Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Implication de l'endothéline dans un modèle murin de néphropathie aux acides aristolochiques

Guillaume, Louise

Award date:
2017

Awarding institution:
Universite de Namur

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.

Download date: 02. May. 2026

UNIVERSITÉ DE NAMUR

Faculté des Sciences

IMPLICATION DE L'ENDOTHELINE DANS UN MODELE MURIN DE NEPHROPATHIE AUX ACIDES ARISTOLOCHIQUES

Mémoire présenté pour l'obtention

du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Louise Guillaume

Janvier 2017

Université de Namur
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@unamur.be - http://www.unamur.be

Implication de l'endothéline dans un modèle murin de néphropathie aux acides aristolochiques

Guillaume Louise

Résumé

La néphropathie aux acides aristolochiques (NAA) est une néphrite tubulo-interstitielle pouvant mener, à terme, à une insuffisance rénale et au développement de cancers urothéliaux. Cette toxicité rénale a été rapportée pour la première fois en Belgique en 1992 suite à l'ingestion de pilules amaigrissantes contenant des plantes chinoises, parmi lesquelles, *Aristolochia fangchi*. En effet, les plantes du genre *Aristolochia* contiennent des acides aristolochiques (AA) qui ont été identifiés comme étant néphrotoxiques mais également carcinogéniques. Cette néphropathie est caractérisée par deux phases interconnectées: d'abord, une phase aiguë au cours de laquelle on observe une nécrose tubulaire et ensuite, une phase chronique caractérisée par une atrophie tubulaire et une fibrose interstitielle. De plus, il est aussi décrit dans la littérature qu'un déséquilibre des agents vasoactifs est observé lors de la NAA. Précédemment, un modèle murin de NAA a été mis au point dans notre laboratoire. Dans une étude antérieure, nous avons observé une diminution de la biodisponibilité rénale en monoxyde d'azote (NO) suite à l'intoxication aux AA. De plus, nous avons démontré que suite à un traitement oral à l'aide de L-Arginine, les souris intoxiquées aux AA étaient partiellement protégées. Par ailleurs, le NO est connu pour interagir avec la voie de l'endothéline (ET). En particulier, l'ET est impliquée dans différentes pathologies rénales. Dès lors, l'objectif de ce travail consiste à déterminer l'implication de l'ET dans la pathogenèse de la NAA via l'utilisation d'un antagoniste de ses récepteurs, ET-A et ET-B.

Pour ce faire, des souris C57BL/6J ont été réparties de manière aléatoire dans différents groupes expérimentaux. Les souris ont reçu quotidiennement une injection intrapéritonéale d'AAI (3.5 mg/kg) pendant 4 jours. De plus, chaque jour, certaines d'entre elles ont reçu, par gavage, un traitement à base de macitentan (10 mg/kg) et ce, 7 jours avant la première injection d'AA, ainsi que tout au long du protocole. Les animaux ont été euthanasiés 5, 10 et 20 jours après le début de l'intoxication aux AA.

Les résultats démontrent que le traitement aux AA induit les lésions tubulaires attendues. L'évolution en deux phases a été observée comme décrite dans la littérature. En effet, l'évaluation de la fonction rénale a montré une polyurie, une protéinurie et une créatininémie augmentée. Les altérations fonctionnelles dues aux AA sont suivies d'un processus inflammatoire qui aboutit au développement d'une fibrose rénale. Le traitement au macitentan n'a pas montré d'impact sur les lésions tubulaires. Par contre, celui-ci semble intensifier les processus d'inflammation et de fibrose.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2017

Promoteur: N. Caron

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier Mme Nathalie Caron de m'avoir permis de réaliser mon mémoire au sein de son laboratoire. Cette année a été remplie de très bons moments aussi bien au niveau professionnel que relationnel. Un grand merci pour le temps accordé à mon mémoire.

Je remercie tous les membres du jury pour la lecture ainsi que l'évaluation de mon manuscrit.

Je tiens à remercier de tout cœur, Inès, ma doctorante qui m'a considérablement aidée durant cette année. Merci pour ta disponibilité malgré ton agenda très rempli, merci pour ton exigence mais surtout ta patience. Merci également pour tout le temps que tu m'as consacré tant dans les explications, les encouragements que les conseils. Je sais que ce n'était pas toujours de tout repos mais merci. Merci à toi, Vanessa, pour ta disponibilité, ton soutien, tes encouragements et toute la contribution que tu as apportée à mon travail. Malheureusement, tu as dû partir au milieu de notre mémoire, mais tu as tout de même contribué à la lecture du mémoire final et je te remercie aussi pour tout ça. Merci à toi, Blanche pour ton rire communicatif, tes encouragements, merci également d'avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions, parfois inutiles certes. Et finalement, merci à toi, Olivia pour ta bonne humeur, merci pour tout le travail fourni nécessaire à la réalisation de ce travail. Merci pour tes petites phrases qui m'ont permises de relativiser lors de mes erreurs et qui m'ont toujours encouragée. Merci à vous toutes pour tous ces petits moments passés à vos côtés et non loin de la nourriture. Merci à cette équipe accueillante et très chaleureuse.

Je tiens à remercier mes amies, Camille, Chloé avec qui j'ai passé des belles années. Merci à toi Chloé pour les moments où tu m'as rassurée dans les moments difficiles. Merci à toi Camille, d'avoir toujours été là pour m'aider que ce soit dans les cours ou dans la vie de tous les jours. Je n'oublie pas non plus de remercier Camille L pour son soutien omniprésent et ses encouragements et plus particulièrement lors de ces derniers moments de rédaction.

Pour finir, je tiens à adresser un grand merci à ma famille. Particulièrement, mes parents, car sans eux, tout ce parcours n'aurait pas été possible. Merci d'avoir toujours été présents, d'avoir toujours eu confiance en mes capacités, pour votre soutien, votre disponibilité et aussi vos encouragements. Merci à toi ma sœur Lauraine pour toutes les choses que tu as réalisées pour moi, ton soutien. Merci d'avoir toujours été là. Et finalement merci à mes grands-parents qui ont toujours été là présents que ce soit lors de mes échecs mais également lors de mes succès.

Liste des abréviations

A	Adénine
AA	Acides aristolochiques
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNase	Désoxyribonucléase
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ANOVA II	Two-way analysis of variance
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adénosine triphosphate
BQ-123	Antagoniste du récepteur à l'endothéline A
BQ-788	Antagoniste du récepteur à l'endothéline B
BUN	Blood nitrogen urea
Ca^+	Calcium
CD3	Marquage pour les lymphocytes
cm	Centimètre
COL I	Collagène I
COL III	Collagène III
Cre	Créatinine
CTGF	Connective tissue growth factor
CTL	Contrôle
Cu	Cuivre
CYP	Cytochromes
dA-AA I	7-(déoxyadénosine-N6-yl)aristolactame I
dA-AA II	7-(déoxyadénosine-N6-yl)aristolactame II
DAB	3'-Diaminobenzidine
dG-AA I	7-(déoxyguanosine-N6-yl)aristolactame I
dG-AA II	7-(déoxyguanosine-N6-yl)aristolactame I
dl	Décilitre
dNTP	Déoxyribonucléotide triphosphate
ECE-1	Enzyme de conversion de l'endothéline
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ET-1	Endothéline-1
ET-A	Récepteurs à l'endothéline A
ET-B	Récepteurs à l'endothéline B
FDA	Food and drug administration
G	Guanosine
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogènase
H	Heure
H^+	Hydrogène
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
HCO_3^-	hydrogénocarbonate
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IL-1β	Interleukin 1β
ISOM	Inner Stripe of Outer Medulla
J	Jour
K^+	Potassium

Kg	kilogramme
M	Molaire
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MCT	Macitentan
MF	Matières fécales
mg	milligramme
ml	Millilitre
mOsm	milliosmole
Na^+	Sodium
NAA	Néphropathie aux acides aristolochiques
NaCl	Chlorure de Sodium
NADH	Nicotinamidine-adénine-dinucléotide phosphate
NAG	N-acétyl-β-D-glucosaminidase
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NEB	Néphropathie endémique des Balkans
Nm	nanomètre
NO	Monoxyde d'azote
OAT	Organic anion transporter
ON	Overnight
OSOM	Outer Stripe of Outer Medulla
PA-1	Plasminogen activator inhibitor
PAS	Periodic Acid Schiff
PBS	Phosphate buffer saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
pH	Potentiel hydrogène
PGI2	Prostaglandine 2
$PO4_3^-$	Phosphate
RNAse	Ribonucléase
Rpm	Tours par minute
RT-qPCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
S2	Segment 2
S3	Segment 3
SEM	Erreur standard de la moyenne
T	Thymine
TGF-β	Transforming growth factor-beta
TNF-α	Tumor necrosis factor
U	Urines
Vs	Versus
°C	Degré
µL	microlitre

Table des matières

INTRODUCTION

1. Généralités sur le rein.....1
   1.1 Caractéristiques morpho-fonctionnelles.....1
   1.2 Vascularisation du rein.....5
2. Néphrotoxicité.....5
   2.1 Insuffisance rénale.....6
3. La néphropathie aux acides aristolochiques.....7
   3.1 Etiologie.....7
   3.2 Epidémiologie.....7
   3.3 Les acides aristolochiques.....8
   3.4 Caractéristiques de NAA.....9
      3.4.1 Les modèles animaux.....9
      3.4.2 Effets néphrotoxiques.....9
      3.4.3 Effets cancérigènes.....10
4. L'endothéline.....11
   4.1 Récepteurs.....11
   4.2 Les antagonistes des récepteurs à l'endothéline.....13
5. Objectifs.....15

MATERIEL ET METHODES

1. Animaux.....16
   1.1 Préparation des solutions.....16
      1.1.1 Solution d'acides aristolochiques.....16
      1.1.2 Solution contrôle.....16
      1.1.3 Solution de macitentan.....16
      1.1.4 Solution contrôle macitentan.....16
2. Groupes expérimentaux.....17
3. PCR quantitative en temps réel.....19
4. Dosages urinaires.....22
5. Dosage sur homogénats.....23
6. Dosage plasmatiques.....24
7. Analyses histologiques et immunohistochimiques.....24
8. Les analyses statistiques.....26

RESULTATS

1. Endothéline.....27
   1.1 Expression relative de l'ARNm d'*ET-1*.....27
   1.2 Expression relative de l'ARNm d'*ET-A* et d'*ET-B*.....27
2. Paramètres de base.....28
   2.1 Poids corporel.....28
   2.2 Poids des reins – Quantité de nourriture – Quantité d'eau ingérée.....29
3. Fonction rénale.....29
   3.1 Diurèse – Osmolarité urinaire – Protéinurie- Créatininémie – Urémie.....29

4. Les dommages tubulaires.....30
4.1 PAS.....30
4.2 Expression relative de l'ARNm du *NGAL*.....32
5. La prolifération cellulaire.....32
6. L'inflammation.....33
6.1 Expression relative de l'ARNm d'*MCP-1*, *IL-1β*, *TNF-α*.....33
6.2 Concentration urinaire de MCP-1.....33
6.3 Infiltration des macrophages et des lymphocytes.....34
7. Fibrose.....35
7.1 Expression relative de l'ARNm du *TGF-β*, *Périostine*, *CTGF*, *PA-1*.....35
7.2 Expression relative de l'ARNm de *COLI* et *COLIII*.....36
7.3 Rouge picrosirius.....37

DISCUSSION

1. Discussion.....38
2. Conclusions et Perspectives.....46

ANNEXE

BIBLIOGRAPHIE

Introduction

1. Généralités sur le rein

1.1 Caractéristiques morpho-fonctionnelles

Chez l'être humain, les reins se situent dans la région lombaire supérieure en position rétropéritonéale. Ce sont des organes ovoïdes, mesurant environ 12 cm de long et 6 cm de large. La face externe du rein est convexe alors que sa face interne est concave. C'est au niveau de cette dernière que se situe le hile où se trouve l'uretère permettant l'évacuation de l'urine vers la vessie. Enfin, l'urine est excrétée via l'urètre lors de la miction (Figure 1) (Silverthorn, 2007).

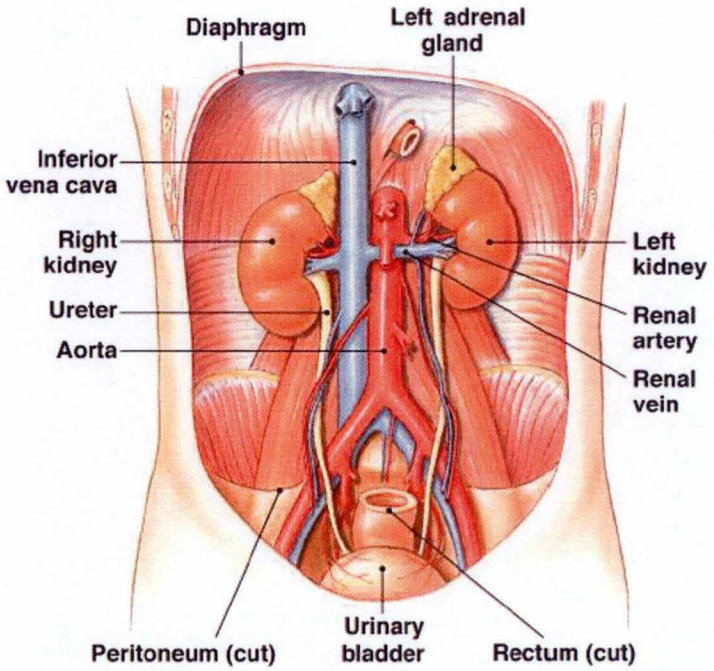


Figure 1. Anatomie de l'appareil urinaire (Silverthorn, 2007)

Du point de vue structurel, le rein est enveloppé d'une capsule protectrice. Sous cette capsule, le parenchyme rénal est divisé en deux couches distinctes : le cortex, qui correspond à la partie externe du parenchyme rénal et qui est de couleur rouge foncée, et la médullaire qui constitue la partie la plus interne, composée de deux parties; la médullaire externe et la médullaire interne. La médullaire externe est elle-même subdivisée en deux zones : la partie externe appelée OSOM (Outer Stripe of Outer Medulla) et la partie interne appelée l'ISOM (Inner Stripe of Outer Medulla) (Figure 2) (Silverthorn, 2007).

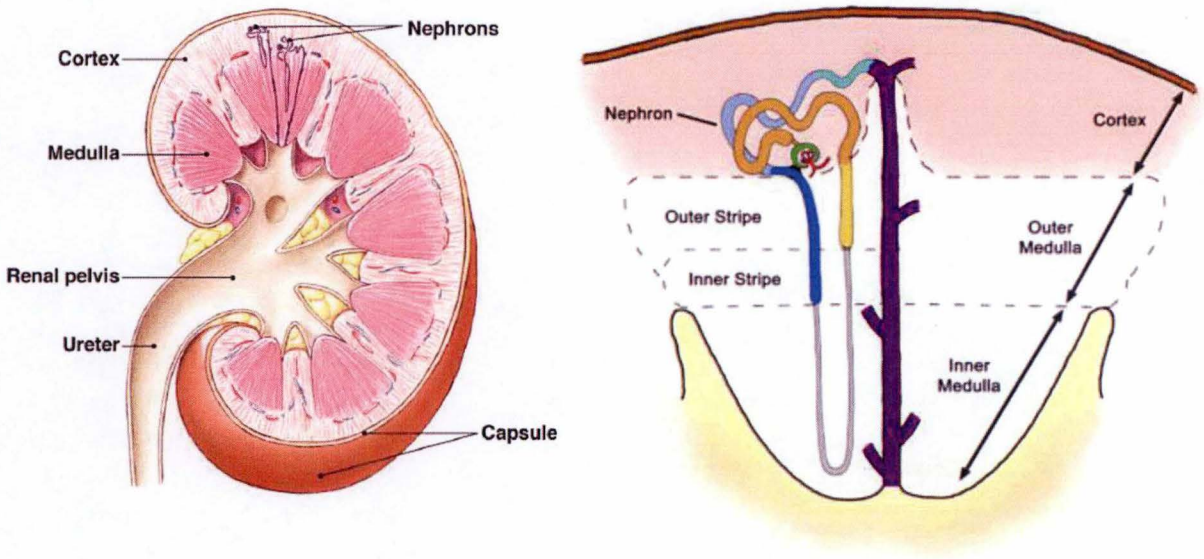


Figure 2. Illustration du parenchyme rénal. (Silverthorn, 2007 ; Davidson, 2008)

L'unité fonctionnelle du rein est le néphron, dont le nombre avoisine un million d'unités par rein. Cette structure est composée d'un glomérule et de différents segments tubulaires, décrits ci-dessous. Tout d'abord, les glomérules, localisés exclusivement dans la zone corticale, constituent la première partie du néphron. Ils sont formés à partir de l'artériole afférente qui se subdivise pour former un peloton de capillaires. Ceux-ci fusionnent pour ensuite former l'artériole efférente. Le glomérule est entouré par la capsule de Bowman, composée d'un feuillet pariétal et d'un feuillet viscéral. Cette structure (glomérule et capsule) est appelée corpuscule rénal. C'est à cet endroit que se déroule le processus de filtration glomérulaire, qui constitue la première étape dans la formation de l'urine. En effet, les éléments, devant être filtrés, vont être en contact avec une barrière de filtration glomérulaire. Cette barrière est constituée de 3 éléments (Figure 3) (Silverthorn, 2007):

- **L'endothélium des capillaires glomérulaires :** cet endothélium est fenestré et chargé négativement. Il permet de filtrer 20% du volume plasmatique, mais aussi des solutés et des protéines de bas poids moléculaire. Par contre, il constitue une barrière pour les protéines de haut poids moléculaire, celles qui sont chargées négativement, ainsi que les éléments figurés du sang.
- **La membrane basale :** elle sépare l'endothélium du capillaire des cellules épithéliales de la capsule de Bowman. Elle est constituée de glycoprotéines chargées négativement et de fibres de collagène formant une matrice extracellulaire.
- **La capsule de Bowman :** elle est composée de podocytes possédant de longs prolongements cytoplasmiques, appelés pédicelles, qui déterminent les fentes de filtration.

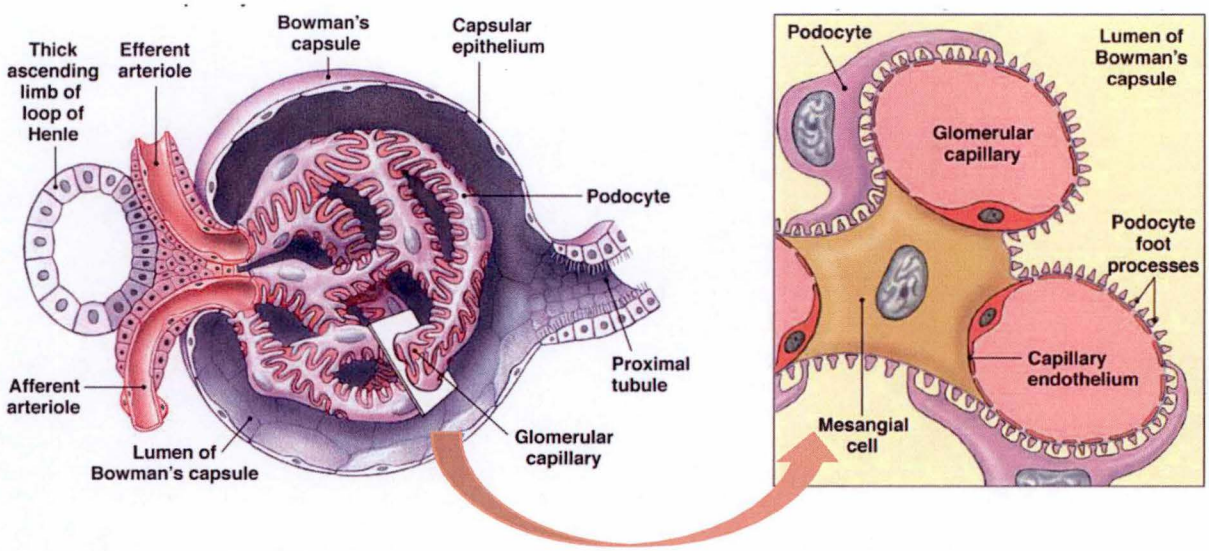


Figure 3. Illustration des différents constituants de la barrière de filtration glomérulaire (Silverthorn, 2007)

Le filtrat, se trouvant dans la capsule de Bowman, est alors appelé urine primitive. Celle-ci s'écoule ensuite dans les différents segments tubulaires qui font suite au glomérule. On distingue la partie proximale, l'anse de Henlé, la partie distale et le canal collecteur (Figure 4). C'est dans ces différentes parties que se produisent les processus de réabsorption et/ou de sécrétion. Ces différents phénomènes permettent d'ajuster le volume et la composition de l'urine en fonction des besoins homéostatiques (Silverthorn, 2007).

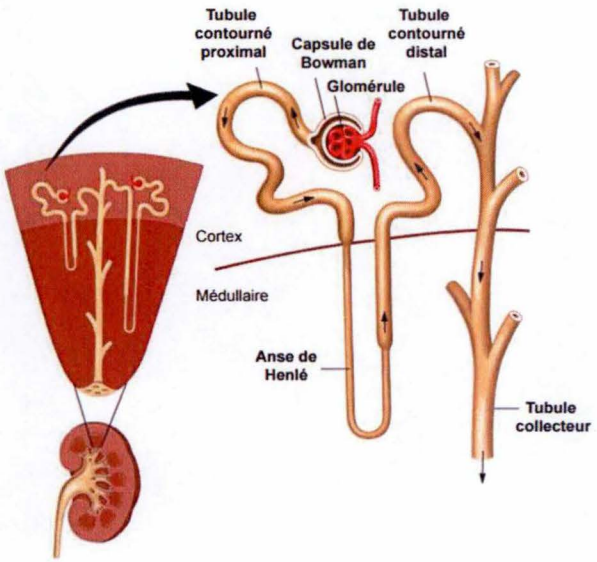


Figure 4. Les différentes structures composant le néphron

L'urine primitive est ainsi dirigée dans le tubule proximal. Cette partie du néphron sera largement abordée dans ce manuscrit puisqu'elle constitue une des cibles principales de la néphropathie aux acides aristolochiques. Ce tubule est composé de deux parties ; la partie contournée et la partie droite. Par ailleurs, il peut également être subdivisé en trois segments : S1 qui est la partie proximale sinueuse, S2 et S3 qui sont des parties rectilignes. Ce tubule est tapissé d'un épithélium simple composé de cellules possédant de nombreuses mitochondries permettant la production d'ATP. De plus, la membrane apicale de ces cellules contient de

nombreuses villosités, permettant d'augmenter la surface de contact avec le liquide tubulaire. Ces différentes particularités permettent d'optimiser le processus de réabsorption. En effet, ce tubule proximal est capable de réabsorber des ions tels que le Na^+, K^+, HCO_3^-, PO_4^{3-}, Cl^- et Ca^{2+} mais aussi de l'eau, du glucose, des acides aminés mais également des protéines de faible poids moléculaire. Ce processus est possible grâce à l'utilisation de l'énergie générée par le transport du Na^+ suivant son gradient. Par la suite, la réabsorption de l'eau est réalisée à l'aide d'un gradient osmotique créé par le mouvement de ces molécules. Et finalement, les protéines, elles, peuvent être réabsorbées via le système d'endocytose. Au final, cette partie du néphron permet de réabsorber 60 % de ce qui a été filtré (Silverthorn, 2007 ; Lacour, 2013).

