

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Implication du monoxyde d'azote (NO) dans les altérations morphofonctionnelles secondaires à l'ischémie-reperfusion rénale chez le rat

Defays, Marie

Award date:
2009

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Implication du monoxyde d'azote (NO) dans les altérations morpho-
fonctionnelles secondaires à l'ischémie-reperfusion rénale chez le rat**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire**

Marie DEFAYS

Janvier 2009

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Implication du monoxyde d'azote dans les altérations morpho-fonctionnelles secondaires à l'ischémie-reperfusion rénale chez le rat

DEFAYS Marie

Résumé

Ce mémoire de fin d'études avait pour objectifs de caractériser les adaptations morpho-fonctionnelles du rein après ischémie-reperfusion (I/R) ainsi que d'y évaluer l'éventuelle implication du monoxyde d'azote (NO). Le modèle expérimental (I/R du rein gauche + néphrectomie contralatérale) a été mis en œuvre chez des rats Wistar-Hanovre (WH) et des rats Wistar-Furth (WF). Nous avons choisi d'étudier cette souche en particulier car elle semble être résistante au développement de différentes formes d'insuffisance rénale chronique, vraisemblablement grâce au maintien d'une production appropriée de NO. L'analyse des échantillons urinaires obtenus au cours des deux semaines qui ont suivi l'induction de l'insuffisance rénale ischémique nous a permis de mettre en évidence des différences entre les deux souches de rats étudiées, principalement en ce qui concerne l'évolution temporelle de la diurèse, de la natriurèse et de la kaliurèse, ainsi que de la capacité de concentration urinaire évaluée grâce à la mesure de l'osmolalité urinaire. Par ailleurs, l'analyse de la concentration urinaire des métabolites du NO (NO_x), mesurée par la méthode de Griess, a révélé également qu'au stade 48 h post-I/R, l'excrétion urinaire des NO_x chez les rats WF était significativement plus élevée que celle des rats WH. Enfin, une approche histologique nous a permis de caractériser les lésions tissulaires. Ces observations préliminaires intéressantes, qui semblent indiquer des divergences entre les souches de rats en termes de métabolisme du NO et de fonction rénale post-ischémique nous incitent à compléter cette étude en vue d'explorer par diverses techniques in vivo et in vitro, l'implication potentielle du NO dans ce modèle animal d'insuffisance rénale aiguë.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2009

Promoteur: N. Caron

Remerciements

Ce mémoire a pu être réalisé grâce à l'aide et au soutien de quelques personnes que je tiens absolument à remercier. A des degrés divers, chacune de ces personnes m'a apporté sa connaissance, sa science, son aide dans les manipulations, un soutien moral ou affectif.

Tout d'abord, je tiens à remercier très sincèrement le professeur Nathalie Caron qui m'a accueillie dans son laboratoire, qui m'a couverte de conseils et qui m'a aiguillé dans mes démarches. Réprimandes quand il le fallait, petit mot d'encouragement pour remonter le moral. Sans oublier les lectures, relectures et corrections à toutes heures...

Mes remerciements vont ensuite aux « 4 filles du labo » :

Virginie dont je suis la première mémorante, toujours disponible, compréhensible, à l'écoute du moindre problème et si didactique.

Anne-Emilie, rassurante, perfectionniste, qui sera assurément un maître de la pédagogie universitaire.

Isabelle, pour toutes ses petites attentions, ses drôleries et surtout son bon esprit... Standard Champion !

Et Laetitia, dernière arrivée, qui, en un bref temps a su, à chaque fois, trouver les mots pour me déstresser.

J'adresse mes remerciements à l'université de Mons qui nous a permis de réaliser les expériences immunohistochimiques au moyen de son matériel de laboratoire et aussi à toute l'équipe de Mr Flamion qui nous a « hébergé » gentiment avant que l'on s'installe dans notre nouveau labo.

Je remercie les membres de mon jury qui vont évaluer ce travail : Mr Arnould, Mme Dogné, Mme Rolin et Mr Toffoli.

Merci aussi à Noémie, ma biologiste d'Edimbourg, qui depuis l'Ecosse a trouvé le temps et les moyens de me soutenir, me corriger et m'encourager. Merci à toi d'avoir su faire face à mes crises de joie et mes baisses de moral (pas toujours évidentes à gérer, je te l'accorde).

Merci à Yolanda, mémorante Erasmus, grâce à qui le début de l'aventure a été moins dur. Et comme nous le disait Bénabar : « Et on s'en fout, on n'ira pas, on a qu'à se cacher sous les draps, on commandera des pizzas, toi, la télé et moi ».

Merci à mon frère et à ma sœur d'avoir écouté tout au long de l'année mes « anecdotes » de labo, tant intéressantes qu'inintéressantes...

Et enfin, un merci tout particulier à mes parents (Papa gâteaux et maman correcteur d'orthographe) qui ont supporté mes humeurs et mes coups de cafard, qui ont toujours cru en moi et qui m'ont redonné du courage et de la motivation quand je n'en avais plus.

Un grand merci à tous et à toutes.

Liste des abréviations

μ l	microlitre
μ M	micromolaire
μ m	micromètre
μ mol	micromoles
ADH	Hormone anti-diurétique
ADN	Adénosine monophosphate
ADP-ribose	Adénosine diphosphate-ribose
AngII	Angiotensine II
ANP	Peptide natriurétique
AQPs	Aquaporines
ATP	Adénosine triphosphate
BH4	Tétrahydrobioptérine
C	Cortex
CAT	Catalase
Cl ⁻	Chlore
CM	Cage métabolique
Ctl	Contrôle
DFG	Débit de filtration glomérulaire
DSR	Débit sanguin rénale
E _{NO}	Excrétion de NO
eNOS	NO synthase endothéliale
ET-1	Endothéline
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FG	Filtration glomérulaire
FMN	Flavine mononucléotide
FTG	Feedback tubuloglomérulaire
GFR	Glomerular filtration rate
GMP _c	Guanylate cyclase cyclique
GPH-px	Glutathione peroxidase
GT-1	Transporteur de glucose de type 1
h	Heure
H ⁺	Hydrogène
HCO ₃	Bicarbonate
HPLC	High performance liquid chromatography
i.p.	intrapéritonéal
I/R	Ischémie/Reperfusion
ICAM	Molécule d'adhésion intracellulaire
IM	Inner medulla
iNOS	NO synthase inductible
IRA	Insuffisance rénale aigue
IRC	Insuffisance rénale chronique
ISOM	Inner stripe of outer medulla
j	Jour
K ⁺	Potassium
Kg	Kilogramme
mEq	milliéquivalent
mEq/L	Milliéquivalent/litre
ml	millilitre

mOsm/kg	Milliosmole/kilogramme
Na ⁺	Sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide Phosphate
nNOS	NO synthase neurale
NO	Monoxyde d'azote
NO ₂	Nitrite
NO ₃	Nitrate
NOS	Synthase de monoxyde d'azote
NOx	Métabolites du monoxyde d'azote
NS	Non significatif
O ₂	Oxygène
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OONO ⁻	Peroxynitrique
Osm _U	Osmolarité urinaire
OSOM	Outer stripe of outer medulla
PAS	Periodic acid schiff
PC	Poids corporels
PCNA	Prolifération cell nuclear antigen
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandine F _{2α}
PRD	Poids du rein droit
PRG	Poids du rein gauche
Réf	Référence
ROS	Reactive oxygen species
SD	Sprague Dawley
SEM	Erreur de mesure standard
SGLT	sodium-dependent glucose cotransporter
SOD	Superoxyde dismutase
TGF	Transforming Growth Factor
U _k V	Kaliurèse
U _{Na} V	Natriurèse
UV	diurèse
VCAM	Molécules d'adhésion des cellules vasculaires
WF	Wistar Furth
WH	Wistar Hanovre
XD	Xanthine déshydrogénase
XO	Xanthine oxydase

Table des matières

INTRODUCTION	1
AVANT-PROPOS	1
1. CARACTERISTIQUES MORPHO-FONCTIONNELLES DU REIN.....	1
2. L'ISCHEMIE-REPERFUSION, CAUSE D'INSUFFISANCE RENALE.....	5
2.1. <i>L'insuffisance rénale</i>	5
2.2. <i>L'ischémie-reperfusion</i>	7
2.2.1. Altérations rénales dues à l'I/R.....	7
Les lésions tubulaires.....	7
Les altérations fonctionnelles.....	8
Les réactions inflammatoires.....	9
3. LE MONOXYDE D'AZOTE ET LES NO SYNTHASES.....	9
3.1. <i>La biosynthèse du NO : les NO synthases</i>	10
3.1.1. Expression des NO synthases dans le tissu rénal.....	10
3.2. <i>Régulation de l'activité des différentes NO synthases</i>	11
3.3. <i>Rôles biologiques du NO</i>	12
3.3.1. Le NO et l'hémodynamique rénale et glomérulaire.....	12
3.3.2. Le NO et le rétro-contrôle tubuloglomérulaire.....	12
3.3.3. Le NO et le transport tubulaire d'ions.....	13
3.3.4. Le NO et la réponse inflammatoire.....	13
3.3.5. Le NO et autres facteurs régulateurs.....	13
3.3.6. Le NO et le superoxyde.....	14
4. LE STRESS OXYDATIF ET NITROSATIF.....	14
OBJECTIFS	17
MATERIEL ET METHODES	18
1. MODELE EXPERIMENTAL.....	18
2. ECHANTILLONS BIOLOGIQUES.....	19
2.1. <i>Prélèvement du plasma</i>	19
2.2. <i>Prélèvement des tissus</i>	19
2.3. <i>Prélèvement des urines</i>	19
3. CONDITIONNEMENT EN CAGE METABOLIQUE.....	19
4. APPROCHES ANALYTIQUES.....	21
4.1. <i>Créatininémie</i>	21
4.2. <i>Mesure de l'osmolalité</i>	21
4.3. <i>Mesure des concentrations en Na⁺ et en K⁺</i>	21
4.4. <i>Mesure des concentrations des métabolites du NO</i>	21
5. ETUDES MORPHOLOGIQUES DU TISSU RÉNAL.....	23
5.1. <i>Coloration au PAS (Periodic Acid Schiff), à l'Hémalun et au Bleu de Luxol</i> . 24	
6. CALCULS.....	24
7. EVALUATION STATISTIQUE.....	26

RESULTATS.....	27
1. GENERALITES.....	27
1.1. Poids corporels et poids rénaux.....	27
1.2. Créatininémie.....	28
2. CAPACITES EXCRETOIRES RENALES.....	29
2.1. Diurèse et osmolarité urinaire.....	29
2.2. Natriurèse et kaliurèse.....	31
2.3. Bilan hydro-électrolytique.....	32
3. EXCRÉTION URINAIRE DES MÉTABOLITES DU NO (NOx).....	36
4. ANALYSES HISTOPATHOLOGIQUES DES LESIONS TUBULAIRES ET INTERSTITIELLES DANS LE TISSU RENAL POST-ISCHEMIQUE.....	37
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	 40
1. EVALUATION FONCTIONNELLE RENALE POST-ISCHEMIQUE CHEZ LES RATS WISTAR HANOVRE.....	40
2. IMPLICATIONS DU NO SUR LES ADAPTIONS FONCTIONNELLES POST-ISCHEMIQUES ..	42
3. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DU MODELE EXPERIMENTAL	43
 PERSPECTIVES	 45

INTRODUCTION

Avant-propos

Les expériences effectuées au cours de ce travail de fin d'études s'inscrivent dans un projet de recherche élaboré au sein de notre laboratoire. Celui-ci a pour finalité de préciser certains facteurs et processus impliqués dans l'étiologie des altérations morpho-fonctionnelles associées à l'ischémie/reperfusion rénale, qui représente l'une des causes majeures d'insuffisance rénale aiguë chez l'homme, en particulier lors de la transplantation du rein.

Afin de rencontrer les objectifs de cette étude, le travail expérimental a consisté à induire une insuffisance rénale ischémique chez le rat, de manière à caractériser certains aspects de la fonction rénale *in vivo* dans ce contexte physiopathologique particulier. Outre les aspects fonctionnels, l'implication du monoxyde d'azote (NO) a également fait l'objet d'une première analyse. A cet égard, il nous a semblé intéressant d'étudier une souche de rats Wistar-Furth et de les comparer à l'une des souches les plus communément utilisées en expérimentation animale, les rats Wistar-Hanovre. En effet, des études conduites par le groupe de Baylis et coll. ont montré que le rat Wistar-Furth ne développe pas d'insuffisance rénale chronique induite soit par une réduction sévère de la masse rénale (5/6^{ième} de néphrectomie), soit par une exposition à la puromycine, un aminonucléoside néphrotoxique (Erdely et al., 2003, 2004). Cette protection contre l'insuffisance rénale était associée au maintien d'un niveau de production constant du NO dans le rein alors qu'habituellement, l'insuffisance rénale chronique est caractérisée par une déficience en NO (Baylis, 2008). Sur la base de ces observations, l'un de nos objectifs était de déterminer dans quelle mesure les rats Wistar-Furth pouvaient également présenter un comportement particulier au cours d'un épisode d'insuffisance rénale aiguë.

1. Caractéristiques morpho-fonctionnelles du rein

Le rein est un organe dont les multiples fonctions excrétrices et régulatrices sont essentielles à l'homéostasie du milieu intérieur, de manière à ajuster au mieux l'équilibre acido-basique, hydrique et électrolytique. De par la formation de l'urine, le rein assure l'élimination des déchets métaboliques ainsi que celle de substances toxiques endogènes ou exogènes, et participe également au contrôle de la pression artérielle. Pour ce faire, la microcirculation intra-rénale et l'unité fonctionnelle du rein, c'est-à-dire le néphron, agissent en synergie pour atteindre un niveau élevé de régulation intégrée des conditions physiologiques optimales. Outre son rôle d'épuration, le rein assure aussi une fonction endocrinienne importante :

- Synthèse et sécrétion de la rénine, une enzyme responsable de la production de l'angiotensine II, qui participe à la régulation de la pression artérielle et du bilan hydro-sodique ;
- Synthèse de l'érythropoïétine qui stimule la différenciation, la prolifération et la maturation de la lignée des globules rouges dans la moelle osseuse ;
- Production de la vitamine D sous sa forme active, qui contribue à la régulation du métabolisme phospho-calcique.

D'un point de vue anatomique, le rein occupe une position rétropéritonéale dans les fosses lombaires de la cavité abdominale. Il est entouré par trois enveloppes, de la plus externe à la plus interne : la capsule fibreuse, la capsule adipeuse et le fascia rénal. Le rein est irrigué par l'artère rénale qui est issue de l'aorte abdominale descendante. Le réseau vasculaire intrarénal présente un niveau d'organisation complexe qui résulte notamment de la ramification de l'artère rénale (Figure 1). Les plus petits vaisseaux artériels constituent le glomérule qui correspond au pôle vasculaire du néphron (voir ci-dessous) et forment ensuite un réseau de capillaires péri-tubulaires entourant le néphron, qui sont à leur tour drainés par le système veineux (Silverthorn, 2007).

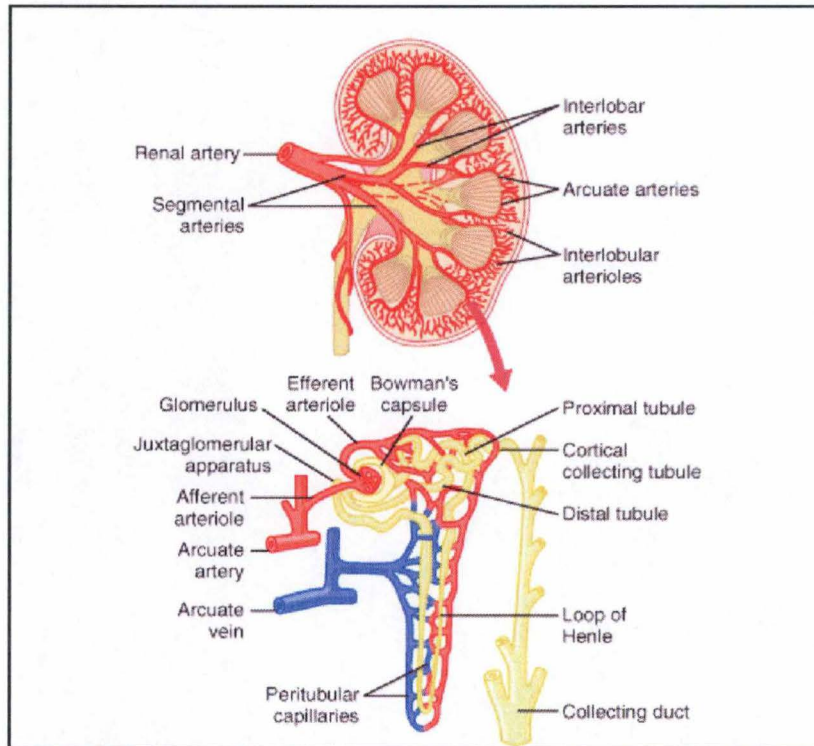


Figure 1. Section d'un rein humain montrant les principales subdivisions de l'artère rénale et la microcirculation de chaque néphron.

D'après Guyton & Hall (2005).

Le rein peut également être divisé en 4 zones concentriques, selon les positions relatives des différents constituants des néphrons :

- le cortex (en périphérie)
- la zone externe de la médullaire externe (OSOM)
- la zone interne de la médullaire externe (ISOM)
- la médullaire interne (IM)

La formation de l'urine est assurée par trois processus : la filtration du plasma sanguin ainsi que l'absorption et/ou la sécrétion tubulaire de diverses molécules, en fonction des contraintes homéostasiques. Pour assurer ces différentes fonctions, chaque néphron est composé d'une partie vasculaire et d'une partie rénale (Figure 2 A et B) (Guyton & Hall, 2005) :

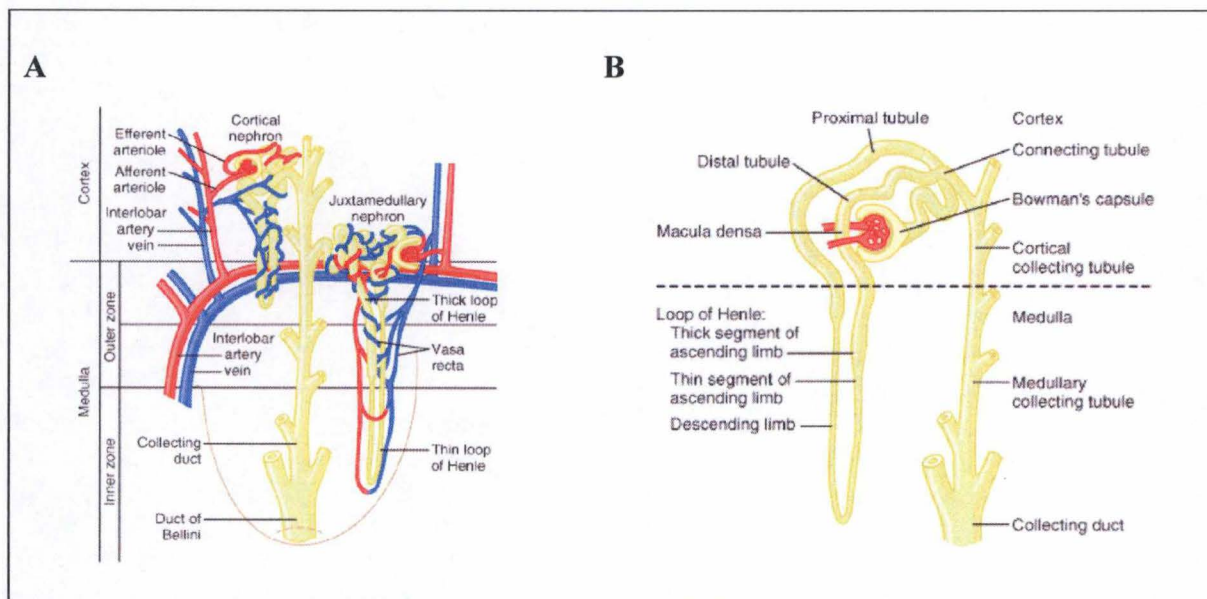


Figure 2.

A. Relations entre vaisseaux sanguins et structures tubulaires, et différences entre un néphron cortical et un néphron juxta-médullaire.

B. Segments tubulaires du néphron.

D'après Guyton & Hall (2005).

- La partie vasculaire est composée d'artérioles afférentes et efférentes, de capillaires glomérulaires ainsi que de capillaires péri-tubulaires (Figure 2A). La particularité de la microcirculation rénale réside dans la présence d'un premier réseau capillaire glomérulaire de type artério-artériel, et d'un second réseau capillaire péri-tubulaire artério-veineux irriguant tous les néphrons. Dans le cas particulier des néphrons juxta-médullaires, les artérioles efférentes donnent naissance aux vasa recta qui suivent un trajet parallèle à l'anse de Henlé. La disposition de ces vasa recta le long des tubules rénaux dans la médulla est essentielle pour certaines fonctions du rein, en particulier celle de la concentration des urines. Ces vasa recta ont la particularité d'être constitués de péricytes, qui sont des cellules contractiles, sensibles à diverses molécules vasoactives produites localement ;
- La partie rénale est composée du corpuscule rénal et de tubules rénaux (Figure 2B). Le corpuscule rénal est formé d'une capsule épithéliale, la capsule de Bowman, et du glomérule. Il existe deux types de néphrons, déterminés selon la position du corpuscule rénal dans l'épaisseur du parenchyme rénal (Figure 2A). La majorité des néphrons (~85 %) sont des néphrons corticaux, localisés essentiellement dans le cortex. Les 15% restants sont des néphrons juxta-médullaires, dont le corpuscule rénal est situé près de la jonction cortico-médullaire, et s'étendant dans la médulla interne. Les tubules sont constitués de segments distincts (Figure 2B), tant sur le plan morphologique que fonctionnel, qui s'échelonnent à partir du corpuscule rénal de la manière suivante :

tubule proximal (partie contournée et droite), anse de Henlé (branche descendante et ascendante), tubule distal (partie droite et contournée) et tube collecteur. Il est à noter qu'un segment du tubule distal (macula densa) est associé aux artérioles afférente et efférente pour former l'appareil juxtaglomérulaire, siège de plusieurs mécanismes de régulation, parmi lesquels on peut citer le rétro-contrôle juxtaglomérulaire (voir p.12).

