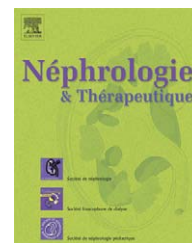




Disponible en ligne sur [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



journal homepage: [//france.elsevier.com/direct/nephro/](http://france.elsevier.com/direct/nephro/)



## Communications affichées

### Recherche

#### AR001 Affiche Recherche. Expérimental-biomoléculaire ou cellulaire

##### Effet des polyéthylènes glycols contenus dans les liquides de conservation sur la réaction allo-immune

H. Perrin <sup>a</sup>, C. Marcus <sup>b</sup>, L. Badet <sup>c</sup>, J.-F. Nicolas <sup>a</sup>, E. Morelon <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Inserm U503, Inserm-Ifr 128, Lyon, France

<sup>b</sup> Laboratoire d'immunologie, hospices civils de Lyon, Lyon, France

<sup>c</sup> Service de néphrologie et de transplantation rénale, hospices civils de Lyon, Lyon, France

**Introduction.** - L'ischémie associée à la transplantation rénale entraîne des lésions qui vont conditionner le fonctionnement et la durée de vie du greffon. Lors de la reperfusion, les altérations tissulaires et l'inflammation sont associées à une sur-expression de molécules activatrices de la réponse allo-immune. Les polyéthylènes glycols (PEG) de hauts poids moléculaires (20 et 35 kDa) dans les liquides de conservation pourraient masquer des sites antigéniques par encombrement stérique, et exercer ainsi un immunomasquage du greffon associé à une diminution de la réaction allo-immune. Nous avons voulu tester cette hypothèse *in vitro*.

**Matériels et méthodes.** - Par immunofluorescence en microscopie et cytométrie en flux, nous avons analysé l'effet des PEG sur l'expression de différents antigènes de lymphocytes humains et lignées cellulaires. Nous avons également utilisé un méthoxy-PEG activé qui se lie de façon covalente aux membranes cellulaires. L'effet des PEG sur la réponse immune a été étudiée dans des tests fonctionnels *in vitro* : mesure de la prolifération en réponse à des antigènes, mitogènes et dans des réactions lymphocytaires mixtes.

**Résultats.** - Après incubation des cellules en présence de différentes concentrations de PEG 6, 20 ou 35 kDa, nous

n'observons aucune modification de l'expression des molécules telles que HLA I, HLA II, CD3, CD4, CD8, CD28, CD29, CD19, CD20. Nous montrons également que ces PEG n'ont pas d'effet sur les mouvements membranaires après activation des lymphocytes par des anticorps anti-CD3. En revanche, lorsque le PEG est lié de façon covalente à la membrane de ces cellules, l'expression des marqueurs étudiés diminue de façon dose-dépendante. Cette pegylation des lymphocytes a pour effet de diminuer leur prolifération en réponse à des antigènes, mitogènes et alloantigènes. *In vitro*, on ne retrouve pas ces effets inhibiteurs pour les PEG 20 et 35 kDa non greffés à la membrane.

**Discussion.** - Les PEG utilisés dans les liquides de conservation n'induisent pas d'immunomasquage, dans des conditions proches de celles de la transplantation. L'effet inhibiteur de la réponse allogénique observé en clinique pourrait être lié à l'amélioration de la préservation des greffons qui diminue ainsi leur immunogénicité. Cette hypothèse sera vérifiée *in vivo*, dans des modèles de reins isolés et perfusés chez la souris.

**Conclusion.** - Ces études *in vitro* nous permettent de réfuter l'hypothèse d'un immunomasquage comme mécanisme immunonoprotecteur par les PEG contenus dans les liquides de conservation d'organe.

#### AR002 Affiche Recherche. Expérimental-biomoléculaire ou cellulaire

##### L'expression membranaire de MICA et la production de MICA soluble procurent de nouvelles fonctions immunomodulatrices aux cellules endothéliales vasculaires

A. Chauveau, S. Coupel, B. Charreau  
Inserm U643, Hôtel-Dieu, Nantes, France

**Introduction.** - MICA est une molécule de CMH de classe I non classique fortement polymorphique impliquée dans

l'activation des cellules TCD8<sup>+</sup> et NK via le récepteur NKG2D. L'expression de MICA est restreinte à un petit nombre de cellules incluant les cellules endothéliales (CE). Cependant, la régulation et les fonctions de MICA par les CE humaines sont mal définies.

**Matériels et méthodes.** - L'étude de l'expression et la régulation de MICA par les CE humaines en réponse aux cytokines (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ ) a été réalisée par cytométrie en flux, microscopie confocale, ELISA et western blot, en utilisant différents anticorps anti-MIC et la protéine recombinante NKG2D-Fc. La capacité des formes membranaire et soluble de MICA à moduler l'activité cytotoxique des cellules NK et l'expression du récepteur NKG2D a aussi été étudiée.