Au niveau de ces tubules proximaux, un autre phénomène impliqué dans la formation de l'urine se produit. C'est la sécrétion. Ce phénomène permet le transfert de molécules du plasma vers la lumière tubulaire via des transporteurs membranaires. Grâce à ceux-ci, les protons, de faibles quantités d'urée et quelques produits exogènes sont sécrétés (Silverthorn, 2007). En effet, au niveau du segment S3 du tubule proximal, une sécrétion de différents composés plasmatiques tels que les anions organiques, les médicaments et des agents toxiques a lieu grâce à des transporteurs d'anions organiques (OAT) (Anzai, 2006). Ce phénomène permet ainsi d'éliminer les agents qui ne sont pas nécessaires pour l'organisme.

Ensuite, l'urine primitive s'écoule dans l'anse de Henlé. Cette structure en forme de « U » est constituée de deux parties ; la branche descendante où l'eau est réabsorbée et la branche ascendante où les solutés sont réabsorbés. Cette partie joue un rôle essentiel dans la concentration des urines (Silverthorn, 2007).

Par après, l'urine passe dans le tubule distal et ensuite dans le tube collecteur de Bellini où ont lieu les phénomènes de réabsorption et de sécrétion. Finalement, au terme de son trajet, l'urine excrétée est dépourvue de protéines et de glucose mais possède des déchets organiques et des molécules qui ne sont pas essentielles pour l'organisme (Silverthorn, 2007).

Dès lors, le rein remplit différentes fonctions physiologiques (Silverthorn, 2007):

- Il joue un rôle dans la régulation de la pression artérielle et du volume du fluide extracellulaire.
- Il assure un équilibre hydro-électrolytique. En effet, les reins contrôlent l'excrétion des principaux ions via des échanges entre l'urine en formation et le plasma et par conséquent l'eau également.
- Il est impliqué dans le contrôle de l'équilibre acido-basique et assure le maintien du pH sanguin dans des valeurs physiologiques. Cet équilibre est principalement régulé par la réabsorption et la sécrétion d'H^+ et d'HCO_3^-.
- Il évacue des agents exogènes tels que les toxines ou les médicaments mais aussi des déchets métaboliques tels que l'urée et la créatinine.
- Il participe à la production d'hormones telles que l'érythropoïétine, la rénine et des facteurs vasoactifs tels que le monoxyde d'azote (NO) et l'endothéline.

1.2 Vascularisation du rein

Le rein est un organe extrêmement perfusé. En effet, il reçoit 20 à 25 % du débit cardiaque. Le sang pénètre dans le rein via l'artère rénale, qui provient de l'aorte abdominale. Cette artère se ramifie en de petites artères appelées artères inter-lobaires, qui elles-mêmes se divisent en artères arquées. L'artère arquée donne naissance à l'artériole afférente qui se ramifie en capillaires glomérulaires. Ceux-ci confluent à leur tour pour former l'artériole efférente, qui sort du glomérule. Cette dernière forme ensuite un réseau de capillaires péritubulaires. Et finalement, le sang est drainé par la veine arquée avant de rejoindre la veine rénale et finalement aboutir à la veine cave inférieure (Figure 5) (Silverthorn, 2007).

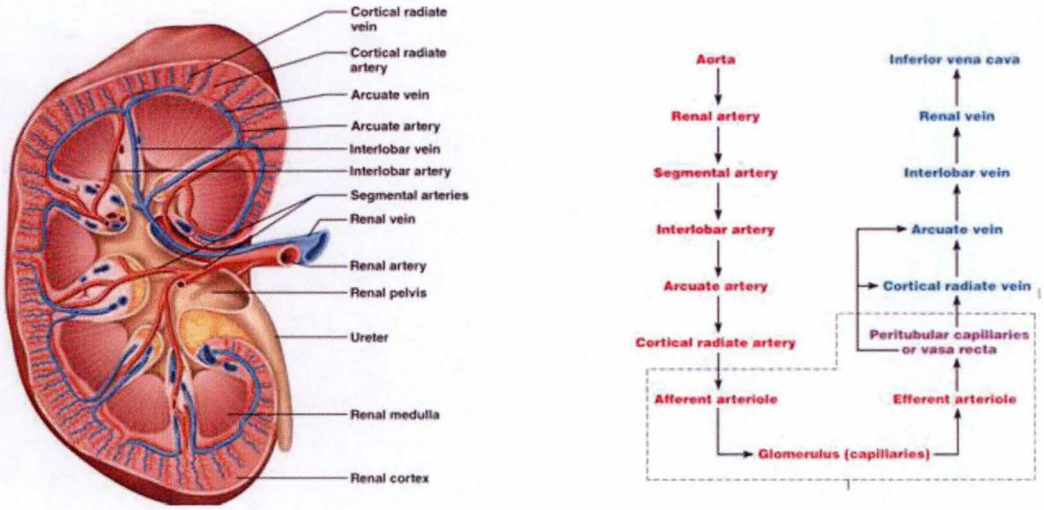


Figure 5. Schéma de la vascularisation du tissu rénal. (Edouard Kunegel, 2013), http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio211/chap25/chap25.htm

2. Néphrotoxicité

On parle de néphrotoxicité lorsque les altérations fonctionnelles et structurelles sont induites par des agents toxiques. En effet, les reins sont régulièrement exposés à différentes toxines étant donné leur fonction d'excrétion. Ainsi, les agents toxiques peuvent s'accumuler dans les cellules et induire des lésions tubulo-interstitielles provoquant des dysfonctionnements rénaux.

Certains segments rénaux peuvent être plus atteints que d'autres en raison de la présence d'enzymes permettant de métaboliser ces composés toxiques, et de transporteurs provoquant l'entrée de ces molécules au sein des cellules. Suite à ces différentes informations, on peut donc dire que les tubules proximaux sont la cible principale de certains agents toxiques. En effet, à la membrane de ces tubules sont situés les OAT comme expliqué précédemment. Il existe chez l'homme 11 formes de ces transporteurs, dont seulement 7 sont exprimées dans le rein. Les isoformes OAT1 et OAT3 sont exprimées au niveau de la membrane basolatérale des cellules tubulaires proximales. La localisation de OAT2 reste controversée (Dickman, 2011). Par contre, OAT4 et les autres isoformes sont exprimées sur la membrane apicale des cellules tubulaires

proximales (Babu et al., 2010). Néanmoins, leur fonction n'est pas encore totalement élucidée. Par ailleurs, il a déjà été démontré que l'activité des transporteurs OAT1, OAT3 et OAT4 était associée aux dommages tubulaires proximaux observés lors d'études antérieures portant sur la néphrotoxicité aux acides aristolochiques (Bakhiya et al., 2009). Cependant, une variabilité d'expression inter-espèces a déjà été mise en évidence indiquant une susceptibilité différente des segments tubulaires aux substances toxiques. De plus, la localisation de ces transporteurs au sein du rein chez l'homme est différente chez les rongeurs. Par exemple, le transporteur OAT2 chez l'homme semble être exprimé sur la membrane basolatérale des cellules tubulaires, alors que chez le rongeur, il semble se trouver sur la membrane apicale de ces mêmes cellules. Par conséquent, cette différence entre les modèles ne permet pas une comparaison optimale, il faut donc être vigilant (Dickman et al., 2011).

Les molécules, se trouvant au sein des cellules tubulaires, peuvent se lier à des cibles intracellulaires et altérer la fonction de ces cellules en induisant ainsi des lésions tubulaires. En effet, les tubules ne peuvent alors plus exercer leurs différentes fonctions. De plus, au sein des cellules vasculaires, ces agents toxiques peuvent aussi induire des perturbations dues à une modulation inappropriée de l'expression des agents vasoactifs. Un changement dans l'expression de ces molécules peut provoquer une vasoconstriction ou une vasodilatation. Par exemple, le NO est un vasodilatateur dont l'expression est diminuée dans certaines maladies rénales. A l'inverse, l'endothéline est un vasoconstricteur dont l'expression est augmentée dans certaines néphropathies. Cette modulation physiopathologique du tonus vasculaire peut alors induire une ischémie (Wen & Li, 2008). En effet, ces phénomènes pourront ainsi modifier le flux sanguin destiné au rein engendrant alors un déficit en nutriments, en ATP et en oxygène.

2.1 Insuffisance rénale

Les structures rénales, altérées suite à une exposition à des agents toxiques, ne sont plus en mesure d'assurer leurs principales fonctions comme filtrer le sang, excréter des substances ou réabsorber divers composants essentiels. Tous ces troubles peuvent, par la suite, mener à une insuffisance rénale qui peut être aiguë ou chronique. La forme aiguë est caractérisée par une détérioration rapide des fonctions rénales engendrée par la présence de nécrose tubulaire créant ainsi des dysfonctionnements rénaux (Lameire, 2004). Cependant, elle peut être réversible au bout de quelques jours à quelques semaines. Par ailleurs, si les dommages persistent, à long terme, la possibilité de développer une insuffisance rénale chronique est très importante. Cette forme chronique est caractérisée par une fibrose interstitielle et par la présence de tubules atrophiques. Dès lors, la détérioration est irréversible en raison de l'évolution lente des dommages rénaux. Il n'y a donc pas de guérison, ni de récupération et la fonction est plus ou moins altérée de manière permanente (Fourcade, 2006). Les patients atteints d'insuffisance rénale en stade terminal ont recourt soit à la dialyse ou soit à une greffe rénale.

Dans le cadre du mémoire, nous nous sommes intéressés à une forme de néphrotoxicité induite par des agents toxiques, les acides aristolochiques provoquant une insuffisance rénale.

3. La néphropathie aux acides aristolochiques

3.1 Etiologie

Cette néphropathie a été découverte en 1992, en Belgique, chez des femmes ayant eu recourt à des régimes amaigrissants. Ces patientes souffraient de néphrites sévères progressant vers des stades terminaux et des cancers urothéliaux (Vanherweghem et al., 1993). Durant ce régime, les patientes ingéraient des pilules contenant des plantes chinoises. Cette maladie porta alors le nom de « Néphropathies aux plantes chinoises ». Cependant, en analysant les pilules amaigrissantes à l'aide de techniques phytochimiques, il s'est avéré que les pilules, qui devaient normalement contenir *Stephania tetrandra*, étaient en réalité composées de l'*Aristolochia Fangchi* riche en acides aristolochiques (Figure 6) (Vanherweghem et al., 1993 ; Vanhaelen, 1994). Suite à cette découverte, le nom de cette pathologie fut changé en « Néphropathie aux acides aristolochiques (NAA) ». Cette substitution, due à leur nom très similaire (*Han fang-ji* pour *Stephania tetrandra* et *Guang fang-ji* pour *Aristolochia Fangchi*), a engendré un grand nombre de conséquences. Effectivement, les tétrandines ne sont pas toxiques, contrairement aux acides aristolochiques qui ont non seulement un effet toxique sur le rein mais aussi un effet carcinogénique (Shibutani et al., 2007). En effet, l'agence internationale pour la recherche sur le cancer les a classé comme carcinogènes (Barton, 2003).

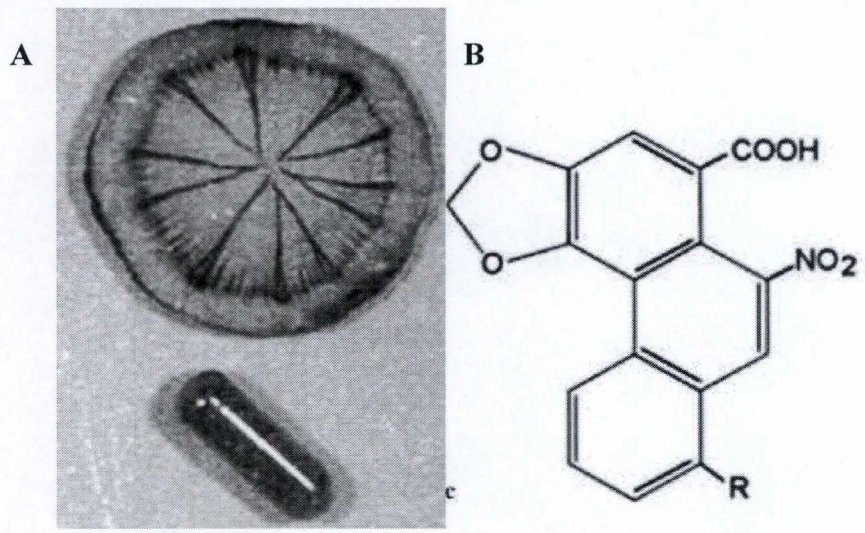


Figure 6. Illustration de la racine d'*Aristolochia Fangchi* en coupe transversale et une gélule du régime amaigrissant (A). Structure chimique de l'acide aristolochique I R= OCH_3 et II R=H (B).

3.2 Epidémiologie

Après cette découverte, d'autres cas d'intoxications aux AA ont été décrits dans d'autres pays comme la France (Stengel, 1998), l'Espagne (Pena, 1996), l'Angleterre (Lord, 1999) mais aussi les Etats-Unis et l'Asie (F. D. Debelle, 2008) en raison des différentes espèces composant la famille des Aristolochiacées.

Une néphropathie très similaire, appelée la néphropathie endémique des Balkans (NEB), a été découverte en 1956. Cette maladie est caractérisée par une néphropathie tubulo-interstitielle. L'origine de cette pathologie était encore inconnue lors de sa découverte. C'est seulement en 1967 que l'étiologie fut proposée. En effet, cette toxicité rénale était causée par la contamination des graines de blé par la plante «*Aristoloche clematites* » (Krogh, 1977).

Cependant, à cette époque, ces résultats n'attiraient guère l'attention des scientifiques. C'est seulement lorsque la néphropathie aux acides aristolochiques a été découverte que cette cause fut acceptée (Grollman, 2007 ; Bamias, 2008).

L'incidence de la néphropathie aux acides aristolochiques est probablement sous-estimée. En effet, en Asie, beaucoup de traitements utilisés en médecine traditionnelle contiennent encore des AA suite à des erreurs d'identifications. Par conséquent, certains patients continuent d'ingérer inconsciemment ces substances toxiques (Debelle, 2008).

3.3 Les acides aristolochiques (AA)

Les AA, produits de manière naturelle par la plante, sont principalement composés de deux dérivés : AAI et AAII qui sont des acides carboxyliques nitrophénanthrènes (Stiborova, 2008). Ces dérivés sont les principes actifs des plantes Aristoloches issues de la famille des Aristolochiacées. Au sein de cette famille, on retrouve 500 espèces, mais uniquement 7 espèces sont présentes dans la pharmacopée chinoise. Il a été démontré que seuls les AAI étaient capables d'induire des effets néphrotoxiques mais également des effets carcinogéniques, alors que les AAII provoquent des effets carcinogéniques (Shibutani et al., 2007). Pour induire ces effets, les AA doivent rentrer au sein des cellules. Ce mécanisme est réalisé à l'aide des transporteurs anioniques (OAT) (Bakhiya et al., 2009 ; Baudoux, 2012). Par ailleurs, les molécules toxiques peuvent également rentrer par le mécanisme de diffusion simple dans d'autres cellules de l'organisme (Dickman et al., 2011). Lorsque les AA se trouvent au sein des cellules, ils sont métabolisés en métabolites actifs appelés aristolactames I et II. Cette métabolisation n'est pas encore parfaitement connue et semble être très complexe. Cependant, différentes enzymes impliquées dans la métabolisation des AA telles que le cytochrome P450 présent dans les microsomes hépatiques et NADPH/CYP réductase dans les microsomes rénaux ont déjà pu être découvertes (Stiborova, 2008). Les aristolactames contiennent un ion N-acylnitrenium possédant une charge positive délocalisable. Ceux-ci peuvent alors se lier de manière covalente aux bases puriques composant l'ADN pour former des adduits d'ADN (Figure 7). Ces derniers peuvent persister dans le corps plusieurs années après l'exposition, plus spécifiquement au niveau du rein et de la vessie (Schmeiser HH, 2014).

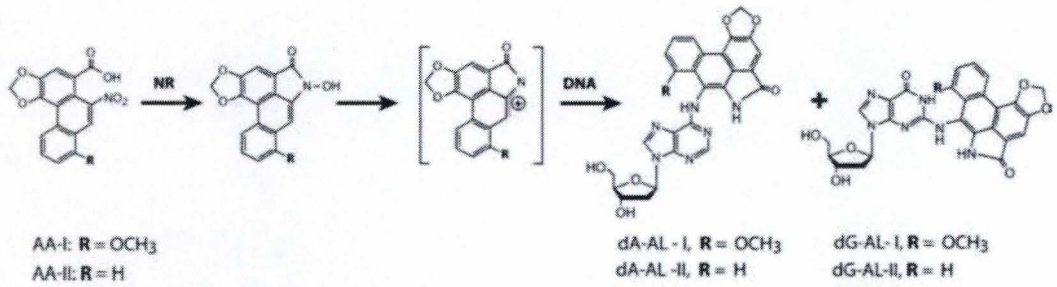


Figure 7. Métabolisation des AA et structure chimique des différents composés.

3.4 Caractéristiques de la NAA

3.4.1 Les modèles animaux

Pour étudier cette maladie, différents modèles animaux ont été élaborés. Le premier modèle, établi en 1962, était un modèle de rats. Celui-ci était basé sur l'injection d'AA en dose unique (Peters, 1963). Par la suite, de nombreux modèles ont été réalisés grâce à différents animaux comme les souris, les rats et les lapins (Cosyns et al., 2001 ; Sato et al., 2004 ; Huang, 2013). Tous ces animaux avaient reçu des AA mais avec des formes d'administration différentes telles qu'une injection intrapéritonéale, une sous-cutanée ou encore une administration par voie orale. De plus, les chercheurs ont également travaillé sur des modèles où le temps d'exposition aux AA pouvait être modifié, ce qui pouvait exacerber les lésions ou non (Huang et al., 2013).

3.4.2 Effets néphrotoxiques

La NAA s'exprime par une néphrite tubulo-interstielle aboutissant sur le long terme à une fibrose et une atrophie tubulaire. Des études ont pu démontrer que cette néphropathie avait une évolution biphasique. En effet, la première phase, dite phase aigüe, est caractérisée par une nécrose tubulaire proximale, tandis que la seconde phase, dite phase chronique, est caractérisée par une atrophie tubulaire et une fibrose interstitielle (Lebeau et al., 2005). Les lésions sont principalement localisées dans le cortex à cause de la présence des OAT sur les cellules tubulaires du segment S3 des tubules proximaux (F. D. Debelle et al., 2008 ; Luciano & Perazella, 2014).

Comme cité plus haut, la phase aigüe est caractérisée par une nécrose. En effet, l'étude de la protéinurie permet de se rendre compte qu'il y a un problème tubulaire. Etant lésés, les tubules ne peuvent donc pas réabsorber les petites protéines filtrées. Celles-ci se retrouvent alors dans l'urine excrétée. De plus, l'analyse de la NAG (N-acétyl-β-D-glucosaminidase) confirme bien les dommages tubulaires. En effet, cette enzyme est localisée sur les tubules proximaux. Dès lors, celle-ci se retrouve en grande quantité dans les urines suite à l'intoxication aux AA confirmant la présence de dommages tubulaires. Par la suite, un infiltrat inflammatoire, composé de macrophages et de lymphocytes, apparait près des lésions en phase aigüe. Cette infiltration a pu être mise en évidence chez les rats et les souris (Agnieszka A Pozdzik et al., 2008) et également chez les patients (Yang, 2007). C'est ce phénomène qui constitue le lien entre les deux phases.

La phase chronique est caractérisée par une fibrose interstitielle. En effet, suite à la stimulation par différents facteurs pro-fibrotiques tels que le transforming growth factor-β (TGF-β), la prolifération des myofibroblastes induit le déclenchement de la fibrose en produisant du collagène. Ces cellules peuvent soit provenir de l'activation des fibroblastes résidents en myofibroblastes, soit des cellules épithéliales transformées en myofibroblastes suite à la transition épithélio-mésenchymateuse (Pozdzik, 2009). De nombreuses études rapportent que les myofibroblastes sont responsables de la production des fibres de collagènes formant la matrice extracellulaire. Cela indique que ce sont ces cellules qui sont principalement impliquées dans le mécanisme de fibrose. Par ailleurs, une autre caractéristique de cette phase est la présence de tubules atrophiques. En effet, au fil du temps, les tubules nécrotiques sont remplacés par des tubules atrophiques dépourvus de cellules avec une lumière très large (A A Pozdzik et al., 2008).

Et finalement, une observation, mise en évidence dans la NAA que ce soit en phase aiguë ou en phase chronique, concerne le déséquilibre des agents vasoactifs tels que le NO et l'endothéline. La modification de l'expression d'ARNm de ces deux molécules peut entrainer un problème de perfusion. En effet, une raréfaction des capillaires péritubulaires peut, par la suite, apparaitre et provoquer l'installation d'une fibrose, augmentant la distance entre les capillaires et les cellules tubulaires (Wen & Li, 2008).

3.4.3 Effets cancérigènes

Comme cité plus haut, les AA, après métabolisation, peuvent se lier à l'ADN et ainsi provoquer la formation d'adduits d'ADN présents dans les organes que ce soit chez l'homme ou dans les modèles animaux. Ces adduits persistent dans le génome car le système de réparation est incapable de les reconnaitre (Ashurst, 1983). Celui-ci n'est donc pas capable de les éliminer, provoquant ainsi leur persistance des années après l'exposition (Sidorenko, 2012). Une fois liés à l'ADN, ils sont capables de bloquer la transcription et la réplication, provoquant une perturbation du cycle cellulaire mais aussi une apoptose des cellules (Luciano & Perazella, 2014). En effet, des mutations vont apparaitre au sein de l'ADN et entrainer le développement de cancers (Arlt, 2002). Il a été démontré que l'expression d'ARNm de certains gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, la réponse au stress, l'apoptose et la réponse fibrogène était altérée après une exposition aux AA suite à ces mutations (Chen, 2010). Le risque de développer un carcinome était fortement lié à la dose d'AA. Différentes mutations ont pu être observées. Une mutation de type transversion A→T a été découverte au niveau du codon 61 du proto-oncogène H-ras chez les rongeurs permettant de le rendre actif. Une autre mutation de type AAG→TAG au sein de l'exon 5 du gène P53 a été mise en évidence dans les atypies urothéliales et les carcinomes, introduisant ainsi un codon stop prématuré (Figure 8) (Arlt et al., 2002).

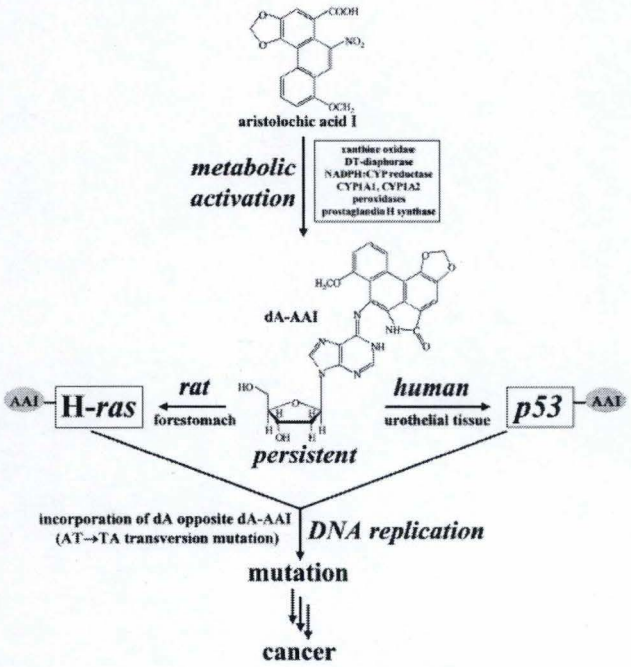


Figure 8. Schéma illustrant le mécanisme de carcinogenèse (Arlt et al., 2002)

4. L'endothéline

L'endothéline est l'un des agents le plus vasoconstricteur chez l'homme. Celui-ci a été, découvert par l'équipe de Yanagisawa il y a plus de 20 ans (Yanagisawa et al., 1988). La famille de l'endothéline regroupe trois membres ; ET-1, ET-2, ET-3 (Inoue et al., 1989). Elle est produite par diverses cellules constituant l'endothélium, le cerveau, le poumon mais aussi le rein (Benigni & Remuzzi, 1999). Au sein de ce dernier, ET-1, l'isoforme majoritaire, est en grande partie synthétisée par les cellules endothéliales, les fibroblastes et les macrophages mais aussi par les cellules du canal collecteur, les cellules mésangiales et les podocytes (Pinet, 2004).