Grâce à ces éléments structurels spécifiques, le rein peut assurer sa fonction primaire d'élaboration de l'urine à partir du sang. Ceci comprend des processus de filtration, de réabsorption et de sécrétion au niveau des néphrons (Figure 3). Les glomérules filtrent le plasma sanguin par un mécanisme appelé filtration glomérulaire pour le transformer en une urine dite primitive. L'eau, les électrolytes et la plupart des substances dissoutes de petite taille traversent la membrane de filtration, alors que les molécules de plus grande taille, comme les protéines, restent confinées au plasma. Dans des conditions physiologiques, environ 20% du sang qui entre dans les glomérules passe par filtration dans les néphrons. L'urine primitive ainsi formée, dont la composition est proche de celle du plasma, est ensuite acheminée dans le tube urinifère où elle est soumise à des processus de réabsorption et de sécrétion afin de former l'urine finale.

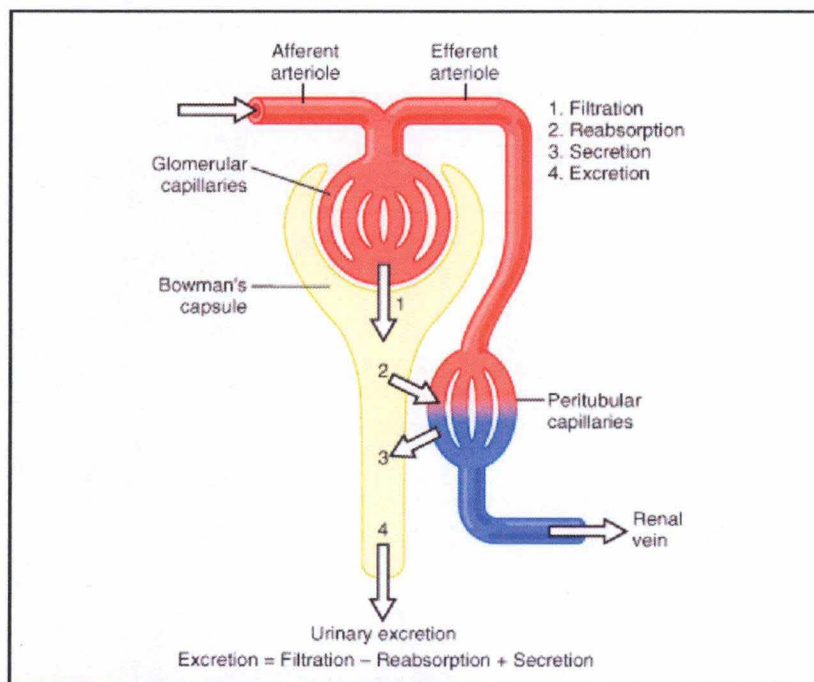


Figure 3. Récapitulatif des processus de formation de l'urine.
D'après Guyton & Hall (2005).

Etant donné que le rein est richement vascularisé (~20 % du débit cardiaque), la régulation de l'hémodynamique rénale joue un rôle important pour assurer une fonction rénale optimale. En outre, les mécanismes de transport tubulaire sont également sous le contrôle intégré de divers facteurs d'origine hormonale, nerveuse ou endothéliale, caractérisés par un mode d'action endocrine, paracrine ou autocrine (Navar et al., 1996). Enfin, un mécanisme intrinsèque spécifique, la capacité d'autorégulation, consiste en un maintien du débit sanguin rénal et du débit de la filtration glomérulaire lorsque la pression artérielle varie dans certaines limites physiologiques et ce, afin de préserver la fonction excrétrice.

En ce qui concerne les aspects régulatoires, l'excrétion rénale de l'eau et du sodium font l'objet d'un point particulier, étant donné que ces variables ont fait l'objet de mesures spécifiques au cours de ce travail. Après avoir été filtré librement, le sodium est principalement réabsorbé au niveau du tubule proximal (~67%), de manière iso-osmotique. Le transport transépithélial du sodium est effectué de manière active via différents transporteurs : l'antiport $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ et le co-transporteur pompe SGLT situés sur la membrane apicale de la cellule tubulaire proximale font entrer le sodium dans la cellule. Celui-ci est ensuite transporté de façon active à travers la membrane basolatérale par une pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$. Le sodium entraîne l'eau de par ses propriétés osmotiques et conduit donc à sa réabsorption. Une partie de la réabsorption tubulaire du sodium (~25%), assurée par la branche ascendante de l'anse de Henlé, a pour fonction de déposer du NaCl en concentration hypertonique dans la médullaire externe et interne, de manière à constituer un gradient osmotique cortico-papillaire qui sert de moteur indispensable à l'élaboration d'une urine concentrée. Cette fonction est rendue possible grâce à l'imperméabilité à l'eau que présente cette partie du néphron. Cette réabsorption du sodium dans la branche ascendante de l'anse est possible grâce au co-transporteur NKCC, localisé à la membrane apicale et qui transporte un Na^+ , deux Cl^- et un K^+ depuis la lumière tubulaire vers l'intérieur de la cellule. Au niveau du tubule distal, le sodium est réabsorbé (~5%) par un co-transporteur $\text{Na}^+ / \text{Cl}^-$ et, dans le tube collecteur, par un canal sodium. La perméabilité à l'eau de ces tubules est régulée par l'action d'une hormone antidiurétique, l'ADH. L'ADH agit sur les cellules cibles en induisant l'insertion d'aquaporines dans la membrane apicale des cellules épithéliales, permettant ainsi à l'eau d'être réabsorbée depuis la lumière tubulaire par osmose, grâce au gradient cortico-papillaire. En l'absence d'ADH, le tube collecteur est donc imperméable à l'eau.

La régulation de la réabsorption du sodium se fait via l'intervention de diverses molécules ou systèmes, parmi lesquels on peut citer :

- l'effet rénal du peptide auriculaire natriurétique (ANP) qui augmente l'excrétion de Na^+ et d'eau ;
- l'activation du système nerveux orthosympatique qui entraîne une diminution du débit de la filtration glomérulaire, une augmentation de la sécrétion de rénine et une augmentation de la réabsorption de Na^+ dans différents segments du néphron ;
- la stimulation du système rénine-angiotensine qui se manifeste par une augmentation de la réabsorption proximale de Na^+ et la sécrétion d'ADH, ainsi que par une absorption accrue de Na^+ dans le tubule distal sous l'influence de l'aldostérone.

2. L'ischémie-reperfusion, cause d'insuffisance rénale

2.1. L'insuffisance rénale

L'insuffisance rénale correspond à un syndrome clinique résultant de la perte partielle ou totale de la fonction rénale. Une agression brutale survenant en quelques heures conduit à une insuffisance rénale aiguë (IRA) qui peut être réversible, ce qui n'est pas le cas d'une atteinte progressive menant à l'insuffisance rénale chronique (IRC).

L'insuffisance rénale aiguë est caractérisée par une détérioration de la fonction rénale sur une période de plusieurs heures ou de plusieurs jours résultant dans certains cas en une impossibilité pour le rein d'exercer ses fonctions. Il a été démontré que lors d'une IRA, la capacité de sécrétion et de réabsorption tubulaire, ainsi que l'homéostasie du milieu intérieur, étaient fortement altérées (Thadhani et al., 1996).

L'insuffisance rénale chronique est le résultat de la destruction lente, progressive et irréversible des néphrons. Une IRC est associée à certains dysfonctionnements tubulaires et/ou glomérulaires tels qu'une hyperfiltration glomérulaire, une hypertension glomérulaire ou encore une hypertrophie du néphron (Ronco et al., 1998 ; Terzi et al., 1998). La progression de cette maladie est si lente qu'elle peut rester silencieuse alors que des dommages significatifs sont déjà présents.

Qu'elle soit aiguë ou chronique, l'insuffisance rénale peut être classée en insuffisance pré-rénale, rénale intrinsèque (parenchymateuse) et post-rénale (Devarajan, 2006), selon les critères suivants (Figure 4) :

- si la fonction tubulaire et glomérulaire est intacte mais que la clairance rénale est limitée par des facteurs compromettant la perfusion rénale, l'insuffisance est dite pré-rénale ;
- si l'insuffisance rénale mène à une obstruction de l'écoulement des voies urinaires, elle est dite post-rénale ;
- si l'insuffisance implique des dommages structurels du parenchyme rénal, elle est dite intrinsèque.

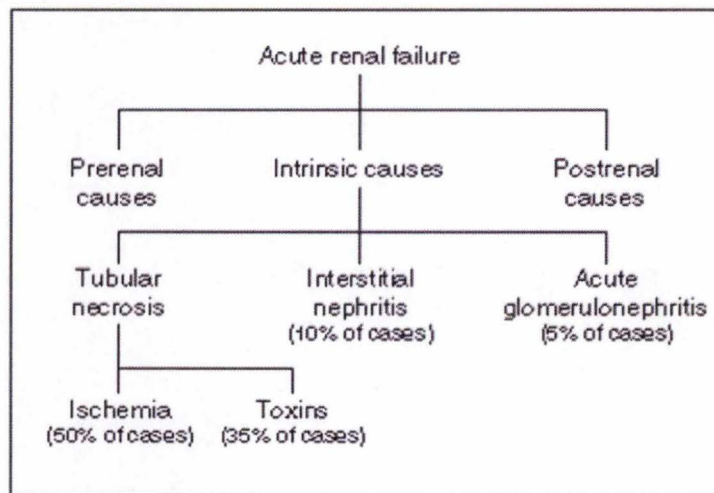


Figure 4. Principales catégories d'insuffisance rénale aiguë.
D'après Thadhani et al. (1996).

En particulier, l'IRA intrinsèque, qui est responsable de taux de mortalité et de morbidité élevés, peut avoir des causes multiples dont les plus fréquentes sont la nécrose tubulaire, d'origine ischémique ou toxique, ainsi que la néphrite interstitielle ou la glomérulonéphrite (Thadhani et al., 1996).

2.2. L'ischémie-reperfusion

Les lésions d'ischémie-reperfusion représentent une cause majeure de l'IRA chez l'adulte (Losser, 2005). L'ischémie se caractérise par une altération du flux sanguin au niveau d'un organe. La reperfusion est la période pendant laquelle la circulation des organes ischémiés est rétablie. Un tel phénomène engendre des dommages d'ordres structurels, biochimiques et inflammatoires qui peuvent être réversibles ou irréversibles suivant la durée de l'exposition à l'ischémie (Devarajan, 2006).

Pendant de nombreuses années, l'ischémie était considérée comme seule responsable des lésions cellulaires et tissulaires observées après un épisode d'I/R. A l'heure actuelle, il a été suggéré qu'autant la reperfusion que l'ischémie elle-même sont à l'origine des lésions observées (Paller, 1994 ; Dobashi et al., 2000).

2.2.1. Altérations rénales dues à l'I/R

Au niveau du rein, une I/R va provoquer d'importantes lésions tubulaires qui vont soit mener à la mort cellulaire, soit à la régénération de celles-ci (Figure 5). De plus, cette I/R va engendrer des altérations au niveau de la fonction rénale ainsi que des réponses inflammatoires.

Les lésions tubulaires

L'exposition du tissu à une hypoxie engendre des lésions plus ou moins sévères selon la structure tubulaire rénale concernée. Ainsi, les tubules proximaux et distaux sont particulièrement sensibles à l'hypoxie alors que les glomérules et les tubes collecteurs sont plus résistants à un déficit en oxygène (Brezis et al., 1984 ; Ruegg & Mandel, 1990).

Au cours de l'ischémie, le métabolisme devient anaérobie. La synthèse de l'ATP n'est plus assurée par la chaîne respiratoire des mitochondries qui se trouve désorganisée. La déplétion en ATP provoque un dysfonctionnement de l'activité des pompes calciques ainsi que des $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPases}$. Ce manque d'ATP dans les cellules va provoquer une altération rapide du cytosquelette d'actine se trouvant au pôle apical et une redistribution de celui-ci du pôle apical vers le cytoplasme. Cette désorganisation est suivie d'une perte de polarité ainsi que d'une perte de la bordure en brosse et des jonctions serrées. Ces changements sont responsables non seulement de la délocalisation des pompes $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPases}$ de la membrane basolatérale à la membrane apicale (Molitoris et al., 1992) mais également d'un défaut de transport des électrolytes. Ces dysfonctionnements peuvent, le cas échéant, aboutir à la desquamation des cellules encore viables ou entraîner la mort cellulaire, et mener ainsi à une obstruction des lumières tubulaires pouvant provoquer des altérations fonctionnelles et des réactions inflammatoires (Figure 5) (Bonventre & Weinberg, 2003 ; Devarajan, 2005, 2006).

La mort de la cellule tubulaire et sa régénération sont des événements caractérisant l'IRA. Il existe deux mécanismes menant à la mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose. La nécrose est un processus explosif, chaotique qui se caractérise par une perte de l'intégrité de la membrane, un gonflement cytoplasmique et une fragmentation cellulaire. L'apoptose est un processus plus ordonné qui se caractérise par une disparition de la membrane nucléaire et cytoplasmique, ainsi que par une fragmentation de l'ADN. Ces deux formes de

mort cellulaire peuvent coexister au sein d'un même tissu. Après un accident ischémique rénal, le type de mort cellulaire dépend essentiellement de la gravité de l'atteinte initiale et de la résistance de la cellule aux altérations tubulaires. La nécrose se produit habituellement après des lésions importantes et dans les segments les plus sensibles des néphrons, alors que l'apoptose prédomine dans des situations moins graves et en particulier dans les segments distaux des néphrons qui sont plus résistants à l'ischémie (Devarajan, 2006).

Après une ischémie, des processus de prolifération et de réparation tissulaires sont aussi observés. En effet, les cellules épithéliales, dans un processus de mort cellulaire, peuvent générer des signaux qui vont activer le processus de réparation. Certains facteurs de croissance et certaines cytokines peuvent ainsi déterminer le devenir d'une cellule épithéliale. Les cytokines, par exemple, peuvent contribuer à la génération de signaux qui vont promouvoir la dédifférenciation ainsi que la prolifération des cellules épithéliales (Figure 5) (Bonventre & Zuk, 2004).

En résumé, lors d'une I/R rénale, les cellules tubulaires subissent un grand nombre de changements morphologiques, qui incluent la perte de la polarité cellulaire et de la bordure en brosse, la mort cellulaire, et dans certains cas la dédifférenciation des cellules viables et la prolifération menant à la reconstitution d'un épithélium normal.

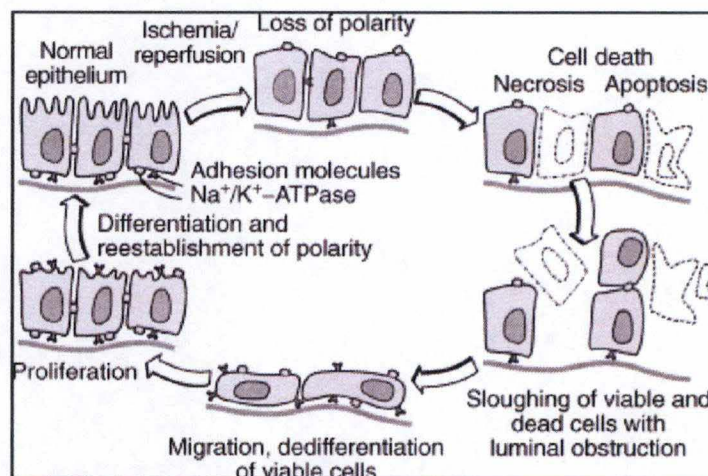


Figure 5. Schéma illustrant le cycle de réparation des lésions tubulaires suivant l'I/R.

D'après Bonventre & Zuk (2004).

Les altérations fonctionnelles

La perte de la polarité cellulaire ainsi que la redistribution membranaire des pompes $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ et les altérations au niveau des jonctions serrées vont causer une augmentation de la concentration des ions Na^+ et Cl^- dans la macula densa. Ceci a pour effet d'activer le rétro-contrôle tubuloglomérulaire, un mécanisme de régulation qui va induire des modifications du tonus vasculaire des artérioles glomérulaires. Il s'ensuit une réduction du débit de la filtration glomérulaire (Thadhani, 1996). En outre, l'altération des cellules endothéliales des vaisseaux du rein induite par l'ischémie, pourrait être un facteur important dans la perte de l'autorégulation locale étant donné que l'endothélium synthétise

des facteurs vasoactifs comme l'endothéline et le monoxyde d'azote, qui sont impliqués dans la régulation hémodynamique paracrine.

Les réactions inflammatoires

L'infiltration leucocytaire en réponse à un épisode d'ischémie est un phénomène bien connu. Les leucocytes activés peuvent initier une cascade inflammatoire qui mène au dysfonctionnement endothélial notamment par le biais de la libération de cytokines, de chimiokines et de médiateurs de stress oxydatif (Kelly & Molitoris, 2000), menant entre autre à une surexpression des molécules d'adhésion (sélectines, intégrines, ICAM-1, VCAM) (Takada et al., 1997, De Greef et al., 2003). Cette surexpression de molécules d'adhésion accroît les interactions (« rolling ») entre les leucocytes et l'endothélium, favorisant leur adhésion et enfin leur diapédèse au niveau des sites inflammatoires tissulaires (De Greef et al., 1998) (Figure 6). Ces leucocytes participent évidemment au processus inflammatoire. Néanmoins, leur présence en quantité importante au moment du processus de régénération après une ischémie suggère que ces cellules jouent un rôle dans le mécanisme de réparation (Ysebaert, 2000). En effet, les macrophages permettent la phagocytose des cellules apoptotiques et des débris nécrotiques (Rabb et al., 1997). De plus, toutes ces cellules sont une source importante de synthèse de facteurs de croissance (Verstrepen et al., 1993).

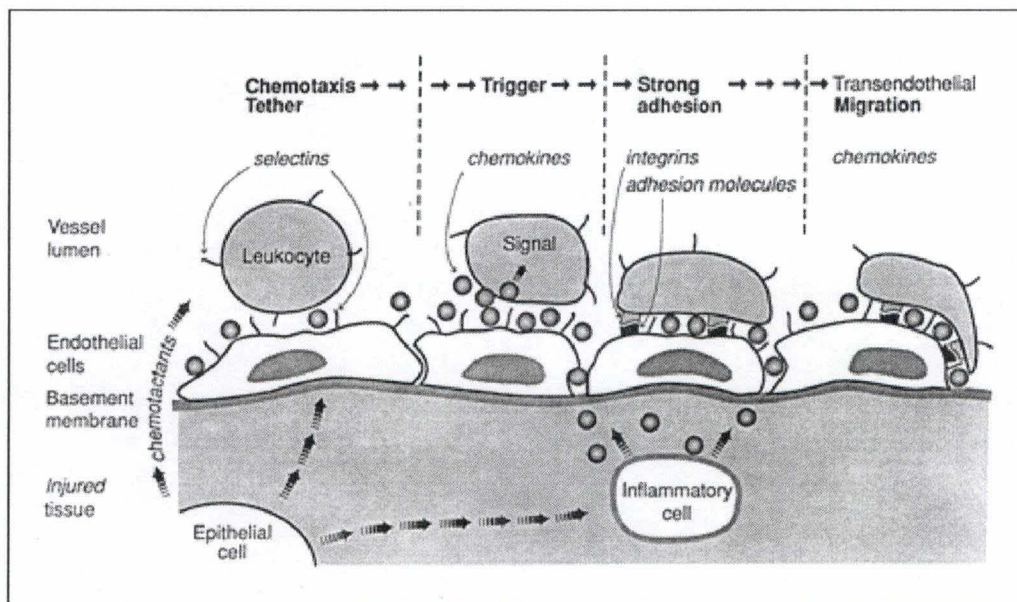


Figure 6. Séquences des étapes conduisant à l'adhésion des leucocytes à l'endothélium.

D'après Adams & Shaw (1994).

3. Le monoxyde d'azote et les NO synthases

Le monoxyde d'azote ou NO est un gaz de faible poids moléculaire possédant un électron libre qui lui confère une grande réactivité chimique. En raison de ses propriétés chimiques, il peut facilement diffuser à travers les membranes cellulaires et entre les cellules, ce qui lui permet de jouer un rôle de médiateur paracrine. Le NO participe ainsi à

de nombreux processus physiologiques ainsi qu'à leur régulation. En effet, il est impliqué dans le maintien de la pression artérielle, dans la neurotransmission, ainsi que dans l'activité des macrophages. Dans le rein, il participe également au maintien de l'homéostasie et au contrôle de la fonction rénale.

3.1. La biosynthèse du NO : les NO synthases

La synthèse du NO s'effectue à partir de la L-arginine grâce aux NO synthases (NOS) en consommant du NADPH et de l'oxygène. Cette activité n'est possible qu'en présence des co-facteurs BH₄ (tétrahydrobioptérine), FAD (flavine adénine dinucléotide), FMN (flavine mononucléotide) et du fer. La NO synthase transforme ainsi l'arginine en hydroxyarginine qui, après réduction, est transformée en NO et en citrulline selon la réaction décrite à la Figure 7. Cette réaction n'est possible que si la calmoduline est couplée à la protéine, ce qui rend l'activité des NOS constitutives dépendante de la concentration en ions calcium (la calmoduline étant couplée fortement à l'isoforme inductible).

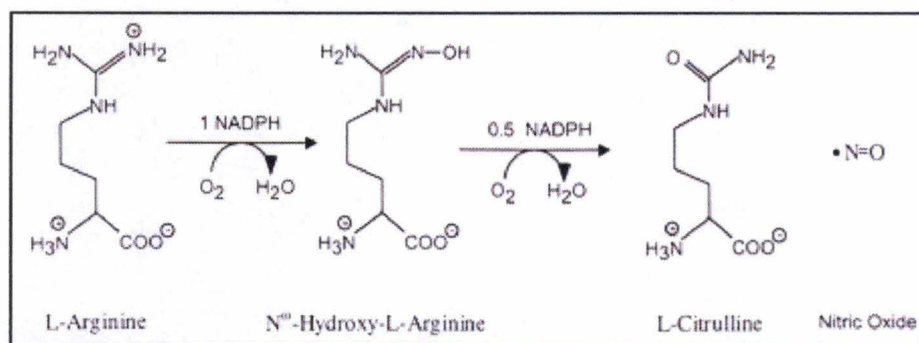


Figure 7. Biosynthèse du monoxyde d'azote.

D'après Stuehr (2004).

