRA (Wenzel 2009; Mann 2010).

Une notion largement véhiculée dans la littérature est que l'effet des bloqueurs des récepteurs de l'ET sur l'albuminurie s'opère par inhibition du récepteur rénal ETA et que les antagonistes non-spécifiques de l'ET exercent des effets rénoprotecteurs moindres que les antagonistes sélectifs. Ce concept, issu d'études expérimentales (Ding 2003) et très controversé (Benigni 1996, 1998; Watson 2010) se doit cependant d'être réexaminé au vu des différences de distribution des récepteurs de l'ET chez l'homme et l'animal, et des études cliniques sont donc essentielles pour identifier le type de récepteurs impliqués dans cet effet. L'avosentan et le bosentan étant tous deux des bloqueurs non sélectifs des récepteurs de l'ET, des études prospectives utilisant des agents ciblant sélectivement les ETA ou ETB sont requises pour élucider si, et jusqu'à quel point, le récepteur de type B est important pour les effets néphroprotecteurs exercés par les antagonistes de l'ET. Nous attendons, à cet effet, le résultat de plusieurs études cliniques évaluant les effets anti-protéïnuriques d'antagonistes sélectifs des récepteurs A de l'ET comme l'atrasentan, le darusentan et le sitaxentan (Barton 2010).

Les variations de divers facteurs, dépendamment ou indépendamment du traitement, sont susceptibles d'influencer la protéïnurie. En accord avec les études de Wenzel et Mann (Wenzel 2009; Mann 2010), nos résultats indiquent que l'effet anti-protéïnurique des bloqueurs des récepteurs de l'ET dans la ND se produit indépendamment de changements hémodynamiques, tel que reflété par l'absence de fluctuations de la TA et du TFG durant notre étude.

La réduction des niveaux de cholestérol constitue un autre facteur pouvant diminuer la protéïnurie (Bianchi 2003; Keech 2005) et il a été suggéré par Wenzel et coll. que l'effet anti-protéïnurique de l'avosentan puisse être, au moins en partie, relié à l'effet

hypocholestérolémiant de cette drogue. Cette hypothèse n'est pas appuyée par nos résultats qui démontrent l'absence d'effet hypocholestérolémiant du bosentan durant notre étude.

L'apport sodé et l'apport protéique sont d'autres variables pouvant avoir influencé la protéinurie indépendamment du traitement par le bosentan. Nos données montrant l'absence de fluctuation importante de la natriurèse au cours du traitement par le bosentan indiquent que l'effet anti-protéinurique observé n'est probablement pas attribuable à une réduction de l'apport sodé.

Tel que mentionné précédemment, les antagonistes des récepteurs de l'ET ont des effets anti-inflammatoires (Dhaun 2006) et un rôle de l'inflammation dans la pathogenèse des maladies rénales protéinuriques est bien démontré. Nos résultats démontrent pour la première fois que l'effet anti-protéinurique du bosentan s'accompagne chez le sujet avec ND d'une réduction des niveaux systémiques et urinaires de divers facteurs inflammatoires incriminés dans le développement ou la progression de la ND. La diminution de la protéinurie est positivement associée à la réduction de ces marqueurs, suggérant que le bosentan puisse exercer des effets néoprotecteurs par ses propriétés anti-inflammatoires. Cette hypothèse est appuyée par l'observation que l'administration du bosentan dans un modèle expérimental d'insuffisance rénale inhibe l'activation rénale du NF- $\kappa$ B, réduit l'infiltration monocytaire et exerce un effet néoprotecteur (Muller 2000).

De toutes les molécules inflammatoires potentiellement impliquées dans la pathogenèse de la ND, le TNF- $\alpha$  a été le plus étudié. Le TNF- $\alpha$  exerce au niveau rénal divers effets délétères pouvant être pertinents à la pathogenèse de la ND. Ainsi, il contribue à la rétention sodée et l'hypertrophie rénale, stimule la production rénale de ROS, augmente la production de facteurs chémoattractants par les cellules tubulaires épithéliales et altère la fonction de barrière de la paroi capillaire glomérulaire, induisant en conséquence une augmentation de la perméabilité à l'albumine (MaCarthy 1998; Dipetrillo 2003; Navarro 1999, 2003, 2006, 2008; Kalantarinia 2003).

Il a été démontré par Navarro et coll. que les sujets atteints de ND avaient une augmentation des niveaux sériques et urinaires de TNF- $\alpha$  ainsi qu'une augmentation de son expression rénale (Navarro 2006). Une association positive entre niveaux urinaires et sériques du TNF- $\alpha$  et protéinurie, ainsi qu'une corrélation de ces paramètres avec la sévérité de la maladie, a aussi été documentée chez ces sujets. Fait intéressant, il a aussi été démontré dans un modèle expérimental de diabète induit par injection de streptozotocine (STZ) que l'augmentation d'excrétion urinaire de TNF- $\alpha$  précédait le développement de l'albuminurie (Kalantarinia 2003) et que cette augmentation d'UAE était positivement corrélée à une augmentation d'expression rénale de TNF- $\alpha$ .

En accord avec un rôle pathogénique du TNF- $\alpha$  dans la ND, nos résultats démontrent que l'effet anti-protéinurique du bosentan est associé à une réduction marquée, de l'ordre de 40%, des niveaux sériques et de l'excrétion urinaire du TNF- $\alpha$ . Au vu des effets délétères de cette cytokine sur la fonction rénale, ces résultats suggèrent que la modulation du TNF- $\alpha$  puisse représenter dans le futur une stratégie intéressante dans la prévention et le traitement de la ND. Cette vision est supportée par l'observation que l'administration de pentoxifylline, un agent prévenant l'augmentation d'expression rénale et d'excrétion urinaire du TNF- $\alpha$  réduit efficacement la protéinurie chez des sujets diabétiques traités par IECA ou BRA (Harmankaya 2003; Navarro 2005).

Bien que nos résultats démontrent de manière évidente une réduction des niveaux sériques et urinaires de TNF- $\alpha$ , il est intéressant de mentionner les très faibles concentrations sériques et urinaires de TNF- $\alpha$  mesurées chez notre patient par rapport aux valeurs documentées par Navarro et coll. chez les sujets diabétiques avec ND (Navarro 2005, 2008). Si 20% des patients diabétiques semblent avoir des niveaux de TNF- $\alpha$  urinaires inférieurs à 5 pg/ml, l'influence potentiellement bénéfique de la réduction de ces faibles niveaux sur la fonction rénale reste cependant inconnue.

Si les monocytes et les macrophages sont les principales sources de TNF- $\alpha$ , cette cytokine est aussi synthétisée au niveau rénal par les cellules endothéliales, mésangiales, glomérulaires et tubulaires épithéliales. Alors que les niveaux sériques de TNF- $\alpha$  sont essentiellement déterminés par sa production systémique, les concentrations urinaires de TNF- $\alpha$  semblent résulter de la production locale de cette cytokine dans le rein. Contrairement aux résultats obtenus par Navarro (Navarro 2008), nous avons observé que les niveaux de TNF- $\alpha$  urinaires chez notre patient corrélaient de manière étroite avec les niveaux sériques de cette cytokine. Ces données, si elles étaient reproduites dans une large population, pourraient suggérer une contribution de la production systémique de cette cytokine à l'excrétion urinaire de TNF- $\alpha$ . Cette hypothèse pourrait expliquer la relation récemment établie entre l'augmentation d'expression génique du TNF- $\alpha$  par les cellules mononuclées sanguines périphériques et l'UAE chez les sujets diabétiques de type 2 (Navarro 2008).

Marqueur prédictif bien documenté de la mortalité cardiovasculaire (Ridker 2001), l'IL-6 est une cytokine reconnue pour ses effets délétères au niveau rénal. En effet, l'IL-6 stimule la prolifération cellulaire au niveau mésangial, augmente l'expression de la fibronectine, altère la production de la matrice extracellulaire au niveau du mésangium et des podocytes, active le système rénal RAS et augmente la perméabilité endothéliale (Rivero 2009). D'un point de vue clinique, l'IL-6 apparaît comme un facteur potentiellement impliqué dans la progression de la ND. En effet, il a été documenté que les niveaux sériques et urinaires de cette cytokine augmentaient lors de la progression de la ND (Shikano 2000; Dalla Vestra 2005) et qu'il y avait une association significative entre leurs niveaux et l'UAE chez les patients diabétiques de type 2. L'IL-6 est exprimée par les cellules glomérulaires et interstitielles chez les sujets avec ND (Suzuki 1995) et, chez le rat STZ, son niveau d'expression rénale est augmenté. Cette augmentation d'expression est significativement associée à une augmentation d'UAE (Navarro 2006).

Il a été rapporté récemment par Ogawa et coll. que l'administration des BRA réduisait les concentrations urinaires d'IL-6 chez les patients diabétiques de type 2 (Ogawa 2009). Nos résultats qui documentent une réduction additionnelle de ce paramètre suite à l'administration de bosentan à un patient diabétique traité par BRA suggèrent un effet anti-inflammatoire suboptimal des BRA chez les patients avec ND et l'utilité potentielle d'une thérapie combinée par BRA et bloqueurs du système ET pour réduire l'inflammation dans cette population.