La synthèse de l'endothéline se fait suivant une succession de clivages. Tout d'abord, la préproendothéline est synthétisée puis clivée par une endopeptidase de type furine pour former la proendothéline. Finalement, cette dernière est clivée par une enzyme de conversion de l'endothéline (ECE-1) pour obtenir la forme mature (Pinet, 2004). La libération d'ET-1 active est, d'une part contrôlée par différents mécanismes tels que la régulation de la transcription, la stabilisation de l'ARNm ou la régulation de l'activité d'ECE (Sorokin & Kohan, 2003). D'autre part, sa synthèse est fortement activée par plusieurs facteurs tels que l'angiotensine 2, le cortisol, le TGF-β, l'insuline et la trombine. Contrairement au NO qui, lui, inhibe cette synthèse (Chabrier & Braquet, 1990). La dégradation d'ET-1 est réalisée à l'aide d'une enzyme membranaire telle qu'une carboxypeptidase et une métalloprotéinase localisée au niveau de la bordure en brosse des tubules proximaux du rein (Remuzzi, 2002).

4.1 Récepteurs

Une fois l'endothéline formée, elle est capable de se lier à ses récepteurs ; ET-A et ET-B, qui sont des récepteurs couplés à des protéines G. Dans le rein humain, ET-B est exprimé en plus grande quantité, alors que chez le rat et la souris, l'expression d'ARNm d'*ET-A* et d'*ET-B* est identique. Ces deux récepteurs diffèrent, entre autre, de par leurs affinités avec les différentes isoformes de l'endothéline. En effet, ET-A a des affinités différentes avec les trois ligands. Il a plus d'affinité pour le ligand ET-1 suivi d'ET-2 et a une affinité moindre pour ET-3 par rapport aux autres. Alors qu'ET-B a une affinité similaire pour les 3 peptides. Ces récepteurs sont exprimés dans différents tissus tels que le rein, l'endothélium, le cerveau, le cœur et le poumon (Chabrier & Braquet, 1990). Selon leur niveau d'expression et leur localisation, les récepteurs exerceront des fonctions différentes qui perdurent dans le temps. En effet, lorsqu'ET-1 est liée à son récepteur, la dissociation est très longue provoquant des effets de longue durée.

Concernant leurs différentes fonctions vasculaires, lorsqu'ET-A est présent sur les cellules musculaires lisses, la liaison d'ET-1 induit un effet vasoconstricteur via l'augmentation du calcium intracellulaire (Boesen, 2015). Concernant ET-B, si le récepteur se situe sur l'endothélium vasculaire, la liaison d'ET-1 provoque une vasodilatation à travers la libération de molécules vasodilatatrices, telles que le NO, qui ont une action sur les cellules musculaires lisses. S'il est exprimé sur les cellules musculaires lisses vasculaires, la liaison d'ET-1 induit une vasoconstriction (Figure 9).

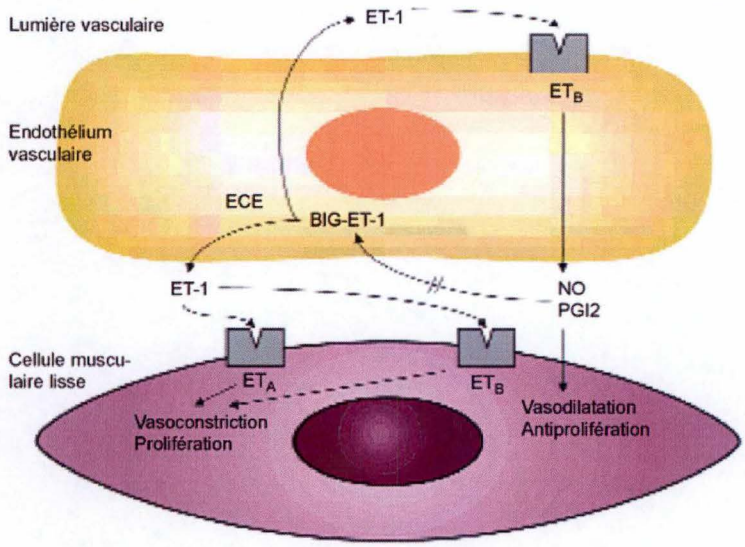


Figure 9. Schéma illustrant le rôle d'ET-1 en fonction du récepteur et de sa localisation http://titan.medhyg.ch/mh/formation/art/31332.html.

Par ailleurs, en se liant à son récepteur ET-B, ET-1 peut aussi réguler sa propre expression en augmentant la transcription de la préproendothéline (Remuzzi et al., 2002). De plus, il a aussi un rôle dans la clairance d'ET-1. En effet, il est capable de retirer ET-1 de la circulation soit en internalisant le récepteur pendant un certain temps, soit en le dégradant (Kawanabe, 2011).

Globalement, en conditions physiologiques, ET-1, via ses récepteurs, joue un rôle dans la régulation du flux sanguin et dans l'excrétion de fluide et de sodium en inhibant la réabsorption d'eau et d'électrolytes, dans l'hémodynamique glomérulaire et dans la modulation du système immunitaire (Figure 10). Il participe également à la mitose, à la survie cellulaire et à l'angiogenèse. En conditions pathologiques telles que les dommages rénaux aigus et chroniques, l'hypertension, l'infarctus du myocarde (Chabrier & Braquet, 1990), cet agent est surexprimé. Cette modulation d'expression induit par conséquent des effets délétères comme l'inflammation, la fibrose et la contraction cellulaire (Sorokin & Kohan, 2003; Vignon-zellweger, 2012).). En effet, on parle alors de pathophysiologie du système endothéline (Kohan, 2012)

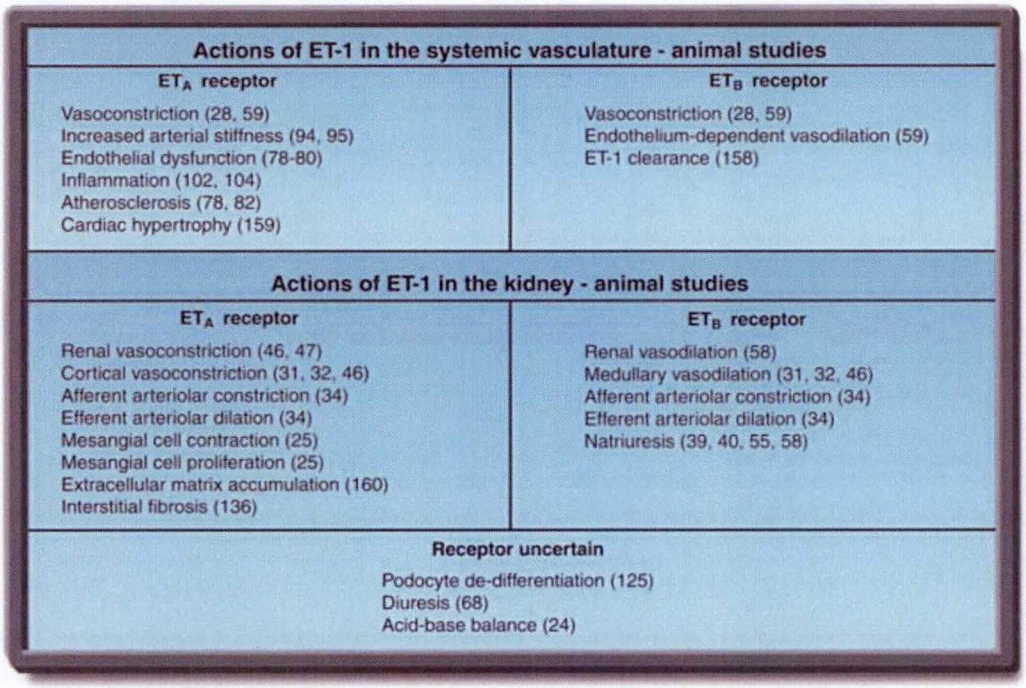


Figure 10. Les différentes actions des récepteurs dans le compartiment vasculaire et le rein (Dhaun, Goddard, & Webb, 2006).

4.2 Les antagonistes des récepteurs à l'endothéline

Des antagonistes des récepteurs à l'endothéline ont été fréquemment utilisés afin d'étudier les effets de l'endothéline dans différents modèles tels que des modèles de rats diabétiques (Cosenzi, 2003), des modèles d'hypertension chez le rat (Boffa, 2001) ou des modèles de toxicité induite par la cyclosporine chez l'homme (Binet, 2000) et chez le rat (Ishikawa, 1998). Par conséquent, au vu de ses effets délétères, bloquer son activité pourrait s'avérer bénéfique et ouvrir ainsi des voies thérapeutiques (Remuzzi et al., 2002). C'est ainsi que de nombreux antagonistes ont été développés. A l'heure actuelle, il existe différents types d'antagonistes ; d'une part, des antagonistes sélectifs, tels que le BQ-123 et le BQ-788, qui se lient respectivement à ET-A et à ET-B et d'autre part, des antagonistes non sélectifs, qui se fixent sur les deux récepteurs, tels que le macitentan ou le bosentan. Par ailleurs, d'autres types de molécules visant à inhiber l'enzyme de conversion de l'endothéline pour inhiber la production de cet agent sont en étude (Matsumura, 2000 ; Kawanabe & Nauli, 2011).

Ces différents antagonistes sont principalement utilisés dans l'étude des maladies vasculaires telles que l'hypertension et les maladies rénales. En ce qui concerne l'hypertension, un antagoniste non-sélectif, le bosentan, a déjà montré des résultats intéressants. En effet, il a été approuvé par la FDA (*food and drug administration*). Concernant les maladies rénales, des études antérieures sur des animaux ont démontré que lorsqu'on utilisait des antagonistes, les dommages rénaux étaient réduits (Kohan & Pollock, 2013). Par conséquent, les études précliniques ont fourni des informations très intéressantes en ce qui concerne l'utilisation de ces antagonistes en vue d'un traitement (Sasser, 2007). Cependant, une question demeure existentielle : « quel type d'antagoniste serait-il préférable d'utiliser en fonction de son étude ? ». Suite à ces nombreux résultats encourageants, les différents types d'antagonistes ont été utilisés en clinique. L'ensemble de ces études cliniques ont montré que le blocage des

récepteurs exerçait un effet protecteur sur le rein. Une phase 2 a même pu être réalisée pour traiter les maladies rénales chroniques avec un antagoniste du récepteur ET-A, l'avosentan. Cependant, un effet secondaire tel que la rétention de fluide dépendante de la dose a été répertorié. En contrôlant cette variable, une phase 3 a cependant été lancée contenu des données récoltées mais elle fut prématurément arrêtée à cause d'autres effets secondaires tels qu'une toxicité hépatique. Actuellement, plusieurs études sont toujours en développement. Il y a beaucoup d'espoir en ce qui concerne les antagonistes des récepteurs de l'endothéline comme outil thérapeutique (Kohan & Pollock, 2013).

Actuellement, le macitentan est beaucoup étudié. En effet, le macitentan a démontré avoir une activité pharmacologique plus importante que celle du bosentan. De plus, les effets secondaires observés avec d'autres antagonistes n'étaient pas présents lors de l'utilisation de celui-ci. En outre, cette molécule a été utilisée dans l'étude des maladies rénales sur des modèles de rat. Les résultats ont démontré que les lésions tubulaires et glomérulaires étaient réduites (Iglarz et al., 2008).

Objectifs

Pourquoi ce sujet ?

A l'heure actuelle, la NAA constitue un problème de santé mondial et son incidence reste encore difficile à évaluer. En effet, de nombreux cas, dus à des erreurs d'identification de l'*Aristolochia* ou à des intoxications accidentelles, sont décrits dans la littérature. Les mécanismes, par lesquels les AA exercent leur action néphrotoxique et carcinogénique, ne sont pas encore totalement connus, c'est pourquoi des études plus approfondies sont nécessaires.

Pourquoi cette molécule ?

Dans la littérature, bon nombres d'études parlent de l'implication de l'endothéline dans différentes maladies rénales. En effet, elle peut exercer des effets sur le rein, tant dans des conditions physiologiques que physiopathologiques. Ces effets ont principalement été démontrés grâce à l'utilisation d'antagonistes des récepteurs de l'endothéline. De plus, lors de maladies rénales, il a été démontré que ces effets pouvaient être exacerbés. Par ailleurs, des études ont déjà montré que lorsqu'on utilisait un antagoniste des récepteurs à l'endothéline, les dommages pouvaient être diminués indiquant les effets bénéfiques de ces molécules. C'est la raison pour laquelle l'endothéline et ces antagonistes ont été utilisés dans le cadre de notre étude.

Comment ?

A cet effet, un modèle murin permettant d'étudier la NAA a été mis au point au sein de notre laboratoire, reproduisant les principales caractéristiques de la pathologie humaine. Notre objectif expérimental était d'étudier le rôle potentiel d'un traitement au macitentan, un antagoniste non-sélectif des récepteurs à l'endothéline, gracieusement mis à notre disposition par la firme Actelion (Bâle, Suisse).

Matériel et méthodes

1. Animaux

Dans le cadre de ce protocole, 84 souris C57BL/6J (Janvier, France) âgées de 6 à 8 semaines ont été utilisées (Janvier, France). Les expérimentations réalisées sur les souris ont été approuvées par le comité d'éthique « Bien-être et santé des animaux d'expérience » de l'Université de Namur.

Les animaux sont hébergés dans une pièce appropriée et agréée dans laquelle la température est maintenue constante, l'humidité est contrôlée et l'éclairage de la pièce suit un cycle jour/nuit de 12h/12h. Les animaux ont un accès illimité à la nourriture (SAFEA03, France) et à l'eau qui sont renouvelées régulièrement.

1.1 Préparation des Solutions

1.1.1 Solution d'acides aristolochiques :

Afin de réaliser la solution d'acides aristolochiques, une solution mère, d'une concentration de 1mg/ml, a été réalisée en diluant les AA I (Sigma-Aldrich, États-Unis) dans du PBS stérile. Pour permettre une meilleure solubilisation, ce mélange a été chauffé dans un bain-marie à 60°C pendant 40 minutes, tout en étant vortexé toutes les 10 minutes. Finalement, cette solution a été conservée à l'abri de la lumière à température ambiante. Lors de l'administration, la solution mère a été diluée dans du NaCl 0,9% stérile pour obtenir une concentration finale de 0.35mg/ml. Cette solution est ensuite injectée par voir intrapéritonéale à raison de 10 ml/kg de poids corporel.

1.1.2 Solution contrôle AA :

Cette solution est composée de PBS dilué dans du NaCl 0,9%. Elle est ensuite injectée par voie intrapéritonéale à raison de 10 ml/kg de poids corporel.

1.1.3 Solution de macitentan :

Cette solution est composée d'eau distillée, de tween 0,05% (Merck, Allemagne) et de macitentan à une concentration de 0,6 mg/ml (Actelion Pharmaceuticals Ltd). Cette solution est administrée par gavage à raison de 10 mg/kg.

1.1.4 Solution contrôle macitentan:

Cette solution est composée d'eau distillée et de tween 0,05%. Elle est administrée par gavage à raison de 10 mg/kg de poids corporel.

2. Groupes expérimentaux

Les souris ont été réparties de manière aléatoire dans 4 groupes expérimentaux (voir Tableau 1):

✓ Groupe contrôle :

Les souris du groupe contrôle reçoivent quotidiennement une injection intrapéritonéale de solution contrôle AA pendant 4 jours consécutifs. Elles reçoivent aussi une administration quotidienne de la solution contrôle macitentan par gavage 7 jours avant les injections intrapéritonéales et tout au long du protocole.

✓ Groupe macitentan :

Ces souris reçoivent du macitentan à une dose de 10 mg/kg/jour par gavage tout au long du protocole mais aussi 7 jours avant le début de celui-ci. Elles reçoivent également des injections intrapéritonéales quotidiennes de solution contrôle AA pendant 4 jours.

✓ Groupe AA :

Les souris assignées à ce groupe reçoivent des injections intrapéritonéales quotidiennes d'AAI à une dose de 3,5mg/kg pendant 4 jours consécutifs. Elles reçoivent aussi la solution contrôle macitentan quotidiennement par gavage tout au long du protocole et 7 jours avant le début de celui-ci.

✓ Groupe AA+macitentan :

Ces souris reçoivent quotidiennement, une injection intrapéritonéale d'AAI à une dose de 3,5mg/kg pendant 4 jours consécutifs. De plus, la solution de macitentan est administrée quotidiennement par gavage tout au long du protocole et 7 jours avant le début de celui-ci.

	CONTROLE	MACITENTAN	AA	AA+ MACITENTAN
Souris (n)	18	18	24	24
Administration par voie intrapéritonéale (Dose)	Solution contrôle	Solution contrôle	AAI (3,5mg/kg)	AAI (3,5mg/kg)
Traitement par gavage (Dose)	Solution contrôle	Macitentan (10mg/kg/jour)	Solution contrôle	Macitentan (10mg/kg/jour)

Tableau 1. Détails des différents groupes expérimentaux

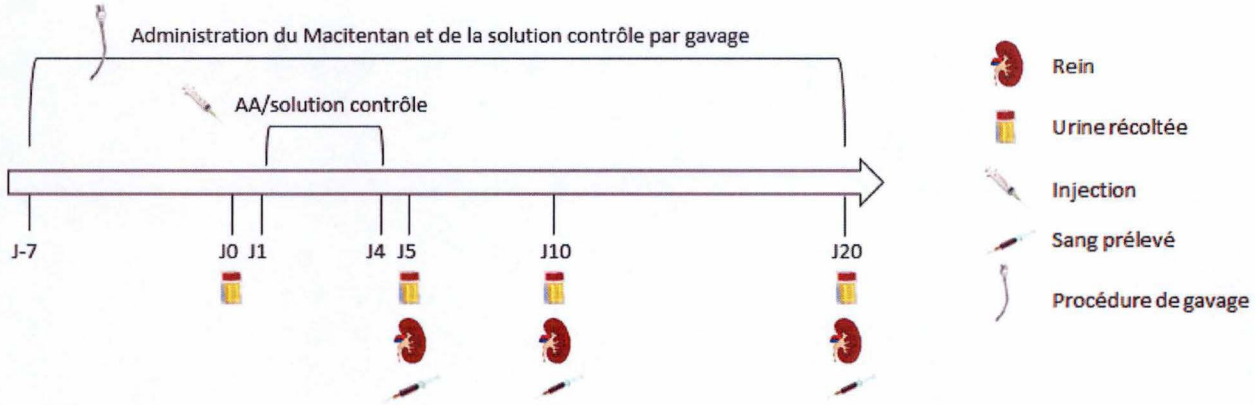


Figure 11. Schéma du protocole expérimental

Aux jours 0, 5, 10 et 20, les souris sont mises en cage métabolique pendant une période de 24h afin de récolter les urines et de contrôler la prise de nourriture et d'eau (Figure 11). Les cages métaboliques permettent de séparer les matières fécales (MF), qui vont rebondir sur la paroi et les urines (U) qui vont ruisseler le long des parois (Figure 12). De la paraffine liquide est ajoutée dans le récipient de récolte d'urine afin d'empêcher l'évaporation de celle-ci. Une fois l'urine récoltée, elle est centrifugée à 2500rpm pendant 10 minutes afin de séparer la paraffine et l'urine mais aussi d'éliminer les impuretés. L'urine sera ensuite aliquotée et conservée à -80°C pour des analyses ultérieures.

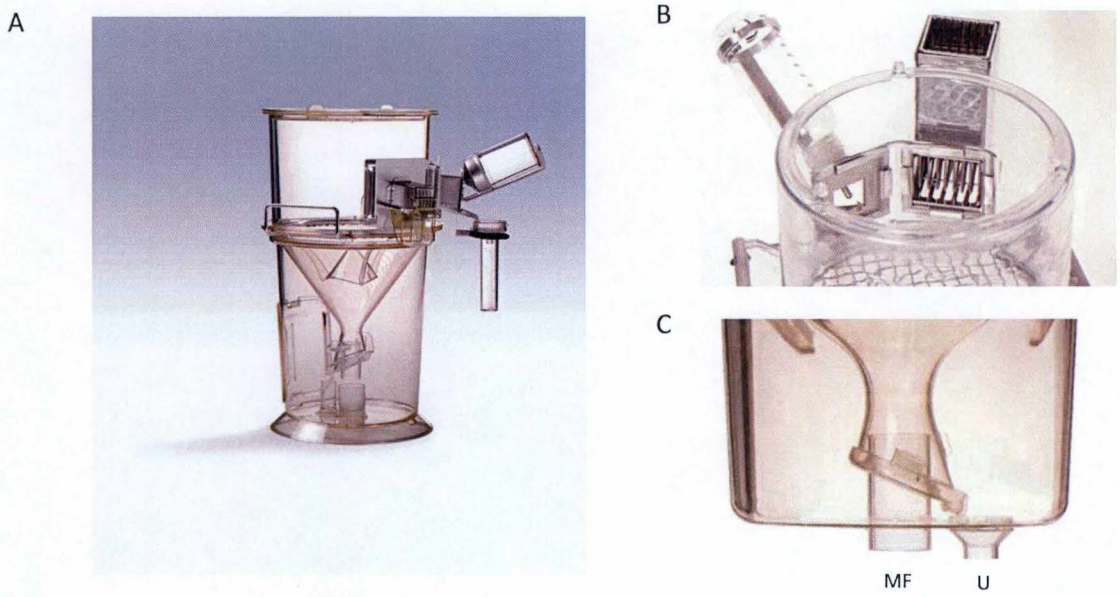


Figure 12. Illustration de l'agencement d'une cage métabolique

Les souris sont sacrifiées 5, 10 ou 20 jours après le premier jour d'injection des AA. Les animaux sont anesthésiés à l'aide d'une injection intrapéritonéale de kétamine (80 mg/kg, NIMATEK®, SEVA, Belgique) et de médétomidine (0,5 mg/kg, DOMITOR®, Elanca, Belgique). Ensuite, une laparotomie est réalisée et le sang est prélevé par ponction intracardiaque à l'aide d'une seringue préalablement traitée à l'héparine, empêchant ainsi la coagulation du sang. Les échantillons sanguins sont soumis à une centrifugation de 2500rpm

pendant 15 minutes pour récolter le plasma. Finalement, les reins sont prélevés dans des conditions RNAse free. Une partie de l'organe est fixée dans du Bouin (acide picrique 1% ; Sigma-Aldrich Etats-Unis, formol 40% ; Univar, Belgique, éthanol 95% ; Univar, Belgique, acide acétique ; VWR, Belgique, eau distillée) pour permettre la réalisation d'analyses histologiques et immunohistochimiques. L'autre partie est congelée dans l'azote liquide et conservée à une température de -80°C pour des analyses ultérieures telles que des dosages et RT-qPCR.