3.1.1. Expression des NO synthases dans le tissu rénal

La NOS est une enzyme hémérique dont la structure ressemble à celle du cytochrome P-450. La NOS existe sous trois isoformes : la NOS endothéliale (eNOS), la NOS neuronale (nNOS) et la NOS inductible (iNOS). Les deux premières isoformes (eNOS et nNOS) sont des enzymes constitutives du rein. Par contre, la troisième isoforme (iNOS) est inductible (Stuehr, 1997).

La NOS neuronale (nNOS ou NOS 1) :

Le gène codant pour la protéine nNOS est situé sur le chromosome 12. L'enzyme nNOS se retrouve dans certains neurones centraux et périphériques et répond à la stimulation nerveuse (Figure 8). Dans le rein, elle est présente principalement dans les cellules de la macula densa (Wilcox et al., 1992) mais on peut aussi la retrouver dans la branche ascendante de Henlé ainsi que dans les cellules du tube distal (Dussaule & Chatziantoniou, 1996).

La NOS endothéliale (eNOS ou NOS 3) :

Le gène pour la protéine eNOS est situé sur le chromosome 7. L'enzyme eNOS est présente dans toutes les cellules vasculaires périphériques où elle joue un rôle crucial dans la régulation du tonus vasculaire (Figure 8). Dans le rein, celle-ci se distribue dans les cellules endothéliales corticales et médullaires (Bachmann et al., 1995) ainsi que dans certains segments du néphron tels que les tubes collecteurs médullaires (Wu et al., 1999), la branche ascendante de Henlé (Plato et al., 2000) ainsi qu'au niveau des tubules proximaux contournés (Baines & Ho 2002).

La NOS inductible (iNOS ou NOS 2) :

Le gène codant pour la protéine iNOS est situé sur le chromosome 17. L'enzyme iNOS est produite majoritairement par les macrophages et est impliquée dans le processus d'inflammation (Figure 8). Il est très difficile de détecter cette enzyme au sein d'un tissu sain. Toutefois, il a été démontré que, dans le rein, l'expression de la iNOS est augmentée de façon spectaculaire par des stimuli pro-inflammatoires lors notamment des lésions d'I/R. De plus, il semble que la production de NO après l'induction de la iNOS soit largement supérieure à celle due à l'activité des NOS constitutives (Kosaka et al., 2003).

3.2. Régulation de l'activité des différentes NO synthases

D'une manière générale, la biosynthèse de NO est régulée à des niveaux transcriptionnels ou post-traductionnels mais également par la concentration du milieu en ions calcium, par différentes hormones, par l'assemblage des NOS sous forme de dimère, par leurs cofacteurs (BH₄, NADPH), par leurs substrats (L-arginine) ou même par leurs produits (NO) (Herrera & Garvin, 2005).

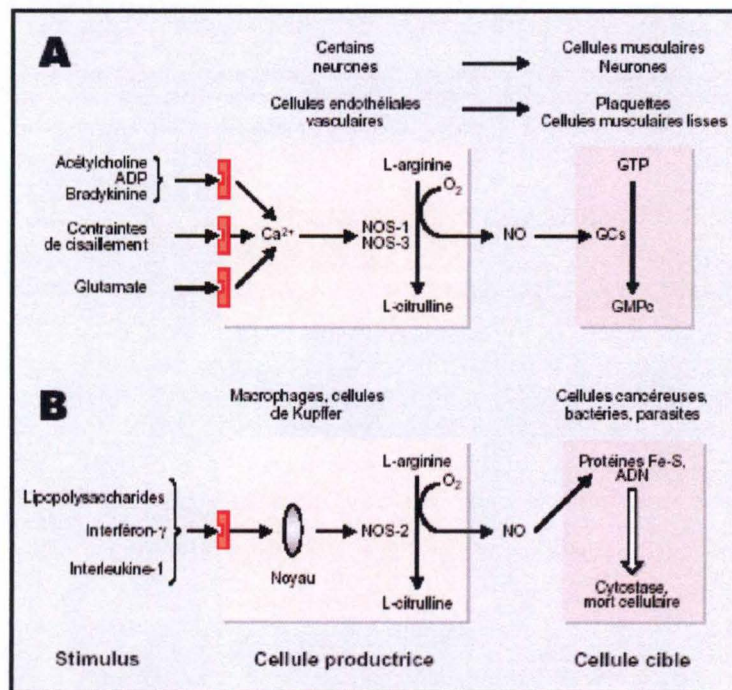


Figure 8. Mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des différentes isoformes de NOS et les principaux modes d'action cellulaires.

D'après Sennequier & Vadon-Le Goff (1998).

La eNOS ainsi que la nNOS sont régulées par différents facteurs tels que des modifications de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} mais également par des facteurs tels que les forces de cisaillement ou l'exposition aux oestrogènes. Des études récentes ont aussi démontré qu'une phosphorylation post-traductionnelle de sites bien particuliers de la eNOS et de la nNOS joue un rôle dans la régulation de la synthèse de NO dans le rein (Mount & Power, 2006). L'enzyme iNOS, quant à elle, n'est généralement pas présente dans les tissus en conditions physiologiques.

3.3. Rôles biologiques du NO

Le monoxyde d'azote participe à de nombreux processus physiologiques ou physiopathologiques. Dans le rein, le NO régule l'hémodynamique rénale et glomérulaire, il est impliqué dans le contrôle de la diurèse et de la natriurèse et joue également un rôle dans le rétro-contrôle tubuloglomérulaire. Plusieurs modèles physiopathologiques soulignent l'importance du NO dans l'hypertension artérielle, dans les phénomènes d'inflammation glomérulaire, ainsi que dans l'IRA ou IRC.

3.3.1. Le NO et l'hémodynamique rénale et glomérulaire

Le NO joue un rôle primordial dans la régulation de la fonction et de l'hémodynamique rénale notamment par son action vasodilatatrice. Ce puissant vasodilatateur agit via le GMP cyclique (GMPc) afin de réguler le tonus des cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux de la microcirculation rénale. Le GMPc est un second messenger intracellulaire qui active certaines protéines kinases responsables de la relaxation vasculaire. En effet, en 1999, Zou & Cowley ont démontré qu'une inhibition de la synthèse du NO provoque une vasoconstriction des artéioles afférentes et efférentes, entraînant ainsi la diminution du débit sanguin et du débit de la filtration glomérulaire. En conditions physiologiques, le NO a aussi pour effet de contrecarrer les effets vasoconstricteurs induits par d'autres facteurs vasoactifs. En effet, il a été montré qu'une légère augmentation de l'endothéline, un puissant vasoconstricteur, est immédiatement suivie d'une production de NO afin de maintenir l'équilibre entre les facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Le NO est donc impliqué dans les mécanismes d'autorégulation du débit de la filtration glomérulaire mais assure également le maintien de la balance glomérulo-tubulaire face à des changements de pression artérielle (voir paragraphe 3.3.2.) (Zou & Cowley, 1999).

3.3.2. Le NO et le rétro-contrôle tubuloglomérulaire

L'appareil juxtaglomérulaire est pourvu de deux mécanismes de rétro-contrôle via le néphron : un rétro-contrôle vasodilatateur sur l'artériole afférente et un rétro-contrôle vasoconstricteur sur l'artériole efférente. La combinaison de ces deux mécanismes a pour but de réguler la filtration glomérulaire (GFR) et est appelé le rétro-contrôle tubuloglomérulaire (TGF). Ainsi, le TGF tend au maintien de la concentration de sel et d'électrolytes dans le fluide tubulaire, celui-ci étant relativement constant.

A cet égard, Wilcox et coll. (1992) ont démontré que la nNOS était fortement exprimée au niveau des cellules de la macula densa. Ces auteurs ont alors émis l'hypothèse du rôle du NO dans la régulation de la réponse du TGF. Cette hypothèse a ensuite été

confirmée par plusieurs équipes qui ont pu mettre en évidence l'effet modérateur du NO dans le rétro-contrôle tubuloglomérulaire dans des conditions physiologiques (Wilcox, 1998 ; Zou & Cowley, 1999).

3.3.3. Le NO et le transport tubulaire d'ions

Le NO joue également un rôle dans la réabsorption du sodium et de l'eau. En effet, en 2002, Ortiz & Garvin ont montré que le NO réduit la réabsorption du sodium dans tous les segments tubulaires, y compris les tubules proximaux, les branches ascendantes de l'anse de Henlé, les tubules distaux et des tubes collecteurs corticaux. Le NO peut donc induire des effets diurétiques et natriurétiques, sans que ceux-ci ne s'accompagnent pour autant de changements du débit de la filtration glomérulaire ni du débit sanguin rénal. Ceci indique que le NO joue un rôle dans la régulation du transport tubulaire au sein du néphron. Le NO intervient aussi au niveau des transporteurs de chlore (Cl^-) et de bicarbonate (HCO_3^-). En effet, dans les branches ascendantes de l'anse de Henlé, on observe qu'une augmentation de NO induit une nette inhibition du transport de Cl^- ainsi que du HCO_3^- (Ortiz & Garvin, 2002).

3.3.4. Le NO et la réponse inflammatoire

Encore à l'heure actuelle, le rôle du NO dans l'inflammation représente l'un des sujets les plus controversés. Un certain nombre d'études ont montré que le NO possédait des propriétés anti-inflammatoires, alors que d'autres études ont démontré que le NO pouvait au contraire promouvoir l'inflammation et induire une cytotoxicité cellulaire ainsi que des lésions tissulaires via la peroxydation des lipides, des dommages de l'ADN et un effet pro-apoptotique (Grisham et al., 1999). Des effets directs se produisent dans des conditions physiologiques lorsque les taux de production de NO sont faibles. Ce sont eux qui régulent la fonction rénale et qui interviennent dans la fonction anti-inflammatoire. Les effets indirects sont les réactions médiées par les dérivés réactifs intermédiaires du NO tels que le peroxynitrite (OONO^-) provenant de la réaction du NO avec l'anion superoxyde (O_2^-). Ces réactions sont produites lorsque les flux de NO sont renforcés, c'est-à-dire principalement en conditions physiopathologiques.

Il a aussi été démontré que le NO inhibe l'adhésion et l'agrégation plaquettaires ou encore favorise l'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales. En outre, le NO à faible concentration stimulerait la production de prostaglandines qui ont des propriétés anti-inflammatoires (Grisham et al., 1999).

3.3.5. Le NO et autres facteurs régulateurs

L'endothélium module le tonus vasculaire par la libération de vasodilatateurs tels le NO, les prostacyclines et les bradykinines, ainsi que de vasoconstricteurs comme l'endothéline-1 (ET-1) et l'angiotensine II (Ang II) en réponse à divers stimuli. En conditions physiologiques, ces facteurs interagissent entre eux afin de maintenir l'homéostasie du milieu intérieur. Cependant, une perturbation de cet équilibre peut entraîner certaines pathologies dont l'insuffisance rénale. Il a effectivement été démontré qu'en cas d'insuffisance rénale chronique, la production de l'ET-1 et de l'Ang II est

augmentée tandis que celle du NO semble diminuée (Vlachojannis et al., 1997 ; Kim & Iwao, 2000 ; Baylis, 2008).

Différentes interactions modulent les effets de ces facteurs dérivés de l'endothélium. Par exemple, il existe des effets compensatoires entre la synthèse d'ET-1 et celle du NO. En conditions physiologiques, l'ET-1 favorise la formation et la libération de NO des cellules endothéliales via la stimulation de son récepteur ET_B (Tomic et al., 2008). D'autres études ont démontré qu'il existe une interaction entre le NO et l'Ang II. En effet, ce peptide, en se liant au récepteur AT₁, stimule la formation d'anions superoxyde dans la cellule, diminuant ainsi la biodisponibilité du NO via sa transformation en peroxynitrite. En revanche, la stimulation du récepteur AT₂ de l'Ang II favoriserait la synthèse du NO en augmentant les taux de bradykinine et l'activité des NOS constitutives (Patzak & Persson, 2007).

3.3.6. Le NO et le superoxyde

Des études ont démontré qu'un stress tissulaire induisait une augmentation de production de l'anion superoxyde (O₂⁻). Cette production excessive d'O₂⁻ favorise la réaction entre l'O₂⁻ et le NO. Ces deux composés hautement réactifs vont interagir entre eux pour former du peroxynitrite (ONOO⁻), hautement cytotoxique (voir ci-dessous).

4. Le stress oxydatif et nitrosatif

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est un phénomène normal pour tous les organismes vivant en conditions aérobie et ne constitue pas en soit une situation de stress oxydatif car la cellule dispose d'un système complexe de détoxification contre les ROS. En effet, en conditions physiologiques, il existe une balance entre les mécanismes anti-oxydants et pro-oxydants. Grâce à cette balance, les cellules sont capable se défendre contre des dommages engendrés par les ROS grâce à des enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) ou encore la glutathione peroxidase (GQH-px). Si ces systèmes de défense sont dépassés ou inefficaces, un déséquilibre se produit en faveur des radicaux libres (principalement l'anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène), définissant ainsi un stress oxydatif, tel qu'on peut l'observer notamment dans les vaisseaux (Figure 9). Ce stress est pathologique pour les tissus et cellules (Zweier & Talukder, 2006). On retrouve ce déséquilibre au cours du phénomène d'I/R. En effet, il a été démontré que la réoxygénation de tissus ischémiés génère une production élevée de ROS qui conduisent à des lésions cellulaires sévères (Zweier & Talukder, 2006). Dans le rein, les principales enzymes capables de former les superoxydes sont la NADPH oxydase (Nath & Norby, 2000), la xanthine oxydase (McCord et al., 1985), la NO synthase (Goligorsky et al., 2002) ainsi que les enzymes de la chaîne respiratoire des mitochondries (Plotnikov et al., 2007). Ces enzymes sont réparties différemment selon que l'on se situe dans le cortex, dans la médullaire ou encore dans la papille rénale (Zou et al., 2001).

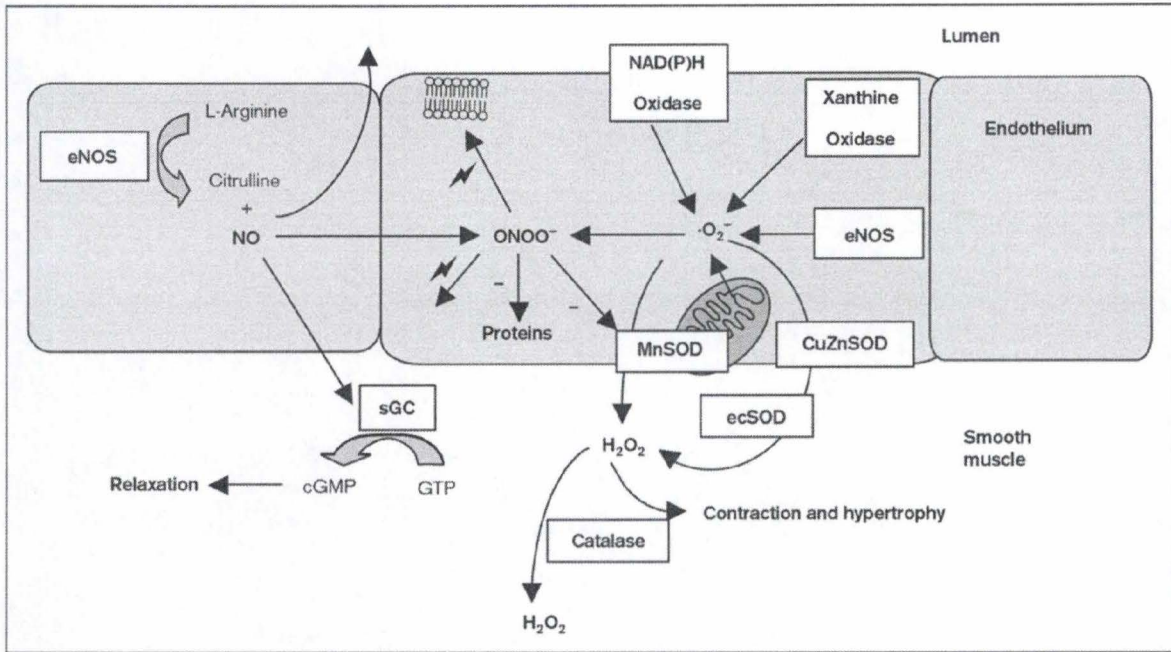


Figure 9. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les dommages oxydatifs au niveau vasculaire : le NO, principalement produit au niveau de l'endothélium par la eNOS à partir de la L-arginine, diffuse à travers la média et produit la relaxation des cellules musculaires lisses via l'activation de la guanylate cyclase (GC). L'anion superoxyde (O_2^-), produit par différentes sources cellulaires (NADPH oxydase, xanthine oxydase, etc...), se combine avec le NO pour former du peroxynitrite ($ONOO^-$) particulièrement cytotoxique. *D'après Berry et al. (2001).*

Par ailleurs, il a été démontré qu'une production excessive d' O_2^- favorise la réaction entre l' O_2^- et le NO, définissant le stress nitrosatif. Le NO, ayant plus d'affinité pour l'anion superoxyde que l'oxygène, aura donc tendance à réagir avec celui-ci pour former du peroxynitrite (Figure 9). Le $ONOO^-$ est un agent hautement cytotoxique, capable d'endommager plusieurs molécules biologiques et de causer d'importants préjudices tissulaires. Le $ONOO^-$ provoque des dommages oxydatifs sur l'ADN, une peroxydation lipidique, ainsi qu'une nitrosylation protéique. Ce stress nitrosatif va par conséquent réduire la biodisponibilité du NO dans la cellule, ce qui va provoquer des dommages vasculaires, cellulaires et tissulaires (Beckman & Koppenol, 1996 ; Goligorsky et al., 2002).

Les constituants et les organelles cellulaires (lipides, carbohydrates, protéines, et acides nucléiques) sont la cible des ROS. Les altérations ainsi induites peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose. L'oxydation des lipides sous l'action des ROS va générer des peroxydes lipidiques, très réactifs, qui vont induire une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes. De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS, au même titre que l'ADN. Le peroxyde d'hydrogène va, en effet, créer des cassures dans les brins d'ADN menant à l'activation de l'enzyme impliquée dans le processus de réparation de l'ADN, la polymérase poly-ADP-ribose. Une telle augmentation de cette activité enzymatique va mener à la consommation du NAD^+ et donc à une réduction de la synthèse d'ATP. De plus, les ROS compromettent la synthèse d'ATP mitochondriale en inhibant le complexe ATP

synthétase. Ces modifications d'activité cellulaire sont suivies d'une élévation de calcium intracellulaire, d'altérations du cytosquelette et de la membrane plasmique pour finir par la mort cellulaire. A ce stade, si le taux d'ATP est relativement préservé, la cellule aura tendance à activer plutôt le mécanisme de l'apoptose ; par contre, si les dommages mitochondriaux sont tels que les ressources cellulaires en ATP sont très fortement réduites, c'est le mécanisme de nécrose qui va prendre le dessus sur l'apoptose (Nath & Norby, 2000).

Objectifs

Au vu des éléments abordés dans l'introduction, l'objectif de ce mémoire était d'évaluer l'implication du NO lors des altérations morfo-fonctionnelles consécutives à une ischémie/reperfusion du rein chez le rat. Toutefois, étant donné la complexité des mécanismes physiopathologiques et des systèmes de régulation mis en jeu, le travail effectué au cours de ce mémoire s'est focalisé sur certaines approches expérimentales et analytiques.

Les objectifs suivants ont donc été définis :

- mise en œuvre du modèle d'ischémie/reperfusion rénale chez deux souches de rats, Wistar-Hanovre et Wistar-Furth, dans un but comparatif. Sur la base de résultats obtenus précédemment (Declèves et al., 2006), une période d'observation de 14 jours après la procédure d'I/R a été retenue. Etant donné que la plupart des études rapportées dans la littérature limitent les analyses à l'un ou l'autre délai post-ischémique, nous avons privilégié un suivi continu des mêmes animaux, placés en cage métabolique pendant 20 jours en moyenne. Une telle approche assure un suivi temporel continu de l'évolution de la fonction rénale et ce, au sein d'un même groupe expérimental.
- évaluation de la fonction rénale grâce à des analyses des échantillons urinaires permettant de caractériser quantitativement et qualitativement les capacités excrétrices du rein post-ischémique, en considérant également une estimation du bilan hydro-électrolytique.
- caractérisation des lésions tissulaires par des méthodes histologiques. Pour ce faire, d'autres groupes expérimentaux ont été constitués de manière à disposer d'échantillons biologiques à des délais post-ischémiques intermédiaires.
- évaluation du métabolisme du NO, par la mesure de la concentration urinaire et de la charge excrétée de ses métabolites. Cette analyse a pour objectif premier de déterminer dans quelle mesure les deux souches de rats étudiés peuvent se différencier en termes de production du NO dans des conditions d'insuffisance rénale aiguë ischémique.

MATERIEL ET METHODES

Les animaux utilisés dans le cadre de ce travail sont des rats Wistar-Hanovre (WH), ainsi que des rats Wistar-Furth (WF), provenant à l'origine du centre d'élevage Harlan (Pays-Bas). La souche Wistar-Hanovre est l'une des plus communes et est largement représentée dans les études *in vivo*. Les rats Wistar-Furth, quant à eux, appartiennent à une lignée de rats consanguins, développée en 1945 par J. Furth. Pour rappel, ces animaux se caractérisent notamment par une résistance au développement de l'insuffisance rénale chronique induite par une réduction de la masse rénale (Erdely et al., 2003) ou par une intoxication à la puromycine (Erdely et al., 2004). Ils représentent ainsi un outil biologique qui pourrait s'avérer intéressant dans l'étude des mécanismes sous-jacents de diverses pathologies rénales.

Les expériences sont réalisées sur des rats mâles d'un poids variant de 220 g à 260 g, qui ont été élevés dans les locaux de l'animalerie Extension Médecine des FUNDP. Ces animaux séjournent dans des locaux maintenus à une température ambiante de 21°C et soumis à un cycle jour/nuit de 12 h/12 h. Ils reçoivent quotidiennement de l'eau fraîche ad libitum et 25 g de nourriture sèche (SAFE, France). L'évolution pondérale et l'état général des rats sont contrôlés deux fois par semaine.