Appuyant le concept d'un rôle physiopathologique de l'IL-6 dans la ND, nos résultats démontrent une réduction du niveau urinaire d'IL-6 de 23% et une corrélation positive de ce paramètre avec la protéinurie de 24h ( $r=0.65$ ). Cette réduction, ajoutée à celle du TNF- $\alpha$  urinaire, identifie l'inflammation rénale comme médiatrice possible des effets délétères de l'ET dans la ND. Sachant que l'expression rénale de TNF- $\alpha$  est un déterminant de l'excrétion urinaire d'IL-6 (Navarro 2006), il est tentant de postuler que le bosentan puisse réduire l'excrétion urinaire d'IL-6 en réduisant la production rénale de TNF- $\alpha$ . Cette hypothèse reste cependant à évaluer.

En accord avec les données par Navarro et coll. (Navarro 2006), nous n'avons pas pu établir de corrélation entre les niveaux urinaires et sériques d'IL-6 et une augmentation des niveaux sériques d'IL-6 a même été observée au cours de l'étude. Les facteurs responsables de cette augmentation sont inconnus.

Plusieurs évidences indiquent que le recrutement de cellules inflammatoires, en particulier des lymphocytes T et des monocytes activés, dans le tissu rénal joue un rôle critique dans le développement de diverses maladies rénales. Des études tant *in vitro* que *in vivo* ont démontré que l'expression différentielle de diverses chémokines, telles VCAM-1, ICAM-1 et MCP-1, est à la base et coordonne de manière précise ce processus.

Comme mentionné précédemment, VCAM-1 est surexprimée dans les reins de souris diabétiques (Ina 1999) et une augmentation des niveaux sériques de cette molécule d'adhésion est rapportée chez les sujets avec ND (Schmidt 1996; Matsumoto 2002). VCAM-1, un marqueur de DE, est associée aux niveaux d'UAE (Stehouwer 2002, Rubio-Guerra 2007, 2009), à la sévérité de la ND (Wong 2007) et inversement associée au TFG (Lin 2006) suggérant que la mesure de ce marqueur, puisse avoir une valeur prédictive de développement et/ou de progression de la ND (Persson 2008; Lopes-Virella 2008). En accord avec ces données, nos résultats démontrent une réduction des concentrations urinaires de VCAM-1 de l'ordre de 20% après 16 semaines de traitement par le bosentan avec une forte corrélation entre les niveaux urinaires de VCAM-1 et l'UAE. Ces résultats, en l'absence de corrélation entre les niveaux sériques de VCAM-1 et la protéinurie, suggèrent un rôle pathogénique de l'expression rénale de VCAM-1 dans le développement et/ou la progression de la lésion rénale chez les sujets diabétiques de type 2.

Comme VCAM-1, ICAM-1 est exprimée dans les reins d'animaux diabétiques et est associée, dans ces modèles, à une progression de la lésion rénale (Matsui 1996, Coimbra 2000). Ses niveaux sériques sont aussi plus élevés chez les sujets diabétiques avec néphropathie que chez ceux ne présentant pas de lésion rénale (Guler 2002; Ulbrich 2003). Indépendamment de la protéinurie, ICAM-1 constitue un marqueur de déclin de la fonction rénale et est associée à un risque accru de morbidité et de mortalité cardiovasculaire chez les patients avec ND (Camilla 2010). Nos résultats démontrent que la diminution de protéinurie secondaire à l'administration du bosentan chez notre patient est associée à une réduction de l'ordre de 20% des niveaux urinaires et sériques d'ICAM-1 supportant encore une fois le rôle des molécules d'adhésion dans la pathogenèse de la ND. Ces données concordent avec celles générées par Muller et coll. dans un modèle expérimental d'insuffisance rénale, démontrant l'efficacité du bosentan à réduire l'expression rénale d'ICAM-1 et la protéinurie ainsi qu'à diminuer de manière significative les lésions et l'infiltrat inflammatoire au niveau rénal (Muller 2000; De Block 2005).

Le MCP-1 est produit dans le rein par les cellules tubulaires épithéliales et est impliqué dans les processus inflammatoires et fibrotiques au niveau rénal. Il a été proposé par plusieurs chercheurs que les effets du MCP-1 sur l'activation et l'accumulation macrophagique au niveau rénal puissent contribuer au développement et à la progression de la ND (Morii 2003; Banba 2000; Guijarro 2001; Tam 2009) et diverses études, dont nous avons déjà discuté dans l'introduction, ont appuyé la possibilité que la modulation de l'activité du MCP-1 puisse devenir dans l'avenir une cible thérapeutique dans le traitement de la ND.

Nos données qui démontrent chez notre patient la présence de MCP-1 dans l'urine à des concentrations 4 fois plus élevées que dans le sérum appuient le concept d'une expression accrue de cette chémokine dans le rein diabétique (Tashiro 2002; Chiarelli 2002; Morii 2003; Takebayashi 2006). De manière surprenante, nos résultats ne font cependant pas état d'une quelconque modulation de ce paramètre par le bosentan en dépit de l'effet anti-protéïnurique de cet agent, Ces résultats sont particulièrement surprenants considérant la corrélation documentée entre niveaux urinaires de MCP-1, UAE (Wu 2010; Wang 2009) et déclin de la fonction rénale chez les sujets diabétiques (Tam 2009). Au vu des effets inhibiteurs des BRA sur les niveaux urinaires de MCP-1 (Ogawa 2009), nous ne pouvons exclure qu'un degré d'inhibition maximale de la production rénale de MCP-1 puisse avoir résulté, chez notre sujet, de la thérapie par BRA. De plus amples recherches cliniques sont nécessaires pour clarifier cette possibilité (Goldberg 2009).

Les résultats de diverses études expérimentales et cliniques appuient fortement un rôle pathogénique de l'ET dans les maladies rénales chroniques protéïnuriques (Benigni 2001; Kohan 2010; Barton 2008, 2010; Richter 2006). Chez l'animal comme chez l'humain, une activation, au niveau rénal, du système de l'ET est documentée dans ces maladies, incluant la ND, activation reflétée par une augmentation des niveaux plasmatiques (Koyama 1989; Karakitsos 2007; Bruno 2002; Zanatta 2008) et urinaires de l'ET-1 (Ohta 1991; Takeda 1994; Lee 1994; Peppas-Patrikiou 1998; Dhaun 2009) ainsi que

par une augmentation d'expression des gènes codants pour les récepteurs ETA et ETB (Benigni 2001). Fait intéressant, il a été documenté que chez les sujets avec maladies rénales chroniques, la production rénale d'ET-1 augmentait lors du déclin de la fonction rénale (Dhaun 2009; Goddard 2007; Bruno 2002; Lehrke 2001). Ces données et les résultats générés chez l'animal montrant que la surexpression rénale d'ET-1 est suffisante pour reproduire les altérations morphologiques et fonctionnelles typiques des maladies rénales chroniques (Hocher 1997, 1996) indiquent, sans équivoque, le rôle de l'ET-1 rénale dans la pathogenèse des maladies rénales chroniques et l'utilité potentielle de ce paramètre comme marqueur de maladies rénales.

Le rôle pathogénique de la production excessive d'ET-1 au niveau rénal semble pouvoir être aisément expliqué par ses propriétés hémodynamiques vasoconstrictives ainsi que par les effets pro-fibrotiques et pro-inflammatoires de ce peptide (Barton 2010). Ainsi, une hypothèse largement avancée dans la littérature est que l'accumulation rénale d'ET-1, secondaire à l'augmentation de production de ce peptide par les cellules glomérulaires ou tubulaires, puisse induire, via des effets autocrines ou paracrines, des lésions de glomérulosclérose avec prolifération des cellules mésangiales et expansion de la matrice ainsi que des lésions fibrotiques et inflammatoires tubulo-interstitielles. Ces lésions pourraient être reliées, au moins partiellement, à la capacité de l'ET-1 de stimuler le recrutement de cellules inflammatoires au niveau rénal et à induire la production de cytokines inflammatoires et de facteurs de croissance par ces cellules.

Une variété impressionnante de facteurs est impliquée dans l'augmentation de production rénale d'ET-1 dans la ND. Parmi eux, des conditions communément associées au diabète ou au syndrome métabolique comme l'inflammation, l'hypertension, l'obésité, l'hyperglycémie (Shin 1999), l'hyperinsulinémie, la dyslipidémie et le stress oxydatif ont été associées à une activation de la synthèse d'ET-1 (Barton 2008). Un autre facteur communément impliqué dans l'augmentation de production rénale de l'ET-1 est l'augmentation de réabsorption des protéines au niveau des cellules tubulaires (Zoja 2004;

Kohan 2010) ou des podocytes (Morigi 2005). À ce sujet, il est important de rappeler que diverses études expérimentales ont pu démontrer, dans les années 90, la capacité de traitements limitant l'ultrafiltration glomérulaire de protéines à prévenir la formation excessive d'ET au niveau rénal (Lariviere 1998; Ruiz-Ortega 1997; Zoja 1998). Il a aussi pu être démontré que plusieurs agents anti-protéïnuriques tels les IECA (Remuzzi 1997), les BRA, les statines et certains bloqueurs des canaux calciques, inhibaient la formation d'ET (Barton 2008). Ces données pourraient suggérer que l'excès de production rénale d'ET-1 soit la conséquence, plutôt que la cause de la protéïnurie associée aux maladies rénales chroniques.