3. PCR quantitative en temps réel

Cette méthode est utilisée pour évaluer l'expression relative d'ARNm d'un gène d'intérêt.

✓ Extraction de l'ARN

La première étape consiste à extraire l'ARN rénal total en conditions RNAse free pour éviter la dégradation de l'ARN présent au sein du tissu. Pour ce faire, les tissus sont homogénéisés avec 1 mL de trizol (TRI reagent, Sigma, Etat-Unis) à l'aide d'un potter électrique (Bioblock Scientific, France) et incubés pendant 5 minutes à température ambiante dans des eppendorfs RNAse free. Par la suite, 200 µL de chloroforme (VWR, France) sont ajoutés et les eppendorfs sont secoués énergiquement durant 15 secondes. Ils sont ensuite incubés 5 minutes à température ambiante, puis centrifugés à 4100rpm pendant 20 minutes à 4°C. La phase aqueuse contenant l'ARN est prélevée et déposée dans un nouvel eppendorf autoclavé avec 500µL d'alcool isopropyl (Merck, Allemagne). Les échantillons sont incubés 10 minutes à température ambiante puis s'en suit une centrifugation pendant 15 minutes à 4100rpm à 4°C afin de précipiter l'ARN qui se retrouve alors sous forme de culot. Après avoir retiré le surnageant, de l'éthanol 75% est ajouté au culot, puis l'eppendorf est centrifugé à 4100rpm pendant 10 minutes à 4°C. Enfin, le surnageant est retiré, et le culot est stocké à -80°C en attendant l'étape suivante, le traitement à l'ADNase.

✓ Traitement à l'ADNase

La première étape consiste à ajouter un mix contenant une ADNase (Promega Etats-Unis), un tampon d'ADNase (Promega, Etats-Unis) et de l'eau RNAse free au culot, s'en suit une incubation de 30 minutes à 37°C. Cette réaction est stoppée par l'ajout d'1µL d'ADNase Stop (Promega, Etats-Unis). Ensuite, la solution est incubée à 37°C pendant 30 minutes et puis à 65°C durant 10 minutes. Finalement, l'ARN présent dans chaque tube est quantifié à l'aide d'un Nanodrop (NanoDrop 1000 spectrophomètre, Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis).

✓ Transcription inverse (RT)

Cette étape permet de transformer l'ARN présent dans les échantillons en ADN complémentaire (ADNc). 5 µg d'ARN sont engagés afin de réaliser cette étape. A cette quantité d'ARN, 1 µL de random hexamer est ajouté ainsi que de l'eau RNAse free afin d'obtenir un volume total de 12 µL. Les échantillons sont incubés pendant 5 minutes à 65°C. Ensuite, un mix RT est ajouté à ces échantillons. Ce mix contient un tampon de réaction 5x (4 µL) (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis), un inhibiteur de RNAse (1 µL) (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis), des oligonuctéotides (2 µL) (Thermo Fisher Scientific, Etats-unis) et une reverse

transcriptase RevertAId H minus M-MuLV(1 µL) (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis). Les échantillons sont ensuite vortexés et incubés successivement 5 minutes à 25°C, 60 minutes à 42°C et 5 minutes à 70°C (BioRad, T100 ™ Thermo Cycle – Belgium). Les échantillons sont finalement dilués avec de l'eau RNAse free et stockés à -80°C. Par ailleurs, quelques échantillons ne sont pas mis en contact avec le mix contenant l'enzyme afin de servir de contrôle RT. Pour ceux-ci, la reverse transcriptase est remplacée par de l'eau RNAse free.

✓ PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Une fois l'ARN transformé en ADNc, la RT-qPCR peut avoir lieu afin d'amplifier et de quantifier l'expression relative d'ARNm du gène d'intérêt. Tout d'abord, un mix est préparé contenant des primers sens (2,5 µL) et antisens (2,5 µL) (Eurogentec, Belgique), ainsi que du Sybr green. Ces primers vont se placer de part et d'autre du gène d'intérêt (Tableau 2). Le mix de 15 µL est déposé sur une plaque 96 puits (Eurogentec, Belgique) suivi de l'ADNc (5 µL). Le gène d'ARN ribosomal 18S est utilisé en tant que « housekeeping gene ». La plaque est centrifugée à 1200rpm pendant 3 minutes, puis est analysée par le dispositif (LightCycler, Roche, Etats-Unis) réalisant la RT-qPCR. Après plusieurs cycles d'amplification de l'ADN complémentaire, l'expression relative de l'ARNm est calculée pour chaque échantillon. Les résultats sont ensuite rapportés au « housekeeping gene » afin de normaliser les résultats. L'expression relative est calculée en utilisant la méthode de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Gène d'intérêt	Direction	Séquence du primer
ET-1	F	TCCTTGATGGACAAGGAGTGT
	R	CCCAGTCCATACGGTACGA
ET-A	F	TGTGAGCAAGAAATTCAAAAATTG
	R	ATGAGGCTTTTGGACTGGTG
ET-B	F	TCAGAAAACAGCCTTCATGC
	R	GCGGCAAGCAGAAGTAGAA
NGAL	F	ATGTCACCTCCATCCTGGTC
	R	CCTGTGCATATTTCCCAGAGT
MCP-1	F	CTTCTGGGCCTGCTGTTCA
	R	CCAGCCTACTCATTGGGATCA
Périostine	F	TCGTGGAACCAAAAATTAAAGTC
	R	CTTCGTCATTGCAGGTCCTT
IL-1β	F	AGTTGACGGACCCCAAAAG
	R	AGCTGGATGCTCTCATCAGG
Collagène I	F	GCAGGTTCACCTACTCTGTCCT
	R	CTTGCCCCATTCATTTGTCT
Collagène III	F	TCCCCTGGAATCTGTGAATC
	R	TGAGTCGAATTGGGGAGAAT
TNF-α	F	TACTGAACTTCGGGGTGATTGGTCC
	R	CAGCCTTGTCCCTTGAAGAGAACC
18s	F	CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT
	R	CGAACCTCCGACTTTCGTTCT
TGF-beta	F	CCTGGAAAGGGCTCAACAC
	R	CAGTTCTTCTCTGTGGAGCTGA
PA-1	F	AGGATCGAGGTAAACGAGAGC
	R	GCGGGCTGAGATGACAAA
CTGF	F	TGACCTGGAGGAAAACATTAAGA
	R	AGCCCTGTATGTCTTCACACTG

Tableau 2. Tableau reprenant les différents gènes d'intérêt étudiés lors de la RT-qPCR ainsi que les primers correspondant.

4. Dosages urinaires

✓ Dosage des protéines urinaires totales

Un dosage colorimétrique est réalisé pour mesurer la protéinurie. Tout d'abord, des échantillons standards d'albumine de concentrations connues sont préparés (Sigma-Aldrich, Etats-Unis). Ensuite, les échantillons urinaires ainsi que les échantillons standards sont déposés sur la plaque multipuits (Greiner bio-one, Belgique). Finalement, le bleu de coomassie, utilisé comme réactif (coomassie brilliant blue 20%, Met OH:H_2O 72%, acide acétique glacial 8%, Sigma-Aldrich, Etats-Unis) est ajouté dans chaque puits. Selon la méthode de Bradford, celui-ci est capable de réagir avec les acides aminés des protéines, indiquant ainsi la quantité de protéines présentes dans chaque échantillon. L'absorbance est ensuite mesurée à 640 nm avec un spectrophotomètre (Versa max micro plate reader, Molecular Devices, États-Unis) après 30 minutes d'incubation à température ambiante. Les standards préparés de concentrations connues permettent de réaliser une courbe standard. Avec cette courbe, une équation est obtenue, permettant de calculer la concentration en protéines des différents échantillons. Les résultats sont exprimés en mg/mg de créatinine (Cre).

✓ Dosage de la créatinine

Un kit de dosage colorimétrique est utilisé pour quantifier la concentration urinaire en créatinine (Enzo Life Sciences, États-Unis). Les échantillons urinaires sont tout d'abord dilués 20x et les échantillons standards de concentrations connues sont préparés. Les échantillons sont déposés sur la plaque, suivis du réactif de détection contenant de l'acide picrique. L'acide picrique va réagir avec la créatinine présente dans la solution et ainsi former un coloré jaune-orange. Pour terminer, l'absorbance est mesurée à 490nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les concentrations sont calculées à l'aide d'une droite standard. Les résultats sont exprimés en mg/dL.

✓ Dosage de l'endothéline

Le kit commercial "Quantikine ELISA Endothelin-1" (R&D systems Biotechne, Royaume-Unis) est utilisé pour mesurer la concentration urinaire en endothéline-1. Premièrement, l'assay diluant RD1-105 est ajouté dans chaque puits afin de bloquer la plaque. Cette dernière a été préalablement coatée avec un anticorps spécifique pour ET-1. Ensuite, les échantillons standards et les échantillons urinaires sont déposés. Par la suite, un anticorps se liant à l'anticorps reconnaissant ET-1 est ajouté. Enfin pour permettre la révélation, la solution substrat composée du réactif A (peroxyde d'hydrogène) et du réactif B (chromogène) est ajoutée pendant 30 minutes, suivie de la solution stop composée d'acide sulfurique pour arrêter la réaction. L'absorbance est lue à 450 et 570 nm grâce à un spectrophotomètre. Les concentrations, exprimées en pg/mL, sont calculées grâce à une droite standard.

✓ Dosage de l'osmolarité urinaire

La mesure de l'osmolarité urinaire nous renseigne sur la capacité des reins à concentrer les urines. En effet, une faible osmolarité indique que le nombre de particules présentes dans les urines est plus faible, démontrant une incapacité du rein à concentrer les urines. Cette faible osmolarité est une caractéristique généralement observée dans certaines maladies rénales telles que les néphropathies. Ce paramètre est évalué à l'aide d'un osmomètre (Fisk micro-osmomètre

model 210). Ce dispositif utilise le point de congélation d'une solution afin d'évaluer l'osmolarité. En effet, celui-ci varie en fonction du nombre de particules présentes dans la solution. Ainsi, l'échantillon est refroidi, puis réchauffé. Finalement, sur base de la température de congélation, l'osmolarité peut être calculée. En effet, plus l'osmolarité est importante, plus la température du point de congélation est petite. Les résultats sont exprimés en mOsm/kg.

5. Dosages sur homogénats

✓ Homogénéisation des tissus

Les tissus conservés dans l'azote liquide doivent être homogénéisés avant d'être utilisés pour les différentes analyses. L'homogénéisation permet de broyer les cellules afin de libérer les protéines du compartiment intracellulaire.

Afin de les homogénéiser, les tissus sont placés dans une solution composée de 500 µL de tampon (Cell signaling #9803, Cell Signaling Technology, États-Unis), d'eau distillée et d'un inhibiteur de protéase (1µL/500µL de Tampon) (Sigma, États-Unis) pour protéger les protéines des protéases endogènes. Ensuite, ces tissus sont broyés à l'aide d'un potter électrique (Bioblock Scientific, France) et les homogénats collectés sont centrifugés à une vitesse de 10000rpm pendant 15 minutes à 4°C. Finalement, le surnageant contenant les protéines est prélevé et est conservé à -80°C.

✓ Dosage des protéines totales

Le kit Pierce BCA protein assay (Thermo Scientific, État-Unis) est utilisé pour doser les protéines tissulaires. Tout d'abord, des échantillons standards d'albumine de concentrations connues sont préparés et les échantillons tissulaires sont dilués 10x dans de l'eau distillée. Une fois les échantillons préparés, ils sont déposés sur la plaque à raison de 25 µL par puits. Ensuite, le réactif est ajouté à chaque puits pendant une incubation de 30 minutes à 37°C. Celui-ci va réagir avec le Cu(I) en formant un coloré mauve. Finalement, l'absorbance est lue avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 562nm. La concentration en protéines des différents échantillons est calculée sur base d'une courbe standard et est exprimée en µg/ml.

✓ Dosage de MCP-1

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) est une chémokine pro-inflammatoire qui permet de contrôler la migration des cellules immunitaires. La concentration en MCP-1 est mesurée grâce à un kit BD optEIA Elisa (BDsciences, États-Unis). D'abord, la plaque nunc (Sigma-aldrich, Etats-Unis) doit être préalablement coatée avec des anticorps de capture dirigés contre MCP-1 et incubée pendant toute la nuit à 4°C. Le lendemain, l'assay diluant est déposé afin de bloquer les puits pendant 1 heure. Ensuite, les échantillons standards et les échantillons tissulaires, dilués 10x, sont ajoutés dans chaque puits pendant deux heures. Par la suite, une solution de détection est ajoutée dans chaque puits. Après une heure d'incubation, la solution substrat, contenant du tetramethylbenzindine et du peroxyde d'hydrogène, est ajoutée à la plaque pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Finalement, la réaction est arrêtée avec une solution stop contenant de l'acide sulfurique, et l'absorbance est lue à une longueur d'onde de 450nm avec un spectrophotomètre. La concentration est calculée sur base d'une courbe standard et est exprimée en pg/mg Cre.

6. Dosages plasmatiques

✓ Dosage de l'urée

L'urée est un produit du catabolisme des protéines, il doit donc être excrété comme un déchet métabolique. Pour calculer la concentration de l'urée dans le plasma, un Quantichrom™ Urea assay kit (DIUR-500) (Bioassay systems, Etat-Unis) est utilisé. Les échantillons standards de concentrations connues sont préparés et les échantillons plasmatiques sont dilués 20x. Tous sont déposés sur la plaque à raison de 5µL par puits. Ensuite, 200µl de réactif sont ajoutés à chaque puits pendant 20 minutes à température ambiante. Le réactif chromogénique va former un complexe coloré en réagissant avec l'urée. Finalement, la plaque est lue au spectrophotomètre à 520 nm et la concentration de l'urée est calculée sur base d'une courbe standard et est exprimée en mg/dl.

✓ Dosage de la créatinine

La mesure de la concentration plasmatique en créatinine est réalisée par chromatographie en phase liquide à haute performance (binary HLPC pomp, Waters, Etats-Unis) en collaboration avec l'Unité de recherche en Néphrologie expérimentale à l'ULB (Erasme, Bruxelles). Les échantillons plasmatiques sont déposés dans une colonne à chromatographie qui est capable de séparer et de mesurer la concentration d'une molécule d'intérêt sur base de sa charge et de son hydrophobicité.

7. Analyses histologiques et immunohistochimiques

Après avoir prélevé la partie du rein destinée aux analyses histologiques et immunohistochimiques, celle-ci est déposée dans une solution de Bouin (acide picrique 1%, Sigma-aldrich Etats-Unis; formol 40%, Univar, Belgique; éthanol 95%, Univar, Belgique; acide acétique, VWR, Belgique; eau distillée) pendant 48h. Une fois fixé, le rein est plongé successivement dans 3 bains d'éthanol pendant 24h et puis dans 3 bains de butanol pendant 24h afin de les déshydrater. Les tissus sont ensuite immergés dans un bain de paraffine renouvelé chaque jour à une température de 60°C pendant 3 jours. Enfin, les tissus sont coulés dans de la paraffine fraiche pour former un bloc. A l'aide d'un microtome (Leica, RM2155, Allemagne), les tissus sont alors coupés en tranches de 5 µm d'épaisseur puis déposées sur des lames préalablement silanées (3-aminopropyl trimethoxysilane 98%, Sigma, Etat-unis).

✓ Rouge picrosirius

Cette méthode permet de mettre en évidence les fibres de collagène I et III fortement présentes lors d'une fibrose. Les lames sont préalablement déparaffinées et réhydratées comme expliqué précédemment. Elles sont ensuite traitées à l'acide phosphomolybdic (300ml d'eau distillée et 600mg d'acide phosphomolybdique) (Merck; 0,2%. Germany) pendant 5 min, avant d'être placées pendant 90 minutes dans un bain contenant 3g d'acide picrique (Sigma-Aldrich, Etats-Unis), 250mg de rouge Sirius (réactifs RAL, France) et 250ml d'H_2O distillée. Les lames sont ensuite immergées dans 0,01M d'HCl et d'éthanol 70% pendant 1 minute et puis dans de l'éthanol 70% uniquement. Les lames sont ensuite placées dans des bains successifs d'alcool et de toluène. Pour finir, le tissu est recouvert d'une lamelle couvre-objet (VWR, Belgique).

✓ Coloration au PAS (Periodic Acid Schiff)

Cette analyse histologique permet de mettre en évidence les sucres, les protéines et les glycoprotéines en rose. Elle permet de visualiser l'aspect des tubules et particulièrement, de la bordure en brosse présente dans certains types de cellules tubulaires. Tout d'abord, les lames sont plongées dans de l'acide périodique 1% (VWR, Belgique) pendant 8 minutes pour oxyder les glycols en aldéhydes. Ensuite, elles sont immergées dans le PAS (Parasilin 1%, Sigma, Etats-Unis) pendant 1 minute, ou plus en fonction de la fraicheur de la solution. Celui-ci est capable de réagir avec les aldéhydes formés et d'induire ainsi la formation d'un précipité magenta. Finalement, les lames sont contre-colorées, déshydratées et recouvertes d'une lamelle couvre-objet.

✓ Analyses immunohistologiques

Cette technique permet de localiser et de semi-quantifier une protéine d'intérêt dans le rein à l'aide d'anticorps. D'abord, les coupes sont déparaffinées et réhydratées à l'aide de 2 bains de toluène et 3 bains d'éthanol à raison de 3 minutes par bain et un bain dans l'eau courante. Une fois déparaffinées, les lames sont incubées dans un tampon citrate (0,01M à pH6,2 , 21g d'acide citrique dans 1L d'eau distillée, Sigma-Aldrich, États-Unis) afin de démasquer les sites antigéniques. Ensuite, elles sont immergées dans un bain d'H_2O_2 (Merck, Germany) pour inhiber l'activité des peroxydases endogènes qui seraient susceptibles de réagir avec le DAB qui est l'agent révélateur. Après, les lames sont successivement incubées avec 30 µL d'avidine (Vector Laboratories. Inc, Etat-Unis) et 30 µL de biotine (Vector Laboratories. Inc, Etat-Unis) pendant 30 minutes. Finalement, les lames sont incubées avec 30 µL de caséine (Sigma, Etat-Unis) afin de prévenir les liaisons aspécifiques des anticorps.

Après ces différents traitements, les lames sont incubées avec un anticorps primaire qui est dirigé contre l'antigène d'intérêt (tableau 3). Par la suite, un anticorps secondaire biotinylé est déposé pendant 30 minutes sur les tissus. Ensuite, une étape d'amplification du signal est effectuée en utilisant la streptavidine HRP qui va se lier à la biotine. Enfin, la révélation est réalisée à l'aide du DAB (3'-Diaminobenzidine) substrate kit (Vector Laboratories. Inc Burlingame). Ainsi, l'H_2O_2 présent dans la solution va induire l'oxydation du DAB dû à une réaction avec les peroxydases et former d'un composé brun à l'endroit où se trouve l'antigène d'intérêt. Enfin, les lames sont colorées avec de l'hémalun (Hematoxylin Mayer, J.T.Baker, Pays-Bas) mettant en évidence les noyaux et au bleu de luxol (0,1% of alchohol 95°, luxol fast blue, Alfa Aesar, Allemagne) mettant en évidence le cytoplasme. Les lames sont recouvertes d'une lamelle couvre objet.

Cible	Anticorps primaires	Anticorps secondaires
F4/80 (macrophages)	Rat, 1:200, ON (Abcam, Royaume-Unis)	Rat (Ig, biotin), 1:50, 30 minutes (biorad, Chine)
CD3 (lymphocytes)	Rabbit, 1:200, 1h (Abcam, Royaume-Unis)	Rabbit, SignalStain Boost IHC Detection Reagent HRP, 30 minutes
PCNA	Rabbit, 1 :50, ON (Abcam, Royaume-unis	Rabbit, SignalStain Boost IHC Detection Reagent HRP, 30 minutes

Tableau 3. Tableau reprenant les différents anticorps primaires et secondaires.

8. Les analyses statistiques

Les données sont présentées sous la forme de moyennes ± S.E.M (erreur standard de la moyenne). Une analyse de variance (ANOVAII) a été utilisée pour comparer les différents groupes. Un post-test de Holm-Sidak a été réalisé pour des comparaisons multiples (GraphPad Prism 5.00). La valeur P est fixée à <0,05. Pour une question de clarté, nous n'avons illustré dans ce manuscrit que les statistiques comparant les différents groupes expérimentaux au sein d'un même timing. Les différences statistiques au sein d'un même groupe expérimental au cours du temps ne sont pas illustrées mais seront énoncées dans le texte en fonction de leur pertinence scientifique.

- La variation du poids corporel (PCx) a été calculée à l'aide de la formule suivante:

$$PCx = \frac{(\text{poids corporel (au jour X)} - \text{poids corporel (au jour 0)})}{\text{poids corporel (au jour 0)}} * 100$$

Concernant l'évaluation des analyses histologiques et immunohistochimiques, chaque lame est observée au microscope optique au grossissement 400x et 10 champs par lames ont été analysés. Les analyses sont réalisées en double-aveugle par deux personnes différentes à l'aide du programme informatique Image J (Macbiophotonics, USA).

- L'évaluation des dommages tubulaires (x) est réalisée à l'aide de la formule suivante:

$$x = \frac{\text{nombre de tubules lésés}}{\text{nombre total de tubules}} * 100$$

Un tubule est considéré comme lésé lorsqu'il y a une interruption de la bordure en brosse, la présence de cellules nécrotiques et/ou atrophiques.

- L'évaluation du marquage PCNA se fait à l'aide de la formule suivante :

$$x = \frac{\text{nombre de noyaux positifs au PCNA}}{\text{nombre total de noyaux}} * 100$$

- L'infiltration des cellules immunitaires est évaluée en comptant le nombre de macrophages (cellules positives au F4/80) et de lymphocytes (cellules positives au CD3) par champ.

- Une analyse morphométrique de la coloration du rouge picrosirius permet de quantifier la proportion de coloration rouge par champ.

Résultats

1. Endothéline

Afin d'évaluer l'expression relative de l'ARNm d'*ET-1* au sein du tissu rénal, une RT-qPCR a été réalisée. Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative entre le groupe « contrôle » et le groupe traité au macitentan (groupe « MCT »)(Tableau 5 en annexe). Par ailleurs, le niveau d'expression relative de l'ARNm d'*ET-1* est significativement plus élevé au jour 10 dans le groupe « AA+MCT » comparé à celui mesuré dans le groupe « contrôle », ainsi que dans le groupe « AA ». Au jour 20, les souris « AA », ainsi que les souris « AA+MCT » présentent une surexpression d'*ET-1* par rapport aux souris « contrôles » (Figure 13A). De plus, un dosage de la concentration urinaire en ET-1 a été réalisé. On peut observer que cette concentration urinaire ne varie ni avec le traitement aux AA, ni avec le traitement au MCT aux jours 5 et 10 du protocole en comparaison avec les souris « contrôles ». Par ailleurs, une augmentation significative est observée au jour 20 dans le groupe « AA+MCT » par rapport aux souris « contrôles » et aux souris « AA » (Figure 13B).