1. Modèle expérimental

Le modèle expérimental utilisé est celui de l'ischémie-reperfusion du rein gauche (I/R), associée à une néphrectomie contralatérale (Declèves et al., 2006). Afin de réaliser l'I/R, les rats sont anesthésiés par une injection intra-péritonéale (i.p.) d'une solution de Nembutal (60 mg/kg PC, Ceva Santé animale, Bruxelles, Belgique). Après une laparotomie, l'ablation du rein droit est effectuée. Ensuite, le flux sanguin de l'artère rénale gauche est interrompu pendant 60 minutes à l'aide d'un clamp microvasculaire. Dès le début de l'ischémie, la surface du rein présente un aspect pâle très différent de sa couleur naturelle rouge foncé. Au terme de la période d'ischémie, la reperfusion du rein est contrôlée et confirmée par la réapparition d'une perfusion normale du tissu. Après des sutures successives des plans musculaire et cutané, l'animal peut récupérer de la procédure chirurgicale. En fonction des protocoles, l'animal est anesthésié à nouveau à des délais précis post-I/R, soit 48 h, 7 ou 14 jours après l'intervention, afin de prélever des échantillons biologiques avant de procéder à une euthanasie. Enfin, certains animaux ne sont pas soumis à la procédure d'I/R, afin de disposer de prélèvements effectués dans des conditions « contrôle » (Figure 10).

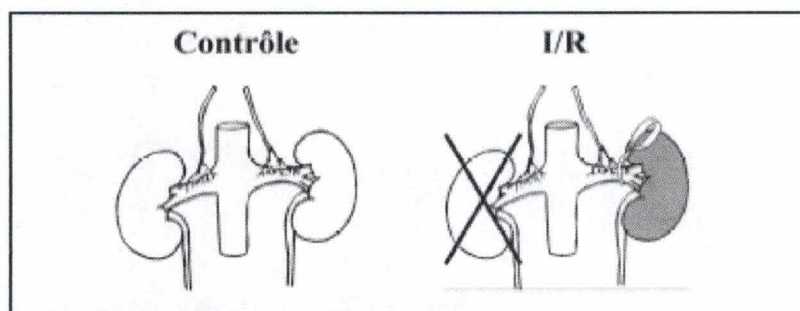


Figure 10. Séries expérimentales : animaux « contrôle » (masse rénale intacte) et animaux « I/R » (ischémie/reperfusion du rein gauche + ablation du rein droit).

Au cours de ce travail, deux protocoles expérimentaux ont été mis en œuvre :

A. Suivi temporel des animaux « I/R », placés en cage métabolique

Ce protocole a pour objectif d'étudier chez l'animal conscient l'évolution temporelle de plusieurs variables caractérisant la fonction rénale, à savoir le comportement dipsique et alimentaire, ainsi que l'excrétion urinaire des métabolites du NO. Des rats WH (n=6) et WF (n=7) ont ainsi été suivis pendant 2 jours avant, et 14 jours après la procédure d'I/R (Figure 11). Au terme de cette période, les animaux ont été euthanasiés, après prélèvement du rein gauche et du sang sous anesthésie générale.

B. Prélèvement du sang et du tissu rénal

Afin de compléter les échantillons biologiques prélevés 14 jours après l'I/R dans le protocole A, d'autres rats (WH et WF) ont également été soumis à la procédure d'I/R et ont ensuite été euthanasiés après une période de 48 heures ou de 7 jours post-I/R afin de prélever le rein gauche et le sang en vue d'analyses ultérieures. Des animaux « contrôles » appartenant aux deux souches ont également été inclus dans ce protocole.

2. Echantillons biologiques

2.1. Prélèvement du plasma

Avant de procéder à l'euthanasie des animaux, un échantillon sanguin a été prélevé par ponction aortique, sous anesthésie générale. Le sang hépariné est centrifugé à 1600 g pendant 15 min à 4°C et le plasma est ensuite stocké à -80°C.

2.2. Prélèvement des tissus

Après l'euthanasie de l'animal, le rein gauche est prélevé, séché et pesé. Ensuite, le rein est coupé suivant le plan sagittal, afin de fixer par immersion une moitié de l'organe dans le Bouin alcool (liquide de Duboscq-Brazil) (Declèves et al., 2006), en vue d'analyses histologiques ultérieures détaillées ci-après. L'autre moitié est micro-disséquée en 4 zones distinctes (C, OSOM, ISOM, IM), et ces échantillons tissulaires sont fixés dans l'azote liquide et ensuite stockés à -80°C.

2.3. Prélèvement des urines

Les urines sont récoltées comme décrit ci-dessous, chez les animaux placés en cage métabolique.

3. Conditionnement en cage métabolique

Les animaux placés en cage métabolique sont tout d'abord acclimatés à ce type d'hébergement pendant 4 jours en moyenne, avant d'intégrer le protocole expérimental A.

La cage métabolique permet de séparer les matières fécales et les urines (Figure 12). Il est également possible de mesurer quotidiennement la quantité de nourriture et d'eau ingérées, ainsi que le volume urinaire excrété. Les prélèvements d'échantillons urinaires en conditions « contrôle » sont effectués sur deux périodes consécutives de 24 h avant d'effectuer la procédure d'I/R. Ensuite, les échantillons sont récoltés chaque jour pendant 14 jours, au terme desquels l'animal est euthanasié (Figure 11). Ces cages, entreposées à l'animalerie, sont soumises aux mêmes conditions d'éclairage et de température que celles décrites auparavant.

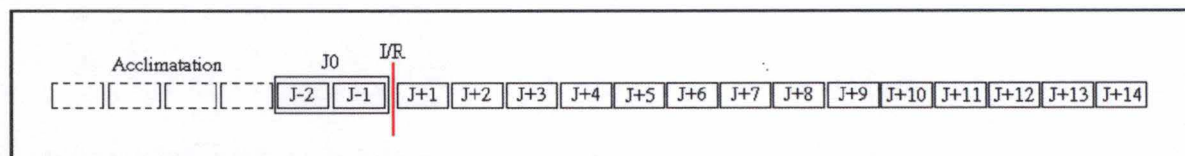


Figure 11. Schéma du protocole expérimental A en cage métabolique. I/R : induction de l'ischémie/reperfusion ; J-2 : période contrôle 2 jours avant l'ischémie/reperfusion ; J-1 : période contrôle 1 jour avant l'ischémie/reperfusion ; J0 : moyenne de J-1 et J-2 qui servira de donnée contrôle.

Les quantités de nourriture et d'eau pesées au début et à la fin de chaque période d'observation fournissent des informations sur le comportement dipsique et alimentaire de l'animal. Toutefois, certaines précautions sont nécessaires afin que les prélèvements soient effectués dans les meilleures conditions et que les échantillons soient préservés au mieux :

- les cages métaboliques sont nettoyées tous les 2 jours ;
- la nourriture mise à disposition est finement broyée afin que les rats ne la dispersent pas, ce qui pourrait contaminer l'échantillon urinaire. En outre, il est ainsi possible de connaître avec précision la quantité de nourriture ingérée ;
- une fine couche d'huile est déposée dans le collecteur d'urines afin d'éviter une évaporation excessive de celles-ci.

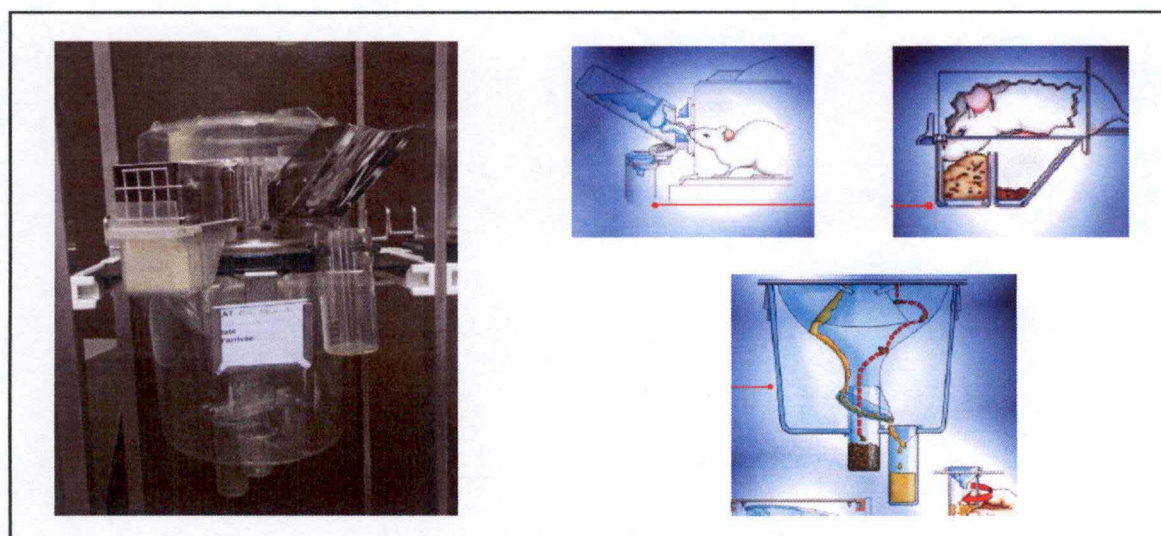


Figure 12. Description des cages métaboliques. Alimentation du rat (en haut à droite) et récolte séparée des fèces et des urines (en bas à droite).

4. Approches analytiques

4.1. Créatininémie

Les échantillons sanguins ont été prélevés sur glace dans des tubes contenant de l'EDTA et ont été soumis à une centrifugation à 4 °C, pendant 15 min à 2500 tours/min. Le plasma est ensuite récupéré et stocké à -80 °C, avant d'être soumis à la mesure de la concentration de la créatinine, indicateur de la fonction rénale. Cette mesure a été effectuée dans le laboratoire d'analyses médicales LB Cama (Wauthier-Braine, Belgique) sur analyseur automatique (Olympus).

4.2. Mesure de l'osmolalité

L'osmolalité des échantillons urinaires est mesurée à l'aide d'un Micro-Osmomètre (Fiske Model 210, Norwood, MA, USA). Le principe de la mesure est basé sur la détermination de l'équilibre entre la phase liquide et cristalline (point cryoscopique). En pratique, l'échantillon (20 µl) est rapidement refroidi, et sa cristallisation est induite par une impulsion mécanique. Ensuite, la solution subit un réchauffement proche de la température de fusion, et atteint l'équilibre glace-eau. Le point cryoscopique est alors mesuré avec une précision de 0,002°C. Cette valeur est convertie par l'osmomètre en unités d'osmolalité (mOsm/kg).

4.3. Mesure des concentrations en Na⁺ et en K⁺

Les concentrations urinaires en Na⁺ et en K⁺ sont déterminées par spectrophotométrie de flamme (IL 943, Instrumentation Laboratory, Italie). L'échantillon (25 µl) est vaporisé dans une flamme propane-air, ce qui amène les atomes à un niveau énergétique supérieur. Cet état énergétique est instable, de sorte que les atomes retournent à leur état de base en émettant de l'énergie sous forme de lumière. Chaque élément possède une longueur d'onde qui lui est propre. L'intensité lumineuse émise est directement proportionnelle au nombre d'atomes contenus dans l'échantillon vaporisé et donc à leur concentration exprimée en mEq/l.

4.4. Mesure des concentrations des métabolites du NO

But : L'évaluation globale du métabolisme du NO est effectuée en mesurant la quantité de nitrites (NO₂⁻) et de nitrates (NO₃⁻) dans les fluides biologiques. En effet, la molécule de monoxyde d'azote a une demi-vie très brève ($t_{1/2} = 4$ secondes), tandis que les nitrites et nitrates, métabolites du NO (NO_x), présentent une plus grande stabilité. L'une des approches permettant de mesurer l'excrétion urinaire du NO est de déterminer la concentration des NO_x par la méthode de Griess. Pour ce faire, nous avons utilisé un kit commercial (Cayman Chemical Company, USA), basé sur le principe de l'ELISA.

Principe : Le principe de ce dosage consiste à convertir les NO₃⁻ en NO₂⁻ grâce à une nitrate réductase. Ensuite, un réactif de Griess est ajouté à l'échantillon, lequel convertit le nitrite en un composé azo pourpre intense qui va permettre de réaliser un

dosage colorimétrique des NO_2^- (Figure 13). Le dosage se fait en référence à des solutions standard de concentrations connues, de 5 à 35 μM de nitrates.

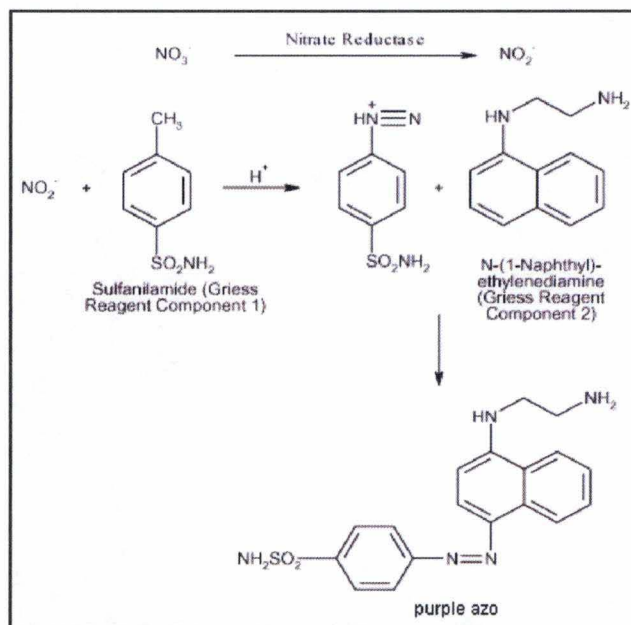


Figure 13. Réaction de Griess (Cayman Chemical Company, USA)

Mode opératoire :

I. Préparation des solutions fournies dans le kit :

Certains composants du kit tels que la solution tampon, la nitrate réductase, le cofacteur enzymatique, le standard nitrate ainsi que les réactifs de Griess R1 et R2, sont fournis sous forme lyophilisée ou concentrée et nécessitent d'être reconstitués ou dilués avant leur utilisation. La solution tampon est utilisée pour diluer ces différents composants.

II. Préparation des échantillons :

Des mises au point préliminaires nous ont permis de déterminer qu'une dilution 1:10 des échantillons urinaires récoltés est nécessaire afin que les valeurs d'absorbance qui leur correspondent soient compatibles avec celles de la courbe standard.

III. Préparation du dosage nitrite + nitrate sur plaque :

Après avoir reconstitué les solutions fournies dans le kit (tampon, standards, enzymes et réactifs de Griess), celles-ci sont distribuées sur une plaque de 96 puits de la manière suivante :

- 200 μl de tampon dans les 2 puits consacrés au « blanc » ;
- 80 μl d'une solution standard ou d'un échantillon (en duplicata) + 10 μl de « Enzyme Cofactor Mixture » + 10 μl de « Nitrate Reductase Mixture ». Cette étape permet de convertir le nitrate en nitrite ;

- la plaque est recouverte d'un film protecteur pendant 1 heure à température ambiante pour incubation ;
- ensuite, on ajoute successivement dans chaque puits (sauf ceux consacrés au « blanc ») 50 μl de « Griess Reagent R1 » et 50 μl de « Griess Reagent R2 ». Ces deux réactifs contiennent respectivement du sulfanilamide et du N-(1-naphtyl)-éthylènediamine. L'incubation des réactifs de Griess avec le NO_2^- contenu dans nos échantillons forme un composé azo pourpre ;
- après 10 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 550 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (Multiskan Ex, Thermo electron corporation, Bruxelles). Après avoir soustrait de chaque valeur d'absorbance celle correspondant au « blanc », la concentration en NO_2^- est déterminée à l'aide d'une courbe standard linéaire de 0 à 35 μM de NO_2^- (Figure 14).

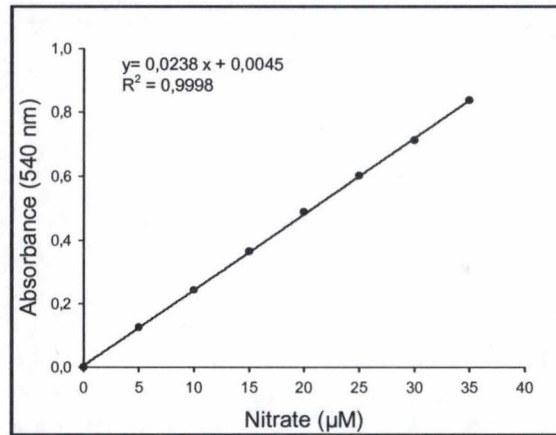


Figure 14. Exemple d'une courbe standard obtenue au cours d'un dosage.

5. Etudes morphologiques du tissu rénal

Après 48 heures de fixation, les tissus sont déshydratés selon le protocole suivant :

- 3 bains d'alcool 95° répartis sur une journée suivis d'un bain "overnight".
- 3 bains de butanol sur une journée suivis d'un bain "overnight".

Au terme de la déshydratation, une étape de paraffinage consiste à transférer les échantillons dans 3 bains de paraffine à 58-60°C, à raison d'un bain par jour pendant 3 jours. Les échantillons sont finalement enrobés dans de la paraffine fraîche. Cet enrobage confère une rigidité suffisante à l'échantillon permettant d'effectuer des coupes de tissu de 5 μm d'épaisseur à l'aide d'un microtome Autocut 2040 (Reichert Inc., USA) équipé de couteaux d'acier. Les coupes histologiques sont ensuite déposées sur un film d'eau à la surface de lames porte-objet préalablement traitées au silane (3-aminopropyltriéthoxysilane, 98%, Sigma, USA), assurant ainsi l'adhésion du tissu sur le verre. Les lames sont ensuite déposées sur une plaque chauffante 24 heures à 37°C. Elles sont alors utilisables pour des colorations ultérieures.

5.1. Coloration au PAS (Periodic Acid Schiff), à l'Hémalun et au Bleu de Luxol

Cette coloration marque les différentes structures histologiques permettant ainsi une mise en évidence des lésions. Elle est effectuée pour chaque animal sur une coupe sagittale de 5µm du rein gauche. Les différentes étapes sont les suivantes:

- déparaffinage par 2 bains de Toluène successifs de 5 minutes chacun et un passage dans 3 bains d'alcool 95° ;
- 10 minutes dans un bain d'eau courante ;
- 8 minutes dans l'acide périodique 1% ;
- 25-30 secondes dans le PAS ;
- 5 minutes dans un bain d'eau courante ;
- 5 minutes dans l'Hémalun de Mayer ;
- 5 minutes dans un bain d'eau courante ;
- passage dans l'éthanol 95% ;
- 2 minutes dans le Bleu de Luxol (0,1% dans l'alcool 95°)

Enfin, le montage des coupes entre lame et lamelle prépare les coupes à l'observation microscopique. Celui-ci consiste en différentes étapes:

- passage dans 3 bains d'alcool 95°
- passage dans un bain de butanol
- passage dans 2 bains de toluène

6. Calculs

Différentes variables permettant de caractériser la fonction rénale sont calculées en utilisant les formules suivantes :

- **La diurèse** (UV - ml/24 h) correspond au volume des urines émises par unité de temps. En pratique, le volume des urines est assimilé au poids de celles-ci.

$$UV = P_u / t$$

P_u = poids de l'urine (g)

t = temps de récolte (24 h)

- **L'excrétion urinaire du Na⁺** (natriurèse, U_{Na}V - mEq/24 h) **et du K⁺** (kaliurèse, U_KV - mEq/24 h) représente la charge excrétée en Na⁺ ou en K⁺.

$$\begin{aligned} U_{Na}V &= [Na^+] \times UV \times 10^{-3} \\ U_{K}V &= [K^+] \times UV \times 10^{-3} \end{aligned}$$

[Na⁺] ou [K⁺] = concentrations urinaires en Na⁺ ou K⁺ déterminées à l'aide du spectrophotomètre à flamme (mEq/l)

- **L'excrétion urinaire des NOx** (E_{NO} - μmole/24 h) représente la charge excrétée des métabolites du NO.

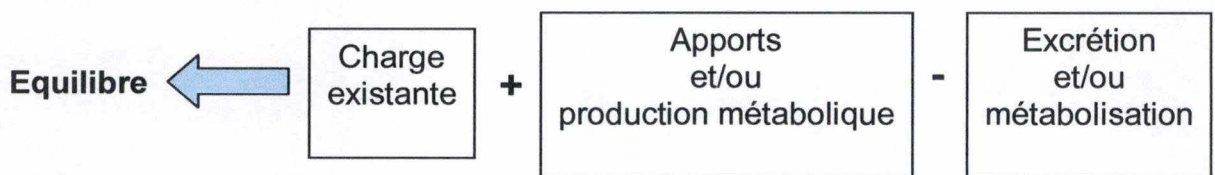
$$\begin{aligned} [NO] &= \frac{A_{540} - b}{a} \times \frac{200}{\text{Volume initial de l'échantillon}} \times CD \\ E_{NO} &= [NO] \times UV \end{aligned}$$

A₅₄₀ = Absorbance de l'échantillon

a et b : pente et ordonnée à l'origine de l'équation « y = ax + b », caractérisant la courbe standard

200 μl = volume total de l'échantillon dans chaque puits (μl)

- **Bilan hydro-électrolytique** : ce bilan est établi pour l'eau, le sodium et le potassium. Il correspond par définition à l'équilibre qui existe entre les apports et les pertes.



Pour chacune des trois molécules considérées, à savoir l'eau, le sodium et le potassium, le bilan a été calculé de la manière suivante : dans chaque groupe expérimental (rats WH ou WF), la moyenne des quantités excrétées par 24 h a été rapportée à la moyenne des quantités ingérées et est ainsi exprimée en %.

7. Evaluation statistique

Les résultats présentés dans ce travail sont des moyennes \pm SEM. Ces résultats ont été soumis à des tests statistiques :

- **un test t de Student pour échantillons appariés** afin d'évaluer la différence statistique entre deux moyennes au sein d'un même groupe expérimental ;
- **un test t de Student** afin d'évaluer la différence statistique entre deux moyennes appartenant à deux groupes expérimentaux différents;
- **un test de variance (one way ANOVA)** pour comparer les moyennes entre plus de deux groupes expérimentaux différents ;
- **un test de variance pour mesures répétées (one way ANOVA repeated measurements)** pour comparer plus de deux moyennes correspondant à différentes périodes expérimentales au sein d'un même groupe ;
- **un test de variance pour mesures répétées à deux facteurs (two way ANOVA repeated measurements)** pour comparer plus de deux moyennes correspondant à différentes périodes expérimentales au sein de deux groupes différents ;
- en cas de signification statistique, l'analyse de variance a été complétée afin de mettre en évidence les différences par rapport aux valeurs de référence au sein d'un même groupe ou les paires de moyennes statistiquement différentes les unes des autres (**test de Dunnett ou test de Newman-Keuls**).