**Discussion.** - Nos résultats montrent que les CE vasculaires humaines (HUVEC et HAEC) expriment de façon constitutive MICA, mais pas MICB, à leur surface. Au niveau intracellulaire, l'expression de MICA est localisée dans le Golgi. Le blocage de NKG2D ou de MICA diminue la lyse des CE par les NK de 56 $\pm$ 4% par rapport aux contrôles, confirmant ainsi l'importance fonctionnelle de l'expression de MICA par l'endothélium. La lyse des CE par les NK allogéniques est corrélée au niveau d'expression de MICA à la surface des CE. Par des tests de co-culture, nous avons montré que l'expression membranaire de MICA par les CE diminue l'expression de NKG2D par les cellules NK et diminue la lyse redirigée des cellules NK sur des cellules cibles transfectées pour MICA (C1R MICA). A la différence des molécules de CMH de classe I classique, l'expression de MICA n'est pas régulée à la surface des CE en réponse aux cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ ). De plus, l'IFN $\gamma$  diminue l'expression de MICA à la surface des CE de 40-50% après 48h d'activation. Nous montrons que le TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  et l'IFN $\gamma$  induisent la production dose-dépendante et temps-dépendante de MICA soluble (sMICA) par CE activées (de 31.1 $\pm$ 1.4 à 126.5 $\pm$  4.3 pg/ml pour les cellules «au repos» et activées par le TNF $\alpha$ , respectivement). L'inhibition des métalloprotéinases (galardine, 50 $\mu$ M) réduit efficacement la production de sMICA et augmente l'expression de MICA à la membrane.

**Conclusion.** - En conclusion, la régulation sélective de MICA à la membrane et la production de sMICA affectent l'activation des effecteurs (cellules NK et CTL) via NKG2D et procurent de nouvelles fonctions immunorégulatrices à l'endothélium.

### AR003 Affiche Recherche. Expérimental-biomoléculaire ou cellulaire

#### Étude par métabolomique cellulaire de l'effet du valproate dans des tranches de cortex rénal humain coupées avec précision

G. Baverel, A. Vittorelli, C. Gauthier, C. Michoudet, G. Martin  
Inserm U499, faculté de médecine Laennec, Lyon, France

**Objectif.** - Le but de notre étude était d'évaluer les tranches de cortex rénal humain comme modèle d'étude du mécanisme par lequel le valproate de sodium, un médicament antiépileptique très efficace et très utilisé, stimule l'ammoniogenèse rénale à partir de la glutamine et conduit ainsi à une hyperammoniémie.

**Matériels et méthodes.** - Nous avons incubé des tranches de cortex rénal humain dans un milieu de Krebs-Henseleit pendant 4 heures ou dans un milieu de William's E pendant 24 et 48 heures en présence de glutamine non marquée ou marquée avec du carbone 13. A la fin de l'incubation, l'utilisation de glutamine et la synthèse des produits carbonés et azotés ont été mesurées par des méthodes enzymatiques et par spectroscopie RMN du carbone 13.

**Résultats.** - L'accumulation de glutamate tend à plafonner mais la consommation de glutamine, l'accumulation d'ions ammonium, de lactate et d'alanine ainsi que le flux au niveau de la glutamate déshydrogénase augmentent au cours du temps d'incubation jusqu'à 4 heures ce qui témoigne de la viabilité des tranches. Le valproate stimule de façon marquée et dose-dépendante la production d'ions ammonium. Avec la 3-13C-glutamine comme substrat, en absence et en présence de valproate (1 mM), les accumulations de 13C-glutamate, 13C-alanine et 13C-lactate rendent compte respectivement de 81% et 96%, 34% et 63%, 30% et 46% des accumulations de glutamate, alanine et lactate mesurées enzymatiquement. La combinaison des mesures enzymatiques et de spectroscopie RMN du carbone 13 avec un modèle mathématique des voies du métabolisme de la glutamine que nous avons développé et validé montre que le valproate stimule les flux au niveau des deux enzymes ammoniogéniques (glutaminase et glutamate déshydrogénase) ainsi qu'au niveau de l'alanine aminotransférase, la phosphoenolpyruvate carboxykinase, la pyruvate kinase et la lactate déshydrogénase. Les tranches conservent leur réactivité vis-à-vis de l'action ammoniogénique du valproate lors d'incubations durant 24 et 48 heures.

**Discussion.** - Bien qu'étant le siège d'un métabolisme endogène substantiel, les tranches de cortex rénal humain sont métaboliquement viables.

**Conclusion.** - La métabolomique cellulaire donne une vision d'ensemble du devenir métabolique d'un substrat donné, identifie les voies métaboliques et mesure l'action à court ou long terme d'un agent pharmaco-toxicologique sur les flux au niveau des enzymes impliquées.