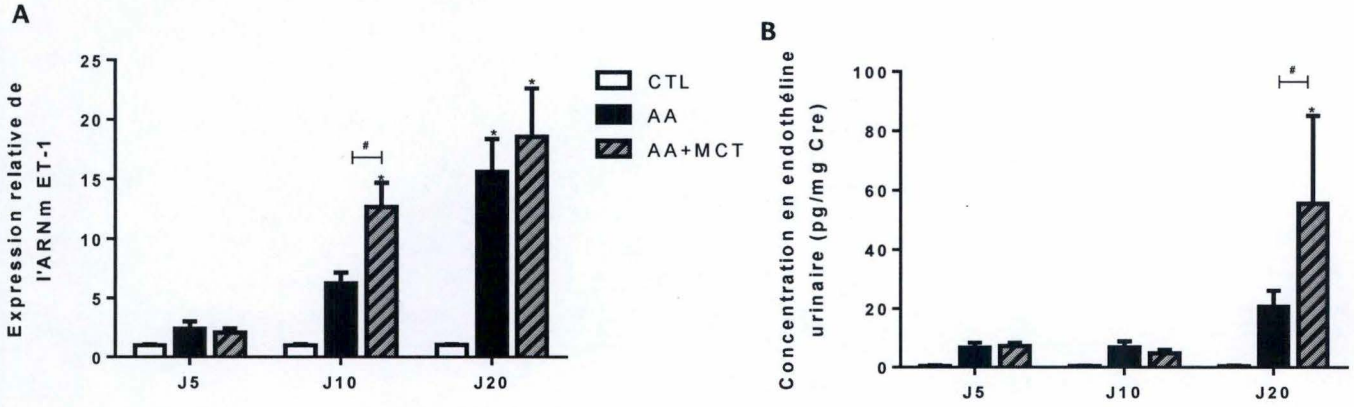


Figure 13. Expression relative de l'ARNm de l'*endothéline-1 (ET-1)* dans le tissu rénal (A) et la concentration urinaire en ET-1 (B) aux jours 5,10 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de variance de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. *P≤0,05 *vs* le groupe contrôle ; # P≤0,05 *vs* le groupe AA.

En ce qui concerne l'expression relative d'ARNm des récepteurs à l'endothéline dans le tissu rénal, on constate que l'expression relative du récepteur *ET-A* augmente significativement chez les souris « AA » mais également chez les souris « AA+MCT » aux jours 10 et 20 par rapport au groupe « contrôle » (Figure 14A). La surexpression d'ARNm d'*ET-A* au jour 10 est significativement plus importante chez les souris « AA » par comparaison avec les souris « AA+MCT ». Concernant *ET-B*, on remarque que son expression relative d'ARNm est significativement diminuée au jour 5, chez les souris « AA » et les souris « AA+MCT » par rapport aux souris « contrôles ». Cette sous-expression est aussi observée au jour 10 uniquement chez les souris « AA » (Figure 14B).

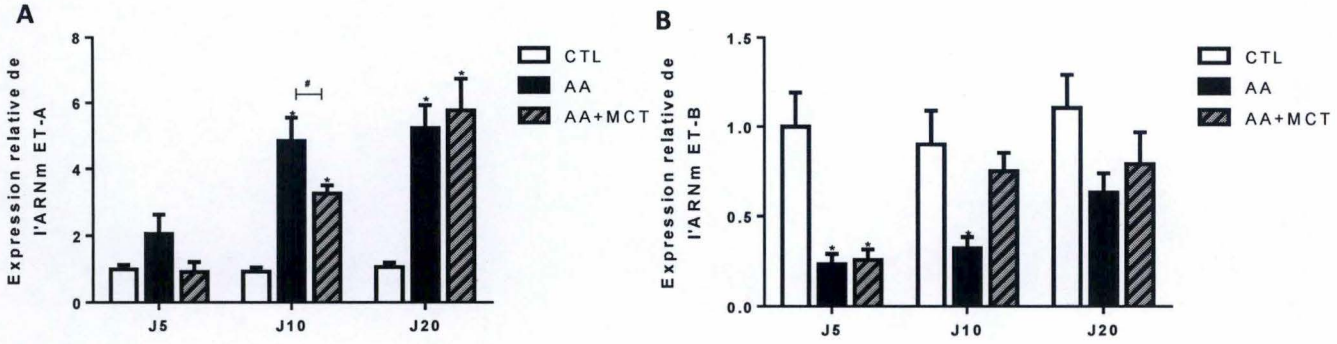


Figure 14. Expression relative de l'ARNm des récepteurs A (A) et B (B) dans le tissu rénal aux jours 5, 10 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de variance de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. * P≤0,05 *vs* le groupe contrôle ; # P≤0,05 *vs* le groupe AA.

2. Paramètres de base

Des mesures du poids corporel ont été réalisées régulièrement afin d'évaluer l'évolution de ce paramètre au sein des différents groupes expérimentaux au cours du protocole. Tout d'abord, aucune différence statistique n'est observée entre le groupe « contrôle » et le groupe « MCT » (Tableau 6 en annexe). En ce qui concerne les autres groupes expérimentaux, on observe que les souris « AA » ainsi que les souris « AA+MCT » perdent du poids à partir du jour 10 jusqu'au jour 20 en comparaison avec les souris « contrôles » dont l'évolution pondérale se poursuit (Figure 15).

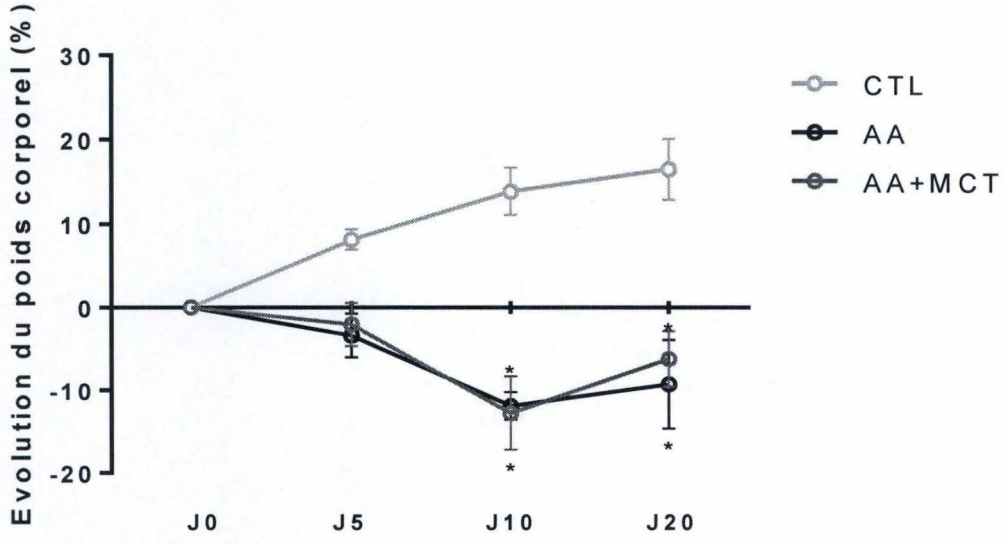


Figure 15. Graphique illustrant l'évolution du poids corporel au cours du protocole au sein des différents groupes expérimentaux. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de variance de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. * P≤0,05 *vs* le groupe contrôle.

Concernant le poids des reins, aucune différence significative n'est observée entre les différents groupes expérimentaux comme l'illustre le tableau 4. A propos de la nourriture ingérée, cette quantité est significativement plus faible dans les deux groupes de souris intoxiquées aux AA au jour 10. En ce qui concerne la quantité d'eau ingérée, elle est

significativement plus élevée dans les deux groupes de souris intoxiquées aux AA comparé aux souris « contrôles » au jour 20 (Tableau 4).

	Poids des reins – mg	Quantité de nourriture ingérée - g/24h	Quantité d'eau ingérée - ml/24h
Jour 5			
CTL	306,9 ± 16,6	4,7 ± 0,2	5,3 ± 0,4
AA	276,3 ± 10,5	4,3 ± 0,1	5,2 ± 0,6
AA+ MCT	273,8 ± 9,2	4,5 ± 0,3	5,6 ± 0,7
Jour 10			
CTL	294,5 ± 13,0	4,7 ± 0,3	5,2 ± 0,3
AA	287,7 ± 6,1	2,8 ± 0,7*	6,3 ± 0,8
AA+ MCT	300,6 ± 5,8	2,9 ± 0,6*	7,3 ± 1,2
Jour 20			
CTL	310,2 ± 19,2	4,9 ± 0,2	5,1 ± 0,3
AA	293,7 ± 6,3	5,4 ± 0,6	8,1 ± 0,9*
AA+ MCT	330,1 ± 10,3	4,8 ± 0,3	7,9 ± 0,6*

Tableau 4. Tableau illustrant le poids des reins, la quantité de nourriture ingérée et la quantité d'eau ingérée pour chaque groupe expérimental aux jours 5, 10 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de variance de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. * $P \leq 0,05$ *vs* le groupe contrôle.

3. Fonction rénale

Dans le but d'évaluer l'impact des différents traitements expérimentaux sur la fonction rénale, plusieurs paramètres ont été évalués. Aucune différence significative n'est observée entre le groupe « contrôle » et le groupe « MCT » (Tableau 7 en annexe).

La Figure 16A illustre la diurèse mesurée au sein des différents groupes expérimentaux. Au jour 10, on observe que ce paramètre augmente chez les souris « AA+MCT ». Au jour 20, la diurèse est significativement augmentée dans les deux groupes de souris intoxiquées aux AA. Concernant l'osmolarité (Figure 16B), on constate qu'elle diminue de manière significative au jour 5 chez les souris « AA+MCT » en comparaison aux souris « contrôles ». Aux jours 10 et 20, elle diminue significativement dans les deux groupes de souris intoxiquées aux AA.

L'évaluation de la protéinurie démontre qu'au jour 5, la concentration urinaire en protéines est significativement plus élevée chez les souris « AA » et « AA+MCT » comparé aux souris « contrôles » (Figure 16C). Cette protéinurie se normalise dans ces deux groupes aux jours 10 et 20.

De plus, la mesure de la concentration plasmatique en créatinine a été réalisée (Figure 16D). Les résultats indiquent que ce paramètre est significativement augmenté dans les deux groupes de souris intoxiquées aux AA et ce, aux jours 5, 10 et 20. Au jour 10, la créatininémie est significativement plus élevée chez les souris « AA » en comparaison aux souris « AA+MCT ».

Concernant l'urémie, la Figure 16E met en évidence une augmentation significative de ce paramètre au jour 10 chez les souris « AA » ainsi que chez les souris « AA + MCT » par rapport aux souris « contrôles ».

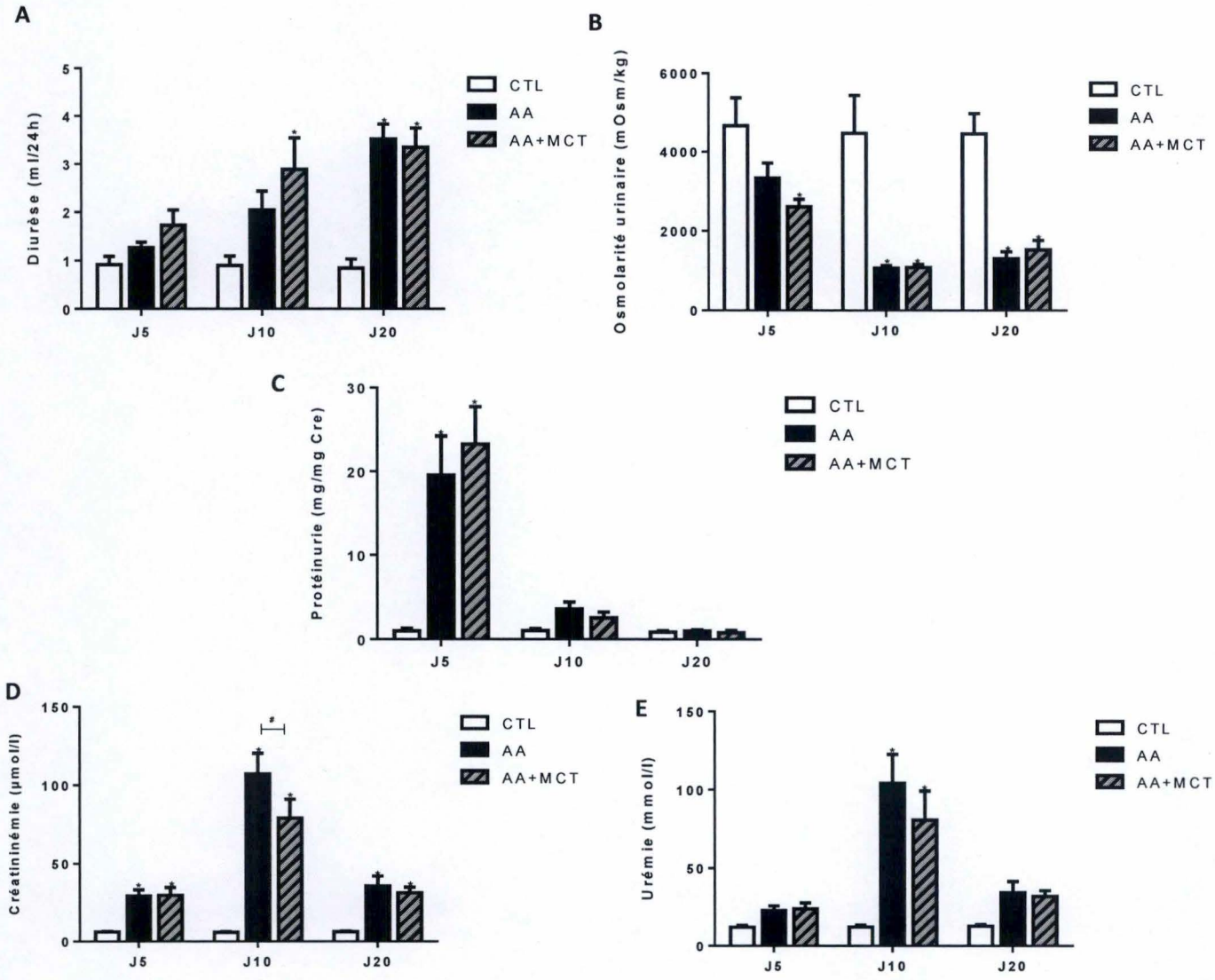


Figure 16. Diurèse (A), osmolarité urinaire (B), protéinurie (C), créatininémie (D) et urémie (E) dans les différents groupes expérimentaux, aux jours 5,10 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. * $P \leq 0,05$ *vs* le groupe contrôle ; # $P \leq 0,05$ *vs* le groupe AA.

4. Les dommages tubulaires

Une coloration au PAS a été effectuée afin d'analyser la structure rénale dans les différents groupes expérimentaux. Tout d'abord, on constate que le traitement au MCT, seul, n'influence pas les structures histologiques rénales (Tableau 8 et Figure 25 en annexe). Les résultats, illustrés à la Figure 17, indiquent que le traitement aux AA provoque des lésions tubulaires. En effet, le nombre de tubules lésés par rapport aux nombre de tubules totaux est significativement plus élevé dans les deux groupes expérimentaux recevant des AA et ce, aux jours 5, 10 et 20 en comparaison au groupe « contrôle » (Figure 17B). Ces altérations sont principalement localisées au niveau des tubules proximaux (Figure 17A). Au jour 5, les souris « AA », ainsi que les souris « AA + MCT » présentent une nécrose des cellules tubulaires

proximales qui ont perdu leur ancrage à la membrane basale ainsi que leur bordure en brosse. Ce phénomène mène à la formation de casts composés d'agrégats cellulaires et de protéines, au sein de la lumière tubulaire. Le jour 10 est caractérisé par un stade intermédiaire où l'on retrouve encore certains tubules nécrotiques alors que d'autres tubules évoluent en tubules dits « atrophiques », c'est-à-dire que beaucoup de cellules tubulaires sont dépourvues de noyaux. De plus, la lumière tubulaire est large et dépourvue de débris cellulaires. Finalement, au jour 20, on retrouve principalement des tubules atrophiques. Par ailleurs, aucun impact du traitement au MCT chez les souris intoxiquées aux AA n'est observé sur le score de lésions tubulaires.

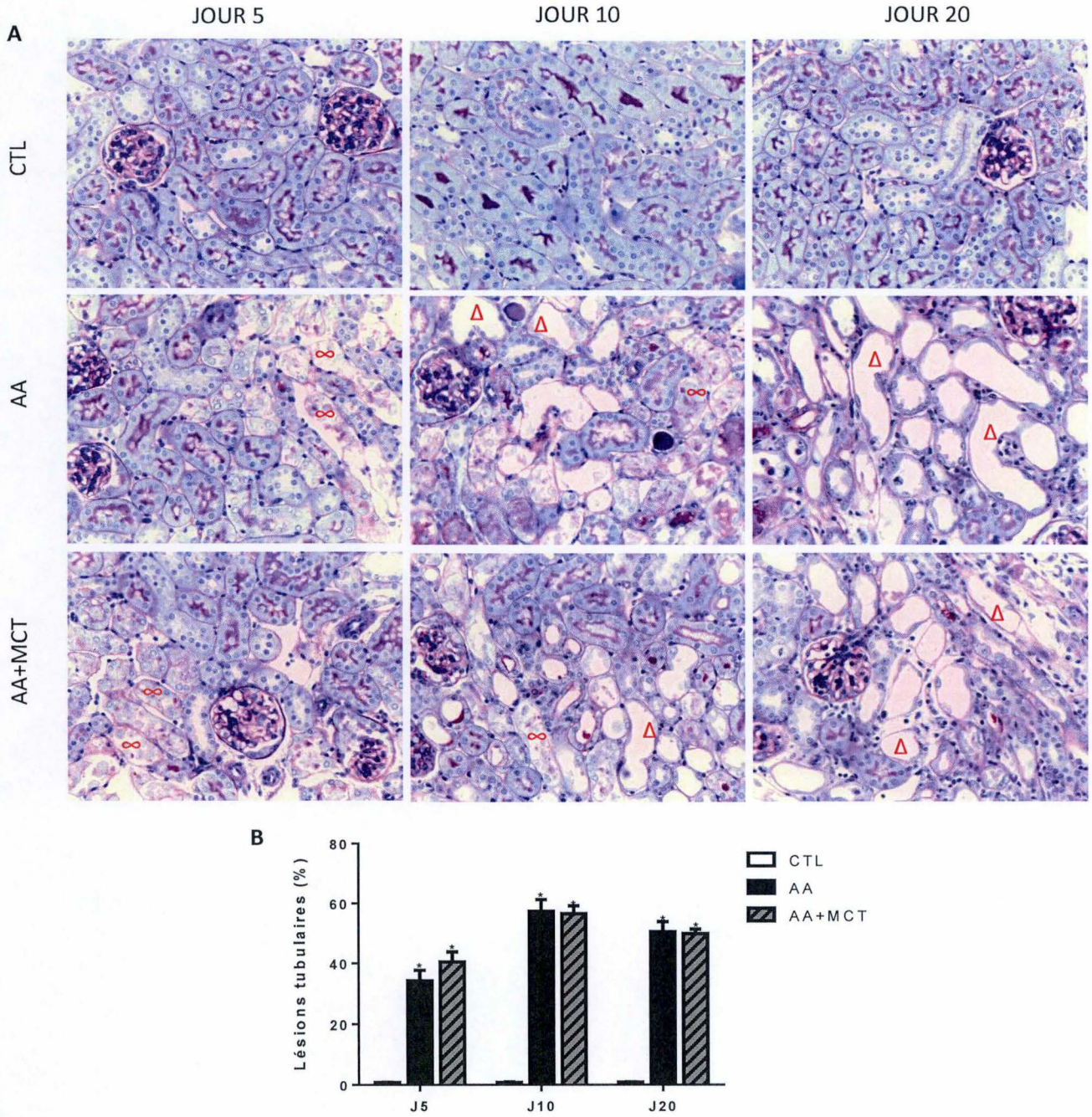


Figure 17. Morphologie des reins colorés avec l'acide périodique Schiff aux jours 5, 10 et 20 dans les différents groupes expérimentaux. Grossissement 400x. Illustration des lésions; tubules atrophiques (Δ), tubules nécrotiques (∞) avec débris au sein de la lumière (A) Pourcentage des lésions tubulaires (B) aux jours 5, 10 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. * P≤0,05 *vs* le groupe contrôle.

L'expression relative d'ARNm de *NGAL* a été évaluée dans le tissu rénal des différents groupes expérimentaux. Les résultats obtenus illustrent une surexpression chez les souris « AA » et chez les souris « AA+MCT » et ce, aux jours 10 et 20 en comparaison avec les souris « contrôles ». De plus, cette surexpression au jour 10 est significativement plus importante chez les souris « AA+MCT » (Figure 18).

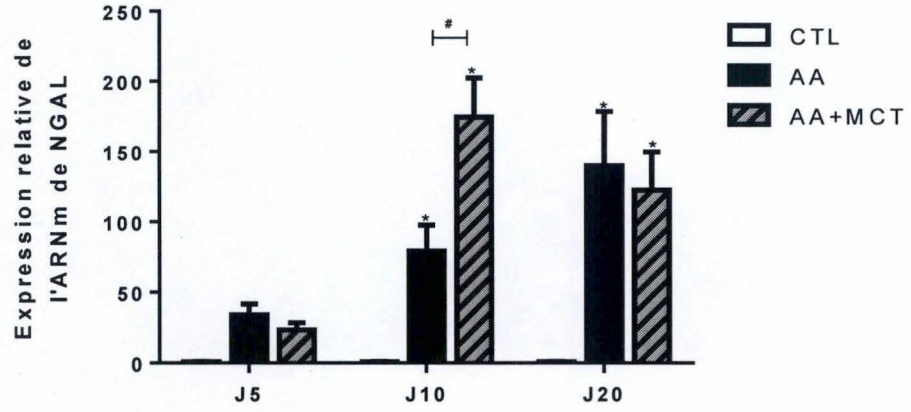
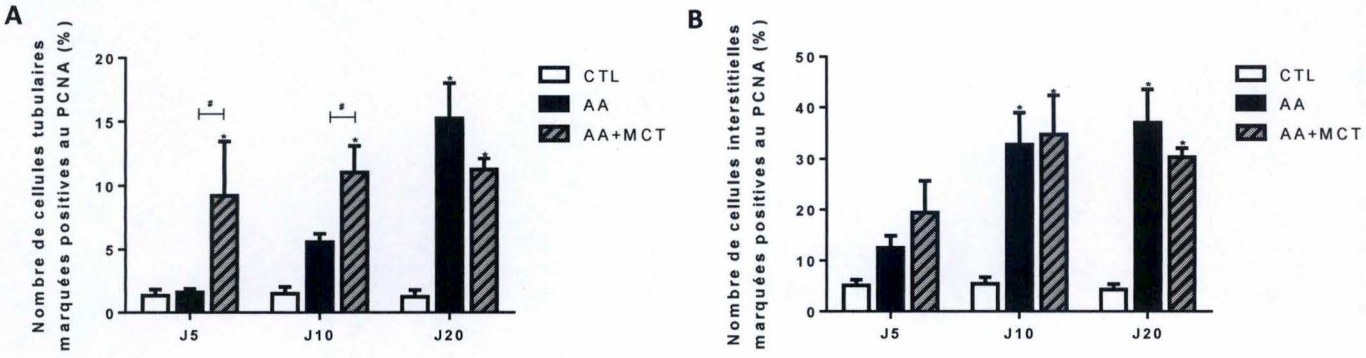


Figure 18. Expression relative de l'ARNm de *NGAL* dans les différents groupes expérimentaux, aux jours 5, 10 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. * P≤0,05 *vs* le groupe contrôle ; # P≤0,05*vs* le groupe AA.