La limite de signification a été fixée à $P < 0.05$.

RESULTATS

1. Généralités

1.1. Poids corporels et poids rénaux

Le Tableau 1 présente les valeurs moyennes du poids corporel, ainsi que le poids du rein gauche dans les différents groupes expérimentaux inclus dans le protocole B (voir p. 19). Le poids du rein droit qui figure dans le Tableau correspond au tissu néphrectomisé lors de la procédure d'I/R, et correspond ainsi à une valeur de référence.

Tableau 1. Poids corporels et poids rénaux mesurés chez des animaux « contrôle », ainsi que 48 heures, 7 et 14 jours après I/R.

	Wistar-Hanovre (WH)			Wistar-Furth (WF)		
	PC (g)	PRG (g)	PRD (g)	PC (g)	PRG (g)	PRD (g)
Ctl (n=7)	243±9	0,875±0,038		239±7	1,072±0,061	
48 h (n=6)	231±11	1,243±0,050*	0,889±0,060	212±5	1,269±0,080*	0,948±0,049
7 jours (n=6)	245±15	2,308±0,166*	0,962±0,068	222±13	2,237±0,188*	1,024±0,062
14 jours (n=6)	270±8	1,473±0,065*	0,830±0,039	268±8	1,695±0,120*	1,018±0,034

Résultats = moyennes ± SEM. Statistiques : * P<0.05 : PRG versus PRD (test t de Student pour échantillons appariés).

n : nombre d'animaux ; Ctl : groupe « contrôle » ; PC : poids corporel ; PRG : poids du rein gauche ; PRD : poids du rein droit.

Aucune différence significative n'a été observée entre les poids corporels des rats appartenant aux souches WH et WF. Après la procédure d'I/R, une perte de poids est observée quel que soit l'animal considéré et représente entre 10 et 20 g, 48 h après l'intervention. Par la suite, les animaux reprennent du poids de manière progressive. En effet, de 48 h à 14 j, une augmentation de leur masse pondérale est observée, de telle sorte que le poids corporel est similaire dans les deux souches 14 j après I/R et avoisine 270 g. Notons toutefois que ces variations de poids dans les différents groupes, au sein d'une même souche, ne présentent pas de signification statistique (NS, Anova).

En ce qui concerne le poids du rein droit (non ischémié), aucune différence significative ne le distingue du poids du rein gauche chez les animaux « contrôle » de même souche. De même, ces valeurs sont similaires chez les animaux WH et WF (NS).

Après la procédure d'I/R, une augmentation du poids du rein gauche est observée au stade 48 h, 7 et 14 j, par comparaison au poids du rein droit correspondant. Le profil évolutif des variations du poids du rein gauche est similaire pour les deux souches WH et WF et se traduit par un accroissement progressif avec une valeur maximale 7 j après I/R. Ensuite, le poids du rein gauche diminue, sans toutefois atteindre des valeurs caractérisant le poids d'un rein contrôle. En outre, à un stade identique, le poids du rein ischémié est comparable chez les rats WH et WF (NS).

1.2. Créatininémie

Pour rappel, la fonction rénale est notamment caractérisée par le débit de la filtration glomérulaire (DFG). La créatinine, produit métabolique endogène est un bon marqueur de la filtration glomérulaire car elle répond aux caractéristiques d'un indicateur de choix :

- est filtrée librement
- n'est ni absorbée, ni sécrétée le long du néphron
- n'est pas métabolisée dans le rein
- n'est pas toxique

Dans des conditions physiologiques, sa concentration plasmatique (créatininémie) est très stable. Notons également que la créatininémie et le DFG sont inversement proportionnels. Ainsi, une créatininémie élevée est indicative d'une réduction du DFG, ce qui traduit une défaillance de la fonction rénale.

La Figure 15 représente l'évolution de la concentration plasmatique de la créatinine chez les rats WH et WF.

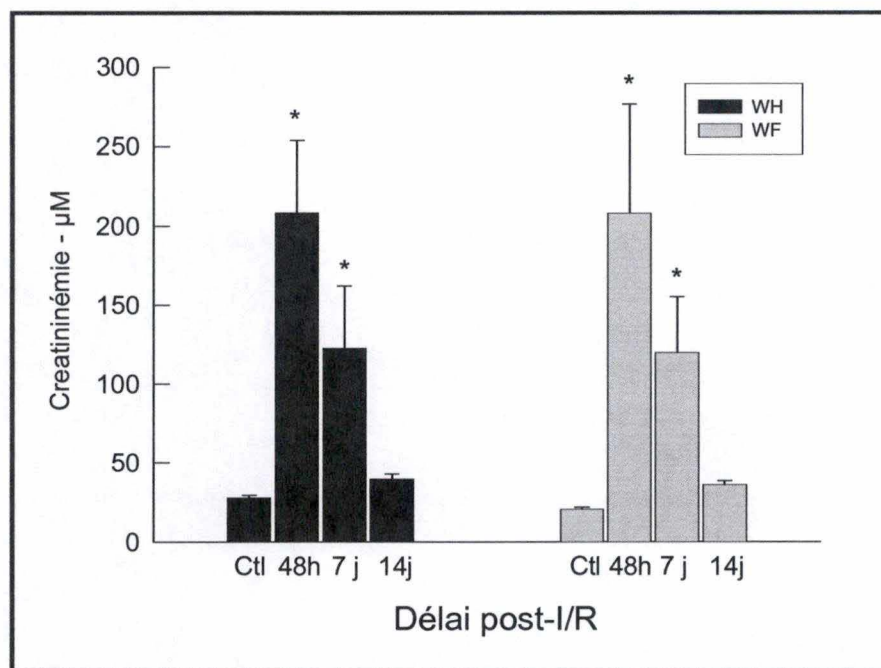


Figure 15. Evolution temporelle de la créatininémie dans le groupe « contrôle » (Ctl), ainsi que 48 h, 7 j et 14 j après I/R chez les rats Wistar-Hanovre (WH) et Wistar-Furth (WF).

Résultats = moyennes \pm SEM. Statistiques : * $P < 0.05$ versus groupe « contrôle » (Anova + test de Dunnett).

Chez les rats WH, la créatininémie augmente significativement 48 h et 7 j après I/R, de $28 \pm 2 \mu\text{M}$ à des valeurs moyennes de 209 ± 45 et de $123 \pm 39 \mu\text{M}$, respectivement ($P < 0.05$). Au stade 14 j post-I/R, la créatininémie est revenue à des valeurs similaires à celles des animaux du groupe « contrôle », soit $40 \pm 3 \mu\text{M}$ (NS). Chez les rats WF, la

créatininémie dans le groupe « contrôle » est similaire à celle des rats WH, de même que l'évolution de son profil temporel. En effet, les rats WF présentent une concentration plasmatique de créatinine, qui augmente de $21 \pm 1 \mu\text{M}$ (groupe « contrôle ») à 208 ± 69 et $120 \pm 36 \mu\text{M}$ aux stades 48 h et 7 j post-I/R, respectivement ($P < 0.05$). A nouveau, la valeur mesurée 14 j après I/R est similaire à celle du groupe « contrôle » ($368 \pm 2 \mu\text{M}$, NS).

2. Capacités excrétoires rénales

Pour rappel, les résultats présentés ci-dessous ont été obtenus sur base des relevés en cage métabolique (protocole A), ainsi que grâce aux analyses effectuées sur les échantillons urinaires récoltés quotidiennement.

2.1. Diurèse et osmolarité urinaire

La Figure 16 (voir page suivante) illustre l'évolution temporelle de la diurèse et de l'osmolarité urinaire dans des conditions « contrôle », correspondant à la moyenne des prélèvements effectués aux jours J-2 et J-1, ainsi qu'au cours d'une période post-ischémique de 14 jours et ce, dans les deux souches de rats étudiées. Notons que la diurèse, ainsi que l'osmolarité urinaire, présentent des valeurs « contrôle » similaires pour les deux souches WH et WF (NS, test t de Student).

A. La diurèse

Chez les rats WH, la diurèse augmente au cours des premières 48 h qui suivent l'I/R et atteint ainsi, au jour 3, une valeur significativement supérieure à la diurèse contrôle ($22,7 \pm 2,4$ versus $14,5 \pm 1$ ml/24 h, $P < 0,05$). La diurèse est ensuite maximale aux jours 5 et 6 post-I/R et correspond en moyenne à 26 ml/24 h. Après ce stade, les valeurs tendent à diminuer progressivement, de telle sorte que la diurèse redevient statistiquement comparable à la valeur « contrôle » au cours des 6 derniers jours de la période d'observation et équivaut en moyenne à 20 ml/24 h.

Chez les rats WF, l'évolution temporelle de la diurèse après l'I/R tend à adopter un profil similaire à celui observé chez les rats WH. Toutefois, la phase d'accroissement de la diurèse au cours des premiers jours semble être plus prononcée. En effet, 72 h après l'I/R, la diurèse atteint une valeur maximale de $32,8 \pm 3,2$ ml/24 h ($P < 0.05$ versus WH, test t de Student). Par la suite, soit à partir du jour 6 post-I/R, les valeurs de la diurèse des rats WF rejoignent celles mesurées chez les rats WH et tendent ainsi à revenir à des valeurs proches de la diurèse « contrôle ».

B. L'osmolarité urinaire

L'osmolarité urinaire, qui reflète la capacité de concentration des urines, présente quant à elle un profil inversé par comparaison à celui décrit ci-dessus pour l'évolution de la diurèse. Chez les rats WH, l'osmolarité urinaire est fortement réduite de 1486 ± 106 à 597 ± 122 mOsm/l, et ce dès les premières 24 h après l'I/R. Cette diminution de l'osmolarité s'atténue au cours du temps mais ses valeurs restent néanmoins inférieures à celle correspondant aux conditions « contrôle ». En effet, au terme de la période d'observation de 14 jours post-I/R, l'osmolarité urinaire équivaut à 1176 ± 153 mOsm/l ($P < 0.05$).

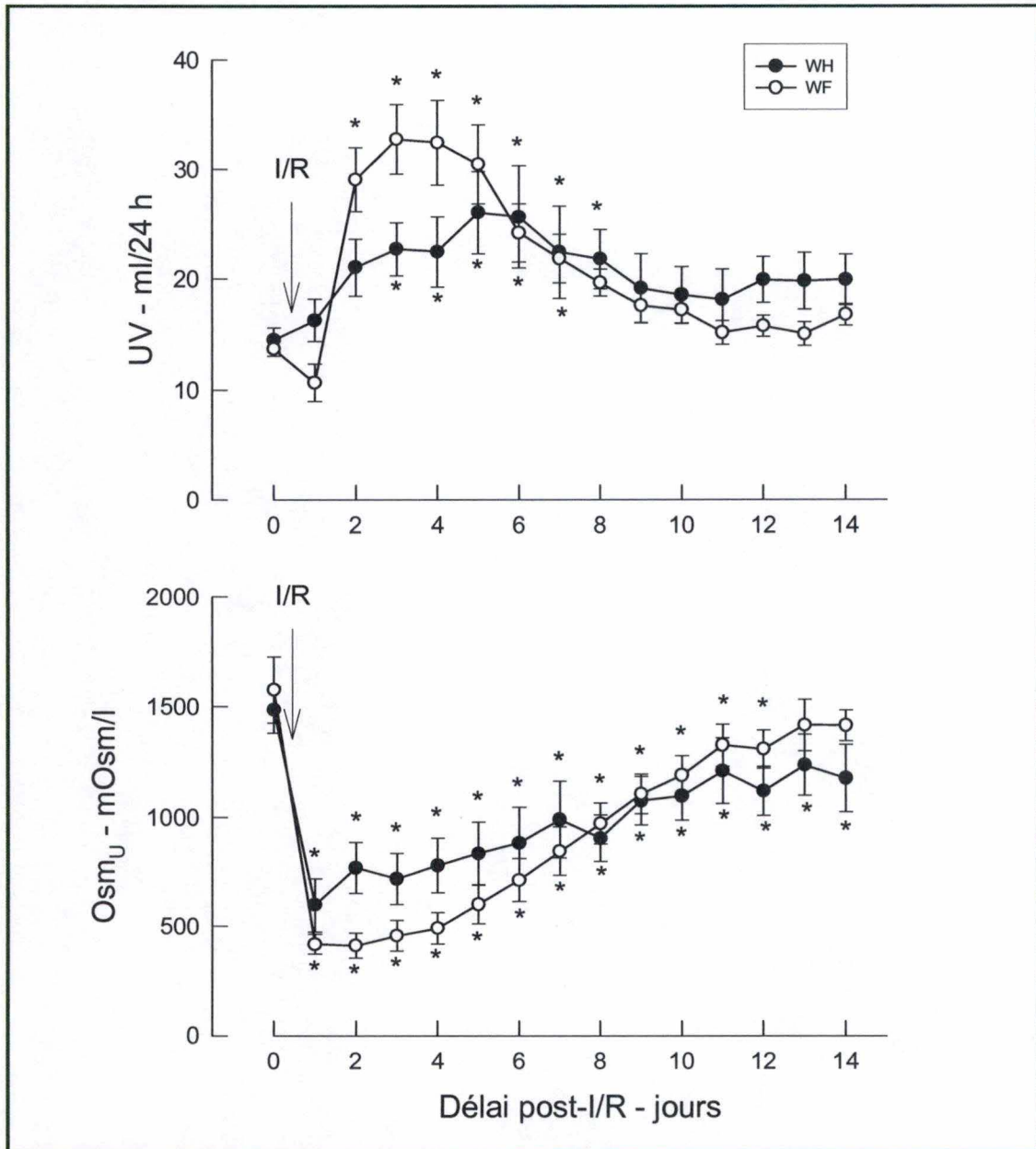


Figure 16. Evolution temporelle de la diurèse (UV) et de l'osmolarité urinaire (Osm_U) en conditions « contrôle », ainsi que sur une période de 14 jours après I/R, chez les rats Wistar-Hanovre (WH) et Wistar-Furth (WF).
 Résultats = moyennes ± SEM. Statistiques : * P<0.05 versus groupe J0 (contrôle) (Anova pour mesures répétées + test de Dunnett).

Chez les rats WF, la dilution des urines se manifeste tout aussi rapidement après l'I/R et semble à nouveau être plus prononcée que chez les rats WH. Ainsi, au stade 48 h post-I/R, l'osmolarité urinaire chez les rats WF représente environ 55% de la valeur correspondante chez les rats WH (410 ± 58 versus 769 ± 119 mOsm/l, P<0.05). Ensuite, l'osmolarité augmente progressivement, atteint des valeurs similaires à celles observées chez les rats WH dès le jour 5 post-I/R et redevient comparable à la valeur « contrôle » à la fin de la période d'observation.

2.2. Natriurèse et kaliurèse

La Figure 17 illustre l'évolution temporelle de la natriurèse (excrétion urinaire du sodium) et de la kaliurèse (excrétion urinaire du potassium) selon un protocole et des conditions expérimentales décrites ci-dessus (voir page 29). A nouveau, les valeurs « contrôle » de ces deux variables sont similaires dans les deux souches WH et WF (NS, test t de Student).

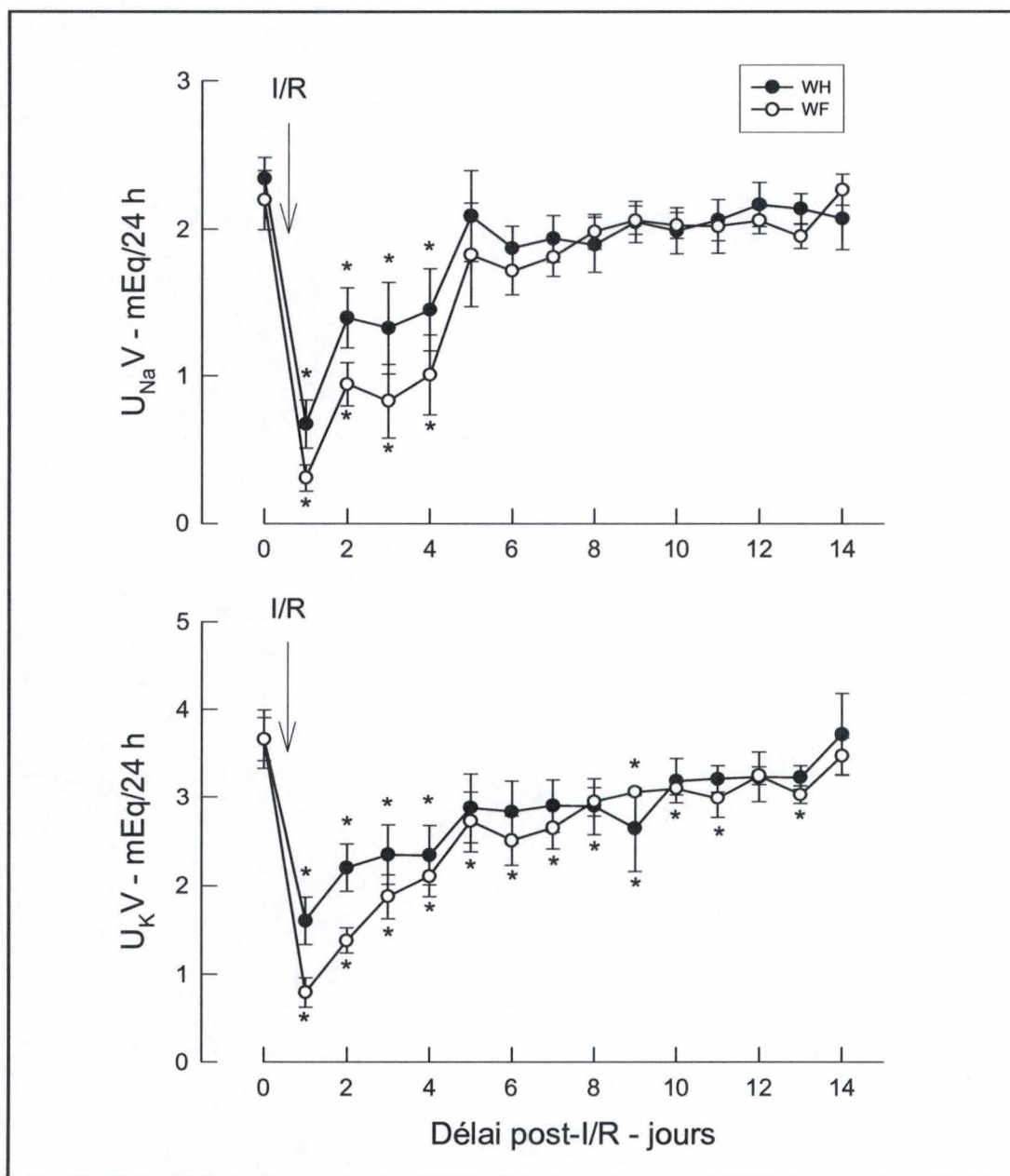


Figure 17. Evolution temporelle de la natriurèse ($U_{Na}V$) et de la kaliurèse (U_KV) en conditions « contrôle », ainsi que sur une période de 14 jours après I/R, chez les rats Wistar-Hanovre (WH) et Wistar-Furth (WF).

Résultats = moyennes \pm SEM. Statistiques : * $P < 0.05$ versus groupe J0 (contrôle) (Anova pour mesures répétées + test de Dunnett).

A. La natriurèse

Comme l'illustre la Figure 17, l'évolution temporelle de la natriurèse est similaire dans les deux souches de rats étudiées et se caractérise par une diminution très importante au cours des premières 24 h après l'I/R. La natriurèse correspond alors à 28 et 14% de sa valeur « contrôle », chez les rats WH et WF, respectivement. Cette réduction de la natriurèse, bien qu'atténuée, reste significative pendant les 3 jours suivants. Dès le jour 5 post-I/R, la natriurèse dans les deux souches est comparable à sa valeur « contrôle ».

B. La kaliurèse

L'évolution temporelle de la kaliurèse présente un profil semblable à celui décrit pour celle de la natriurèse. En effet, dans les deux souches, la kaliurèse est fortement diminuée dès les premières 24 h post-I/R. Chez les rats WH, elle est ainsi réduite de 3.662 ± 0.331 à 1.605 ± 0.267 mEq/24 h, ce qui représente environ 44% de la valeur « contrôle ». Cette variation aiguë est transitoire, étant donné que les valeurs de la kaliurèse augmentent ensuite progressivement et se stabilisent à partir du jour 5 post-I/R jusqu'au terme de la période d'observation. Notons toutefois que la kaliurèse reste alors inférieure à sa valeur « contrôle » d'environ 20%. Chez les rats WF, l'évolution temporelle de la kaliurèse est qualitativement similaire à celle des rats WH, mais sa réduction au cours de la phase aiguë est plus prononcée. Sa valeur au stade 24 h post-I/R équivaut ainsi à 0.796 ± 0.169 mEq/24 h, soit environ 22% de la valeur « contrôle ». Une différence significative apparaît ainsi entre les valeurs de la kaliurèse mesurée dans les deux souches ($P < 0.05$). Au-delà de 48 h post-I/R, les deux profils sont statistiquement comparables.

2.3. Bilan hydro-électrolytique

Pour rappel, la balance hydrique, sodique et potassique peut être illustrée par l'établissement en parallèle de profils temporels qui déterminent les apports de l'eau, du sodium et du potassium, ainsi que leur excrétion rénale. Le bilan, pour chacun de ces éléments, est quant à lui calculé par le rapport entre les apports et les pertes caractérisant la balance.

A. Bilan hydrique

Les parties A et B de la Figure 18 représentent la balance hydrique des rats WH (A) et des rats WF (B), avant et après l'I/R. De manière générale, ces deux graphiques démontrent que l'ingestion d'eau excède l'excrétion rénale. En effet, les volumes d'eau excrétés représentent en moyenne la moitié des apports quotidiens en conditions « contrôle », et ce, dans les deux souches. Une perturbation de la balance hydrique est observée au cours des 24 h qui suivent l'intervention chirurgicale qui permet de procéder à l'I/R. Elle se traduit par une réduction du volume ingéré. Par la suite, chez les rats WH, l'apport est rapidement rétabli à des valeurs sensiblement comparables à celles mesurées dans des conditions « contrôle ». En revanche, chez les rats WF, le comportement dipsique est modifié comme l'atteste une augmentation soutenue du volume d'eau ingéré pendant 5 jours environ. Au stade 7 jours post-I/R, il semble que la situation redevienne similaire aux conditions « contrôle ». Rappelons que, comme illustré à la Figure 16, le volume d'eau excrété augmente au cours de la phase post-ischémique, et ce de manière plus importante chez les rats WF.