### AR004 Affiche Recherche. Expérimental-biomoléculaire ou cellulaire

#### Les plaquettes sanguines expriment les « tissu inhibitors of metalloproteinases » et stimulent leur expression par les cellules mésangiales

J. Villeneuve <sup>a</sup>, A. Block <sup>b</sup>, Y. Delmas <sup>a</sup>, A. Desmoulière <sup>a</sup>, P. Costet <sup>c</sup>, J. Rosenbaum <sup>a</sup>, A.-T. Nurden <sup>b</sup>, C. Combe <sup>a</sup>, J. Ripoche <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Inserm E 362, université Bordeaux-II, Bordeaux, France

<sup>b</sup> Service d'hématologie, hôpital du Haut-Lévêque, Bordeaux, France

<sup>c</sup> Animalerie spécialisée, université Bordeaux-II, Bordeaux, France

**Introduction.** - Les plaquettes sanguines pourraient être des acteurs de la fibrose tissulaire mais leur implication est peu explorée. Elles peuvent intervenir (1) directement par la libération de médiateurs pro-fibrosants stockés dans leurs granules, comme le TGF- $\beta$  ou (2) indirectement, par le biais de médiateurs pro-fibrosants générés lors de l'activation de la coagulation, comme la thrombine. La fibrose

tissulaire se caractérise par l'accumulation excessive de matrice extra cellulaire (MEC) ; l'insuffisance de sa dégradation par les métalloprotéases matricielles (MMPs) semble être un paramètre clé. Par exemple, dans la fibrose hépatique, il existe une surexpression des "Tissue Inhibitors of Metalloproteinases" (TIMPs), une famille d'enzymes inhibant l'activité des MMPs. Dans ce travail, nous avons étudiés les liens entre plaquettes et expression des TIMPs.

**Matériels et méthodes.** - Les plaquettes et les cellules mésangiales humaines (CMs) ont été obtenues selon les techniques standard. L'expression des TIMPs par les plaquettes a été analysée par des méthodes de Western blot et de microscopie confocale. Leur expression a été également recherchée dans une lignée de mégacaryocytes humains par microscopie confocale et RT-PCR. Pour analyser l'induction des TIMPs par les CMs, nous les avons co-cultivées en présence de plaquettes activées à la thrombine ; la quantification des ARNm a été effectuée par RT-PCR quantitative.

**Résultats.** - Nous montrons que les plaquettes expriment les 4 membres de la famille des TIMPs. Ces derniers sont stockés dans les granules- $\alpha$  et sécrétés après activation plaquettaire. Les TIMPs sont également exprimés dans une lignée de mégacaryocytes suggérant qu'ils sont synthétisés au niveau du mégacaryocyte, résultats confirmés par la présence de leurs ARNm. D'autre part, les plaquettes stimulent l'expression de l'ARNm de TIMP-1 par les CMs. Nous analysons les bases moléculaires de cette induction.

**Discussion.** - Nos résultats indiquent que les plaquettes expriment les différents membres de la famille des TIMPs, qu'elles les sécrètent après activation et qu'elles induisent l'expression de TIMP-1 par les CMs (l'induction des autres TIMPs est en cours d'étude).

**Conclusion.** - Compte tenu du rôle clé des TIMPs dans le contrôle de la dégradation de la MEC, nos résultats suggèrent un nouveau mécanisme moléculaire par lequel les plaquettes pourraient intervenir dans la fibrose glomérulaire.

## AR005 Affiche Recherche. Expérimental-biomoléculaire ou cellulaire

### Modulation des protéines liées au métabolisme rénal du cholestérol au cours de l'ischémie-reperfusion

F. Favreau, E. Manguy, L. Rossard, J.-P. Richer, T. Desurmont, C. Doucet, I. Petit-Paris, G. Mauco, T. Hauet  
Inserm E0324, CHU La Milétrie, faculté de médecine et de pharmacie, Poitiers, France

**Introduction.** - Parmi les problèmes d'actualité en transplantation rénale on retrouve : la pénurie de greffons et la reprise retardée de fonction liée à l'ischémie reperfusion (IR). Les donneurs « à cœur arrêté » représentent une source potentielle de greffons, mais associée à un taux important de reprise différée de fonction. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au rôle du récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR) au cours de l'IR. La fonction essentielle de cette protéine mitochondriale, sous sa forme polymérique, est de transporter le cholestérol en partenariat avec la protéine Steroidogenesis acute receptor (StAR) au cours de la synthèse des stéroïdes. PBR a été également décrit dans de nombreux tissus n'ayant pas de fonction stéroïdogène. Notre objectif a été dans un modèle d'IR

rénale porcin, d'étudier l'effet de la conservation (IF) associée ou non à une ischémie chaude (IC) sur la fonction de ce récepteur.

**Matériels et méthodes.** - Dans cet objectif, nous avons quantifié, dans le tissu rénal, le cholestérol et son premier dérivé au cours de la stéroïdogénèse, la pregnénolone, et nous avons évalué l'expression protéique et génique des protéines associées à la formation de ce dérivé telles que StAR et le cytochrome P450scc.

**Résultats.** - Nous avons constaté que la séquence d'IC-IF-reperfusion lors d'une transplantation entraînait une augmentation intra-tissulaire du cholestérol estérifié au cours de la reperfusion. Les résultats indiquent une diminution de la quantité de pregnénolone au 3<sup>ème</sup> jour de reperfusion et que l'expression génique de StAR est non déterminable avec les moyens utilisés.