Outre les agents mentionnés plus haut, il a été documenté que l'administration aiguë de bloqueurs non-spécifiques des récepteurs de l'ET à des sujets atteints de maladie rénale réduisaient les niveaux d'excrétion urinaire de ce peptide (Goddard 2007) et augmentaient les concentrations sériques d'ET-1 (Weber 1996; Dhaun 2009). En accord avec cette dernière donnée, nos résultats démontrent que l'administration du bosentan induit une augmentation substantielle des niveaux plasmatiques de l'ET-1 chez notre patient. Cet effet témoigne de l'activité antagoniste du bosentan sur les ETB, responsable d'une diminution de clairance de l'ET-1. L'impact clinique hémodynamique de l'augmentation des niveaux plasmatiques de l'ET-1 reste indéterminé. L'excrétion urinaire d'ET-1 étant un reflet de la production rénale d'ET-1, ces données suggèrent que l'administration pendant 16 semaines du bosentan puisse avoir réduit la synthèse de l'ET par les cellules rénales tel que proposé par Suga et coll. (Suga 2003). Compte tenu de l'administration au long cours du bosentan dans notre étude, il est peu probable que cet agent puisse avoir altéré l'excrétion rénale tubulaire de l'ET-1, ce phénomène n'étant observé que de manière extrêmement fugace après infusion d'un bloqueur de ETB (Goddard 2007).

Supportant un rôle du système de l'ET-1 comme promoteur des maladies rénales protéïnuriques, nos données confirment en outre l'existence d'une relation étroite entre concentrations urinaires d'ET-1 et protéïnurie (Tharaux 2005; Vlachojannis 1997; Lehrke

2001). Si ces résultats ne permettent pas d'établir de relation de cause à effet entre ces deux paramètres, ils suggèrent néanmoins l'utilité possible de la mesure de l'excrétion urinaire de l'ET-1 comme paramètre d'activité de la maladie et d'efficacité thérapeutique.

Une question souvent soulevée dans la littérature concerne le type d'antagonistes des récepteurs de l'ET à utiliser avec prédilection afin d'assurer un effet rénoprotecteur optimal tout en minimisant les effets secondaires potentiels. Pour y répondre, il faut se rappeler que les ETA ont essentiellement des fonctions vasoconstrictives et prolifératives, alors que l'activation des ETB induit principalement des effets vasodilatateurs, anti-prolifératifs et anti-inflammatoires. Donc, de manière schématique, les ETB paraissent antagoniser les effets de l'activation des ETA. Les effets hémodynamiques et rénaux néfastes de l'ET-1 étant reliés de manière primaire à l'activation des récepteurs ETA, la plupart des études ont été menées avec des bloqueurs spécifiques de ETA ou avec des antagonistes non-spécifiques de ETA et ETB (Barton 2008). Si les résultats de ces études paraissent, selon certains auteurs, favoriser l'usage des bloqueurs spécifiques de ETA, il faut cependant rappeler que la plupart d'entre elles ont été menées chez l'animal et ne permettent donc pas de tirer de conclusions définitives sur le type d'antagonistes à utiliser chez les sujets atteints de maladies rénales chroniques.

Avant de tirer toute conclusion à ce sujet il est particulièrement important de tenir compte des considérations suivantes i) aucune étude clinique n'a comparé jusqu'à présent les effets des antagonistes spécifiques des ETA avec les antagonistes non-spécifiques ii) une distribution différente des ETA et ETB est documentée chez l'animal et l'homme iii) l'activation de ETB au niveau des cellules musculaires lisses induit des effets vasoconstricteurs (Nazzareno 2004) et l'impact du blocage de ce récepteur dans l'effet rénoprotecteur des antagonistes de l'ET est totalement inconnu iv) l'effet inhibiteur d'un bloqueur de l'ET sur ETA et/ou ETB varie en fonction de la dose à laquelle il est administré v) en présence d'une inhibition maximale de ETA, l'activation de ETB peut médier des effets classiquement attribués aux ETA.

Plusieurs études ont pu démontrer que le bosentan exerçait des effets anti-protéinuriques et rénoprotecteurs dans divers modèles d'insuffisance rénale expérimentale (Benigni 1996; Gomez-Garre 1996). Au meilleur de notre connaissance, l'étude présentée dans ce mémoire constitue le premier et le seul essai contrôlé randomisé démontrant l'effet anti-protéinique du bosentan, un bloqueur non-spécifique des récepteurs ETA et ETB, chez un patient avec ND. D'autres études menées dans la même population et utilisant l'avosentan, un bloqueur relativement spécifique des récepteurs ETA (Wenzel 2009; Andress 2009, Mann 2010) ont obtenu des effets anti-protéinuriques similaires à ceux que nous avons documenté et n'établissent donc pas à priori la supériorité de bloqueurs plus sélectifs en terme de rénoprotection. Pour ce faire, il nous faut attendre d'autres études, dont certaines sont actuellement en cours, utilisant des bloqueurs totalement sélectifs pour les récepteurs ETA.

Un des arguments souvent avancé en faveur de l'usage d'antagonistes des récepteurs ETA chez les patients avec maladies rénales chronique est que ces agents n'interfèrent pas avec les effets diurétiques, natriurétiques et de clairance de l'ET-1 médiés par l'activation des récepteurs ETB. Cet argument contraste avec les résultats de récentes études démontrant que l'administration d'avosentan, un bloqueur préférentiel des récepteurs ETA, à des sujets sains réduit l'excrétion urinaire de sodium (Smolander 2009) et que le traitement de sujets atteints de ND par ce même agent induit des problèmes majeurs de rétention liquidienne (Mann 2010). Bien que notre étude ne porte que sur un seul patient, nous n'avons pu mettre en évidence, chez ce sujet, ni d'effet anti-natriurétique important, ni de problème clinique relatif à une rétention liquidienne. À noter qu'une diminution du taux d'Hb a été observé au cours du traitement par le bosentan. Cette diminution du taux d'Hb probablement dilutionnelle, est maximale après 4 semaines de traitement et tend à se normaliser par la suite.

Au vu des critères d'inclusion stricts appliqués dans notre étude, il est tentant de postuler que la sélection d'une population cible idéale (sans insuffisance rénale importante ni défaillance cardiaque préalable) et non le type d'antagonistes utilisés puisse constituer le déterminant majeur de la survenue d'effets secondaires reliés à l'administration de bloqueurs de l'ET-1.

L'administration des inhibiteurs du RAS représente une des options thérapeutiques disponibles pour les patients avec ND. Toutefois, ce traitement présente des risques d'hyperkaliémie, et administré seul, se voit le plus souvent insuffisant à arrêter la progression de la maladie. Ceci rend compte de la nécessité de mise en place de stratégies complémentaires.

Selon plusieurs experts, les BRA constituent le premier choix en matière de néprotection dans le diabète de type 2, leurs effets néprotecteurs ayant été, dans cette population, plus amplement documentés dans la littérature que ceux des IECA. De manière intéressante, ces drogues lors de l'élaboration de notre projet, ne démontraient pas d'effet anti-inflammatoire alors que les IECA, et plus spécifiquement l'énapril, réduisait l'expression rénale du TNF- $\alpha$  chez le rat diabétique et l'excrétion urinaire de cette cytokine chez l'homme (Navarro et al, 2006), propriétés susceptibles d'exercer un effet confondant sur l'effet anti-inflammatoire postulé du bosentan. Pour ces raisons, nous avons sélectionné dans notre étude des patients traités exclusivement par BRA.

Les études faites chez l'animal ont suggéré que le blocage concomitant du système RAS et de l'ET puisse permettre l'obtention d'effets anti-protéinurique et néprotecteur plus importants que le blocage de chaque système individuellement (Benigni 1998; Gagliardini 2009), un synergisme basé sur les interactions entre l'AII et l'ET-1 au niveau moléculaire. Comme discuté au cours de ce travail, nous ne disposons à ce jour que d'un nombre restreint d'études cliniques montrant un effet néprotecteur additif des bloqueurs des récepteurs de ET-1 chez les sujets diabétiques de type 2 traités par IECA ou BRA. Les

études menées chez l'animal suggèrent que les antagonistes de l'ET réduisent les conséquences néfastes reliées à la production rénale excessive d'ET-1 en réponse à l'augmentation de réabsorption tubulaire de protéines. Cette action, combinée aux effets bénéfiques des inhibiteurs du RAS (restauration des propriétés de perméabilité de la barrière glomérulaire et effets hémodynamiques intra-rénales favorables) rend compte de l'efficacité en terme de néprotection d'un traitement combiné par ces deux types d'agents. Notre étude, démontrant un effet anti-inflammatoire additif des bloqueurs des récepteurs de ET-1 chez un patient diabétique de type 2 traité par BRA, identifie l'inflammation rénale comme un médiateur clé des effets néfastes de l'ET sur la progression de la maladie et comme un mécanisme permettant d'expliquer les effets anti-protéïnuriques additifs d'un traitement combiné par inhibiteurs de l'AII et de l'ET-1.