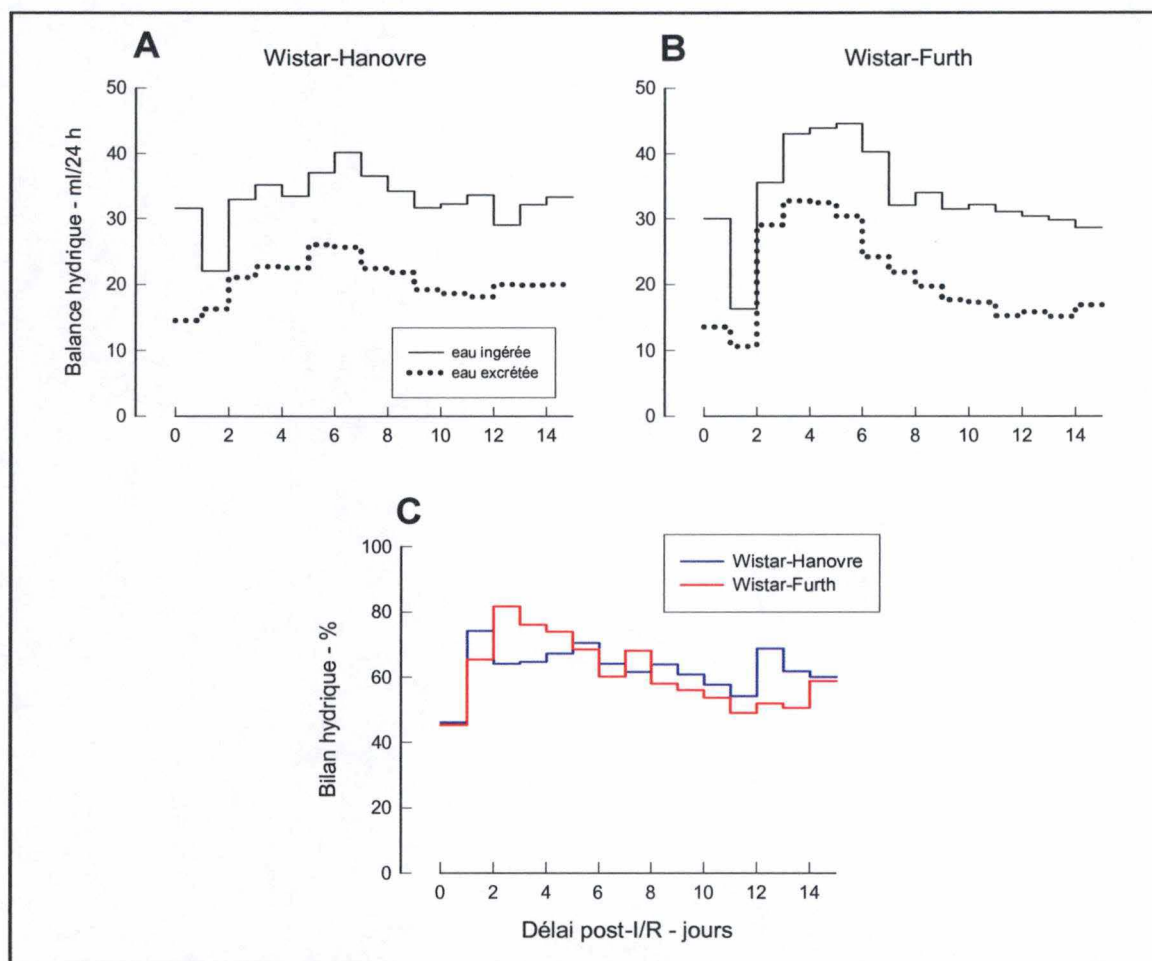


Figure 18. **A et B :** Balance hydrique (volume d'eau ingéré et excrété) chez les rats Wistar-Hanovre et Wistar-Furth.
C : Bilan hydrique (volume d'eau excrété / volume d'eau ingéré) chez les rats Wistar-Hanovre et Wistar-Furth.

Le bilan hydrique (Figure 18 C) indique qu'après l'I/R, le volume d'eau excrété est proportionnellement plus important que dans les conditions « contrôle », où il représente environ 45% du volume ingéré dans les deux souches de rats. Le volume excrété peut ainsi représenter de 70 à 80% du volume ingéré au cours de la phase aiguë post-ischémique. Chez les rats WF, le bilan hydrique semble être plus élevé pendant les 4 premiers jours. Il est à noter également que le bilan hydrique tend à rester supérieur à celui mesuré en conditions « contrôle » : il équivaut en effet en moyenne à 60% pour les deux souches étudiées au stade 14 jours post-I/R.

B. Bilan sodique

Les parties A et B de la Figure 19 représentent la balance sodique des rats WH (A) et des rats WF (B), avant et après l'I/R.

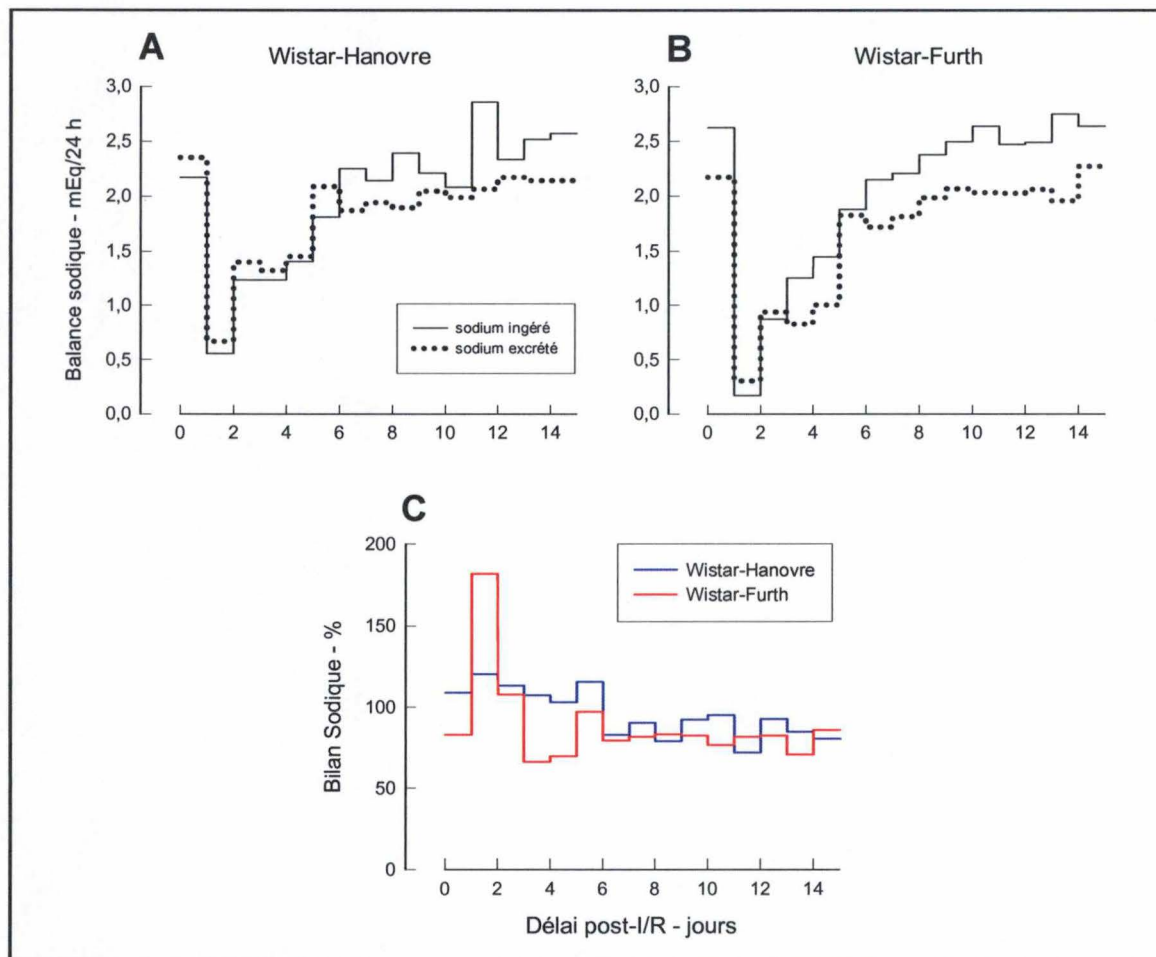


Figure 19. A et B : Balance sodique (charge de sodium ingérée et excrétée) chez les rats Wistar-Hanovre et Wistar-Furth.
 C : Bilan sodique (charge excrétée / charge ingérée) chez les rats Wistar-Hanovre et Wistar-Furth.

Au vu du profil temporel global de la balance sodique mesurée dans les deux souches de rats WH et WF (Figure 19 A et B), il apparaît que les charges ingérées et excrétées sont étroitement associées tout au long du protocole. La phase aiguë qui suit la procédure d'I/R est caractérisée par une réduction de la prise alimentaire, qui persiste pendant 5 à 6 jours et qui semble être plus marquée chez les rats WF. On observe en parallèle une diminution de la charge excrétée du sodium qui tend à se normaliser endéans 6 jours post-I/R. En terme de bilan sodique (Figure 19 C), cette corrélation étroite entre les quantités ingérées et excrétées se traduit par un bilan proche de 100% en conditions « contrôle », ce qui témoigne d'une intervention régulatoire majeure de la fonction rénale. Les rats WH maintiennent un bilan en équilibre au cours des 5 premiers jours post-I/R et tendent ensuite à présenter un bilan plus faible (~85%), qui pourrait refléter une rétention

de sodium. Quant aux rats WF, le bilan est positif au cours des 48 h qui suivent l'I/R mais se stabilise ensuite rapidement à des valeurs comparables à celle mesurée en conditions « contrôle ».

C. Bilan potassique

Les parties A et B de la Figure 20 représentent la balance potassique des rats WH (A) et des rats WF (B), avant et après l'I/R.

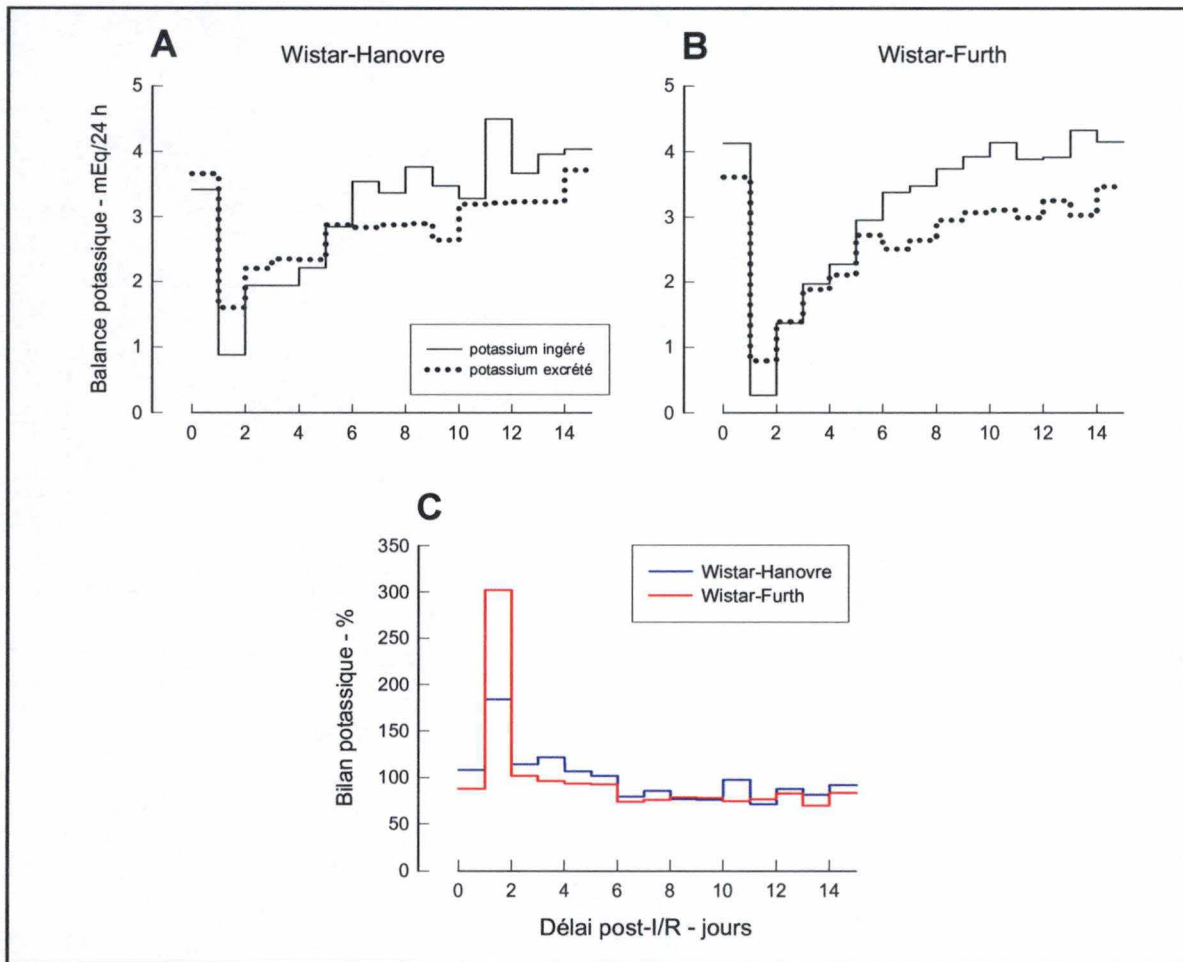


Figure 20. A et B : Balance potassique (charge de potassium ingérée et excrétée) chez les rats Wistar-Hanovre et Wistar-Furth.
 C : Bilan potassique (charge excrétée / charge ingérée) chez les rats Wistar-Hanovre et Wistar-Furth.

L'évolution temporelle de la charge ingérée de potassium présente un profil identique à celui illustré pour la charge ingérée de sodium étant donné qu'elles dépendent de l'apport alimentaire total. Les variations de la charge excrétée sont parallèles à celles de la charge ingérée, non seulement en conditions « contrôle », mais également au cours des 5 premiers jours qui suivent l'I/R. Ensuite, la charge excrétée tend à rester inférieure à la charge ingérée et ce, dans les deux souches de rats. En ce qui concerne le bilan (Figure 20 C), on note que la valeur « contrôle » est à nouveau proche de 100%, ce qui caractérise une

intervention majeure du rein dans la régulation de l'équilibre du potassium. Au cours des premières 24 h, ce bilan devient largement positif et représente 183% et 300% chez les rats WH et WF, respectivement. Sa valeur redevient très rapidement normale (endéans 24 h) et se maintient à ce niveau pendant 5 jours. Ensuite, les valeurs avoisinent 80 à 90% jusqu'au terme de la période d'observation.

3. Excrétion urinaire des métabolites du NO (NOx)

Afin d'évaluer le métabolisme du NO au cours des altérations morpho-fonctionnelles secondaires à une ischémie-reperfusion rénale, l'excrétion urinaire de ses métabolites a été calculée en déterminant leur concentration urinaire par un dosage colorimétrique.

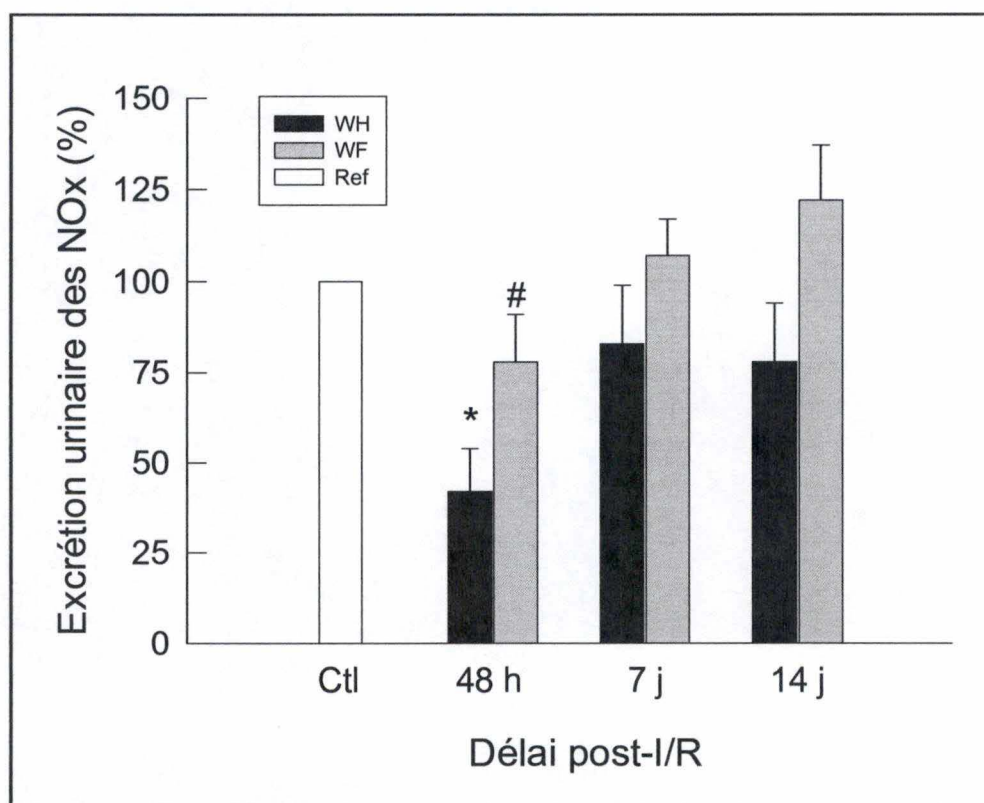


Figure 21. Excrétion urinaire des métabolites du NO (NOx) chez les rats WH et les rats WF, dans des conditions « contrôle », ainsi que 48 h, 7 j et 14 j après l'I/R. Statistiques : * $P < 0.05$ (versus Ctl), # $P < 0.05$ (WF versus WH) (two-way Anova + test de Newman-Keuls).

Ref: valeur de référence fixée à 100% pour les deux groupes (WH et WF), correspondant à la période « contrôle » pré-I/R.

La Figure 21 illustre l'excrétion urinaire des métabolites du NO aux stades 48 h, 7 et 14 j après l'I/R, dans les deux souches de rats étudiées. Les valeurs « contrôle » sont comparables dans les deux groupes et correspondent à 7.066 ± 0.581 et 6.432 ± 0.615 $\mu\text{mol}/24$ h chez les rats WH et WF, respectivement (NS). Ces valeurs ont été considérées

comme une référence, fixée à 100%, de manière à exprimer les variations de l'excrétion urinaire des NOx de manière relative au sein d'un même groupe expérimental.

L'analyse des résultats ainsi obtenus révèle que, chez les rats WH, l'excrétion urinaire des NOx diminue significativement 48 h après l'I/R et représente alors $44 \pm 12\%$ de la valeur « contrôle ». Une et deux semaines après l'I/R, l'excrétion urinaire des NOx reste légèrement inférieure à la valeur « contrôle » et représente respectivement 83 ± 16 et $78 \pm 16\%$ (NS versus valeur « contrôle »). Chez les rats WF, on observe également une réduction de l'excrétion urinaire des NOx 48 h après l'I/R ($78 \pm 13\%$), qui n'est toutefois pas statistiquement significative. Aux stades ultérieurs, ces valeurs peuvent être considérées comme étant similaires et représentent 107 ± 10 et $122 \pm 15 \%$ de la valeur « contrôle » (NS). Enfin, notons que l'analyse statistique des éventuelles différences intergroupes, par un test « two-way Anova », souligne qu'à 48 h post-I/R, l'excrétion urinaire des NOx est plus importante chez les rats WF.

4. Analyses histopathologiques des lésions tubulaires et interstitielles dans le tissu rénal post-ischémique

La planche « lésions histopathologiques » (voir page 39) illustre différentes zones du rein dans des conditions « contrôle », ainsi qu'à différents stades post-ischémiques. Chez les individus « contrôle », les signes de lésions rénales sont pratiquement indécélables. Seules de rares nécroses cellulaires focales, correspondant au turn-over physiologique de l'épithélium tubulaire (1 cellule par néphron et par jour en moyenne), sont observées. De même, l'interstitium ne présente que quelques rares amas de cellules interstitielles (a).

Chez les individus soumis à une ischémie, les premières lésions du tissu rénal apparaissent en phase aiguë, majoritairement dans l'OSOM avant de s'étendre dans le cortex et l'ISOM (Declèves et al., 2006). Ces lésions se caractérisent par des inclusions intracytoplasmiques ainsi que par une perte de la bordure en brosse des cellules tubulaires proximales. Ponctuellement, une mort cellulaire par nécrose ou par apoptose est déjà observée. Celle-ci se caractérise par une exfoliation des cellules dans les lumières tubulaires. Il est à noter que notre modèle expérimental n'entraîne aucune lésion glomérulaire apparente.

Après 48 heures, ces altérations, particulièrement sévères, s'amplifient et ce, quelle que soit la zone considérée. Les tubules nécrotiques deviennent alors très abondants (b). Ceux-ci présentent de nombreux débris cellulaires ainsi qu'une protéinurie (b). De nombreuses membranes basales sont dénudées suite à l'exfoliation des cellules épithéliales (b). A ce stade, les lésions peuvent être considérées comme maximales. En outre, les premiers signes de régénération apparaissent déjà de manière ponctuelle dans l'OSOM, principalement.

Au stade 7 jours, ce processus de régénération se poursuit dans l'OSOM et s'étend au cortex et à l'ISOM. Ce phénomène se caractérise par une ré-épithélialisation des membranes basales dénudées par des cellules aplaties d'aspect très indifférencié. Ces cellules prolifèrent abondamment, conduisant au développement de tubules hyperplasiques caractérisés par une haute densité de cellules cubiques (c). Cependant, des lésions peuvent encore persister. Ainsi, certains tubules proximaux présentent une lumière collapsée et une

membrane basale épaissie donnant alors naissance à des tubules atrophiés (**d**). Enfin, des tubules peuvent présenter un stade ultime d'altération et sont alors qualifiés de tubules kystiques. Ces derniers sont presque totalement dépourvus de cellules épithéliales (**d**). Ces lésions persistantes sont fréquemment entourées d'amas interstitiels inflammatoires riches en lymphocytes et macrophages.