**Discussion.** - Ces résultats montrent que le métabolisme du cholestérol est modulé au cours de l'IR et de façon moindre celui de la pregnénolone. Il semblerait que : 1. Le faible niveau d'expression de StAR n'en fait pas un partenaire essentiel de PBR dans le métabolisme du cholestérol en particulier au cours de la régénération tissulaire ; 2. L'implication de PBR dans ce contexte n'est pas lié à la synthèse stéroïdienne de façon primordiale et 3. Le rôle de ce récepteur reste dévolu au métabolisme du cholestérol mais avec d'autres fonctionnalités dans les organes non stéroïdogènes. Notre hypothèse est que dans le contexte de la régénération tissulaire, PBR est essentiellement fonctionnelle sous forme monomérique.

**Conclusion.** - Ces résultats ouvrent des perspectives nouvelles dans le métabolisme du cholestérol dans des tissus exprimant PBR mais n'ayant pas de fonction directe dans la stéroïdogénèse.

## AR006 Affiche Recherche. Expérimental-biomoléculaire ou cellulaire

### Induction de la transition épithélium-mésenchyme en conditions hypoxiques et expression des gènes de mucines dans des lignées cellulaires rénales

S. Aubert <sup>a</sup>, M. Perrais <sup>b</sup>, A. Bernigaud <sup>b</sup>, X. Leroy <sup>a</sup>, I. Van Seuningen <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Service d'anatomie pathologique, centre hospitalier régional et universitaire, Lille, France

<sup>b</sup> Inserm U560, Lille, France

**Introduction.** - Dans le rein, organe non mucisécrétant, il existe une expression des gènes de mucines membranaires *MUC3* et *MUC20* au niveau du tube contourné proximal et de *MUC1* au niveau du tube contourné distal et des tubes collecteurs. Une surexpression de ces gènes de mucines a été mise en évidence dans des carcinomes rénaux ainsi que dans des modèles de néphropathie aiguë et chronique. 70% des carcinomes à cellules claires du rein présentent une inactivation du gène suppresseur de tumeur *VHL*. La protéine pVHL régule l'expression de nombreux gènes dont *VEGF*, par le biais d'un facteur de transcription, HIF1- $\alpha$  dont il contrôle la stabilité. En situation d'hypoxie ou lorsque *VHL* est inactivé, HIF1- $\alpha$  est stabilisé et induit donc une surexpression de ces gènes cibles. En outre, l'hypoxie prolongée peut induire une Transition Epithélium Mésenchyme (TEM) des cellules épithéliales tubulaires rénales normales. Des tra-

vaux récents mettent en évidence que HIF-1 peut contribuer à cette TEM par répression indirecte de l'*E-cadhérine* dans des lignées de carcinomes à cellules rénales mutées pour *VHL*. La TEM est un processus adopté par les cellules normales au cours du développement et des processus de réparation ainsi que par les cellules cancéreuses afin d'acquies des propriétés d'invasion et de mobilité accrue.

**Matériels et méthodes.** - En conditions hypoxiques, nous induisons une TEM sur certaines lignées cellulaires rénales. Par RT-PCR et Western blots, l'expression des gènes de mucine ainsi que de différents marqueurs sont évalués.

**Discussion.** - En conditions hypoxiques, les lignées cellulaires rénales, tubulaire proximale normale, HK-2 et carcinomateuse non mutée pour *VHL*, ACHN montrent les caractéristiques d'une TEM. Nous observons une induction par l'hypoxie de l'expression de *MUC1*, *MUC3* et *MUC20* ainsi qu'une répression des marqueurs épithéliaux (*E-cadhérine*, certaines cytokératines) et une induction des marqueurs mésenchymateux (fibronectine, MMPs, Zeb-1). En outre l'utilisation du Chlorure de Cadmium et de YC-1, inhibiteurs des effets transactivateurs de HIF1- $\alpha$ , indique une inhibition de *MUC3* et de *MUC1*. Les mucines membranaires pourraient être des gènes cibles de HIF1- $\alpha$  et pourraient jouer un rôle au cours de la TEM.

**Conclusion.** - En conditions hypoxiques, nous observons une TEM dans nos modèles cellulaires ainsi qu'une surexpression des gènes *MUC1*, *MUC3* et *MUC20* probablement via HIF1- $\alpha$ . Les marqueurs mis en évidence seront évalués sur des échantillons issus de la Tumorothèque de Lille.

## AR007 Affiche Recherche. Expérimental-biomoléculaire ou cellulaire

### Nouvelles fonctions de l'IL-15 dans la biologie des cellules épithéliales rénales

K. Khawam, J. Giron Michel, M. Giuliani, A. Devocelle, B. Azzarone  
U542 Inserm, hôpital Paul-Brousse, Villejuif, France

**Introduction.** - L'IL-15 sécrétée par les cellules épithéliales rénales participe à l'initiation et à l'évolution du rejet d'allogreffe. Cependant, l'IL-15 semble être impliquée d'une façon indirecte, par le biais de son action sur l'expansion et la survie des lymphocytes allospécifiques CD8<sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup> qui infiltrent le greffon.