5. La prolifération cellulaire

Pour mettre en évidence la prolifération cellulaire, un immunomarquage de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) a été réalisé sur des coupes du tissu rénal des différents groupes expérimentaux. Ici encore, aucune différence significative entre le groupe « contrôle » et le groupe « MCT » n'a été observée (Tableau 9 en annexe). Comme le montre la Figure 19, le nombre de cellules tubulaires positives au PCNA est plus important chez les souris « AA+MCT » comparé aux souris « contrôles » et aux souris « AA » et ce, aux jours 5 et 10. Par contre, au jour 20, aucune différence significative entre le groupe « AA » et le groupe « AA+MCT » n'est observée. Cependant, à ce timing, le nombre de cellules tubulaires positives est plus important dans les deux groupes de souris intoxiquées aux AA par rapport au groupe « contrôle » (Figure 19A). En ce qui concerne le compartiment intestitiel (Figure 19B), le nombre de cellules interstitielles positives au PCNA est plus important aux jours 10 et 20 chez les souris « AA » mais également chez les souris « AA+MCT » par rapport aux souris « contrôles ».



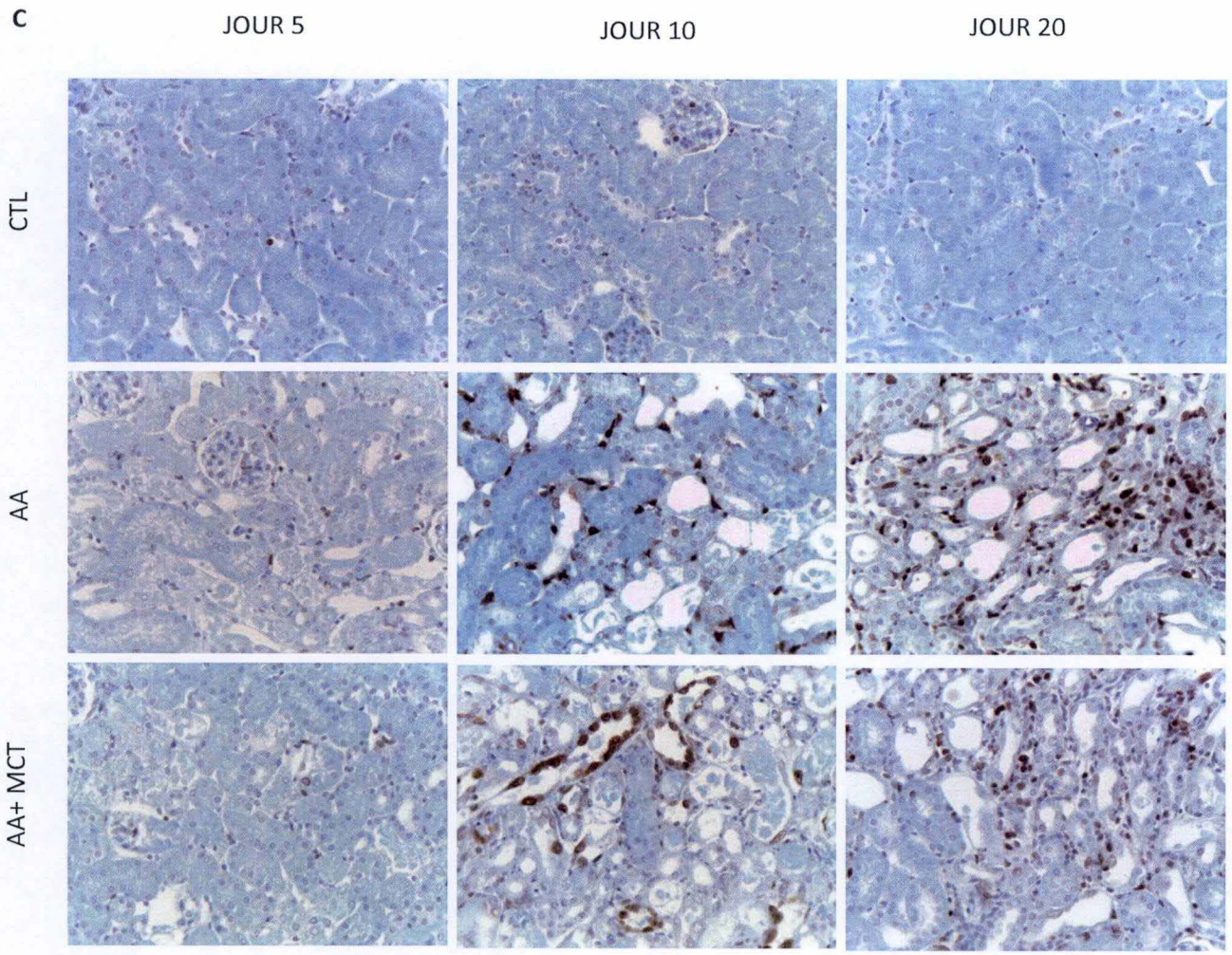


Figure 19. Quantification en pourcentage des cellules des cellules tubulaires (A) ou interstitielles (B) marquées positives au PCNA et illustration de celles-ci aux jours 5, 10 et 20 et. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. * P≤0,05 *vs* le groupe contrôle ; # P≤0,05*vs* le groupe AA.

6. Inflammation

Afin de caractériser le phénomène d'inflammation qui a lieu suite aux lésions tubulaires, différents marqueurs inflammatoires ont été évalués. Parmi ceux-ci, aucune différence significative entre le groupe « contrôle » et le groupe « MCT » n'est observée (Tableau 10 en annexe).

Concernant *MCP-1*, les résultats démontrent que son expression relative en ARNm aux jours 10 et 20 est significativement plus élevée chez les souris « AA » et chez les souris « AA+MCT » en comparaison avec les souris « contrôles » (Figure 20A). Ensuite, la concentration rénale en MCP-1 a été évaluée. On constate que ce paramètre est significativement plus élevé aux jours 5, 10 et 20 chez les souris « AA » comparé aux souris « contrôles ». De plus, la concentration rénale en MCP-1 est également significativement plus élevée aux jours 10 et 20 chez les souris « AA+MCT » comparé aux souris « contrôles ». En outre, l'augmentation est d'autant plus importante chez les souris « AA+MCT » au jour 20 en comparaison aux souris « AA » et aux souris « contrôles » (Figure 20B).

En ce qui concerne *IL-1β* (Figure 20C), on observe que l'expression relative de l'ARNm de cette cytokine est significativement plus élevée au jour 20 dans les deux groupes de souris intoxiquées aux AA par rapport aux souris « contrôles ». De plus, à ce même timing, cette surexpression est significativement plus importante chez les souris « AA+MCT » comparé aux souris « AA ». Le même profil d'expression est observé pour l'expression relative d'ARNm du *TNF-α* (Figure 20D).

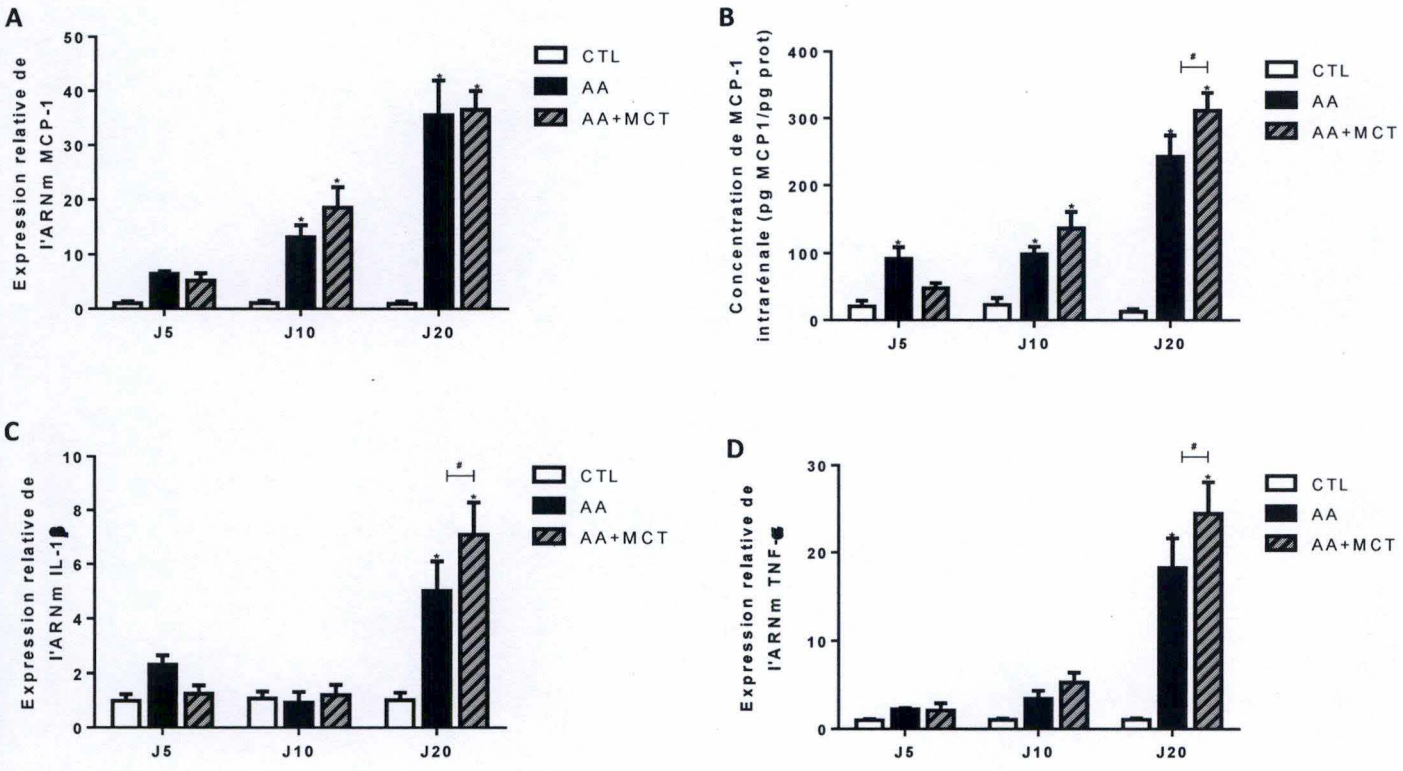


Figure 20. Expression relative de l'ARNm de *MCP-1* (A), concentration en MCP-1 dans le tissu rénal (B) et expression relative de l'ARNm de l'*IL-1β* (C) et du *TNF-α* (D) aux jours 5, 10 et 20 dans les différents groupes expérimentaux. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. * P≤0,05 *vs* le groupe contrôle ; # P≤0,05*vs* le groupe AA.

Ensuite, l'infiltration de cellules inflammatoires, particulièrement les macrophages et les lymphocytes, au sein du tissu rénal a été évaluée. En ce qui concerne les macrophages (Figure 21A), on observe un début d'infiltration de ces cellules au jour 10 dans les deux groupes de souris intoxiquées aux AA mais celle-ci n'est significative que pour le groupe « AA+MCT ». Au jour 20, on constate une augmentation de l'infiltrat de macrophages pour ces deux groupes de souris intoxiquées aux AA et celle-ci est d'autant plus grande chez les souris « AA+MCT ». Ensuite, les résultats concernant les lymphocytes indiquent une augmentation significative du nombre de lymphocytes présents dans le tissu rénal au jour 20 chez les souris « AA » ainsi que chez les souris « AA+MCT » comparé aux souris « contrôles ». Par ailleurs, le traitement au MCT n'a pas montré d'impact sur l'infiltration des lymphocytes au sein du tissu rénal (Figure 21B).

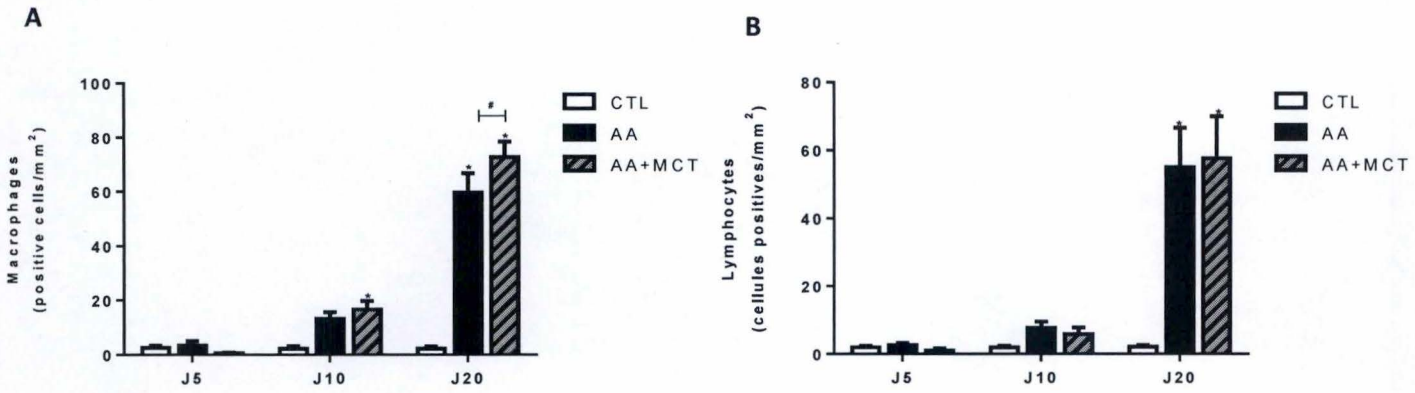


Figure 21. Quantification (A) du nombre de macrophages présents au sein du tissu rénal/mm² et quantification du nombre de lymphocytes présents au sein du tissu rénal/mm² (B) dans les différents groupes expérimentaux aux jours 5, 10 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. * P≤0,05 vs le groupe contrôle ; # P≤0,05vs le groupe AA.

7. Fibrose

Enfin, la fibrose interstitielle, qui est une caractéristique majeure de la phase chronique de la NAA, a été caractérisée à l'aide de différents paramètres. Lors de cette évaluation, on constate qu'il n'y a pas de différence significative entre le groupe « contrôle » et le groupe « MCT » (Tableau 11 en annexe).

Tout d'abord, l'expression relative de l'ARNm des différents facteurs profibrotiques tels que le *TGF-β*, la *périostine*, le *CTGF* et le *PA-1* a été évaluée. Premièrement, l'expression relative du *TGF-β* est significativement plus élevée chez les souris « AA » ainsi que chez les souris « AA+MCT » en comparaison aux souris « contrôles » et ce, aux jours 10 et 20. De plus, à ces différents timings, on constate que les souris « AA+MCT » présentent une surexpression d'ARNm du *TGF-β* significativement plus élevée que celle mesurée chez les souris « AA » (Figure 22A). Concernant la *periostine* (Figure 22B), les résultats démontrent que son expression relative d'ARNm est significativement plus importante chez les souris « AA » et les souris « AA+MCT » en comparaison aux souris « contrôles » et ce, au jour 20. Pour ce qui est du *CTGF* (Figure 22C), *connective tissue growth factor*, on constate que son expression relative aux jours 10 et 20 est significativement plus importante chez les souris « AA » ainsi que chez les souris « AA+MCT » en comparaison avec les souris « contrôles ». Cette surexpression est plus importante au jour 10 chez les souris « AA+MCT ». Finalement, on observe le même profil d'expression relative pour *PA-1*(Figure 22D).

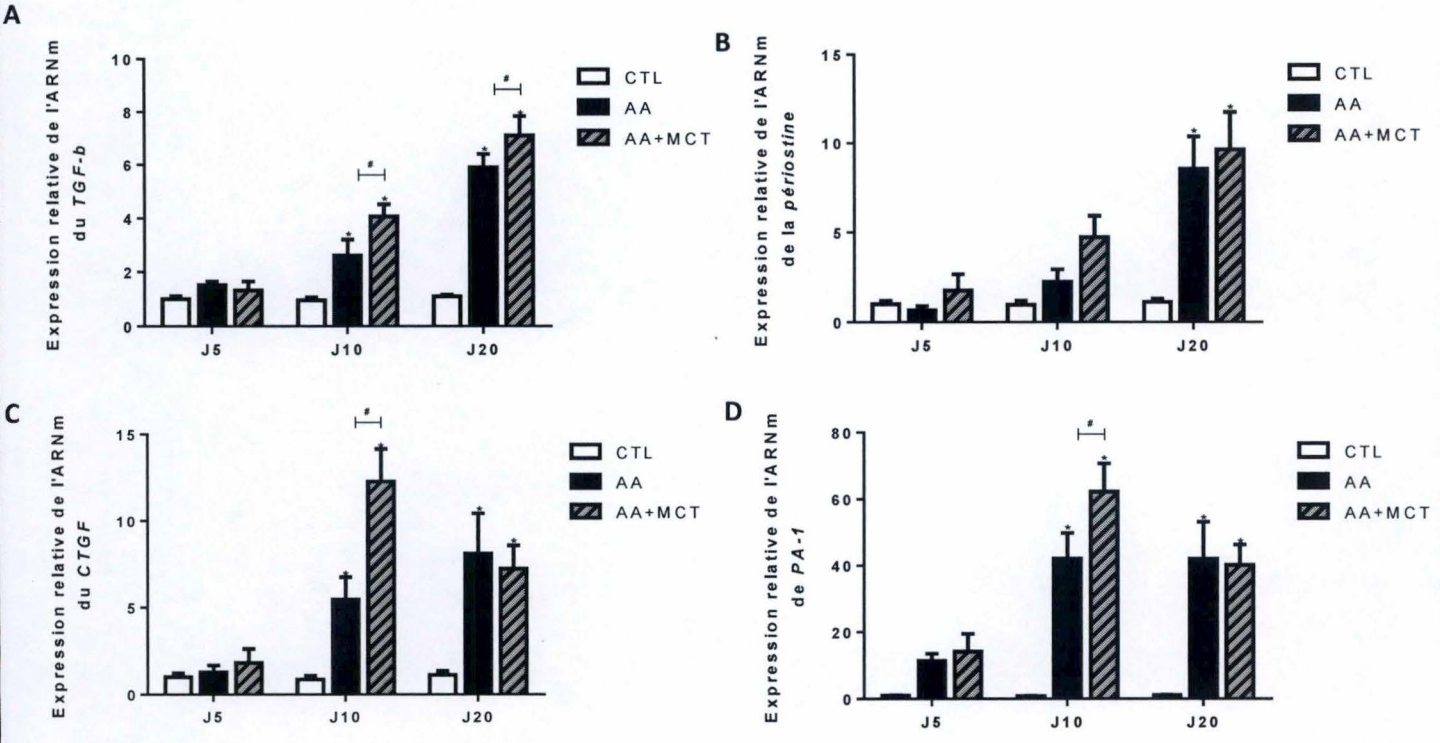


Figure 22. L'expression relative de l'ARNm du *TGF-β* (A) de la *périostine* (B), du *CTGF* (C) et du *PA-1* (D) aux jours 5, 10 et 20 dans les différents groupes expérimentaux. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. * P≤0,05 *vs* le groupe contrôle ; # P≤0,05*vs* le groupe AA.

L'expression relative de l'ARNm des collagènes I et III (*COLI* et *COLIII*), constituants majeurs des dépôts fibrotiques, a été évaluée. Les résultats indiquent que l'expression relative de *COLI* est significativement plus élevée chez les souris « AA » ainsi que chez les souris « AA+MCT » en comparaison avec les souris « contrôles » et ce, aux jours 10 et 20 (Figure 23A). De plus, au jour 20, l'expression relative est significativement plus élevée chez les souris « AA+MCT » par rapport aux souris « AA ». En ce qui concerne l'expression relative de l'ARNm du *COLIII*, aux jours 5 et 10, aucune différence significative n'est observée entre les différents groupes expérimentaux. Par contre au jour 20, le même profil d'expression relative que pour le collagène I au jour 20 est observé (Figure 23B).

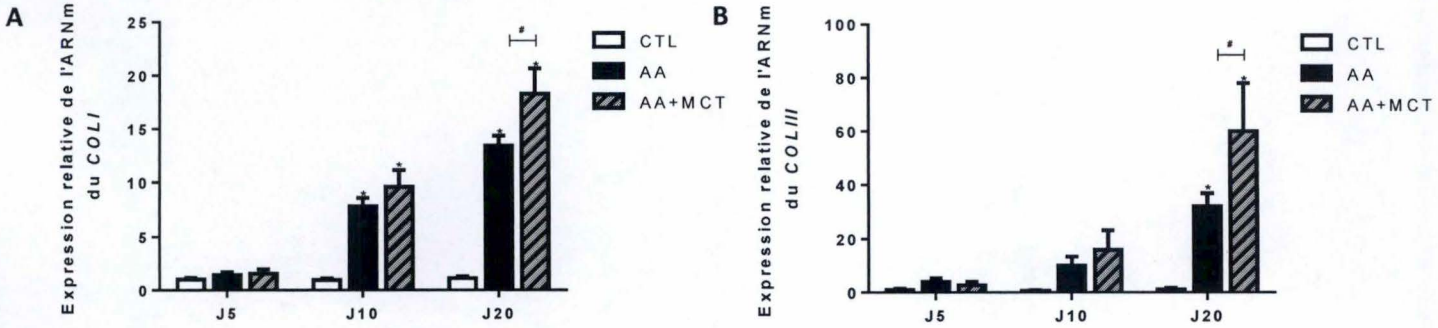


Figure 23. L'expression relative de collagène I (A) et III (B) au jour 5, 10 et 20 dans les différents groupes expérimentaux. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. * P≤0,05 *vs* le groupe contrôle ; # P≤0,05*vs* le groupe AA.

Enfin, une coloration au rouge picrosirius a été réalisée afin de mettre en évidence les fibres de collagène de types I et III. Les résultats montrent une accumulation de collagènes au sein de l'interstitium rénal dans les deux groupes de souris intoxiquées aux AA par rapport aux souris « contrôles » et ce, aux jours 10 et 20. De plus, au jour 20, l'accumulation de fibres de collagène est significativement plus importante chez les souris « AA+MCT » en comparaison aux souris « AA » (Figure 24).