Des études cliniques bien faites et menées dans des populations soigneusement sélectionnées sont maintenant requises pour déterminer le dosage optimal, la durée d'administration et les effets secondaires des antagonistes de l'ET-1. Des études sont aussi requises pour évaluer en quoi diffère l'effet anti-protéïnurique de ces drogues par rapport aux inhibiteurs de l'AII et les principaux mécanismes présidant à l'effet anti-protéïnurique additif observé lors d'un traitement combiné par inhibiteurs de l'AII et de l'ET-1. Certains sous-groupes de patients pourraient bénéficier plus que d'autres de l'administration des antagonistes de l'ET-1 et doivent être identifiés. Des études prospectives à long terme sont aussi nécessaires pour évaluer la capacité des bloqueurs des récepteurs de l'ET à ralentir le développement et la progression de la ND. Enfin, des études sont requises pour évaluer la mortalité cardiovasculaire suite à ce traitement afin de déterminer si l'effet anti-protéïnurique exercé par ces agents confère une protection cardiovasculaire chez les patients avec maladies rénales chroniques.

Administré avec précaution à des sous-groupes de patients bien sélectionnés, il est possible que les antagonistes de l'ET constituent une innovation dans la prise en charge thérapeutique et préventive de la ND.

En conclusion, si les résultats de cette étude, présentés sous forme de rapport de cas clinique, suggèrent un intérêt clinique potentiel des bloqueurs de l'ET-1 dans la néphropathie diabétique, ils ne concernent qu'un seul patient et ne permettent donc pas de tirer de conclusions sur l'efficacité additionnelle du bosentan chez les patients diabétiques de type 2 avec néphropathie et traités par BRA. La validation de ces résultats sur le plan statistique aurait nécessité l'inclusion d'un nombre minimal de 36 patients, ce qui n'a malheureusement pu être réalisé dans cette étude.

## **VI. BIBLIOGRAPHIE**

American Diabetes Association: Executive Summary. *Standards of Medical Care in Diabetes*. Diabetes Care: 2010; **33**: S4-S10.

Andress. D, Rabelink. T, Padley. R: *Atrasentan reduces proteinuria in patients with diabetic nephropathy*. ET-11: APS International Conference on Endothelin, Montréal. Abstract **5.4**, 2009.

Arendshorst. WJ, Brännström. K, Ruan. X: *Actions of angiotensin II on the renal microvasculature*. J Am Soc. Nephrol: 1999; **10**: S149-S161.

Arici. M, Walls. J: *End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: Is C-reactive protein the missing link?* Kidney Int: 2001; **59**: 407-414.

Asakawa. H, Tokunaga. K, Kawakami. F: *Elevation of fibrinogen and thrombin-antithrombin III complex levels of type 2 diabetes mellitus patients with retinopathy and nephropathy*: J Diabetes Complications: 2000; **14**:121-126.

Aso. Y, Matsumoto. S, Fujiwara. Y, Tayama. K: *Impaired fibrinolytic compensation for hypercoagulability in obese patients with type 2 diabetes: Association with increased plasminogen activator inhibitor-1*. Metabolism: 2002; **51**: 471-476.

Association canadienne du diabète clinical Practice Guidelines Expert Committee. *Canadian Diabetes Association 2003 clinical practice guidelines for the prevention and management of diabetes in Canada*. Can J Diabetes: 2003; **27**: S1-S152.

Banba. N, Nakamura. T, Matsumura. M, Kuroda H, Hattori Y, Kasai K: *Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy*. *Kidney Int* : 2000; **58**: 684-690.

Barton. M: *Reversal of proteinuric renal disease and the emerging role of endothelin*. Nature clinical practice, Nephrology: 2008; **4**:490-501.

- Barton. M: Therapeutic potential of endothelin receptor antagonists for chronic proteinuric renal disease in humans. *Biochim Biophys Acta*: 2010; **1802**:1203-1213.
- Bauersachs. J, Fraccarollo. D, Galuppo. P, Ertl. G: *Endothelin-receptor blockade improves endothelial vasomotor dysfunction in heart failure*. *Cardiovasc Res*: 2000; **47**:142-149.
- Beck. KF, Mohaupt. MG, Sterzel. RB, Peters. S, Fees. H: Endothelin-1 inhibits cytokine-stimulated transcription of inducible nitric oxide synthase in glomerular mesangial cells. *Kidney Int*: 1995; **48**:1893-1899.
- Benigni. A, Remuzzi. G: *Treatment of chronic proteinuric kidney disease: What next?* *Hypertension*: 2009; **54**: 29-31.
- Benigni. A, Remuzzi. G: *How renal cytokines and growth factors contribute to renal disease progression*. *Am J Kidney Dis*: 2001; **37**: S21-S24.
- Benigni. A, Zoja. C, Corna. D: *Blocking both type A and B endothelin receptors in the kidney attenuates renal injury and prolongs survival in rats with remnant kidney*. *Am J Kidney Dis*: 1996; **27**: 416-423.
- Brenner. BM, Cooper. ME, de Zeeuw. D, Keane. WF: *Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy*. *N Engl J Med*: 2001; **345**: 861-869.
- Braun. C, Conzelmann. T, Vetter, S: *Prevention of chronic renal allograft rejection in rats with an oral endothelin A receptor antagonist*. *Transplantation*: 1999; **68**:739-746.
- Bruno. G, Merletti. F, Biggeri. AP: *Progression to overt nephropathy in type 2 diabetes: The Casale Monferrato Study*. *Diabetes Care*: 2003; **26**: 2150-2155.

Bruno. B, Andreas. R, Boden. PJ, Bieker. E, Dashood. M, Reichen. J, Shaw. SG: *Endothelin A-receptor blockade in experimental diabetes improves glucose balance and gastrointestinal function*. Clinical Science: 2002; **103**: 430S-433S.

Bruno. CM, Meli. S, Marcinno. M, Ierna. D, Sciacca. C, Neri. S: *Plasma endothelin-1 levels and albumin excretion rate in normotensive, microalbuminuric type 2 diabetic patients*. J Biol Regul Homeost Agents: 2002; **16**:114-117.

Bushe. E: *CC chemokine receptor 2 is required for macrophage infiltration and vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension*. Hypertension: 2000; **36**: 360-363.

Callera. GE, Touyz. RM, Teixeira. SA, Muscara. M.N, Carvalho. M.H, Fortes. Z. B, Nigro. D: *ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension*. Hypertension: 2003; **42**: 811-817.

Camilla. R, Brachemi. S, Pichette. V, Cartier. P, Laforest-Renald. A, MacRae. T, Madore. F, Troyanov. S: *Urinary monocyte chemotactic protein 1: marker of renal function decline in diabetic and nondiabetic proteinuric renal disease* (Abstract). J Nephrol: 2010; DOI: 10.5301/JN.2010.1458

Chan. WB, Chan. NN: *Vascular defect beyond the endothelium in type II diabetic patients with overt nephropathy and moderate renal insufficiency*. Kidney Int: 2006; **70**: 711-716.

Chantrel. F, Moulin. B, Hannedouche. T: *Blood pressure, diabetes and diabetic nephropathy*. Diabetes Metab: 2000; **26** Suppl 4:37-44.

Cheng. H, Tian. XF, Dong. HR, Ding. SS, Qiu. CB, Chen. YP: *The preliminary studies on the cross action between endothelin-1 and angiotensin II in kidney tissue of rat with diabetic nephropathy*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi: 2004; **84**:248-252.

Chiarelli. F, Cipollone. F, Mohn. A, Marini. M, Iezzi. A, Fazia. M, Tumini. S, De Cesare. D: *Circulating monocyte chemoattractant protein-1 and early development of nephropathy in type 1 diabetes*. Diabetes Care: 2002; **25**:1829-1834.

Chow. FY, Nikolic-Paterson. DJ, Ozols. E, Atkins.RC, Tesch. GH: *Intracellular adhesion molecule-1 deficiency is protective against nephropathy in type 2 diabetic db/db mice*: J Am Soc Nephrol: 2005; **16**:1711-1722.

Clausen. P, Jacobsen. P, Rossing. K, Jensen. JS, Parving. HH, Feldt-Rasmussen. B: *Plasma concentrations of VCAM-1 and ICAM-1 are elevated in patients with type 1 diabetes mellitus with microalbuminuria and overt nephropathy*: Diabet Med. 2000; **17**:644-649.