Néanmoins, plusieurs éléments potentiellement importants comme l'expression des différentes formes fonctionnelles de la cytokine (soluble, membranaire, hyper-IL-15), la sécrétion d'un immuno-modulateur puissant comme la forme soluble de la chaîne IL-15Ra, ou l'existence d'une activité autocrine nous semblent avoir été sous-estimées au cours de ces études. Nous proposons ainsi que l'IL-15 sous sa forme membranaire pourrait être impliquée d'une manière plus directe dans le processus de rejet d'allogreffe en agissant sur la transition épithelio-mésenchymateuse (TEM).

**Matériels et méthodes.** - Analyse sur cultures primaires de cellules épithéliales rénales humaines de l'expression et fonction du système IL-15/IL15R.

**Résultats.** - Les cellules épithéliales rénales humaines 1) expriment, un IL-15R incomplet (IL-15Ra<sup>+</sup>/b<sup>+</sup>/gc<sup>-</sup>). 2) expriment une nouvelle espèce biochimique trans-mem-

branaire d'IL-15 (27 kDa), clivable par des métallo-protéases. 3) Sécrètent une nouvelle forme d'IL-15Ra soluble (32 kDa) qui peut agir comme : 1) antagoniste en inhibant la maturation NK, 2) agoniste en activant des boucles autocrines. En effet, en se liant à l'IL-15 transmembranaire, l'IL-15Ra soluble active une signalisation reverse (voie de MAP-kinases, p38 et ERK1/2) et, en synergie avec le TGF $\beta$ , la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine.

**Discussion.** - Les cellules épithéliales rénales expriment l'IL-15mb qui possède le potentiel d'induire une signalisation bidirectionnelle : En agissant comme ligand active sur les cellules environnantes un IL-15R incomplet et induit probablement une signalisation partielle. En agissant comme récepteur en réponse à l'IL-15Ra soluble active des voies de signalisation compatibles avec l'induction de la TEM.

**Conclusion.** - Enfin, l'IL-15Ra soluble pourrait développer des interactions moléculaires « spécifiques » au microenvironnement rénal, interférant sur la réponse immunitaire et sur le comportement des cellules épithéliales.

## AR008 Affiche Recherche. Expérimental-biomoléculaire ou cellulaire

### Induction de la mort tumorale par activation du complément dépendante des anticorps naturels

J. Dupont <sup>a</sup>, A. Durrbach <sup>a</sup>, A. Durrbach <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Inserm U 542, hôpital Paul-Brousse, Villejuif, France

<sup>b</sup> Service de néphrologie et de greffe rénale, CHU, Le Kremlin-Bicêtre, France

**Introduction.** - L'adénocarcinome rénal (RCC) est la tumeur solide dont la fréquence est très accrue chez les patients dialysés et les transplantés rénaux. Chez les malades ayant des métastases, la mortalité est très importante (90 % la première année quelque soit les traitements reçus). Le développement d'immunothérapie antitumorale « spécifique » ouvre des perspectives intéressantes en permettant le ciblage sélectif de molécules ayant une toxicité directe ou indirecte sur des cellules cancéreuses. Notre modèle d'étude est la nécrose cellulaire observée au cours du rejet hyperaigu observé en xénotransplantation. Il est lié à la reconnaissance d'un oligosaccharidique à la surface des cellules de mammifère, l'épitope Gala1-3Gal, par les anticorps naturels anti-Gala1-3Gal, notamment les IgM, présents dans le sérum humain. L'activation du système du complément qui en découle est responsable du rejet de greffe et de la nécrose cellulaire (CDCC).

**Matériels et méthodes.** - Nous exprimons, à la surface des RCC humaines, l'épitope Gala1-3Gal par transfection plasmidique de l'ADNc codant pour la galactosyltransférase et également par ciblage cellulaire des anticorps monoclonaux antitumoraux conjugués de façon covalente à l'épitope.

Nous développons également une protéine chimérique de type scFV constituée des parties variables des chaînes lourdes et légères de l'immunoglobuline 5C5 (spécifique des RCC) auxquelles ont été adjointes deux séquences hexapeptidiques SSLRGF connues pour fixer fortement les anticorps naturels anti-Gala1-3Gal du sérum humain.

**Résultats.** - Les études in vitro montrent que l'expression membranaire de l'épitope Gala1-3Gal induit une augmentation de l'activation du complément à la surface cel-

lulaire en présence de sérum humain et la mort par nécrose. L'inhibition des régulateurs membranaires du complément tels que CD55 ou CD59 augmente la quantité de complément activé.

*Discussion.* - Cependant, la mortalité cellulaire complément-dépendante semble quantitativement proportionnelle à la quantité d'épitope exprimé.