A plus long terme, 14 jours post-I/R, le rein peut présenter des zones, plus ou moins étendues, où le processus de régénération a pris fin de telle sorte que la morphologie du tissu est similaire à celle d'individus « contrôle » (**e**). En outre, ces zones coexistent avec des zones dites « en remodelage » caractérisées par des tubules en régénération ou encore par des lésions chroniques, visibles sous l'aspect de tubules atrophiés et de tubules kystiques (**f**).

En ce qui concerne l'interstitium des animaux en IRA, il est caractérisé, dès les premières heures qui suivent l'ischémie, par des amas cellulaires essentiellement de type inflammatoire, localisés autour des structures tubulaires lésées ainsi que dans les régions péri-vasculaires. A plus long terme (7 et 14 jours), les cellules interstitielles persistent dans les zones en remodelage. Ces cellules correspondent d'une part à des cellules inflammatoires et d'autre part, à des cellules plus allongées probablement de nature fibroblastique.

Notons que, quel que soit le stade considéré, aucune différence significative n'a pu être observée dans l'IM, tant concernant les lésions tubulaires qu'interstitielles.

Enfin, l'évolution des lésions tubulaires et interstitielles au cours des différents stades envisagés semble être similaire pour les deux souches de rats étudiées.

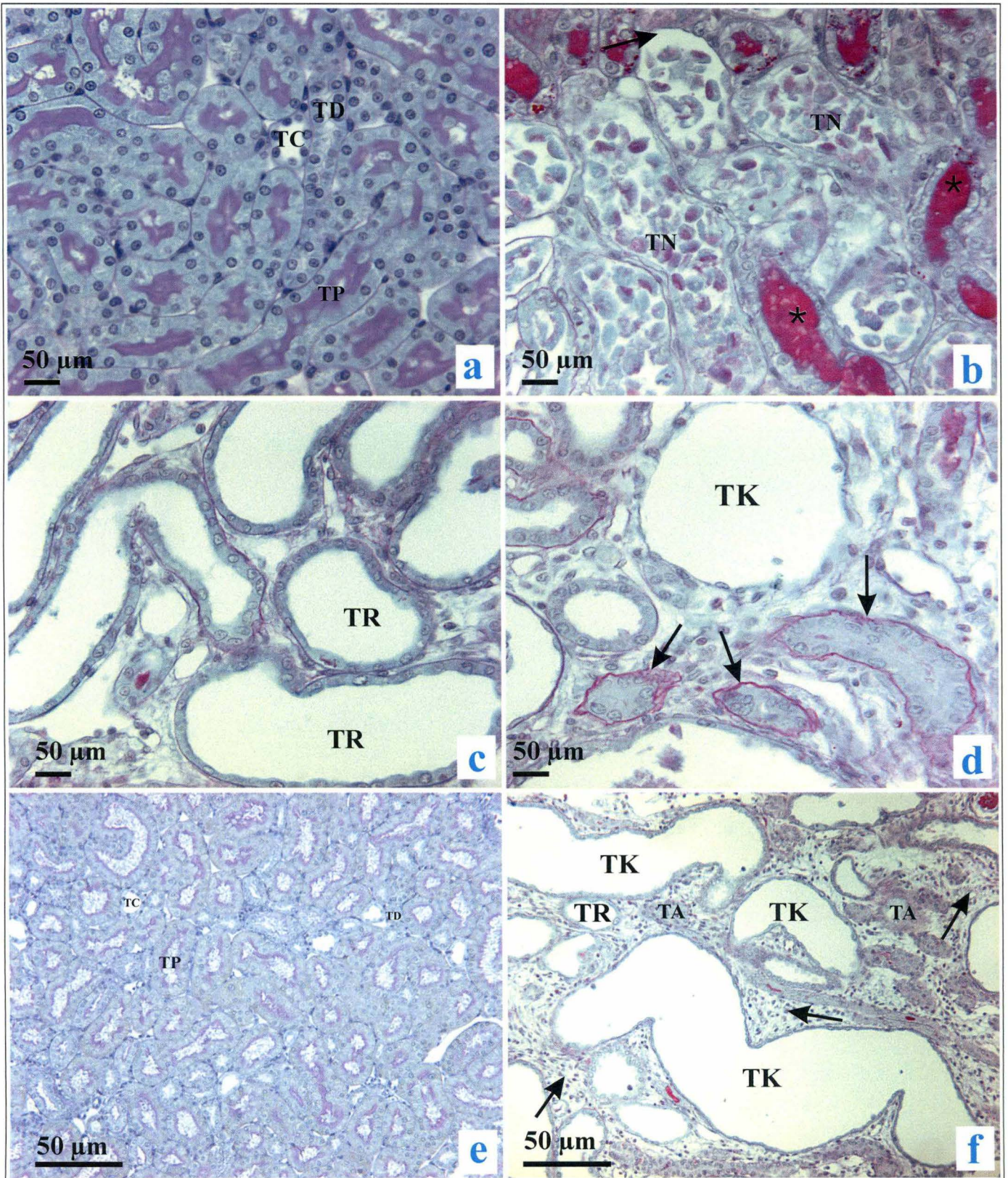


Planche. Lésions histopathologiques

- a. Morphologie standard de l'OSOM chez un animal Contrôle. Cette zone est principalement occupée par les segments droits des tubules proximaux (TP). TC : Tube collecteur ; TD : Tubule distal
- b. 48 h après I/R des nécroses cellulaires massives sont visibles dans les tubules proximaux de l'OSOM . Ces tubules nécrotiques (TN) se caractérisent par une membrane basale dénudée (→). La présence de matériel PAS positif (*) dans la lumière des tubules collecteurs traduit une protéinurie.
- c. Tubules en régénération (TR) dans l'OSOM 7 j après I/R. Ces tubules se caractérisent par un épithélium cubique indifférencié.
- d. Présence de tubules atrophiques caractérisés par un collapsus de la lumière et une membrane basale épaissie (→→). Un tubule kystique (TK) à lumière dilatée et bordé d'un épithélium pavimenteux est visible sur ce cliché pris dans l'OSOM 7 j après I/R. A cette période, cette zone du rein est le siège d'un grand nombre d'amas cellulaires interstitiels.
- e. Présence dans l'OSOM 14 j post-I/R de zones où le processus de régénération a pris fin de telle sorte que la morphologie du tissu est similaire à celle d'un individu contrôle.
- f. 14 j post-I/R dans l'OSOM, présence de zones de remodelage caractérisées par des tubules en régénération (TR) ou encore par des lésions chroniques, visibles sous l'aspect de tubules kystiques (TK) ainsi que de tubules atrophiques (TA). Ces lésions sont généralement accompagnées d'importants amas interstitiels (→→).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail nous ont permis de rencontrer les objectifs qui avaient été définis au sein du projet de recherche. L'analyse et la discussion de ces éléments, en relation avec les données de la littérature sont abordées ci-dessous, avant de citer les perspectives qui nous ont paru les plus pertinentes.

1. Evaluation fonctionnelle rénale post-ischémique chez les rats Wistar Hanovre

La perte de poids des animaux observée après l'intervention chirurgicale permettant de réaliser la procédure d'ischémie-reperfusion, est associée à la quantité de nourriture ingérée par les rats. En effet, au cours des premières 24 heures, les animaux ont réduit leur prise alimentaire de manière importante (jusqu'à 10 fois moins de nourriture qu'au préalable). Cette perte d'appétit persiste durant les 5 premiers jours après l'I/R et revient à des valeurs normales par la suite (± 20 g à 22 g par jour). Ce comportement modifie également les quantités de sodium et de potassium ingérées. L'apport hydrique est transitoirement réduit d'1/3 environ (24 h post-I/R), et est ensuite rapidement normalisé.

Les reins ischémiés, prélevés 48 heures, 7 et 14 jours après l'I/R, présentent une masse beaucoup plus élevée que celle du rein droit, prélevé au moment de la préparation chirurgicale. Cette augmentation est vraisemblablement liée au phénomène d'hypertrophie et d'hyperplasie compensatoire du rein résiduel (Brezis & Rosen, 1995 ; Fitzgibbon et al., 1999 ; Fleck, 1999). Par ailleurs, cet accroissement pondéral pourrait aussi être associé à l'apparition d'œdèmes tissulaires consécutive aux altérations tubulaires survenant après l'I/R (pour plus de détails, voir ci-dessous) (Paller, 1994 ; Thadhani et al., 1996 ; Declèves et al., 2006).

En ce qui concerne les aspects fonctionnels du rein, rappelons que la créatinine est un bon indicateur du débit de la filtration glomérulaire. Dans nos conditions expérimentales, les concentrations plasmatiques de créatinine sont significativement accrues 48 h après l'I/R, ce qui reflète une diminution de la fonction glomérulaire. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette réduction du débit de la filtration glomérulaire, telle qu'elle est observée dans diverses conditions d'insuffisance rénale aiguë (Thadhani et al., 1996 ; Fleck, 1999). L'une des causes potentielles serait l'apparition de nombreuses lésions et nécroses cellulaires tant au niveau tubulaire que glomérulaire. En particulier, les lésions induites par l'ischémie s'accompagnent de l'obstruction des lumières tubulaires, qui entraîne une augmentation de la pression intra-tubulaire et induit la réduction du processus de filtration (Basile et al., 2003 ; Declèves et al., 2006). Notre analyse histopathologique des lésions tubulaires et interstitielles confirme tout à fait cette hypothèse. Toutefois, en ce qui concerne plus précisément l'aspect structurel des glomérules, nous n'avons relevé aucune lésion apparente. La diminution du débit de la filtration glomérulaire pourrait également être attribuée à une vasoconstriction persistante au niveau des artéioles afférentes. En effet, une vasoconstriction causée, d'une part, par l'activation du rétro-contrôle tubuloglomérulaire et, d'autre part, par la libération d'une variété de substances vasoactives telles que l'endothéline ou l'angiotensine II, va engendrer une réduction du flux sanguin glomérulaire (Fleck, 1999 ; Jerkić et al., 2004 ; Schnermann & Briggs, 2008).

Au cours des épisodes d'IRA, les atteintes fonctionnelles peuvent concerner non seulement la filtration glomérulaire, mais aussi les processus de transport tubulaire. A cet égard, Kwon et coll. (2000) ont démontré que les lésions tubulaires, induites lors d'une I/R

bilatérale, conduisaient à une inhibition du transport tubulaire de sodium. Cette inhibition engendre une diminution de la réabsorption du sodium et augmente l'excrétion fractionnelle urinaire de Na^+ (Kwon et al, 2000 ; Paller, 1994). La réabsorption de sodium se produit principalement dans le tubule proximal via l'échangeur Na^+/H^+ et dans l'anse de Henlé via la pompe Na^+/K^+ -ATPase (Wang et al., 1998). Il a été démontré qu'une déplétion en ATP au niveau tubulaire provoquait une redistribution de la Na^+/K^+ -ATPase ainsi qu'une inhibition de l'activité de certains transporteurs tubulaires accompagnée d'une diminution de leur expression. La redistribution de la Na^+/K^+ -ATPase va engendrer une accumulation intracellulaire de sodium, qui induit un excès d'eau intracellulaire résultant en un gonflement cellulaire (œdème). Ce gonflement des cellules épithéliales contribue au développement d'une obstruction tubulaire qui va, ensuite, mener à une nécrose tubulaire (Paller, 1994 ; Kwon et al, 2000). De manière similaire, la diminution de l'excrétion urinaire du potassium est due, en partie, à la réduction de la charge filtrée des ions potassium. Simultanément, on observe des changements de l'expression de certains canaux potassiques exprimés dans l'épithélium tubulaire au niveau du cortex et de la médullaire externe, 48h après l'I/R (Rabb et al., 2000). Rappelons que, comme pour le sodium, l'ingestion alimentaire du potassium est réduite au cours de la phase aiguë post-I/R.

L'excrétion urinaire de l'eau, quant à elle, dépend notamment de la balance entre le débit de la filtration glomérulaire et le taux de réabsorption le long des tubules rénaux (Fernández-Llama et al., 1999). Dans ce contexte, Kwon et coll. (1999) ont démontré, dans un modèle d'ischémie-reperfusion bilatérale, une réduction de l'expression des aquaporines (AQPs) exprimées dans le tube collecteur et le tubule proximal. Ces aquaporines ont pour fonction de stimuler la réabsorption d'eau en permettant son transport depuis la lumière tubulaire vers l'interstitium et les capillaires sanguins, par modification de la perméabilité de l'épithélium. Une diminution de l'expression des AQPs va donc entraîner une augmentation de l'excrétion urinaire de l'eau. L'effet diurétique que nous observons dans nos conditions expérimentales pourrait ainsi être une résultante d'une diminution du débit de la filtration glomérulaire associée à la réduction de la réabsorption tubulaire de l'eau, peut-être sous l'influence d'une production accrue d'endothéline (Clavell & Burnett, 1994). Un autre facteur est également capable d'influencer l'excrétion urinaire de l'eau. En effet, Basile et coll. (2001), dans un modèle d'ischémie bilatérale, ont mis en évidence une altération de la tonicité médullaire ainsi qu'une réduction du nombre de microvaisseaux dans certaines zones du rein, la zone la plus touchée étant l'ISOM. Cette diminution de la densité microvasculaire accentue le phénomène d'hypoxie rénale et va provoquer des altérations au niveau de la capacité de concentration urinaire. La réduction de la perfusion sanguine pourrait expliquer la diminution de la tonicité médullaire, soit par une diminution de l'activité des pompes à sodium, soit en perturbant les échanges par contre-courant qui se produisent entre les vasa recta et le tube collecteur de la médullaire interne (Fernández-Llama, 1999 ; Kwon et al, 1999 ; Basile et al, 2001). De plus, une diminution de l'osmolarité interstitielle pourrait aussi être due à une diminution de la concentration en solutés.

Aux alentours du 7^{ème} jour après l'ischémie, les valeurs de la créatininémie, de l'excrétion urinaire de sodium et de potassium ainsi que les valeurs de la diurèse et de l'osmolarité tendent à revenir vers leurs valeurs basales. Tous ces résultats semblent correspondre à une récupération de la fonction rénale. Plusieurs études ont, en effet, détecté un processus de régénération et de prolifération cellulaires au niveau des différents tubules rénaux, à cette même période (Nony & Schnellmann, 2003 ; Declèves et al., 2006).

2. Implications du NO sur les adaptations fonctionnelles post-ischémiques

L'analyse de l'excrétion urinaire des métabolites du NO (NOx) a permis de mettre en évidence une différence significative entre le profil évolutif chez les rats WH et les rats WF, 48 h après l'I/R. En effet, à ce stade, l'excrétion urinaire de NO est significativement diminuée chez les rats WH, alors que cette variation est moins prononcée chez les rats WF. Il pourrait s'agir d'un mécanisme de maintien d'une production de NO, comme cela a été démontré chez ces animaux, en cas de développement d'une insuffisance rénale chronique (Erdely et al., 2003, 2004). Cette propriété, si elle est avérée, pourrait être mise en relation avec les différences fonctionnelles post-ischémiques que nous avons observées entre les deux souches de rats WH et WF.

A cet égard, l'analyse des données obtenues chez les animaux WF en cage métabolique indique que la diurèse post-ischémique au stade 48 h post-I/R augmente de 30% par rapport à celle des rats WH. Cette accentuation de la diurèse se poursuit au cours des 5 premiers jours post-I/R puis revient à des valeurs similaires à celles qui caractérisent les rats WH. Cet effet pourrait être attribué aux propriétés diurétiques du NO (Ortiz & Garvin., 2002). Il a notamment été démontré, en cas de traitement de rats ischémiés à l'aide d' α -MSH, un inhibiteur des voies inflammatoires et du NO, que la réponse diurétique était atténuée via un effet impliquant la vasopressine. En conditions physiologiques, la vasopressine, libérée par la neurohypophyse, a pour caractéristique fonctionnelle de stimuler la réabsorption d'eau au niveau des tubes collecteurs en agissant sur les aquaporines, ce qui va donc entraîner une diminution du volume urinaire. La vasopressine va être inhibée par le NO, ce qui va induire une diminution de l'activité des aquaporines et par conséquent, une augmentation de la diurèse (Kwon et al., 1999). Nos résultats, indiquant une augmentation de la diurèse chez les WF, sont donc en concordance avec les observations rapportées dans cette étude. Par ailleurs, le même groupe a également démontré qu'outre son effet diurétique, le NO pouvait jouer un rôle dans la réabsorption tubulaire du sodium (Kwon et al., 2000). En effet, une inhibition de NO chez le rat ischémié via l'action d' α -MSH, réduit l'abondance des transporteurs de sodium, ce qui engendre une augmentation de son excrétion urinaire. Cette diminution de la réabsorption du sodium est très probablement causée par une diminution de l'activité du transporteur Na^+/H^+ au pôle apical ainsi qu'une diminution conjointe de l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase (Ortiz & Garvin., 2002). Cela signifie que le NO induit une diminution de l'excrétion du sodium dans les urines. Dans notre étude, une diminution plus importante de la natriurèse est perçue chez les WF, 48 h après l'I/R. Celle-ci pourrait être due, tout au moins en partie, au maintien d'une production de NO, sur base de l'étude menée par Kwon et coll. (2000).

De manière similaire à la natriurèse, la kaliurèse diminue de manière plus importante chez les rats WF que chez les rats WH. Ces résultats pourraient suggérer que parallèlement à une diminution de la charge filtrée, il y ait une inhibition de la sécrétion de potassium. A cet égard, certaines études démontrent que le NO augmente l'activité des canaux potassiques dans le tube collecteur, via une augmentation de la production de GMPc (Lu et al, 1996). Cependant, le NO combiné au superoxyde en cas de stress oxydatif, forme le peroxynitrite (OONO-) qui va exercer un effet inverse et bloquer ces canaux potassiques (Lu & Wang, 1998). De plus, la sécrétion de K^+ dans le tube collecteur se produit parallèlement à la réabsorption de sodium (Na^+/K^+). Par conséquent, lorsque la réabsorption du sodium est inhibée, la sécrétion du potassium est moins efficace. Il est donc particulièrement difficile d'identifier les mécanismes qui gèrent l'excrétion urinaire

du potassium étant donné qu'il peut subir simultanément des processus d'absorption et de sécrétion d'ampleur variable. Seuls des études de microponction permettraient vraisemblablement d'éclaircir ces aspects particuliers de la régulation du bilan potassique.

Erdely et coll. (2003, 2004) ont démontré qu'une production maintenue de NO chez les rats WF était à l'origine de leur résistance à l'IRC. Ces auteurs ont notamment établi qu'une inhibition des NO synthases chez les rats WF par un traitement à l'aide de L-NAME engendre une diminution de leur capacité de résistance à l'IRC (Erdely et al., 2003 ; 2006). Une telle observation semble indiquer que le maintien du taux suffisant de NO est le facteur principal dans cette protection contre l'IRC, connue pour être habituellement associée à une déficience en NO (Baylis, 2008). De plus, d'un point de vue histologique, cette étude souligne que les rats WF présentent une atteinte glomérulaire réduite par rapport à celle observée chez les Sprague-Dawley (Erdely et al., 2003). Cette caractéristique semblerait avoir des répercussions sur la pression sanguine ainsi que sur le débit de filtration glomérulaire, qui sont effectivement moins altérés chez les rats SD. Notons cependant que, dans notre modèle, aucune différence n'a été observée entre les deux souches, en ce qui concerne les structures glomérulaires et les lésions tissulaires post-ischémiques.

Par ailleurs, il est également possible que le maintien d'une production de NO chez les rats WF puisse influencer le débit de filtration glomérulaire de par ses propriétés vasodilatatrices. En effet, le NO et l'endothéline (ET-1) sont de puissants médiateurs vasoactifs impliqués dans la régulation intégrée du tonus vasculaire et de la pression sanguine (Freedman et al., 2000). Ces deux facteurs ont la particularité d'interagir en tant qu'antagonistes fonctionnels. Il a effectivement été démontré que le NO inhibe la surproduction d'endothéline, induite après une ischémie chez le rat (Kurata et al., 2005).

3. Caractérisation morphologique du modèle expérimental

Le modèle d'I/R rénale avec néphrectomie contralatérale induit des lésions tubulaires, vasculaires ainsi qu'une infiltration de cellules inflammatoires conduisant à une insuffisance rénale aiguë. Des études faites préalablement au sein de notre laboratoire, ont révélé une apparition précoce de lésions tubulaires déjà 2 h après l'I/R. Cependant, ces lésions s'amplifient atteignant leur maximum à 48 heures (Declèves et al., 2006), et ce, dans les quatre zones du rein. Au cours de ce travail, nous avons également observé ces lésions sévères 48 heures après ischémie.

Le type de lésions évolue au cours du temps ; celles-ci se caractérisent tout d'abord par la perte de la bordure en brosse des cellules tubulaires proximales. On note également la présence d'inclusions intracytoplasmiques et de dégénérescence hydrotopique qui entraînent la mort des cellules épithéliales par nécrose ou par apoptose. Il s'ensuit alors une exfoliation des cellules dans les lumières tubulaires (Thadhani et al., 1996).