Coimbra. TM, Janssen. U, Grone. HJ: *Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes*. Kidney Int: 2000; **57**:167-182.

Coyle. JD, Gardner. SF, White. CM: *The renal protective effects of angiotensin II receptor blockers in type 2 diabetes mellitus*: Ann Pharmacother: 2004; **38**:1731-1738.

Dalla Vestra. M: *Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes*. J Am Soc Nephrol: 2005; **16**:S78-S82.

Dalla Vestra. M, Saller. A, Bortoloso. E, Mauer. M, Fioretto. P: *Structural involvement in type 1 and type 2 diabetic nephropathy*. Diabetes & Metabolism: 2000; **26**: 8-14.

Dalla Vestra. M, Mussap. M, Gallina. P, Bruseghin.M, Cernigol. AM, Saller. A, Plebani. M, Fioretto. P: *Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes*. J Am Soc Nephrol: 2005; **16**: S78-S82.

Dandona. P, Kumar. V, Aljada. A, Ghanim. H, Syed. T, Hofmayer. D, Mohanty. P, Tripathy. D, Garg. R: *Angiotensin II receptor blocker Valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor-kB, in mononuclear cells of normal subjects: evidence of an anti-inflammatory action.* J Clin Endocrinol Metab: 2003; **88**:4496-4501.

De Block. CE, De Leeuw. IH: *Impact of overweight on chronic microvascular complications in type 1 diabetic patients.* Diabetes Care: 2005; **28**:1649-1655.

De Jongh. RT, Serne. EH, Ijzerman. RG, de Vries. G, Stehouwer. CDA: *Free Fatty Acid Levels Modulate Microvascular Function: Relevance for Obesity-Associated Insulin Resistance, Hypertension, and Microangiopathy.* Diabetes: 2004; **53**: 2873-2882.

Dhaun. N: *The Endothelin System and Its Antagonism in Chronic Kidney Disease.* J Am Soc Nephrol: 2006; **17**: 943-955.

Dhaun. N, MacIntyre. M, Melville. V, Webb. DJ: *Blood pressure-independent reduction in proteinuria and arterial stiffness after acute endothelin-A receptor antagonism in chronic kidney disease.* Hypertension: 2009; **54**:113-119.

Ding. SS, Qiu. C, Hess. P, Xi. JF, Zheng. N, Clozel. M: *Chronic Endothelin Receptor Blockade Prevents Both Early Hyperfiltration and Late Overt Diabetic Nephropathy in the Rat.* J Cardiovasc Pharmacol: 2003; **42**:48-54.

Dipetrillo. K, Coutermarsh. B, Gesek. FA: *Urinary tumor necrosis factor contributes to sodium retention and renal hypertrophy during diabetes.* Am J Physiol Renal Physiol. 2003; **284**: F113-F121.

Du. XL, Edelstein. D, Rossetti. L: *Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation*. Proc Natl Acad Sci USA: 2000; **97**:12222-12226.

Edwards. RM, Trizna. WT: *Renal microvascular effects of endothelin*. Am J Physiol: 1990; **259**: F217-F221.

Endemann. DH, Schiffrin. EL: *Endothelial dysfunction*. J Am Soc Nephrol: 2004; **15**: 1983-1992.

Erema. C, Hacıhasanog. A, Celik. S: *Coagulation and fibrinolysis parameters in type 2 diabetic patients with and without diabetic vascular complications*. Med Princ Pract: 2005; **14**: 22-30.

Feldstein. C, Romero. C: *Role of endothelins in hypertension*. Am J Ther: 2007; **14**:147-153.

Ferris. M, Hogan. SL, Chin. H, Shoham. DA, Gipson. DS, Gibson. K, Yilmaz. S, Falk. RJ, Jennette. JC: *Obesity, Albuminuria, and Urinalysis Findings in US Young Adults from the Add Health Wave III Study*: CJASN: 2007; **2**:1207-1214.

Festa. A, D'Agostino. R, Howard. G, Mykkänen. L, Tracy. RP, Haffner. SM: *Inflammation and microalbuminuria in nondiabetic and type 2 diabetic subjects: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study*. Kidney Int: 2000; **58**: 1703-1710.

Gagliardini. E, Corna. D, Zoja. C, Remuzzi. A, Remuzzi. G, Benigni. A: *Unlike each drug alone, lisinopril if combined with avosentan promotes regression of renal lesions in experimental diabetes*: Am J Physiol Renal Physiol: 2009; **297**: F1448-F1456.

- Gellai. M: *Physiological role of endothelin in cardiovascular and renal hemodynamics : studies in animals*. Curr Opin Nephrol Hypertens: 1997; **6**: 64-68.
- Gerstein. HC, Mann. JFE, Yi. Q: *Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals*. JAMA: 2001; **286**:421-426.
- Goddard. J, Johnston. NR, Cumming. AD, Webb. DJ: *Fractional urinary excretion of endothelin-1 is reduced by acute ETB receptor blockade*: Am J Physiol Renal Physiol: 2007; **293**: F1433-F1438.
- Goldberg. RB: *Cytokine and Cytokine-Like Inflammation Markers, Endothelial Dysfunction, and Imbalanced Coagulation in Development of Diabetes and Its Complications*. J Clin Endocrinol Metab: 2009; **94**:3171-3182.
- Gomez-Garre. D: *Activation of NF-kappa B in tubular epithelial cells of rats with intense proteinuria: role of angiotensin II and endothelin-1*. Hypertension: 2001; **37**:1171-1178.
- Gomez-Garre. D: *An orally active ETA/ETB receptor antagonist ameliorates proteinuria and glomerular lesions in rats with proliferative nephritis*. Kidney Int: 1996; **50**: 962-972.
- Gomez-Garre. D, Ruiz-Ortega. M, Ortego. M, Largo. R, López-Armada. MJ, Plaza. JJ, González. E, Egido. J: *Effects and interactions of endothelin-1 and angiotensin II on matrix protein expression and synthesis and mesangial cell growth*. Hypertension: 1996; **27**: 885-892.
- Guijarro. C, Egido. J: *Transcription factor kB (NF-kB) in renal disease*. Kidney Int: 2001; **59**: 415-424.

Guler. S, Cakir. B, Demirbas. B, Yönem. A, Odabasi. E, Onde. U, Aykut. O, Gürsoy. G: *Plasma soluble intercellular adhesion molecule 1 levels are increased in type 2 diabetic patients with nephropathy*. Horm Res: 2002; **58**: 67-70.

Harmankaya. O, Seber. S, Yilmaz. M: *Combination of pentoxifylline with angiotensin converting enzyme inhibitors produces an additional reduction in microalbuminuria in hypertensive type 2 diabetic patients*. Ren Fail: 2003; **25**: 465-470

Hartner. A, Veelken. R, Wittmann. M, Cordasic. N: *Effects of diabetes and hypertension on macrophage infiltration and matrix expansion in the rat kidney*. BMC Nephrol: 2005; **6**: 6. doi:10.1186/1471-2369-6-6.

Hasslacher. C, Ritz. E, Wahl. P, Michael C: *Similar risks of nephropathy in patients with type I or type II diabetes mellitus*. Nephrol Dial Transplant: 1989; **4**: 859-863, 1989.

Heitzer. T, Schlinzig. T, Krohn. K: *Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease*. Circulation: 2001; **104**: 2673-2678.

Hernandez-Presa. M: *Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis*. Circulation: 1997; **95**:1532-1541.

Hoche. B, Thone-Reineke. C, Bauer. C, Raschack. M, Neumayer. HH: *The paracrine endothelin system: Pathophysiology and implications in clinical medicine*. Eur J Chem Clin Biochem: 1997; **35**:175-189.

Hoche. B, Liefeldt. L: *Characterization of the renal phenotype of transgenic rats expressing the human endothelin-2 gene*. Hypertension: 1996; **28**:196-201.

- Hovind. P, Rossing. P, Tarnow. L, Parving. HH: *Smoking and progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetes*. Diabetes Care: 2003; **26**:911-916.
- Hovind. P, Tarnow. L, Oestergaard. PB, Parving. HH: *Elevated vascular endothelial growth factor in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy*. Kidney Int Suppl: 2000; **75**:S56–S61.
- Hovind. P, Tarnow. L, Rossing. P: *Predictors for the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1 diabetes: Inception cohort study*. Br Med J: 2004; **328**: 1105-1110.
- Imanishi. M, Yoshioka. K, Konishi. Y: *Glomerular hypertension as one cause of albuminuria in type II diabetic patients*. Diabetologia: 1999; **42**: 999-1005.
- Ina. K, Kitamura. H, Okeda. T, Nagai. K, Liu ZY: *Vascular cell adhesion molecule-1 expression in the renal interstitium of diabetic KK<sup>Ay</sup> mice*: Diabetes Research and Clinical Practice: 1999; **44**:1-8.
- Lehrke. I, Waldherr. R, Ritz. E, Wagner. J: *Renal endothelin-1 and endothelin receptor type B expression in glomerular diseases with proteinuria*: J Am Soc Nephrol: 2001; **12**:2321-2329.
- Lemley. KV, Abdullah. I, Myers. BD: *Evolution of incipient nephropathy in type 2 diabetes mellitus*. Kidney Int: 2000; **58**:1228-1237.
- Lerman. A, Andreas. M, Zeiher. AM: *Endothelial function: Cardiac events*. Circulation: 2005; **111**: 363-368.