*Conclusion.* - La création de ces molécules originales pourrait permettre d'observer *in vivo* une régression tumorale efficace caractérisée par un mécanisme similaire à celui observé lors du rejet hyper aigu observé en xénotransplantation.

## AR009

### Affiche Recherche. Expérimental modèle animal

#### Conséquences de la carence en œstrogènes sur l'hypertrophie rénale compensatrice chez la souris

J. Allard, M. Buléon, F. Praddaude, A. Jaafar, M.-T. Ranera, I. Tack

Service des explorations fonctionnelles physiologiques, CHU Rangueil, Toulouse, France

*Introduction.* - Le rôle physiologique rénal et glomérulaire des œstrogènes est encore peu connu. Afin d'évaluer leur rôle trophique potentiel, nous avons examiné, *in vivo*, le rôle des œstrogènes dans le modèle d'hypertrophie rénale adaptative à l'uni-néphrectomie (UNx).

*Matériels et méthodes.* - Des souris C57BL6j femelles ont subi une ovariectomie à 8 semaines (sem) puis une UNx quatre semaines plus tard (groupe ON). Une substitution physiologique en 17 $\beta$ -œstradiol (implants E2, 80  $\mu$ g/kg/j) a été débutée aussitôt après (groupe ONE), ou bien 18 semaines après l'UNx (groupe ONEd). Le Débit de Filtration Glomérulaire (DFG), l'histomorphologie rénale et l'expression glomérulaire de protéines d'intérêt ont été étudiés précocement (48 heures, 1, 4 et 8 sem) et tardivement (34 sem).

*Discussion.* - L'uni-néphrectomie seule (groupe N) s'accompagne d'une diminution du DFG de 28,2% ( $p < 0.01$ ) par rapport aux animaux non néphrectomisés et d'une hypertrophie rénale controlatérale de 142% ( $p < 0.01$ ) qui concerne majoritairement les structures tubulaires. L'ovariectomie ralentit et limite l'hypertrophie rénale adaptative à l'UNx et augmente le volume mésangial fractionnel (23 $\pm$ 4,9% groupe N ; 26,7 $\pm$ 9,8 % groupe ON,  $p < 0,05$ , 8 sem après l'Unx), sans induire de modifications du DFG à 34 semaines. La substitution en E2 concomitante de l'UNx prévient les conséquences de la carence en œstrogènes et s'accompagne d'un surcroît significatif d'hypertrophie glomérulaire, qui prédomine sur les capillaires, sans augmentation de l'aire mésangiale. En revanche, lorsque la substitution est différée, le DFG s'altère significativement (34 sem : 187 $\pm$ 33  $\mu$ L/min/65cm<sup>2</sup> groupe ONE ; 108 $\pm$ 30  $\mu$ L/min/65cm<sup>2</sup> groupe ONEd,  $p < 0,001$ ). Le niveau d'expression glomérulaire de l'IGF1-R, de l'IRS-1, ERK1/2 et du TGF $\beta$ -R11 n'est pas modifié à 48 heures, 1 et 8 semaines après l'UNx. L'expression glomérulaire du récepteur 2 du VEGF (Flk-1) augmente 48 heures après la néphrectomie (N et ONE) sauf dans le groupe ON.

*Conclusion.* - Cette observation, *in vivo*, met en évidence le rôle bénéfique des œstrogènes sur l'initiation de l'hypertrophie rénale compensatrice de l'uni-néphrecto-

mie, mais indique également qu'ils peuvent devenir délétères s'ils sont introduits tardivement.

## AR010

### Affiche Recherche. Expérimental modèle animal

#### La transglutaminase tissulaire (tTg) contribue au développement de la fibrose rénale en favorisant l'accumulation de collagène fibrillaire

N. Shweke<sup>a</sup>, N. Boulos<sup>a</sup>, C. Jouanneau<sup>a</sup>, C. Chatziantoniou<sup>a</sup>, J.-C. Dussaule<sup>a</sup>, P. Ronco<sup>a</sup>, J.-J. Boffa<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Inserm U702, hôpital Tenon, Paris, France

<sup>b</sup> service de néphrologie et de dialyses, hôpital Tenon, Paris, France

*Introduction.* - La fibrose rénale est définie par une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire (MEC). Celle-ci peut résulter d'une augmentation de synthèse ou d'une diminution de leur dégradation. La tTg est connue pour modifier les protéines de la MEC par la création de liaisons covalentes irréversibles les rendant plus résistantes à la dégradation. De plus, elle participe à l'activation du TGF- $\beta$ , facteur profibrosant. Indépendamment de son activité enzymatique, elle joue le rôle de co-récepteur de la fibronectine.

*Matériels et méthodes.* - Nous avons testé si la tTg est impliquée dans le développement de la fibrose rénale grâce à l'utilisation de souris dont le gène de la tTg a été invalidé. Les souris ont été étudiées à l'état basal et après 12 jours d'obstruction urétérale unilatérale.