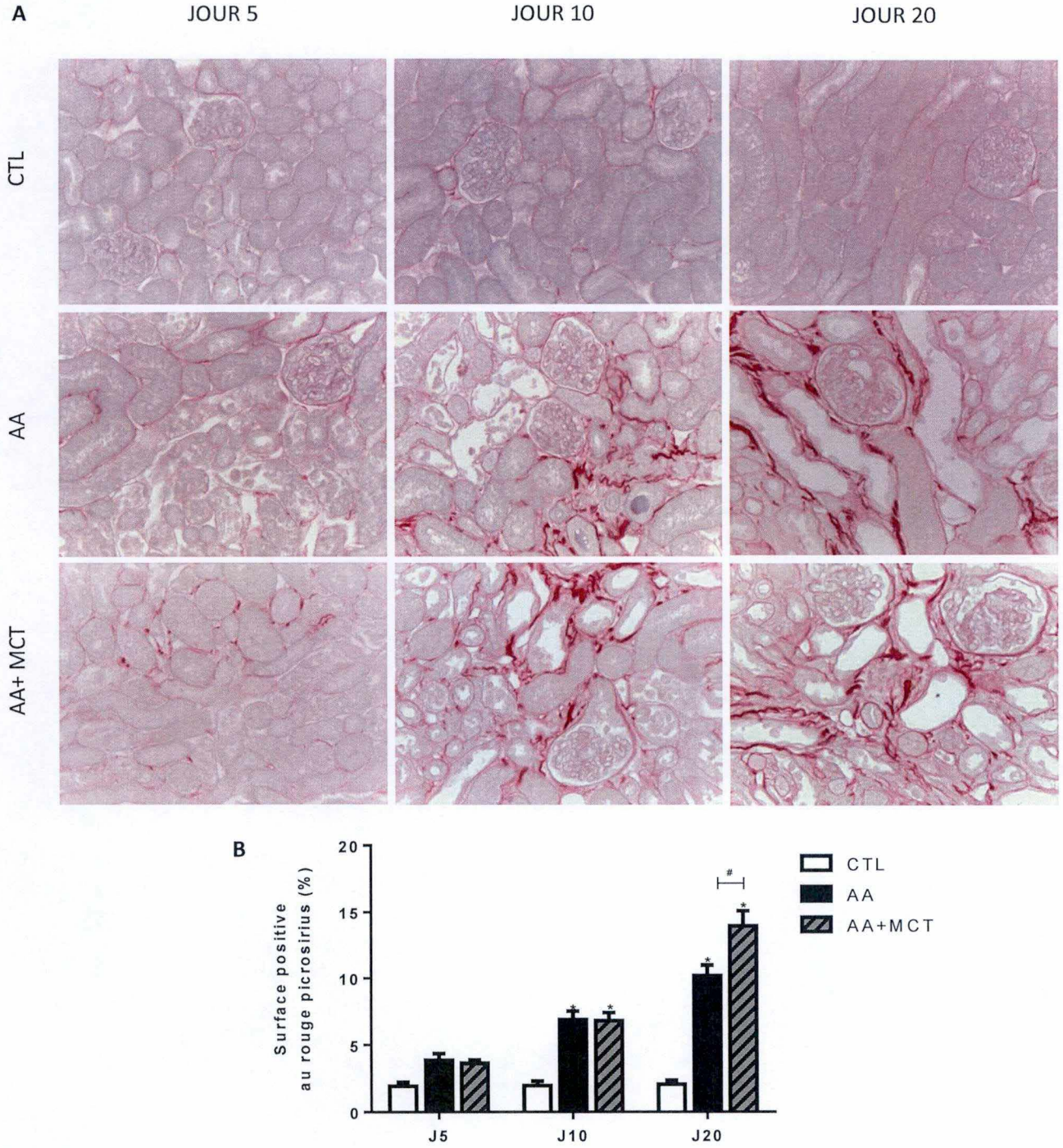


Figure 24. Illustration de la fibrose sur les coupes, rouge=fibrose (A) et quantification de la fibrose (B) pour les différents groupes expérimentaux aux jours 5, 10 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak. * P≤0,05 *vs* le groupe contrôle ; # P≤0,05*vs* le groupe AA.

Discussion

La néphropathie aux acides aristolochiques (NAA) a été identifiée en 1992 en Belgique chez des femmes qui avaient eu recours à un régime amaigrissant. Après différentes analyses phytochimiques, il a été démontré que les pilules amincissantes prescrites contenaient en réalité des acides aristolochiques (AA) (Vanherweghem et al., 1993). Quelques années plus tard, il a été prouvé que les AA étaient à l'origine de cette toxicité rénale (Vanhaelen, 1994). La NAA est depuis lors décrite comme une néphrite tubulo-interstitielle qui à terme progresse vers une insuffisance rénale chronique et le développement de cancers urothéliaux. L'incidence de cette néphrotoxicité est fortement sous-estimée vu la difficulté de son diagnostic et elle constitue dès lors un problème de santé mondial (Nortier, 2015). A l'heure actuelle, les mécanismes pathologiques sous-jacents à cette néphropathie ne sont pas encore totalement clarifiés.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est d'étudier les mécanismes pathologiques impliquant l'endothéline dans un modèle murin de NAA. Dans des études antérieures réalisées au sein de notre laboratoire, il a été observé que la biodisponibilité rénale du NO était diminuée dans ce modèle. Suite à cette observation, il a été démontré qu'en cas de supplémentation de L-Arg dans l'eau de boisson, les souris exposées aux AA présentaient des atteintes rénales atténuées (Declèves et al., 2016). Par ailleurs, dans la littérature, plusieurs études ont établi l'interaction entre les deux médiateurs que nous avons ciblés au cours de notre étude : NO et l'endothéline. En effet, le NO est capable de diminuer la production d'ET-1 (Wen & Li, 2008). En outre, l'expression de l'ARNm d'*ET-1* chez des rats intoxiqués par voie gastro-intestinale avec une dose de 20 mg/kg d'AA est augmentée (Wen & Li, 2008). L'implication de l'endothéline a été étudiée en utilisant des antagonistes des récepteurs dans différentes maladies telles que la néphropathie diabétique (Kohan, 2013 ; Anguiano, 2015), les maladies tubulo-interstitielles (Ong, 2015) ou les glomérulonéphrites (Rodríguez-pascual, 2014) mais également la néphrotoxicité induite par le cisplatine (Helmy, 2014). Cependant, aucune étude n'aborde le lien entre la NAA et l'ET-1. C'est pourquoi nous avons décidé de concentrer nos recherches sur ce système.

Différents modèles décrits dans la littérature ont été mis en œuvre pour étudier les mécanismes physiopathologiques de la NAA. Ainsi, Cosyns et al. ont administré à des lapins les AA par injection intrapéritonéale à une dose de 0,1mg/kg pendant 5 jours. Après 17 et 21 mois, les résultats démontraient la présence d'une fibrose interstitielle ainsi qu'une atrophie tubulaire et un processus de cancérisation (Cosyns et al., 2001). Ces animaux présentaient également une protéinurie et une créatininémie plus importante. Par la suite, un modèle de NAA a également été réalisé chez des rats par Lebeau et son équipe. Au cours de cette étude, les rats avaient reçu des injections sous cutanées à une dose de 10 mg/kg d'un mix des deux dérivées de AA (AAI et AAII) pendant 5 et 35 jours. Les résultats de ce modèle ont démontré qu'une phase aiguë était observée après 3 jours de traitement. Cette phase était caractérisée par une perte de la bordure en brosse des tubules proximaux au niveau du segment S3 et par une augmentation de la concentration urinaire des protéines illustrant l'atteinte rénale. Après 35 jours de traitement, une fibrose rénale apparaissait, caractérisant la phase chronique de la NAA. A ce timing, la créatininémie était également augmentée (Lebeau et al., 2005). Au sein de notre laboratoire, un modèle *in vivo* de NAA a été mis au point chez des souris C57BL/6J auxquelles une dose de 2,5 mg/kg d'AAI a été administrée par injection intrapéritonéale pendant 4 jours consécutifs. Les résultats ont démontré les différentes caractéristiques déjà observées dans d'autres modèles *in vivo* de NAA telles que la présence d'une nécrose du tubule proximal, une réduction de l'expression de la NEP, une augmentation de la créatininémie et une protéinurie (mémoire B. Martin, Declèves et al., 2016), nous permettant ainsi de valider notre modèle.

L'un des premiers objectifs expérimentaux consistait à évaluer dans quelle mesure les AA et le MCT modulaient l'expression de l'ARNm d'*ET-1* et sa concentration urinaire. Nos

résultats mettent en évidence une surexpression de l'ARNm d'*ET-1* à partir du jour 10 dans les deux groupes de souris intoxiquées aux AA comme l'avaient déjà démontré Wen dans un modèle de NAA chez des rats (Wen & Li, 2008) ainsi que Lee, dans un modèle murin de néphrotoxicité induite au cisplatine (Seokwoo Lee, 2008). Cette augmentation pourrait être expliquée par le fait que le NO est capable d'inhiber l'expression d'ARNm d'*ET-1*, alors que le TGF-β, lui, peut l'augmenter. Or, il a été précédemment démontré dans notre laboratoire que la biodisponibilité du NO était diminuée dans notre modèle de NAA, ce qui pourrait donc empêcher cette inhibition (Declèves et al., 2016). En parallèle, il a aussi été largement décrit que l'expression de l'ARNm du *TGF-β* est augmentée lors de la NAA, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'expression relative de l'ARNm d'*ET-1* (Meyers, 2013). De plus, l'expression relative d'ARNm d'*ET-1* est encore plus élevée chez les souris « AA+MCT » au jour 10. Cette différence pourrait être expliquée par le fait que l'ARNm du *TGF-β* est d'autant plus surexprimé dans ce groupe en comparaison au groupe « AA ».

Par la suite, l'excrétion urinaire de l'endothéline a été évaluée afin de compléter les résultats précédents. Nos analyses démontrent que la concentration urinaire en ET-1 est plus importante chez les souris « AA+MCT » au jour 20. Ces données sont similaires à d'autres valeurs observées dans un modèle murin de néphrotoxicité induite au cisplatine (Seokwoo Lee, 2008). A cet égard, plusieurs études ont démontré que l'excrétion urinaire accrue d'ET-1 pouvait être considérée comme un marqueur précoce des maladies rénales (Shin, 1996). Par ailleurs, cette augmentation observée dans notre modèle pourrait résulter de l'augmentation de l'expression de l'ARNm d'*ET-1* dans ce groupe expérimental. Par ailleurs, une autre explication peut être envisagée, en lien avec le fait que la protéinase, qui dégrade ET-1 normalement localisée sur les tubules, est moins abondante puisque les tubules proximaux subissent des lésions. Par conséquent, l'endothéline se retrouve alors en plus grande quantité dans l'urine, étant donné que cette enzyme ne la dégrade plus au sein des tubules proximaux (Schini, 1991). En outre, une hypothèse pouvant expliquer l'augmentation de l'excrétion d'ET-1 dans le groupe « AA+MCT », repose sur l'un des rôles du récepteur ET-B qui est impliqué dans la clairance d'ET-1. En effet, celui-ci est capable d'extraire 50% de la concentration totale en ET-1 du plasma. La liaison d'ET-1 à son récepteur ET-B peut engendrer l'internalisation du complexe ligand-récepteur au sein de la cellule. Une fois dans la cellule, celui-ci sera soit redirigé vers la membrane ou soit dirigé vers les lysosomes en vue de sa dégradation (Maguire, 2015). Par conséquent, lorsque le MCT se lie au récepteur ET-B, le phénomène de clairance n'a plus lieu provoquant probablement l'augmentation de la concentration plasmatique chez les souris « AA+MCT ». Par conséquent, ET-1 pourrait probablement se retrouver dans l'urine. Cependant, il serait tout de même intéressant de doser l'ET-1 dans le plasma, ce qui va être réalisé dans la suite du projet.

Nous avons ensuite tenté de mettre en évidence un impact des AA et du traitement au MCT sur l'expression relative de l'ARNm des récepteurs d'ET-1 au sein du tissu rénal. Les résultats démontrent que l'expression relative de l'ARNm du récepteur *ET-A* est significativement plus élevée chez les souris « AA », ainsi que chez les souris « AA+MCT » au jour 10 et 20. Cette expression relative d'ARNm est plus importante au jour 10 chez les souris « AA » en comparaison avec les souris « AA+MCT ». A propos du récepteur ET-B, on constate que l'expression est significativement diminuée au jour 5 chez les souris « AA » et chez les souris « AA+MCT ». Cette diminution est également observée au jour 10 mais uniquement chez les souris « AA ». La régulation des gènes impliqués dans le système endothéline semble très complexe. En effet, dans certaines études de maladies rénales telles que la néphropathie diabétique (Khan et al., 1999) ou les glomérulonéphrites (Drakopoulos, 2006), l'expression de l'ARNm des deux récepteurs était augmentée. Cependant, dans un modèle murin de néphrotoxicité induite au cisplatine, l'expression de l'ARNm d'*ET-B* était inchangée (Seokwoo

Lee & Ahn, 2008). Dans ces différentes études décrites dans la littérature, les timings choisis pour analyser l'expression de l'ARNm des deux récepteurs varient des nôtres. Par exemple, Khan a étudié l'expression d'ARNm des récepteurs chez des lapins atteints de néphropathie diabétique après 6 mois. Lee a analysé leur expression d'ARNm 72 heures après avoir injecté le cisplatine. Par conséquent, la variabilité du timing d'analyse de l'expression d'ARNm des récepteurs dans les différents modèles de néphropathie pourrait expliquer, en partie, les différences dans les résultats obtenus. Par ailleurs, les animaux utilisés sont différents, ce qui pourrait probablement expliquer cette variabilité.

Ensuite, les paramètres généraux ont été évalués dans les différents groupes expérimentaux. Tout d'abord, le poids corporel est fréquemment mesuré tout au long du protocole. Les résultats démontrent que les souris « AA » ainsi que les souris « AA+MCT » perdent du poids contrairement aux souris « contrôles » dont l'évolution pondérale se poursuit normalement. Au jour 10, on observe que la perte de poids est la plus importante ce qui est à mettre en corrélation avec une diminution significative de la prise de nourriture à ce même timing. Cette perte de poids corporel a déjà été observée lors d'études antérieures dans différents modèles de NAA et intoxiqués via différents types d'administration (Sato et al., 2004; Huang et al., 2013; Declèves et al., 2016). Certaines études suggèrent que cette perte de poids pourrait être due à des problèmes de métabolisation des nutriments (Stevens, 1995). En effet, il a été démontré que la formation d'adduits d'ADN pouvait apparaître dans un bon nombre d'organes tels que la vessie, le foie, l'intestin et l'estomac (Shibutani et al., 2007). Cette formation pourrait alors induire des lésions au sein de ces organes les empêchant de fonctionner correctement. Par ailleurs, les résultats illustrant une diminution de la prise de nourriture avaient déjà été rapportés dans un modèle de lapins intoxiqués aux AA (Cosyns et al., 2001). Des résultats similaires concernant le poids corporel avaient déjà été observés chez des rats atteints de néphropathie au cisplatine traités par un autre antagoniste mixte des récepteurs de l'ET, le bosentan (Jokar, 2015). Ensuite, la quantité d'eau ingérée a été évaluée. On remarque que les deux groupes de souris intoxiquées aux AA boivent plus que les souris « contrôles » au jour 20. Cette observation pourrait être mise en relation avec la diurèse. En effet, les souris boivent probablement plus car la réabsorption rénale de l'eau est altérée suite aux lésions tubulaires. En effet, la diurèse augmente légèrement au jour 5 dans les deux groupes de souris intoxiquées aux AA. Au jour 10, ce paramètre est augmenté dans les deux groupes de souris intoxiquées aux AA mais cette augmentation n'est significative que pour le groupe « AA+MCT ». Au jour 20, elle est significativement plus élevée chez les souris « AA », ainsi que les souris « AA+MCT » par rapport aux souris « contrôles ». De manière simultanée, une diminution de l'osmolarité urinaire est observée dans les deux groupes de souris intoxiquées aux AA. Ces différents résultats ont souvent été observés dans d'autres études (Cui, 2005 ; Chan, 2008 ; Nortier, 2015 ; Declèves et al., 2016). De plus, l'augmentation de la diurèse a aussi été observée chez l'homme (Yang et al., 2011). Par conséquent, ces résultats indiquent bien que l'eau n'est pas correctement réabsorbée à cause des lésions tubulaires observées. En effet, comme expliqué dans l'introduction, ce sont ces tubules proximaux qui réabsorbent en grande partie l'eau. Par conséquent, s'ils sont altérés, ils n'assurent plus leurs fonctions (Lacour, 2013). Par ailleurs, on observe que le MCT n'a pas d'impact sur ces deux paramètres. Cependant, en ce qui concerne la prise d'eau, peu d'études discutent de ce paramètre dans les modèles animaux de NAA. Par contre, dans de nombreux cas humains atteints du syndrome de Fanconi, cette polydipsie a pu être observée (Sangho Lee et al., 2004).

Lors des sacrifices, les reins ont été prélevés et pesés. Les résultats concernant le poids des reins démontrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les différents groupes expérimentaux. Ceci avait déjà été observé dans notre laboratoire dans une étude précédente (Declèves et al., 2016). Par ailleurs, certaines études sur des patients ou sur des modèles de

souris, étudiant la phase chronique de la NAA rapportent une diminution du poids des reins (Reginster, 1997 ;Huang et al., 2013), après une intoxication de 35 jours, alors que dans notre protocole, les souris sont intoxiquées pendant 20 jours. Cette différence de temps d'exposition pourrait probablement expliquer la raison pour laquelle nous n'avons pas observé de différence dans notre modèle. Enfin, le traitement au MCT n'a pas montré d'effet sur ce paramètre.

Ensuite, la protéinurie a été évaluée. Les résultats démontrent qu'au jour 5, la quantité de protéines urinaires est plus importante chez les souris « AA », ainsi que chez les souris « AA+MCT », indiquant que les lésions apparaissent très tôt. Ce résultat avait déjà été observé dans un modèle de rats intoxiqués aux AA (Lebeau et al., 2005) mais aussi chez des patients (Kabanda, 1995). Ce paramètre illustre que les protéines filtrées ne sont probablement pas correctement réabsorbées à cause des lésions tubulaires. En outre, la quantité de protéines dans les urines pourrait également provenir des tubules endommagés. En effet, au jour 5, la lumière tubulaire contient encore des débris cellulaires suite aux lésions engendrées par les AA. De plus, la diminution de la protéinurie aux jours 10 et 20 pourrait être associée à l'initiation d'un processus de réparation/régénération tubulaire, qui pourrait ainsi permettre de récupérer un certain degré de réabsorption (Pozdzik et al., 2008). Par ailleurs, on observe que le MCT n'a pas d'influence sur ce paramètre. Dans d'autres études portant sur la néphropathie diabétique, il a été démontré que le blocage d'ET-A pouvait réduire la protéinurie mais pas celui de l'ET-B (Saleh et al., 2011; Meyers & Sethna, 2013; Maguire, 2015).

Deux autres paramètres permettant d'évaluer la fonction rénale sont les mesures de la créatinine plasmatique et de l'urée plasmatique. La concentration en urée plasmatique est plus importante dans les deux groupes de souris intoxiquées aux AA au jour 10. A la fin du traitement aux AA, l'urémie augmente fortement (J10) et puis diminue en phase chronique comme l'avaient déjà démontré des études sur des souris C3H/HE intoxiquées par un mix d'AA (AAI et AAII) (Sato et al., 2004) et sur des rats intoxiqués aux AAI à une dose de 4mg/ml (Cui et al., 2005). Ce métabolite est considéré comme un marqueur de la fonction de filtration, étant filtré librement et légèrement réabsorbé. Par conséquent, si la quantité plasmatique d'urée augmente, cela reflète une altération de la fonction rénale. Suite à ces observations, on pourrait probablement imaginer que la diminution en phase chronique pourrait mettre en évidence un mécanisme de récupération de la fonction rénale (Sato et al., 2004). Par ailleurs, dans une étude où les souris étaient intoxiquées aux AA, l'urémie était plus importante chez les souris mâles que chez les souris femelles probablement grâce à une protection hormonale chez les femelles (Huang et al., 2013). Finalement, le MCT induit une légère diminution de ce paramètre au jour 10. Des résultats similaires avaient déjà été démontrées dans une autre étude analysant la néphropathie induite par le cisplatine chez des rats (Jokar, 2015). En effet, lors de l'utilisation d'un antagoniste du récepteur ET-A, le BQ-123, l'urémie était diminuée (Helmy et al., 2014).

A propos de la créatinine plasmatique qui est aussi un marqueur de la fonction rénale, on constate que ce paramètre est augmenté aux jours 5, 10 et 20 chez les souris « AA » et chez les souris « AA+MCT ». Ces résultats ont déjà été démontrés dans d'autres études utilisant un modèle murin (Sato et al., 2004) mais également un modèle de lapins (Cosyns et al., 2001). Une augmentation de la créatininémie avait également été observée chez l'homme (Luciano, 2014). En outre, à ce timing, on observe que le traitement au MCT induit une diminution de la créatininémie chez les souris « AA+MCT ». Cependant au jour 20, la diminution de ce facteur pourrait probablement être mise en relation avec un début de récupération de la fonction rénale suite à l'arrêt de l'injection des AA comme l'avait démontré Sato et al. chez des souris et Cui et al. chez des rats (Sato et al., 2004; Cui et al., 2005). Une autre étude concernant les effets du bosentan dans un modèle de néphropathie induite par le cisplatine avait démontré que cet antagoniste mixte pouvait moduler la créatinémie par rapport aux résultats obtenus chez les

animaux contrôles. En effet, après 7 jours de traitement, la concentration plasmatique en créatinine était plus importante dans les groupes intoxiqués au cisplatine. Le bosentan, par contre, n'avait pas d'impact sur ce paramètre comme nos résultats l'ont démontré au jour 5 avec un autre antagoniste mixte (Jokar et al., 2015a).

Après l'étude des paramètres caractérisant la fonction rénale, nous avons évalué la structure tubulaire. Pour ce faire, une analyse histologique a été réalisée, mettant en évidence les différentes lésions rénales. D'abord, on remarque la présence de dommages tubulaires dès le jour 5 chez les souris « AA » et les souris « AA+MCT », contrairement aux souris « contrôles » où la morphologie est intacte. Au jour 5, ce sont principalement des tubules nécrotiques qui ont été mis en évidence. Au jour 10, c'est un stade intermédiaire au cours duquel on observe des tubules nécrotiques et atrophiques. Enfin, au jour 20, on remarque la présence de tubules atrophiques. Par conséquent, cela indique que les lésions tubulaires surviennent très tôt, comme illustré dans des études antérieures (Lebeau et al., 2005 ; Pozdzik et al., 2008; Agnieszka A Pozdzik et al., 2010 ; Declèves et al., 2016). De plus, ces lésions ont également été découvertes chez les patients atteints de la NAA (Yang et al., 2011; Luciano, 2014). Dans la littérature, une évolution biphasique des lésions a été décrite (Lebeau et al., 2005). En effet, au début de l'intoxication, ce sont principalement des castes et des tubules nécrotiques qui sont observés (Declèves et al., 2016). Au jour 35, illustrant la phase chronique, chez le rat, des tubules nécrotiques commencent à être remplacés par des tubules atrophiques, dépourvus de cellules suite à une régénération inefficace (Lebeau et al., 2005). Par ailleurs, le MCT n'a pas montré d'impact sur le nombre de lésions tubulaires. Cette constatation avait déjà été faite dans des études antérieures dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez le rat (Forbes, 2001) et dans un modèle murin de néphrotoxicité au cisplatine (Jokar, 2015).

Après l'apparition des lésions, les tubules pourraient commencer à se régénérer pour tenter de réparer la lésion (Liu, 2011). Nous avons alors évalué le processus de régénération. En effet, il a été montré dans la littérature que la réparation des dommages rénaux après la phase aiguë est provoquée par la régénération et la prolifération des cellules épithéliales saines (Pozdzik et al., 2008). Cette caractéristique a été mise en évidence à l'aide du marquage du PCNA, un cofacteur impliqué dans la réplication de l'ADN. Les résultats de notre étude montrent que le pourcentage de cellules tubulaires marquées est significativement augmenté tout au long du protocole dans le groupe de souris « AA+MCT ». Concernant le groupe « AA », cette augmentation atteint le seuil de signification au jour 20. Ainsi, on peut constater que les cellules prolifèrent pour tenter de réparer les blessures tubulaires (Pozdzik et al., 2008). De plus, la présence de ce cofacteur augmente au fil du temps pour les souris « AA » illustrant probablement qu'il y a plus de cellules lésées qui essaient de se régénérer indiquant la présence de dommages cellulaires plus importants. Les données étaient similaires à celles observées dans la littérature que ce soit chez des rats ischémiques ou chez des rats intoxiqués aux AA (Forbes et al., 2001; A A Pozdzik et al., 2008). En effet, le pourcentage de cellules positives était plus important chez les souris intoxiquées aux AA mais d'autant plus important lorsque les rats ischémiques étaient traités par un antagoniste mixte, SB209670, par rapport aux rats contrôles (Forbes et al., 2001). En ce qui concerne les cellules interstitielles, le nombre de cellules positives au PCNA est plus important dans les deux groupes souris de intoxiquées aux AA. Ici aussi, le pourcentage de cellules interstitielles marquées augmente jusqu'au jour 10. Une hypothèse serait que les cellules mésenchymateuses prolifèrent pour tenter de réparer les lésions. Par contre, le MCT n'a pas montré d'impact sur cette prolifération cellulaire interstitielle. Par ailleurs, dans la NAA observée chez les rats (Pozdzik et al., 2008), il a été démontré qu'après un certain temps, ce marqueur PCNA diminue de plus en plus car la présence d'adduits interfère avec la prolifération des cellules épithéliales du tubule proximal empêchant

ainsi la réparation de l'ADN. Elles ne sont donc plus capables de proliférer (A A Pozdzik et al., 2008).