Ces lésions tissulaires vont donc être l'une des causes du dysfonctionnement de la fonction rénale. La distribution des dommages tubulaires semble être déterminée par le gradient d'oxygène intrarénal. Ainsi, comme le confirment nos résultats, l'OSOM est la cible majeure d'une atteinte ischémique (Brezis & Rosen, 1995 ; Persy et al., 2003). En effet, la médullaire externe est la zone la plus dépourvue en oxygène dans des conditions physiologiques, étant donné la disposition particulière des vasa recta permettant d'optimiser le mécanisme de concentration des urines, ainsi que l'importante quantité

d'oxygène utilisée pour assurer la réabsorption de sodium. Ainsi, une atteinte ischémique ne fait qu'exacerber encore davantage cette hypoxie et contribue donc à amplifier les lésions dans cette zone (Brezis & Rosen, 1995). Parallèlement aux lésions tubulaires, des lésions interstitielles ont été observées au cours de notre étude et se caractérisent par l'infiltration de cellules qui pourraient être composées de cellules inflammatoires telles que des polynucléaires ou des macrophages (Matthys et al., 1983). Comme pour les lésions tubulaires, l'augmentation de la densité des cellules interstitielles est détectée dans un premier temps dans l'OSOM, 12 heures après I/R (Declèves et al., 2006). Comme nous avons pu également le constater, cette infiltration s'accroît avec le temps et s'étend en outre aux autres zones adjacentes que sont le cortex et l'ISOM. Notons que ces cellules se localisent préférentiellement autour des tubules altérés. Les premiers signes de régénération tubulaire, caractérisés par la ré-épithélialisation des membranes basales, apparaissent dès 48 h et s'amplifient encore jusqu'à 7 jours. Les tubules proximaux présentent en effet la capacité de se régénérer après une atteinte ischémique. Des cytokines issues du tissu rénal, des cellules épithéliales et mésenchymateuses ou des cellules infiltrantes (Bonventre & Weinberg, 2003) peuvent jouer un rôle déterminant dans l'initiation de la réponse réparatrice par les cellules épithéliales. Ces cytokines génèrent des signaux qui résultent en une infiltration de neutrophiles et de monocytes dans le tissu rénal. Ceux-ci vont alors produire des facteurs de croissance (Verstrepen et al., 1993 ; Humes, 1993) qui sont des médiateurs majeurs intervenant dans la prolifération des cellules épithéliales tubulaires (Ysebaert et al., 2003). Parmi les cellules en prolifération, certaines d'entre elles pourraient également dériver des cellules tubulaires proximales matures. Ces nouvelles cellules possèdent une bordure en brosse faiblement marquée et expriment la vimentine, un marqueur embryonnaire exprimé dans les cellules rénales pluripotentes mésenchymateuses. Outre la vimentine, d'autres protéines exprimées abondamment dans les cellules rénales en développement mais pratiquement pas dans les cellules rénales adultes, interviennent également dans le processus de réparation du rein post-ischémique. Il est donc possible que les cellules tubulaires proximales viables gardent la capacité de se différencier et de proliférer (Bonventre & Weinberg, 2003).

A ce stade (7 jours post-I/R), il n'est cependant pas rare d'observer des tubules dont la régénération est incomplète. Ces tubules finissent par s'atrophier ou, au contraire, se dilater. Ces derniers évoluent vers un phénotype kystique. A plus long terme (14 jours post-I/R), ce type de lésions peut persister en présence d'une forte densité de cellules interstitielles, de nature inflammatoire ou fibroblastique, précédant le développement d'un processus cicatriciel se traduisant par le développement d'une fibrose tubulo-interstitielle.

A ce stade de notre étude, nous ne pouvons rien conclure quant à une éventuelle protection des rats WF dans un modèle d'I/R avec néphrectomie unilatérale. En effet, en évaluant les lésions histologiques, aucune différence majeure n'a pu être mise en évidence. Un nombre d'animaux plus important se doit d'être expérimenté en vue de mettre en exergue une intervention possible du NO dans l'évolution des lésions tubulaires et de la prolifération cellulaire. Néanmoins, cette approche analytique est considérée comme qualitative et non quantitative. Il sera donc nécessaire d'effectuer des analyses quantitatives plus précises et ciblées afin de déceler d'éventuelles différences entre ces deux souches.

Perspectives

L'objectif de mon mémoire était de participer à un projet de recherche qui s'intéresse aux mécanismes physiopathologiques de l'IRA consécutive à une ischémie/reperfusion et plus particulièrement à l'implication du stress oxydatif et nitrosatif dans ces mécanismes (thèse de doctorat en cours).

Dans ce contexte, notre approche expérimentale s'est portée sur la comparaison de deux souches de rat, les rats Wistar-Hanovre, classiquement utilisés en expérimentation animale, et les rats Wistar-Furth, qui présentent une résistance au développement d'une IRC grâce au maintien d'une production intrarénale de NO (Erdely et al. 2003).

La première étape de ce travail a consisté à mettre en oeuvre le modèle d'I/R rénale chez ces deux souches de rats. Ensuite, l'étude consacrée à la caractérisation de la fonction rénale post-ischémique a pu être réalisée. Nous avons également déterminé l'excrétion urinaire des métabolites du NO et caractérisé les lésions tissulaires au moyen d'une analyse histologique.

Toutes ces expériences, bien que préliminaires, nous permettent de tirer différentes conclusions. En effet, nos résultats montrent des divergences au niveau des adaptations de la fonction rénale entre les rats WH et les rats WF. Ces derniers présentent une diurèse post-ischémique plus élevée et des bilans sodiques et potassiques qui se normalisent plus rapidement, ce qui pourrait traduire par une meilleure adaptation fonctionnelle du rein post-ischémique. Ces résultats pourraient être mis en relation avec une excrétion urinaire des métabolites du NO qui tend à être moins déprimée, ce qui pourrait constituer le signe d'un métabolisme du NO plus performant en cas d'atteinte rénale. Bien qu'aucune différence significative n'ait pu être mise en évidence en ce qui concerne les lésions tissulaires post-ischémiques, tous ces résultats sont encourageants et ouvrent la voie à de nombreuses perspectives.

Tout d'abord, les analyses qualitatives et/ou quantitatives, par immunohistochimie ou Western blotting, permettant la mise en évidence des différentes isoformes de NOS dans les reins post-ischémiques, devront être effectuées afin de pouvoir localiser ces protéines de manière plus précise dans le parenchyme rénal et de quantifier leur expression protéique. Cette approche pourra être complétée par l'évolution post-ischémique de leur expression génique via la technique de RT-PCR en temps réel. Ces différents résultats amèneront des compléments d'information quant à l'origine de la production de NO plus élevée chez les rats WF après l'ischémie.

Ensuite, une analyse morphologique et comparative plus précise du parenchyme rénal post-ischémique chez les rats WH ainsi que les rats WF aura pour objectif de déterminer l'évolution des lésions, de l'inflammation et de la régénération tissulaires. A ce stade, l'analyse qualitative des lésions tissulaires ne montre aucune différence entre les deux souches étudiées, néanmoins des mesures quantitatives plus précises des dysfonctionnements post-ischémiques devront être mises en oeuvre, grâce au dosage de biomarqueurs urinaires spécifiques.

Dans une seconde étape, étant donné l'affinité du NO pour les ROS, une évaluation du stress oxydatif et nitrosatif après ischémie sera nécessaire afin d'évaluer son impact sur la biodisponibilité du NO, ainsi que sa participation à la cinétique des événements post-ischémiques (Evans & Fitzgerald, 2005). Il sera en effet possible, sur base des échantillons biologiques récoltés au cours de ce mémoire (tissus et urines), de mesurer par diverses techniques analytiques, l'étendue des altérations moléculaires et cellulaires induites par la présence des ROS.

D'un point de vue fonctionnel, des approches pharmacologiques *in vivo*, ciblant différents facteurs régulateurs paracrines susceptibles d'interférer avec le NO (tels que ET-1 et Ang II), pourraient amener des compléments de réponse quant aux schémas de régulation intégrés de la fonction rénale en conditions post-ischémiques. En outre, ce type d'analyse pourrait également permettre de mieux identifier l'origine potentielle du maintien de la production du NO, telle que nous l'avons observé.

Enfin, étant donné que le NO a été identifié comme l'un des médiateurs de l'apoptose en cas d'I/R dans le rein ainsi que dans d'autres organes (Du et al., 2006), il serait également particulièrement intéressant de déterminer la proportion de mort cellulaire par apoptose versus nécrose, dans notre modèle expérimental chez les rats WH et WF. Une influence bénéfique du NO dans ce type de processus pourrait contribuer à son éventuel effet protecteur chez les rats WF.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMS, D.H., SHAW, S. Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *Lancet* 343: 831-836, 1994.

BACHMANN, S., BOSSE, H.M., MUNDEL, P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 268, F885-F898, 1995.

BAINES, A., HO, P. Glucose stimulates O₂ consumption, NOS, and Na/H exchange in diabetic rat proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: 286-293, 2002.

BASILE, D.P., DONOHOE, D., ROETHE, K., OSBORN, J.L. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol* 28(5): F887-99, 2001.

BASILE D.P., DONOHOE D.L., ROETHE K., MATTSON D.L. Chronic renal hypoxia after acute ischemic injury: effects of L-arginine on hypoxia and secondary damage. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(2): F338-48, 2003.

BAYLIS, C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 294(1): 1-9, 2008.

BECKMAN J.S., KOPPENOL W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1): 1424-1437, 1996.

BERRY, C., BROSNAN, J., M., FENNELL, JEROME; HAMILTON, CARLENE A., DOMINICZAK, ANNA F. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension* 10(2): 247-255, 2001.

BONVENTRE, J.V., WEINBERG, J.M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephro* 14(8): 2199-2210, 2003.

BONVENTRE, J.V., ZUK, A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? : *Kidney Int* 66(2): 480-485, 2004.

BREZIS, M., S. ROSEN P. SILVA, F.H. EPSTEIN. Selective vulnerability of the medullary thick ascending limb to anoxia in the isolated perfused rat kidney. *J. Clin. Invest* 73: 182-190, 1984.

BREZIS, M., ROSEN, S. Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *N. Engl. J. Med* 9; 332(10): 647-55, 1995.

CLAVELL A.L., BURNETT J.C JR. Physiologic and pathophysiologic roles of endothelin in the kidney. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 3(1):66-72, 1994.

DE GREEF, K.E., D.K. YSEBAERT, M. GHIELLI, S. VERCAUTEREN, E.J. NOUWEN, E.J. EYSKENS, M.E. DE BROE. Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury. *J. Nephrol* 11: 1210-1223, 1998.

DE GREEF, K.E., D.K. YSEBAERT, V. PERSY, S.R. VERCAUTEREN, M.E. DEBROE. ICAM-1. Expression and leukocyte accumulation in inner stripe of outer medulla in early phase of ischemic compared to HgCl₂-induced ARF. *Kidney Int.* 63: 1697-1707, 2003.

DECLEVES, A.E., N. CARON, D. NONCLERQ, A. LEGRAND, G. TOUBEAU, R. KRAMP, B. FLAMION. Dynamics of hyaluronan, CD44 and inflammatory cells in the rat kidney after ischemia/reperfusion injury. *Int. J. Mol. Med* 18: 83-94, 2006.

DEVARAJAN, P. Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis. *Curr Opin Pediatr* 17(2):193-199, 2005.

DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 17(6): 1503-1520, 2006.

DOBASHI, K., GHOSH, B., ORAK, J.K., SINGH, I., SINGH, A.K. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem* 205(1-2): 1-11, 2000.

DU C., GUAN Q., DIAO H., YIN Z., JEVIKAR A.M. Nitric oxide induces apoptosis in renal tubular epithelial cells through activation of caspase-8. *Am J Physiol Renal Physiol* 290(5): F1044-54, 2006.

DUSSAULE, J.C., CHATZIANTONIOU, C. Role of nitric oxide in the regulation of arterial pressure and renal function. *Presse Med* 23; 25(36): 1789-1793, 1996.

ERDELY, A., FRESHOUR, G., SMITH, C., ENGELS, K., OLSON, J.L., BAYLIS, C. Protection against puromycin aminonucleoside-induced chronic renal disease in the Wistar-Furth rat. *Am. J. Physiol* 287: 81-89, 2004.

ERDELY, A., WAGNER, L., MULLER, V., SZABO, A., BAYLIS, C. Protection of Wistar-Furth rats from chronic renal disease is associated with maintained renal nitric oxide synthase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 : 2526-2533, 2003.

ERDELY A., FRESHOUR G., BAYLIS C. Resistance to renal damage by chronic nitric oxide synthase inhibition in the Wistar-Furth rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(1):R66-72, 2006.

EVANS R.G., FITZGERALD S.M. Nitric oxide and superoxide in the renal medulla: a delicate balancing act. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14(1): 9-15, 2005.

FERNÁNDEZ-LLAMA P., ANDREWS P., TURNER R., SAGGI S., DIMARI J., KWON T.H., NIELSEN S., SAFIRSTEIN R., KNEPPER M.A. Decreased abundance of collecting duct aquaporins in post-ischemic renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol* 10(8): 1658-68, 1999.

FITZGIBBON, W.R., GREENE, E.L., GREWAL, J.S., HUTCHISON, F.N., SELF, S.E., LATTEN, S.Y., ULLIAN, M.E. Resistance to remnant nephropathy in the Wistar-Furth rat. *J Am Soc Nephrol* 10(4): 814-21, 1999.

FLECK, C. Determination of the glomerular filtration rate (GFR): methodological problems, age-dependence, consequences of various surgical interventions, and the influence of different drugs and toxic substances. *Physiol Res* 48(4): 267-79, 1999.

FREEDMAN B.I., YU H., ANDERSON P.J., ROH B.H., RICH S.S., BOWDEN D.W. Genetic analysis of nitric oxide and endothelin in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 15(11): 1794-800, 2000.

GOLIGORSKY, M.S., BRODSKY, S.V., NOIRI, E. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney Int* 61(3): 855-861, 2002.

GRISHAM, M.B., JOURD'HEUIL, D., WINK, D.A. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 276(2 Pt 1): 315-321, 1999.

GUYTON, A.C., J.E. HALL. Medical Physiology. Saunders Elsevier 1vol: 11th ed., 2005.

HERRERA, M., GARVIN, J.L. Recent advances in the regulation of nitric oxide in the kidney. *Hypertension* 45(6): 1062-1067, 2005.

HUMES HD. Potential molecular therapy for acute renal failure. *Cleve Clin. J. Med* 60(2): 166-168. Review, 1993.

JERKIĆ M., MILORADOVIĆ Z, JOVOVIĆ D, MIHAILOVIĆ-STANOJEVIĆ N, ELENA JV, NASTIĆ-MIRIĆ D, GRUJIĆ-ADANJA G, RODRÍGUEZ-BARBERO A, MARKOVIĆ-LIPKOVSKI J, VOJVODIĆ SB, MANERO MV, PRIETO MP, LÓPEZ-NOVOA JM. Relative roles of endothelin-1 and angiotensin II in experimental post-ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 19(1): 83-94, 2004.

KELLY, K.J., B.A. MOLITORIS. Acute renal failure in the new millenium: time to consider combination therapy. *Sem. Nephrol* 20: 4-19, 2000.

KIM, S., IWAO, H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52(1): 11-34, 2000.

KOSAKA, H., YONEYAMA, H., ZHANG, L., FUJII, S., YAMAMOTO, A., IGARASHI, J. Induction of LOX-1 and iNOS expressions by ischemia-reperfusion of rat kidney and the opposing effect of L-arginine. *FASEB J* 17(6): 636-643, 2003.

KURATA H., TAKAOKA M., KUBO Y., KATAYAMA T., TSUTSUI H., TAKAYAMA J., OHKITA M., MATSUMURA Y. Protective effect of nitric oxide on ischemia/reperfusion-induced renal injury and endothelin-1 overproduction. *Eur J Pharmacol* 11;517(3): 232-239, 2005.

KWON T.H., FRØKIAER J., FERNÁNDEZ-LLAMA P., KNEPPER M.A., NIELSEN S. Reduced abundance of aquaporins in rats with bilateral ischemia-induced acute renal failure: prevention by alpha-MSH. *Am. J. Physiol* 277(3 Pt 2): 413-427, 1999.

KWON T.H., FRØKIAER J., HAN J.S., KNEPPER M.A., NIELSEN S. Decreased abundance of major Na⁽⁺⁾ transporters in kidneys of rats with ischemia-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(6): 925-939, 2000.

LOSSER, M.R. On what mechanism of renal aggression is it possible to intervene? *Ann Fr Anesth Reanim* 24(2): 140-147, 2005.

- LU M., ZHU Y., BALAZY M., REDDY K.M., FALCK J.R., WANG W. Effect of angiotensin II on the apical K⁺ channel in the thick ascending limb of the rat kidney. *J Gen Physiol* 108(6): 537-547, 1996.
- LU M., WANG W.H. Reaction of nitric oxide with superoxide inhibits basolateral K⁺ channels in the rat CCD. *Am J Physiol* 275: 309-316, 1998.
- MATTHYS E., PATTON M.K., OSGOOD R.W., Venkatachalam M.A., Stein J.H. Alterations in vascular function and morphology in acute ischemic renal failure. *Kidney Int* 23(5): 717-724, 1983.
- MCCORD, J.M., ROY, R.S., SCHAFFER, S.W. Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Adv Myocardiol* 5: 183-189, 1985.
- MOLITORIS, B.A., R. DAHL, A. GEERDES. Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal NA⁺-K⁺-ATPase during ischemia. *Am. J. Physiol* 263: 488-495, 1992.
- MOUNT, P.F., POWER, D.A. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol (Oxf)* 187(4): 433-446, 2006.
- NATH, K.A., S.M. NORBY. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am. J. Med* 109: 665-678, 2000.
- NAVAR, L.G., INSCHO, E.W., MAJID, D.S.A., IMIG, J.D., HARRISSON-BERNARD, L.M., MITCHELL, K.D. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol. Rev* 76: 425-536, 1996.
- NONY P.A., SCHNELLMANN R.G. Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure. *J Pharmacol Exp Ther* 304(3): 905-912, Review, 2003.
- ORTIZ, P.A., GARVIN, J.L. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am. J. Physiol* 282: 777-784, 2002.
- PALLER, M.S. The cell biology of reperfusion injury in the kidney. *J Investig Med* 42(4): 632-639, 1994.
- PATZAK, A., PERSSON, A.E. Angiotensin II-nitric oxide interaction in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16(1): 46-51, 2007.
- PERSY V.P., VERHULST A., YSEBAERT D.K., DE GREEF K.E., DE BROE M.E. Reduced postischemic macrophage infiltration and interstitial fibrosis in osteopontin knockout mice. *Kidney Int* 63(2): 543-53, 2003.
- PLATO, C., SHESELY, E. & GARVIN, J.L. eNOS mediates L-arginine-induced inhibition of thick ascending limb chloride flux. *Hypertension* 35: 319-323, 2000.

PLOTNIKOV, E.Y., KAZACHENKO, A.V., VYSSOKIKH, M.Y., VASILEVA, A.K., TCVIRKUN, D.V., ISAEV, N.K., KIRPATOVSKEY, V.I., ZOROV, D.B. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney. *Kidney Int* 72(12): 1493-1502, 2007.

RABB, H., Y.M. O'MEARA, P. MADERNA, P. COLEMAN, H.R. BRADY. Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 51: 1463-1468, 1997.

RABB H., WANG Z., POSTLER G., SOLEIMANI M. Possible molecular basis for changes in potassium handling in acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 35(5): 871-7, 2000.

RONCO P., ROSSERT J., TERZI F., FRIEDLANDER G. Progression of chronic renal insufficiency *Rev. Prat* 48(3):241-247, 1998.

RUEGG, C.E., L.J. MANDEL. Bulk isolation of renal PCT and PST II. Differential responses to anoxia or hypoxia. *Am. J. Physiol* 259: 176-185, 1990.

SCHNERMANN, J., BRIGGS, J.P. Tubuloglomerular feedback: mechanistic insights from gene-manipulated mice. *Kidney Int* 74(4): 418-26, 2008.

SENNEQUIER, N., VADON-LE GOFF, S. Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *Médecine/Science* 14: 1185-95, 1998.

SILVERTHORN D.U., Human Physiology: An integrated approach. *Pearson Education* 4th ed, 2007.

STUEHR, D.J. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J Nutr* 134(10 Suppl): 2748S-2751S, 2004.

STUEHR, D.J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 339-359, 1997.

TAKADA, M., K.C. NADEAU, G.D. SHAW, K.A. MARQUETTE, N.L. TILNEY. The cytokine/adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J. Clin. Invest* 99: 2682-2690, 1997a.

TERZI, F., BURTIN, M., FRIEDLANDER, G. Early molecular mechanisms in the progression of renal failure: role of growth factors and protooncogenes. *Kidney Int Suppl* 65: S68-73, 1998.

THADHANI, R., PASCUAL, M. & BONVENTRE, J. V. Acute renal failure. *New Engl. J. Med* 334: 1448-1460, 1996.

TOMIĆ, M., GALESIĆ, K., MARKOTA, I. Endothelin-1 and nitric oxide in patients on chronic hemodialysis. *Ren Fail* 30(9): 836-842, 2008.

VERSTREPEN, W.A., E.J. NOUWEN, X.S. YUE, M.E. DEBROE. Altered growth factor expression during toxic proximal tubular necrosis and regeneration. *Kidney Int* 43: 1267-1279, 1993.

VIÑAS J.L., SOLA A., GENESCA M., ALFARO V., PÍ F., HOTTER G. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 40(6): 992-1003, 2006.

VLACHOJANNIS, J., TSAKAS, S., PETROPOULOU, C., KURZ, P. Increased renal excretion of endothelin-1 in nephrotic patients. *Nephrol Dial Transplant* 12(3): 470-473, 1997.

WANG Z., RABB H., HAQ M., SHULL G.E., SOLEIMANI M. A possible molecular basis of natriuresis during ischemic-reperfusion injury in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 9(4):605-613, 1998.

WILCOX, C.S. Role of macula densa NOS in tubuloglomerular feedback. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7(4): 443-449, 1998.

WILCOX, C.S., WELCH, W.J., MURAD, F., GROSS, S.S., TAYLOR, G., LEVI, R., SCHMIDT, H.H.H.W. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 11993-11997, 1992.

WU, F., PARK, F., COWLEY, A.W. JR, MATTSON, D.L. Quantification of nitric oxide synthase activity in microdissected segments of the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 276, 874-881, 1999.

YSEBAERT, D.K., K.E. DE GREEF, S.R. VERCAUTEREN, M. GHIELLI, G.A. VERPOOTEN, E.J. EYSKENS, M.E. DEBROE. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol. Dial. Transplant* 15: 1562-1574, 2000.

YSEBAERT D.K., DE GREEF K.E., VERCAUTEREN S.R., VERHULST A., KOCKX M., VERPOOTEN G.A., DE BROE M.E. Effect of immunosuppression on damage, leukocyte infiltration, and regeneration after severe warm ischemia/reperfusion renal injury. *Kidney Int* 64(3): 864-73, 2003.

ZOU, A.P., COWLEY, A.W. Role of nitric oxide in the control of renal function and salt sensitivity. *Current Sci. Reports* 1: 178-186, 1999.

ZOU, A.P., YANG, Z.Z., LI, P.L., COWLEY, A.W. Oxygen-dependent expression of hypoxia-inducible factor-1 α in renal medullary cells of rats. *Physiol. Genomics* 6: 159-168, 2001.

ZWEIER, J.L., TALUKDER, M.A. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 70(2): 181-190, 2006.