Liebson. PR, Amsterdam. EA : *Ongoing Telmisartan Alone and in Combination With Ramipril Global Endpoint Trial (ONTARGET): implications for reduced cardiovascular risk*. *Prev Cardiol*: 2009; **12**:43-50.

Lin. Yang, Kowalski. JR, Yacono. P, Luscinskas. FW: *Endothelial cell cortactin coordinates ICAM-1 clustering and actin cytoskeleton remodeling during polymorphonuclear leukocyte adhesion and transmigration*. *J. Immunol*: 2006; **177**:6440-6449.

Luyckx. VA, Brenner. BM: *Low birth weight, nephron number, and kidney disease*. *Kidney Int Suppl*: 2005; **97**: S68-S77.

Jafar. TH, Stark. PC, Schmid. CH: *Progression of chronic kidney disease: The role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin-converting enzyme inhibition: A patient-level meta-analysis*. *Ann Intern Med*: 2003; **139**: 244-252.

Kalantarinia. K, Awas. AS, Siragy. HM: *Urinary and renal interstitial concentrations of TNF- $\alpha$  increase prior to the rise in albuminuria in diabetic rats*. *Kidney Int*: 2003; **64**:1208-1213.

Karakitsos. D, Patrianakos. A, Parthenakis. F: *Altered proximal aortic stiffness and endothelin plasma levels in diabetic patients with end-stage renal disease*. *ASAIO J*: 2007; **53**:343-350.

Kawamoto. R, Kohara. K, Tabara. Y, Miki. T: *An Association between Decreased Estimated Glomerular Filtration Rate and Arterial Stiffness*. *Int Med*: 2008; **47**: 593-598.

Keech. A, Simes. RJ, Barter. P: *Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial*. *Lancet*: 2005; **366**:1849-1861.

Kelly. DJ, Chanty. A, Gow. RM, Zhang. Y, Gilbert. RE: *Protein kinase C beta inhibition attenuates osteopontin expression, macrophage recruitment, and tubulointerstitial injury in advanced experimental nephropathy.* J Am Soc Nephrol: 2005; **16**: 1654-1660.

Klein. RL, Hunter. SJ, Jenkins. AJ: *DCCT/ECIC Study Group: Fibrinogen is a marker for nephropathy and peripheral vascular disease in type 1 diabetes: Studies of plasma fibrinogen and fibrinogen gene polymorphism in the DCCT/EDIC cohort.* Diabetes Care: 2003; **26**:1439-1448.

Kohan. DE: *Endothelin, hypertension and chronic kidney disease: new insights.* Curr Opin. Nephrol. Hypertens: 2010; **19**:134-139.

Koyama. H, Tabata. T, Nishzawa. Y, Inoue. T, Morii. H, Yamaji. T: *Plasma endothelin levels in patients with uraemia.* Lancet: 1989; **1**: 991-992.

Krolewski. AS, Ng. DP, Canani. LH, Warram. JH: *Genetics of diabetic nephropathy: how far are we from finding susceptibility gene?* Adv Nephrol Necker Hosp: 2001; **31**:295-315.

Larivière. R, Lebel. M, Kingma. I, Grose. JH, Boucher. D: *Effects of losartan and captopril on endothelin-1 production in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass.* Am J Hypertens: 1998; **11**: 989-997.

Lee. SH, Lee. TW, Ihm. CG, Kim. MJ, Woo. JT, Chung. JH: *Genetics of diabetic nephropathy in type 2 DM: candidate gene analysis for the pathogenic role in inflammation.* Nephrology: 2005; **10**:S32-S36.

Lee. YJ, Lee. YJ, Shin. SJ, Tsai. JH: *Increased urinary endothelin like immunoreactivity in NIDDM patients with albuminuria.* Diabetes Care: 1994; **17**: 263-266.

Lim. SC, Caballero. AE, Smakowski. P, Logerfo. FW, Horton. ES, Veves. A: *Soluble intercellular adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule, and impaired microvascular reactivity are early markers of vasculopathy in type 2 diabetic individuals without microalbuminuria.* Diabetes Care: 1999; **22**: 1865-1870.

Lopes-Virella. MF, Carter. RE, Gilbert. GE, Klein. RL: Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Intervention and Complications Cohort Study Group: *Risk factors related to inflammation and endothelial dysfunction in the DCCT/EDIC cohort and their relationship with nephropathy and macrovascular complications.* Diabetes Care: 2008; **31**: 2006-2012.

MaCarthy. E, Sharma. R, Sharma. M, Ge. XL, Dileepan. KN, Savin. VJ: *TNF- $\alpha$  increases albumin permeability of isolated rat glomeruli through the generation of superoxide.* J Am Soc Nephrol: 1998; **9**: 433-438.

Mathew. B, Francis. L, Kayalar. A, Cone. J: *Obesity: Effects on Cardiovascular Disease and its Diagnosis.* J Am Board Fam Med: 2008; **21**: 562-568.

Mathiesen. ER, Ronn. B, Storm. B. *The natural course of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes: a 10-year prospective study.* Diabet Med: 1995; **12**: 482-487.

Matsui. H, Suzuki. M, Tsukuda. R, Ikeda. H: *Expression of ICAM-1 on glomeruli is associated with regression of diabetic nephropathy in a genetically obese diabetic rat, Wistar fatty.* Diabetes Res Clin Pract: 1996; **32**: 1-9.

Matsumoto. K, Sera. Y, Miyake. S: *Serum levels of adhesion molecules correlate with insulin resistance.* Atherosclerosis: 2002; **161**: 243-244.

Myers. BD, Winetz. JA, Chui. F, Michaels. AS: *Mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy: A study of glomerular barrier function.* Kidney Int 1982; **21**: 633-641.

McEniery. CM, Qasem. A, Schmitt. M, Avolio. AP, Cockcroft. JR, Wilkinson. IB: *Endothelin-1 regulates arterial pulse wave velocity in vivo*. J Am Coll Cardiol: 2003; **42**:1975-1981.

Mezzano. S, Aros. C, Droguett. A, Burgos. ME, Ardiles. L, Flores. C: *NF-kB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy*. Nephrol Dial Transplant: 2004; **19**:2505-2512.

Mezzano. S, Droguett. A, Burgos. ME, Ardiles. LG, Flores. CA, Aros. CA, Caorsi. I, Vío. CP, Ruiz-Ortega. M, Egido. J: *Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy*. Kidney Int Suppl: 2003; **86**:S64-S70.

Mora. C, Navarro. JF: *Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy*. Metabolism: 2004; **53**: 265-266.

Mora. C, Navarro. JF: *The role of inflammation as a pathogenic factor in the development of renal disease in diabetes*. Curr Diab Rep: 2005; **5**: 399-401.

Morii. T, Fujita. H, Narita. T, Shimotomai. T, Fujishima. H, Yoshioka. N: *Association of monocyte chemoattractant protein-1 with renal tubular damage in diabetic nephropathy*. J Diab Compl: 2003; **17**:11-15.

Morigi. M, Buelli. S, Zanchi. L, Longaretti. D, Macconi. A, Benigni. D, Moioli. G, Remuzzi. C: *In response to protein load podocytes reorganize cytoskeleton and modulate endothelin-1 gene: implication for permselective dysfunction of chronic nephropathies*. Am J Pathol: 2005; **166**: 1309-1320.

Muller. DN, Mervaala. EM, Schmidt. F: *Effect of bosentan on NF-kappa B, inflammation, and tissue factor in angiotensin II-induced end-organ damage*. Hypertension: 2000; **36**:282-290.

Nakamura. T, Fukui. M, Ebihara. I, Shirato. I, Tomino. Y, Osada. S, Nagaoka. I, Tomino. Y, Koide. H: *mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats*. Diabetes: 1993; **42**: 450-456

Navarro. JF: *Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin excretion in type 2 diabetes mellitus*. Am J Kidney Dis: 2003; **42**:53-61.

Navarro. JF, Mora. C: *Role of inflammation in diabetic complications*. Nephrol Dial Transplant: 2005; **20**: 2601-2604.

Navarro. JF, Mora. C, Rivero. A: *Urinary protein excretion and serum tumor necrosis factor in diabetic patients with advanced renal failure: Effects of pentoxifylline administration*. Am J Kidney Dis: 1999; **33**: 458-463.

Navarro. JF, Mora. C, Macia. M, Garcia. J: *Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin excretion in type 2 diabetes mellitus*. Am J Kidney Dis: 2003; **42**:53-61.