*Résultats.* - A l'état basal, la PA et le DFG n'étaient pas différents entre les groupes. Les souris KO avaient une microalbuminurie physiologique plus élevée que les témoins ( $p < 0,01$ ), mais elles n'ont pas développé de lésions rénales spontanément. L'obstruction urétérale a induit une forte augmentation de l'expression de la tTg interstitielle chez les souris sauvages et une fibrose interstitielle chez tous les animaux caractérisée par une accumulation de matrice, une infiltration cellulaire, une dilatation et une atrophie tubulaire. La quantification de la MEC par l'étude morphométrique après coloration par le trichrome de Masson n'était pas différente entre les groupes. Une dilatation tubulaire plus importante a été observée chez les souris KO ( $p = 0,001$ ). Le contenu en collagène fibrillaire quantifié par le rouge Sirius et en hydroxyproline était plus abondant chez les souris sauvages que chez les KO. De même, les souris sauvages avaient un marquage du COL I plus marqué que les souris KO. Le produit de dégradation du COL I, était très élevé chez les animaux sauvages par comparaison aux animaux invalidés ( $p = 0,001$ ).

*Discussion.* - Ces résultats témoignent du rôle profibrosant de la tTg puisque les animaux possédant la tTg ont accumulé plus de collagène fibrillaire interstitiel après obstruction urétérale que les souris ne disposant pas de cette enzyme. Cette accumulation n'est pas liée à une réduction de la dégradation du collagène mais secondaire à une synthèse accrue. Le rôle de la tTg sur la libération du TGF- $\beta$  est en cours d'exploration.

*Conclusion.* - Nos résultats suggèrent que l'inhibition de l'expression ou de l'activité de la tTg pourrait constituer un nouvel objectif thérapeutique pour limiter la progression de la fibrose rénale.

## AR011 Affiche Recherche. Expérimental modèle animal

### Long-term effects of in utero exposure to maternal diabetes on renal function and arterial pressure

T. Nehiri, J.-P. Duong-Van-Huyen, M. Viltard, N. Freund, P. Houillier, P. Bruneval, M. Lelievre-Pegorier

Laboratoire de physiologie et de pharmacologie vasculaire et rénale, Inserm U652, Paris, France

**Aim.** - Many epidemiological and experimental studies lead to the fetal origins of adult diseases ; this hypothesis, termed fetal programming, suggesting that some adult diseases might be determined before birth by an altered fetal development. We have previously demonstrated in the rat that *in utero* exposure to maternal diabetes impairs renal development leading to a 30% reduction in nephron number. The aim of the present study was to assess long-term effects of *in utero* exposure to maternal diabetes on arterial blood pressure and renal function in rats from 1 month to 18 months of age.

**Materials et methods.** - Diabetes was induced in Sprague-Dawley pregnant rats by intraperitoneal streptozotocin injection (35 mg/kg) on day 0 of gestation. Arterial blood pressure (BP) was measured using the tail-cuff plethysmography method. Rats were housed in metabolic cages for 24 hr urine collections ; blood was drawn from tail 24-hr urinary creatinine clearance was calculated as an estimate of GFR and urinary protein excretion was measured.

**Results.** - At birth, the weights of offsprings from control and diabetic mothers were similar. BP was significantly higher in rats issued from diabetic mothers than in control rats since 6 months and increased more and more until 18 months of age. Creatinine clearance was significantly lower in offsprings of diabetic mothers than in control rats since 3 months of age.

**Discussion.** - This decline observed in GFR may result from the nephron deficit caused by the exposure *in utero* to maternal diabetes. In addition proteinuria was found to be two fold greater in rats issued from diabetic mothers of the two groups of age, and morphometry analysis showed a mesangial hypertrophy in offspring from diabetic mothers.

**Conclusion.** - In conclusion, *in utero* exposure to maternal diabetes induces hypertension and chronic kidney disease with renal failure in the offsprings at adulthood.

## AR012 Affiche Recherche. Expérimental modèle animal

### Effets de la darbépoétine sur l'apoptose rénale en aval d'une sténose de l'artère rénale

N. Rognant, R. Gadet, B. McGregor, M. Laville, L. Juillard  
Service de néphrologie, Umr-Ma 103, hôpital E-Herriot, Lyon, France

**Introduction.** - Comme d'autres néphropathies chroniques, les néphropathies ischémiques se caractérisent par un excès d'apoptose responsable d'une perte de tissu fonctionnel. L'érythropoïétine possède une action antiapoptotique démontrée dans les tissus cérébral et cardiaque, transmise par son récepteur spécifique également présent sur les cel-

lules tubulaires rénales. L'érythropoïétine pourrait ainsi ralentir la progression de l'insuffisance rénale par un effet antiapoptotique, indépendamment de la correction de l'anémie. Le but de cette étude est de rechercher un effet antiapoptotique de l'érythropoïétine dans un modèle d'ischémie rénale chronique par sténose de l'artère rénale.

**Matériels et méthodes.** - 25 rats sont répartis en 4 groupes selon l'existence d'une sténose de l'artère rénale induite par un clip métallique (S+/S-) et selon l'administration de darbépoétine alfa (E+/E-) à la dose de 0,75 mg/kg/semaine. L'apoptose a été quantifiée selon la méthode TUNEL, les lésions parenchymateuses à l'aide d'un score semi quantitatif et la fibrose par le pourcentage de surface marquée par le rouge Sirius et l'alpha-actine.