Navarro. JF, Mora. C, Muros. M, Garcia. J: *Urinary tumour necrosis factor- $\alpha$  excretion independently correlates with clinical markers of glomerular and tubulointerstitial injury in type 2 diabetic patients*. Nephrol Dial Transplant: 2006; **21**: 3428-3434.

Navarro. JF, Mora. C, Gómez. M: *Influence of renal involvement on peripheral blood mononuclear cell expression behaviour of tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in type 2 diabetic patients*. Nephrol Dial Transplant: 2008; **23**:919-926.

Nazzareno. G, Alessandra. M, Angelo. B: *The endothelin system in pulmonary arterial hypertension*. Cardiovasc Res: 2004; **61**: 227-237.

- Nord. EP: *Signalling pathways activated by endothelin stimulation of renal cells*. Clin Exp Pharmacol Physiol: 1996; **23**: 331-336.
- Kshirsagar. AV, Bombback. AS, Bang. H, Gerber. LM, Vupputuri. S, Shoham. DA, Mazumdar. M, Ballantyne. CM, Paparello. JJ, Klemmer. PJ: *Association of C-reactive protein and microalbuminuria (from the National Health and Nutrition Examination Surveys, 1999 to 2004)*. Am J Cardiol: 2008; **101**: 401- 406.
- Ogawa. S, Mori. T, Nako. K, Ito. S: *Combination therapy with renin-angiotensin system inhibitors and the calcium channel blocker azelnidipine decreases plasma inflammatory markers and urinary oxidative stress markers in patients with diabetic nephropathy*: Hypertens Res: 2008; **31**: 1147-1155.
- Ogawa. S, Kobori. H, Ohashi. N, Urushihara. M, Nishiyama. A, Mori. T: *angiotensin II type 1 receptor blockers reduce urinary angiotensinogen excretion and the levels of urinary markers of oxidative stress and inflammation in patients with type 2 diabetic nephropathy*: Biomark Insights: 2009; **4**: 97-102.
- Ohta. K, Hirata. Y, Shichiri. M.: *Urinary excretion of endothelin-1 in normal subjects and patients with renal disease*: Kidney Int: 1991; **39**: 307-311.
- Oliver. JJ, Webb. DJ: *Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events*. Arterioscler Thromb Vasc Biol: 2003; **23**: 554-566.
- Ono. N, Matsui. T, Yoshida. M: *Renal effects of endothelin in anesthetized rabbits*. Eur J Pharmacol: 1998; **359**:177-184.
- Owada. A, Tomita. K, Terada. Y: *Endothelin (ET)-3 stimulates cyclic guanosine 3, 5-monophosphate production via ETB receptor by producing nitric oxide in isolated rat glomerulus, and in cultured rat mesangial cells*. J Clin Invest: 1994; **93**: 556-563.

Peppas-Patrikiou. M, Dracopoulou. M, Dacou-Voutetakis. C: *Urinary endothelin in adolescents and young adults with insulin-dependent diabetes mellitus: Relation to urinary albumin, blood pressure, and other factors*: Metabolism: 1998; **47**:1408-1412.

Persson. F, Rossing. P, Hovind. P, Stehouwer. CD: *Endothelial dysfunction and inflammation predict development of diabetic nephropathy in the Irbesartan in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria (IRMA 2) study*: Scand J Clin Lab Invest: 2008; **68**: 731-738.

Ravera. M, Ratto. E, Vettoretti. S, Parodi. D, Deferrari. G: *Prevention and treatment of diabetic nephropathy: the program for irbesartan mortality and morbidity evaluation*: J Am Soc Nephrol: 2005; **16**:S48-S52.

Ravid. M, Lang. R, Rachmani. R, Lishner. M: *Long-term renoprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A 7-years follow-up study*. Arch Intern Med: 1996; **156**: 286-289.

Reaven. G, Lithell. H, Landsberg. L: *Hypertension and associated metabolic abnormalities. The role of insulin resistance and the sympatho-adrenal system*. N Engl J Med: 1996; **334**: 374-381.

Remuzzi. G, Macia. M, Ruggenenti. P; *Prevention and Treatment of Diabetic Renal Disease in Type 2 Diabetes: The BENEDICT Study*. J Am Soc Nephrol: 2006; **17**: S90-S97.

Remuzzi. G, Ruggenenti. P, Benigni. A: *Understanding the nature of renal disease progression*. Kidney Int: 1997; **51**:2-15.

Richter. CM: *Role of endothelin in chronic renal failure--developments in renal involvement*. Rheumatology: 2006; **45**: iii36-iii38.

Ridker. PM: *High-sensitivity C-reactive protein: Potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease*. *Circulation*: 2001; **103**:1813-1818.

Rivero. A, Mora. C, Muros, M, Garcia. J, Herrera. H, Navarro. JF: *Inflammation in diabetic nephropathy*. *Clinical Science*: 2009; **116**: 479-492.

Rossing. P. *Prediction, progression and prevention of diabetic nephropathy*. The Minkowski Lecture 2005. *Diabetologia*: 2006; **49**:11-19.

Rossing. P, Hougaard. P, Parving. HH: *Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients: a 10-year prospective observational study*. *Diabetes Care*: 2002; **25**: 859-864.

Royall. JA, Berkow. RL, Beckman. JS, Cunningham. MK, Matalon. S, Freeman. BA: *Tumor necrosis factor and interleukin 1 increase vascular endothelial permeability*. *Am J Physiol*: 1989; **257**: L339-L410.

Rubio-Guerra. AF, Vargas-Robles. H, Vargas Ayala. G, Escalante-Acosta. BA: *Correlation between circulating adhesion molecule levels and albuminuria in type 2 diabetic normotensive patients*. *Med Sci Monit*: 2007; **13**:CR349-CR352.

Rubio-Guerra. AF, Vargas-Robles. H: *Correlation between circulating adhesion molecule levels and albuminuria in type-2 diabetic hypertensive patients*. *Kidney Blood Press Res*: 2009; **32**:106-109.

Ruiz-Ortega. M, Esteban. V, Rupérez. M, Sánchez-López. E, Rodríguez-Vita. J, Carvajal. G, Egido. J: *Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*: 2006; **15**:159-166.

Ruiz-Ortega. M, Rupérez. M, Lorenzo. O, König. S, Wittig. B, Egidio. J: Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT (1) and AT (2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res*: 2000; **86**:1266-1272.

Ruiz-Ortega. M, Lorenzo. O, Suzuki. Y: *Proinflammatory actions of angiotensin II*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*: 2001; **10**: 321-329.

Ruiz-Ortega. M, Ruperez. M, Esteban. V, Egidio. J: *Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury*. *Curr Hypertens Rep*: 2003; **5**: 73-79.

Ruiz-Ortega. M, Ruperez. M, Esteban. V, Rodriguez-Vita. J: *Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases*. *Nephrol Dial Transplant*: 2006; **21**: 16-20.

Ruiz-Ortega. M, Gomez-Garre. D, Liu. XH, Blanco. J, Largo. R, Egidio. J: *Quinapril Decreases Renal Endothelin-1 Expression and Synthesis in a Normotensive Model of Immune-Complex Nephritis*. *J Am Soc Nephrol*: 1997; **8**: 756-768.

Sasser. JM, Sullivan. JC, Hobbs. JL, Yamamoto. T, Pollock. DM, Carmines. PK, Pollock. JS: *Endothelin A Receptor Blockade Reduces Diabetic Renal Injury via an Anti-Inflammatory Mechanism*. *J Am Soc Nephrol*: 2007; **18**: 143-154.

Schmidt. A, Crandall. J: *Elevated plasma levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in diabetic patients with microalbuminuria: a marker of vascular dysfunction and progressive vascular disease*. *Br J Haematol*: 1996; **92**:747-750.

Scott. LJ, Warram. JH, Hanna. LS, Laffel. LM, Ryan. L, Krolewski. AS: *A nonlinear effect of hyperglycemia and current cigarette smoking are major determinants of the onset of microalbuminuria in type 1 diabetes*. *Diabetes*: 2001; **50**:2842-2849.

Shikano. M, H. Sobajima. H, Yoshikawa. H, Toba. T, Kushimoto. H, Katsumata. H, Tomita. M, Kawashima. S: *Usefulness of a highly sensitive urinary and serum IL-6 assay in patients with diabetic nephropathy*. Nephron: 2000; **85**: 81-85.

Shin. SJ, Hsiao. PJ, Hsieh. MC, Lee. YJ, Tsai. JH: Increased urinary endothelin-1 excretion in newly diagnosed type 2 diabetic patient. Kaohsiung J Med Sci: 1999; **15**:589-596.

Simonson. MS: *Endothelins; multifunctional renal peptides*. Physiol Rev: 1993; **2**:375-411.

Smolander. J, Vogt. B, Maillard. M, Zwiackner. C, Littke. T, Hengelage. T, Burnier. M: *Dose-dependent acute and sustained renal effects of the endothelin receptor antagonist avosentan in healthy subjects*. Clin Pharmacol Ther: 2009; **85**: 628-634.

Sorokin. A, Kohan. DE: *Physiology and pathology of endothelin-1 in renal mesangium*. Am J Physiol Renal Physiol: 2003; **285**: F579–F589.

Standl. E, Balletshoffer. Dahl. VB, Weichenhain. B, Steigler. H, Hormann. A, Holle. R: *Predictors of 10-year macrovascular and overall mortality in patients with NIDDM: The Munich General Practitioner Project*. Diabetologia: 1996; **39**:1540-1545.

Stehouwer. CD, Gall. MA, Twisk. JW, Knudsen. E, Emeis. JJ, Parving. HH: *Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death*. Diabetes: 2002; **51**:1157-1165.

Stehouwer. CD, Fischer. HR, van Kuijk. AW: *Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM*. Diabetes:1995; **44**: 561-564.

Stengel. B, Tarver-Carr. ME, Powe. NR: *Lifestyle factors, obesity and the risk of chronic kidney disease*. Epidemiology: 2003; **14**:479-487.

Stratton. IM, Adler. AL: *Association of glycemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes: Prospective observational study*. BMJ: 2000; **321**: 405-412.

Stuveling. EM, Hillege. HL, Bakker. SJ: *C-reactive protein is associated with renal function abnormalities in a nondiabetic population*. Kidney Int: 2003; **63**:654-661.

Suga. S, Yasui. N, Yoshihara. F: *Endothelin a receptor blockade and endothelin B receptor blockade improve hypokalemic nephropathy by different mechanisms*: J Am Soc Nephrol: 2003; **14**:397-406.

Suzuki. Y: *Susceptibility to T cell-mediated injury in immune complex disease is linked to local activation of renin-angiotensin system: the role of NF-AT pathway*. J Immunol: 2002; **169**:4136-4146.

Suzuki. D, Miyazaki. M, Naka. R, Koji. T, Yagame. M, Jinde. K: *In situ hybridization of interleukin 6 in diabetic nephropathy*. Diabetes: 1995; **44**: 1233-1238.

Takebayashi. K, Matsumoto. S, Aso. Y: *Aldosterone blockade attenuates urinary monocyte chemoattractant protein-1 and oxidative stress in patients with type 2 diabetes complicated by diabetic nephropathy*: J Clin Endocrinol Metab: 2006; **91**: 2214-2217.

Takeda. M, Iwasaki. S, Hellings. SE, Yoshida. H, Homma. T, Kon. V: *Divergent expression of EtA and EtB receptors in response to cyclosporine in mesangial cells*. Am J Pathol: 1994; **144**: 473-479.

Tam. FW, Riser. BL, Meeran. K, Rambow. J, Pusey. CD, Frankel. AH: *Urinary monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and connective tissue growth factor (CCN2) as prognostic markers for progression of diabetic nephropathy*. Cytokine: 2009; **47**:37-42.

Tarnow. L: Diabetic nephropathy. Pathogenetic aspects and cardiovascular risk factors. Dan Med Bull: 2002; **49**:19-42.

Tashiro. K, Koyanagi. I, Saitoh. A, Shimizu. A, Shike. T, Ishiguro. C, Koizumi. M, Funabiki. K, Horikoshi. S, Shirato. I, Tomino. Y: *Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin -8 (IL-8) and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy.* J Clin Lab Anal: 2002; **16**:1-4.

Tharoux. PL, Hagege. I, Placier. S, Vayssairat. M, Kanfer. A, Girot. R, Dussaule. JC: *Urinary endothelin-1 as a marker of renal damage in sickle cell disease.* Nephrol Dial Transplant: 2005; **20**:2408-2413.

Tone. A., Shikata. K, Sasaki. M, Ohga. S, Yozai. K, Nishishita. S, Usui. H, Nagase. R, Ogawa. D, Okada. S, Shikata. Y, Wada. J, Makino. H: *Erythromycin ameliorates renal injury via anti-inflammatory effects in experimental diabetic rats.* Diabetologia: 2005; **48**: 2402-2411.

Ulbrich. H, Eriksson. EE, Lindbom. L: *Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease.* Trends Pharmacol Sci: 2003; **24**: 640-647.

Utimura. R, Fujihara. CK, Mattar. A, Malheiros. DM, Noronha. IL, Zatz. R: *Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes.* Kidney International: 2003; **63**: 209-216.

Verma. S, Li. SH, Badiwala. MV, Weisel. RD, Fedak. PW, Li. RK, Dhillon. B, Mickle. D: *Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein.* Circulation: 2002; **105**:1890-1896.

Verma. S, Kuliszewski. MA, Li. SH, Szmitko. PE, Zucco. L: *C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: Further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease.* Circulation: 2004; **109**: 2058- 2067.

Vlachojannis. J, Tsakas. S, Chinari. E, Orphanos. V, Zoumbos. N, Kurz. P: *Increased endothelin-1 content in the platelets of hemodialysed patients.* Clin Nephrol: 1997; **48**:185-190.

Vuurmans. TJ, Boer. P, Koomans. HA: *Effects of endothelin- 1 and endothelin-1 receptor blockade on cardiac output, aortic pressure, and pulse wave velocity in humans.* Hypertension: 2003; **41**: 1253-1258.

Yozai. K, Shikata. K, Sasaki. M: *Methotrexate prevents renal injury in experimental diabetic rats via anti-inflammatory actions.* J Am Soc Nephrol: 2005; **16**: 3326-3338.

Wang. QY, Chen. FQ: *Clinical significance and different levels of urinary monocyte chemoattractant protein-1 in type 2 diabetes mellitus.* Diabetes Res Clin Pract: 2009; **83**: 215-219.

Wang. Y, Rangan. GK, Tay. Y-C, Wang. Y, Harris. DC: *Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by albumin is mediated by nuclear factor kB in proximal tubule cells.* J Am Soc Nephrol: 1999; **10**:1204-1213.

Warram. JH, Gearin. G, Laffel. L, Krolewski. AS: *Effect of duration of type I diabetes on the prevalence of stages of diabetic nephropathy defined by urinary albumin/creatinine ratio.* J Am Soc Nephrol: 1996; **7**:930-937.

Watson. AM, Li. J, Schumacher. C, de Gasparo. M, Feng. B, Thomas. MC, Allen. TJ, Cooper. ME, Jandeleit-Dahm. KA: The endothelin receptor antagonist avosentan ameliorates nephropathy and atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia*: 2010; **53**:192-203.

Weber. C, Schmitt. R, Birnboeck. H, Hopfgartner. G, van Marle. SP, Peeters. PA, Jonkman. JH, Jones. CR: *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the endothelin-receptor antagonist bosentan in healthy human subjects*. *Clin Pharmacol Ther*: 1996; **60**:124-137.

Wenzel. RR, Mann. J, Jurgens. C, Yildirim. I, Bruck. H, Philipp. T, Mitchell. A, Mitchell. A: for the SPP301 (Avosentan) Endothelin Antagonist Evaluation in Diabetic Nephropathy Study Investigators. *Avosentan reduces albumin excretion in diabetics with macroalbuminuria*. *J Am Soc Nephrol*: 2009; **20**: 655-664.

Wolf. G, Ritz. E: *Diabetic nephropathy in type 2 diabetes prevention and patient management*. *J Am Soc Nephrol*: 2003; **14**:1396-1405.

Wong. CK, Ho. AW, Tong. PC, Yeung. CY, Chan. JC, Kong. AP, Lam. CW: Aberrant expression of soluble co-stimulatory molecules and adhesion molecules in type 2 diabetic patients with nephropathy. *J Clin Immunol*: 2007; **28**:36-43.

Wu. CC, Chen. JS, Lu. KC, Chen. CC, Lin. SH, Chu. P, Sytwu. HK, Lin. YF: Aberrant cytokines/chemokines production correlate with proteinuria in patients with overt diabetic nephropathy: *Clin Chim Acta*: 2010; **2**:700-704.

Wu. X, Zha. D, Xiang. G, Zhang. B, Xiao. SY, Jia. R: *Combined MMF and insulin therapy prevents renal injury in experimental diabetic rats*. *Cytokine*: 2006; **36**: 229-236.

Zanatta. CM, Gerchman. F, Burttet. L, Nabinger. G, Jacques-Silva. MC, Canani. LH, Gross. JL: *Endothelin-1 levels and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Diabetes Res Clin Pract*: 2008; **80**:299-304.

Zohdi. V, Moritz. KM, Bubb. KJ, Cock. ML, Wreford. N, Harding. R, Black. MJ: Nephrogenesis and the renal renin-angiotensin system in fetal sheep: effects of intrauterine growth restriction during late gestation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*: 2007; **293**: 1267-1273.

Zoja. C, Donadelli. R, Colleoni. S, Figliuzzi. M, Bonazzola. S, Morigi. M, Remuzzi. G: *Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kB activation*. *Kidney Int*: 1998; **53**:1608-1615.

Zoja. C, Morigi. M, Benigni. A, Remuzzi. G: *Cellular responses to protein overload: key event in renal disease progression*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*: 2004; **13**:31-37.