**Résultats.** - Le marquage par la méthode TUNEL était de  $13 \pm 2,1\%$  dans le groupe S+ et de  $9,4 \pm 2\%$  dans le groupe S+/E+ ( $p = \text{NS}$ ), alors qu'elle était de  $4,7 \pm 1,7\%$  dans le groupe contrôle ( $p < 0,05$  avec le groupe S+). Le marquage par le rouge Sirius était de  $18,9 \pm 2,9\%$  dans le groupe S+ contre  $9,5 \pm 1,1\%$  dans le groupe S+/E+ ( $p = 0,066$ ) et  $6,8 \pm 0,8\%$  pour le groupe contrôle ( $p = 0,029$ ). De la même façon, il n'y avait pas de différence entre les groupes S+ et S+/E+ pour le marquage par l'alpha-actine. Le score de lésions parenchymateuses (cotés de 0 à 15) était de  $3,35 \pm 2$  dans le groupe S+ contre  $1,01 \pm 0,3$  dans le groupe S+/E+ ( $p = \text{NS}$ ) et  $0,56 \pm 0,15$  dans le groupe contrôle ( $p < 0,05$ ).

**Discussion.** - L'absence de différence statistique peut en partie s'expliquer par le faible nombre d'individus et par la difficulté d'obtenir une sténose reproductible avec un clip métallique.

**Conclusion.** - Cette étude tend à montrer que l'érythropoïétine possède un effet antiapoptotique et antifibrosant sur le rein ischémique en aval d'une sténose de l'artère rénale.

## AR013 Affiche Recherche. Complication cardiovasculaire

### La concentration plasmatique d'aldostérone est corrélée à la structure artérielle

P. Rossignol<sup>a</sup>, C. Labat<sup>b</sup>, F. Leviel<sup>c</sup>, F. Thomas<sup>d</sup>, P.-F. Plouin<sup>a</sup>, A. Benetos<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Service de médecine vasculaire-Hta, hôpital européen Georges-Pompidou, Paris, France

<sup>b</sup> Inserm U684, Nancy, France

<sup>c</sup> Département de physiologie, hôpital européen Georges-Pompidou, Paris, France

<sup>d</sup> Centre des investigations préventives et cliniques, Paris, France

**Objectif.** - Les résultats de plusieurs études cliniques suggérant que des niveaux élevés d'aldostéronémie sont associés à la survenue d'événements cardiovasculaires, alors que l'aldostérone peut induire un remodelage cardiaque et artériel par fibrose chez l'animal, notre objectif est de déterminer si l'aldostéronémie est corrélée à la morphologie artérielle, chez l'homme.

**Patients et méthodes.** - 87 sujets (sexe ratio homme/femme 0.53 ; âge  $54 \pm 1.1$  ans (moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne)) normotendus ou modérément hypertendus (Pression artérielle systolique  $141 \pm 2$  mm Hg ; diastolique  $87 \pm 1$  mm Hg ; moyenne (PAM)  $105 \pm 2$  mmHg)) jamais trai-

tés, normokaliémiques ( $4.1 \pm 0.03$  mmol/L) ont eu un échotrackage carotidien et une mesure de l'aldostéronémie en position demi-assise (dosage radio-immunologique).

**Résultats.** - L'aldostéronémie moyenne était de  $225 \pm 12$  nmol/L. En analyse univariée, le logarithme de l'aldostéronémie est significativement corrélé à la surface de la média ( $R = 0.27$  ;  $P = 0.01$ ), comme le sont également le sexe ( $R = -0.2$ ,  $P = 0.05$ ), l'âge ( $R = 0.49$  ;  $P = 0.0001$ ), la PAM ( $R = 0.4$  ;  $P = 0.0001$ ), l'indice de corpulence ( $R = 0.23$ ,  $P = 0.03$ ), la cholestérolémie totale ( $R = 0.27$ ,  $P = 0.01$ ), et la glycémie ( $R = 0.29$  ;  $P = 0.006$ ). En régression multiple (pas à pas), seuls l'âge (rendant compte de 26.97 % de la variation de la surface de la media ( $P = <0.0001$ )), le sexe

(5.1 % ( $P = 0.01$ )), le logarithme de l'aldostéronémie (3.73% ( $P = 0.03$ )) sont significativement corrélés à la surface de la média. En revanche, le logarithme de l'aldostéronémie n'est pas significativement corrélé au nombre de plaques carotidiennes.

**Discussion.** - Corroborant des données expérimentales chez l'animal, nos résultats montrent que la concentration plasmatique d'aldostérone est significativement corrélée au remodelage de la média artérielle, et à son hypertrophie.

**Conclusion.** - Ce phénomène pourrait contribuer à la survenue d'événements cérébro-vasculaires, et constituer une cible thérapeutique.