De nombreuses études ont démontré que, suite à une agression rénale d'origine toxique, l'ARNm du *NGAL* est fortement exprimé par les tubules lésés. Il pourrait ainsi avoir un rôle dans la régénération du tissu endommagé (Mishra et al., 2005). En effet, plusieurs études ont émis l'hypothèse que ce facteur pourrait être exprimé lors des lésions dans le but d'induire la reconstruction des tubules en stimulant la formation des cellules épithéliales à partir des cellules mésenchymateuses (Huot, 2012). Au cours de notre étude, on constate que l'expression de l'ARNm du *NGAL* est plus importante chez les souris « AA » comme observé dans d'autres études étudiant la néphrotoxicité induite par le cisplatine (Mishra et al., 2004). Par ailleurs, on observe qu'elle est d'autant plus importante chez les souris « AA+MCT » au jour 10. Cette surexpression observée dans ce groupe pourrait être due aux processus inflammatoires qui sont accrus (voir paragraphes suivants) dans ce groupe expérimental (Ding et al., 2007). En effet, le NGAL a aussi été considéré comme un médiateur de la réponse immunitaire (Castellano et al., 2013). Par conséquent, son expression est augmentée lors des processus inflammatoire. De plus, on pourrait probablement identifier ce gène comme un médiateur de la transition entre l'insuffisance rénale aiguë et chronique qui se produit au jour 10 chez les souris (Ko et al., 2010). En effet, c'est à ce timing qu'on relève une modulation de l'expression relative de l'ARNm plus importante de ce facteur.

Par la suite, nous avons évalué le processus inflammatoire. A ce sujet, il a été démontré que les lésions tubulaires induisaient la formation de niches pro-inflammatoires composées de cytokines chimiotactiques qui vont orienter les cellules inflammatoires vers le site lésé (Liu, 2011). Ces résultats concordent avec ceux que nous avons obtenus. En effet, les expressions relatives d'ARNm de molécules pro-inflammatoires telles que *MCP-1*, *IL-1β*, *TNF-α* ont été évaluées. Tout abord, l'expression de l'ARNm de *MCP-1* est significativement augmentée à partir du jour 5 chez les souris « AA+MCT » et à partir du jour 10 chez les souris « AA » comme l'avait également observé l'équipe de Pozdzik et al. dans un modèle de NAA chez le rat (Pozdzik et al., 2008). De plus, l'analyse de la concentration intra-rénale de cette cytokine concorde également avec les niveaux d'expression de l'ARNm. A ce sujet, la persistance de cette cytokine pourrait être associée à la persistance de l'inflammation en phase chronique (Pozdzik et al., 2008). Par ailleurs, en phase chronique, la concentration en MCP-1 est plus importante chez les souris « AA+MCT ». Dans la littérature, il a été mentionné que lorsque les cellules mésangiales étaient soumises à une stimulation d'ET-1, l'expression d'ARNm de *MCP-1* augmentait. Curieusement, si ces cellules étaient prétraitées avec un antagoniste du récepteur ET-A, BQ-123, l'expression d'ARNm de *MCP-1* mais également sa concentration protéique diminuaient de manière significative. Par ailleurs, lorsqu'un antagoniste du récepteur ET-B était utilisé, cette diminution n'était pas significative (Simonson & Ismail-beigi, 2011). Par conséquent, on pourrait penser que c'est via son récepteur ET-A qu'ET-1 induit une surexpression de *MCP-1*. Par conséquent, bloquer ET-B pourrait s'avérer inutile voir même négatif.

Concernant l'IL-1β, ce facteur est impliqué dans divers mécanismes inflammatoires. Il est principalement produit par les macrophages et les fibroblastes ce qui pourrait probablement expliquer la raison pour laquelle l'expression de l'ARNm aux jours 5 et 10 n'est pas plus importante. En effet, à ce timing-là, les macrophages ne sont pas encore présents en grande quantité au sein du tissu. C'est seulement au jour 20 que les macrophages sont observés dans le rein des souris « AA » et des souris « AA+MCT ». Par conséquent, l'infiltration des macrophages pourrait expliquer la surexpression de l'ARNm de cette cytokine à ce timing. De plus, l'infiltration des macrophages est plus importante chez les souris « AA+MCT », expliquant probablement la différence d'expression entre les deux groupes de souris

intoxiquées aux AA. Il est possible que cette augmentation d'expression d'ARNm d'*IL-1β* serait due à la production de cette cytokine par les macrophages probablement dans le but de recruter plus de cellules pour augmenter le processus d'inflammation. En effet, le nombre de cellules immunocompétentes augmente au cours du temps.

Par la suite, nous avons évalué le comportement du TNF-α qui est un médiateur pro-inflammatoire mais aussi pro-apoptotique (Eddy, 2000). En effet, ce facteur est capable de promouvoir la réponse inflammatoire en stimulant la phagocytose réalisée par les macrophages mais aussi en induisant l'adhérence des leucocytes pour permettre leur recrutement (Kowalczyk, 2015). Les résultats d'expression relative d'ARNm du *TNF-α* sont similaires à ceux observés pour l'*IL-1β* comme l'avait déjà démontré Pozdzik et al. (Agnieszka A Pozdzik et al., 2008). Par ailleurs, son expression peut être mise en relation avec l'infiltration lymphocytaire. En effet, l'augmentation de l'infiltration de ces cellules apparaît au jour 20, lorsque l'expression de l'ARNm du *TNF-α* est augmentée. Par ailleurs, le TNF-α est aussi capable de stimuler la prolifération des fibroblastes et la synthèse des collagènes (Eddy, 2000). Cette fonction pourrait expliquer la raison pour laquelle on retrouve encore cette cytokine inflammatoire en phase chronique. En outre, le TNF-α est aussi capable d'activer les caspases et d'augmenter les protéines pro-apoptotiques (Helmy et al., 2014). Concernant le MCT, on remarque que ce traitement peut intensifier cette expression d'ARNm au jour 20. Dans une étude utilisant des macrophages en culture, il a été démontré qu'ET-1 pouvait augmenter la libération du TNF-α via l'activation du récepteur ET-A. En effet, cette même étude en utilisant des macrophages traités par un antagoniste du récepteur ET-A, le BQ-123, a démontré une diminution de la concentration en TNF-α ou en l'IL-β (Ruetten, 1997). Par contre, le blocage du récepteur ET-B, BQ-788, quant à lui ne modifie pas les concentrations plasmatiques du TNF-α (Piechota-polañczyk & Gorca, 2012).

Suite à ce recrutement de cytokines, une infiltration de cellules immunitaires telles que les macrophages et les lymphocytes va alors se produire (Liu, 2011). En effet, les résultats démontrent qu'au jour 20, les souris « AA » ainsi que les souris « AA+MCT » présentent une infiltration de lymphocytes autour des tubules lésés. Ces données coïncident avec celles décrites dans la littérature dans des modèles de néphrotoxicité chez le rat ainsi que chez les patients (Lo et al., 2004; A A Pozdzik et al., 2008; Pozdzik et al., 2010). Le MCT, par contre, n'a pas montré d'impact sur ce paramètre. En ce qui concerne les macrophages, ceux-ci sont généralement attirés et activés par MCP-1 (Duffield, 2014). Ces données concordent avec nos résultats. En effet, le nombre de macrophages est plus important en phase chronique et ceci est à mettre en corrélation avec l'augmentation d'expression d'ARNm et protéique de MCP-1.

Finalement, l'inflammation persistante entraîne le développement du processus de fibrose (Liu, 2011). En effet, les cellules inflammatoires vont produire des cytokines et des facteurs pro-fibrotiques tels que le TGF-β, PA-1, CTGF (Liu, 2011). Concernant le TGF-β, il a été démontré que ce facteur pouvait augmenter la transcription de gènes de la matrice extracellulaire tels que celui codant pour le collagène I et III ou encore moduler les inhibiteurs des enzymes de dégradation de la matrice (Agnieszka A Pozdzik et al., 2008). De plus, il pouvait également induire l'attraction des cellules inflammatoires (Khan et al., 1999) mais également promouvoir la transformation des fibroblastes en myofibroblastes (Eddy, 2000). Toutes ces actions font partie intégrale du processus de fibrogenèse. Lors de cette étude, nos résultats montrent que l'expression d'ARNm du *TGF-β* est augmentée chez les souris intoxiquées aux AA comme il a déjà été observé dans d'autres études (Agnieszka A Pozdzik et al., 2008). De plus, cette surexpression d'ARNm est d'autant plus élevée chez les souris « AA+MCT ». L'augmentation d'expression de l'ARNm de ce facteur pourrait probablement être liée au fait que la réponse inflammatoire semble être exacerbée avec le traitement au MCT.

Il a aussi été démontré que le TGF-β avait un impact sur d'autres médiateurs de la fibrose tels que la périostine (Mael-ainin, 2014). Celle-ci semble être impliquée dans l'inflammation et dans la fibrose en régulant l'accumulation du collagène (Mael-ainin et al., 2014). En effet, il a été décrit que son expression, en conditions physiologiques, est très faible. Cependant, après le développement de lésions rénales, sa transcription peut augmenter comme démontré dans notre modèle; en effet, l'expression d'ARNm de la *périostine* est significativement plus élevée chez les souris intoxiquées aux AA au jour 20. Cette augmentation est à mettre en corrélation avec la surexpression de l'ARNm du *TGF-β* étant donné qu'il a été décrit que la périostine était régulée par le TGF-β (Mael-ainin et al., 2014).

Deux autres médiateurs du processus de fibrose ont été mis en évidence: CTGF et PA-1. Tout d'abord, CTGF est impliqué dans la prolifération des fibroblastes mais aussi dans la synthèse de la matrice extracellulaire. Il joue donc un rôle majeur dans le processus de fibrose (Eddy, 2000; Liu, 2011). Dans notre modèle, l'expression relative de l'ARNm du *CTGF* est significativement plus élevée chez les souris « AA » ainsi que chez les souris « AA+MCT » à partir du jour 10. Ces résultats ont déjà été observés chez des patients intoxiqués aux AA (Yang, 2007). De plus, cette expression d'ARNm est d'autant plus importante si les souris intoxiquées sont en plus traitées avec du MCT. Des résultats similaires ont été observés dans une étude portant sur des fibroblastes pulmonaires en culture. Il a ainsi été démontré qu'ET-1 induisait l'expression de *CTGF* via son récepteur ET-A. En effet, l'utilisation d'un antagoniste du récepteur ET-A, le BQ-123, pouvait réduire l'expression de ce facteur contrairement à un antagoniste du récepteur ET-B. Par conséquent, une hypothèse serait que ces deux récepteurs semblent avoir des effets antagonistes concernant le processus de fibrogenèse (Weng, 2014).

En ce qui concerne le PA-1, *plasminogen activator inhibitor,* il est également impliqué dans le processus de fibrose en inhibant les enzymes qui dégradent la matrice (Ghosh, 2012), provoquant ainsi une accumulation excessive de collagène. PA-1 est synthétisé par les fibroblastes, les macrophages et les cellules endothéliales. Il est aussi stimulé par le TGF-β et l'IL-1β. Un lien étroit a déjà été démontré entre la fibrose rénale et la concentration rénale en PA-1 (Ghosh, 2012). Dans notre étude, l'expression de l'ARNm de *PA-1* est similaire à celui du *CTGF*. L'augmentation de son expression pourrait être en relation avec l'augmentation du nombre de macrophages présents dans le milieu interstitiel mais également avec celle de l'expression du *TGF-β*. Ces deux derniers médiateurs, CTGF et PA-1, pourraient avoir un rôle prédominant lors de la transition entre les deux phases puisque qu'ils sont particulièrement surexprimés au jour 10.

Suite à l'évaluation de ces différents facteurs, nous avons décidé de mettre en évidence l'accumulation de fibres de collagène dans le milieu interstitiel. En effet, la fibrose résulte avant tout d'une accumulation de fibres de collagènes I et III dans l'interstitium rénal. Ces fibres sont majoritairement produites par les myofibroblastes issus de l'activation des fibroblastes résidents. Pour évaluer ce processus, nous avons analysé l'expression de l'ARNm des *collagènes I* et *III*. Nos résultats démontrent que l'expression de l'ARNm de ces gènes est augmentée chez les souris « AA » et les souris « AA+MCT ». Les valeurs obtenues dans notre étude sont similaires à celles observées dans la littérature (Pozdzik et al., 2008). De plus, une surexpression de l'ARNm est observée chez les souris « AA+MCT » au jour 20. Ce résultat indique que le traitement au MCT a tendance à exacerber le processus de fibrose. En effet, ces résultats ont été confirmés par une analyse histologique à l'aide d'une coloration au un rouge picrosirius. En effet, cette accumulation de collagène est plus importante chez les souris « AA » et d'autant plus chez les souris « AA+MCT ». Dans un modèle de néphropathie diabétique chez le rat, il a été démontré que le récepteur ET-B avait une action anti-fibrotique contrairement au récepteur ET-A. Ce résultat indique que le fait de bloquer uniquement le récepteur ET-A pourrait empêcher l'apparition du processus de fibrose et induire une action anti-fibrotique

(Saleh et al., 2011). Dans une autre étude sur la maladie rénale polykystique chez des rats, il a été démontré que l'utilisation d'un antagoniste mixte pouvait augmenter la fibrose présente au sein du rein. L'apparition d'une fibrose accrue et ce, après avoir bloqué les récepteurs serait probablement causée par des facteurs hémodynamiques dépendants de l'endothéline. En effet, ces facteurs modulés pourraient alors induire une microcirculation rénale diminuée entrainant l'apparition de la fibrose (Godes, 2003).

1. Conclusions et perspectives

Au terme de ce travail, nous pouvons considérer que notre modèle murin de NAA reproduit bien les différentes caractéristiques de la NAA. En effet, les différents paramètres évalués illustrent de nombreuses similitudes aux modèles *in vivo* décrits dans la littérature mais aussi aux cas de patients suite à une exposition aux AA. Durant ce protocole, nous avons décidé d'étudier l'implication potentielle de l'endothéline parce qu'il avait été rapporté qu'ET-1 est impliquée dans de nombreuses néphropathies. Plus particulièrement, il avait déjà été décrit qu'ET-1 était surexprimé dans un modèle de NAA chez le rat (Wen & Li, 2008). Dès lors, notre stratégie était d'administrer un antagoniste mixte des récepteurs d'ET-1 dans notre modèle murin de NAA. Suite à ce traitement, nous avons pu observer que le MCT semble exacerber les processus inflammatoires et fibrotiques.

En conclusion, les résultats démontrent que l'insuffisance rénale survient très tôt lors du protocole expérimental. En effet, les lésions tubulaires apparaissent à partir du jour 5 en phase aiguë et évoluent jusqu'en phase chronique. Lors de la première phase, l'aiguë, on observe des tubules nécrotiques qui progressent ensuite en tubules atrophiques caractérisant la phase chronique.

Une fois que les lésions apparaissent, un mécanisme inflammatoire se met en place. Ce mécanisme a été mis en évidence par l'analyse de l'expression relative de cytokines inflammatoires. Les résultats démontrent que les AA induisent une surexpression de l'ARNm de ces cytokines indiquant que l'inflammation est bien présente. Par ailleurs, on observe que le MCT augmente d'autant plus le processus inflammatoire. L'inflammation, qui est maintenue tout au long du protocole va promouvoir la fibrogenèse via un facteur principal, le TGF-β. Dans de nombreuses études, on identifie le TGF-β comme le lien entre les deux phénomènes.

Malgré la tentative de régénération, on remarque que le processus de fibrose se met en place à partir du jour 10 jusqu'au jour 20. De plus, ce processus évolue au cours du protocole et semble être exacerbé avec le traitement au MCT.

Différentes perspectives peuvent être intéressantes à aborder. En effet, il serait intéressant d'évaluer comment évolue l'insuffisance rénale après 20 jours de protocole étant donné que nos résultats révèlent une tentative de récupération sur le long-terme suite à la diminution de la créatininémie au jour 20. De plus, il serait peut-être intéressant de voir comment la maladie rénale évolue lorsque le MCT est administré chez des souris déjà intoxiquées.

Par ailleurs, beaucoup d'études relatent l'implication du récepteur ET-A à lui seul dans l'apparition des dommages cellulaires. C'est pourquoi, il serait intéressant d'utiliser un antagoniste bloquant uniquement le récepteur ET-A. En effet, des études ont déjà démontré des effets bénéfiques d'un tel traitement sur les néphropathies induites par des agents toxiques (Helmy et al., 2014).

Une autre perspective pour contrer les effets négatifs de l'endothéline serait d'empêcher sa surexpression en conditions pathologiques, plus particulièrement en cas de NAA. Pour ce faire,

on pourrait envisager l'utilisation de la technique d'interférence d'ARN. En effet, via cette technique on pourrait silencer le gène (Li et al., 2010). Une autre approche serait d'inhiber l'enzyme de conversion de l'endothéline par des inhibiteurs de cette enzyme ou en utilisant des souris KO pour cette enzyme. En effet, il a déjà été démontré dans une étude portant sur les problèmes cardiaques (Miyagawa et al., 2010), que lorsqu'on utilisait ces souris, les défauts étaient diminués.

Enfin, il serait peut-être intéressant d'évaluer l'intégrité du compartiment vasculaire pour évaluer la présence d'une ischémie rénale. En effet, l'endothéline est un agent vasoconstricteur, il pourrait ainsi moduler le flux sanguin et induire des déficits en oxygène et en nutriments pouvant contribuer aux dommages tubulaires. Pour ce faire, on pourrait réaliser un marquage de l'isolectine B4. Il permet de mettre en évidence les cellules endothéliales et donc de donner une idée sur l'intégrité du compartiment vasculaire. On pourrait également évaluer l'expression d'ARNm du *VEGF* et doser sa concentration protéique. Celui-ci est un facteur de croissance qui est stimulé lorsque le compartiment vasculaire est altéré afin de promouvoir l'angiogénèse.

Annexe

1. Endothéline

	Jour 5		Jour 10		Jour 20	
	Contrôle	Macitentan	Contrôle	Macitentan	Contrôle	Macitentan
ARNm *ET-1*	1 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2
Excrétion d'ET-1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2
ARNm *ET-A*	1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,1 ± 1,1	1,3 ± 0,1
ARNm *ET-B*	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1

Tableau 5. Tableau reprenant la comparaison entre le groupe contrôle et le groupe macitentan pour les différents paramètres évalués aux jours 5, 10 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak.

2. Paramètres de base

	Jour 5		Jour 10		Jour 20	
	Contrôle	Macitentan	Contrôle	Macitentan	Contrôle	Macitentan
Variation du poids corporel	8,2 ± 1,2	5,7 ± 1,3	13,9 ± 2,8	17,7 ± 2,6	16,5 ± 3,6	17,3 ± 1,9
Poids des reins	306,9 ± 16,6	286,6 ± 10,9	294,5 ± 13,0	287,5 ± 12,9	310,2 ± 19,2	282,8 ± 12,1
Quantité d'eau ingérée	5,3 ± 0,4	5,3 ± 0,3	5,2 ± 0,3	4,7 ± 0,3	5,1 ± 0,3	5,7 ± 0,3
Quantité de nourriture ingérée	4,6 ± 0,2	4,9 ± 0,2	4,7 ± 0,2	4,9 ± 0,2	4,9 ± 0,2	5,3 ± 0,4

Tableau 6. Tableau reprenant la comparaison entre le groupe contrôle et le groupe macitentan pour les différents paramètres évalués aux jours 5, 10 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak.

3. Fonction rénale

	Jour 5		Jour 10		Jour 20	
	Contrôle	Macitentan	Contrôle	Macitentan	Contrôle	Macitentan
Osmolarité	4664 ± 710	4919 ± 275	4474 ± 958	4279 ± 352	4458 ± 515	4830 ± 341
Diurèse	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1
Protéinurie	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9±0,1
Urée plasmatique	12,0 ± 1,1	11,1 ± 2,7	12,2 ± 1,3	11,5 ± 3,3	12,8 ± 0,9	8,7±1,3
Créatinine plasmatique	6,2 ± 0,4	5,6 ± 0,3	5,9 ± 0,4	5,6 ± 0,4	6,3 ± 0,4	5,6±0,4

Tableau 7. Tableau reprenant la comparaison entre le groupe contrôle et le groupe macitentan pour les différents paramètres évalués. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak.

4. Les dommages tubulaires

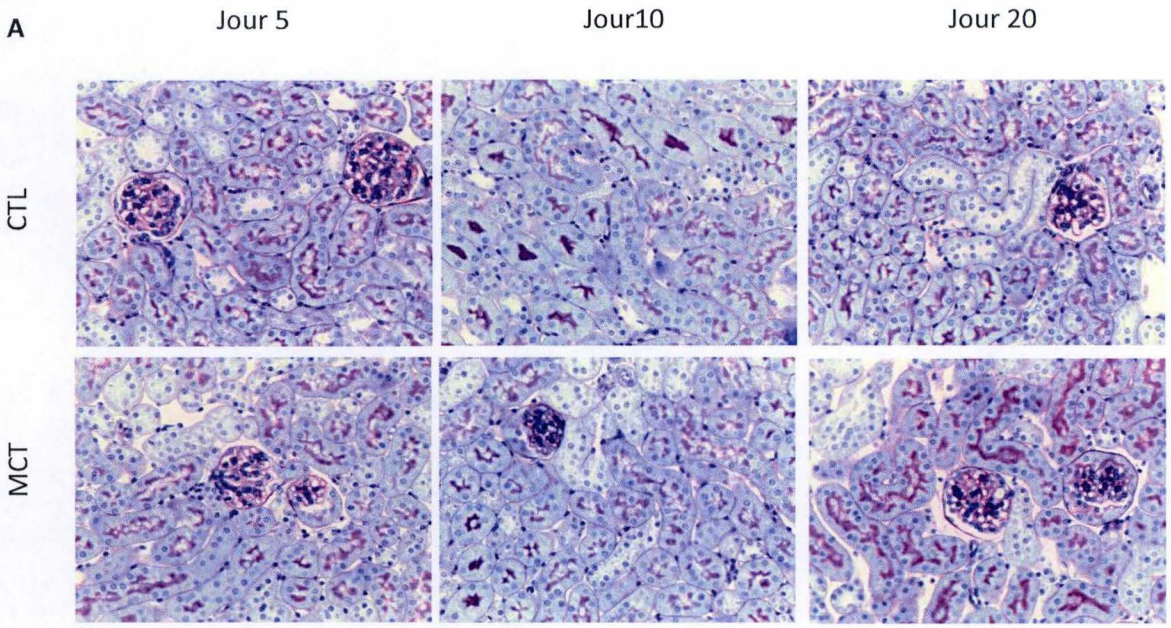


Figure 25. Illustration de la structure rénale dans le groupe contrôle et dans le groupe macitentan (grossissement 400x).

	Jour 5		Jour 10		Jour 20	
	Contrôle	**Macitentan**	**Contrôle**	**Macitentan**	**Contrôle**	**Macitentan**
Score de lésions tubulaires	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,2
ARNm *NGAL*	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1

Tableau 8. Tableau reprenant la comparaison entre le groupe contrôle et le groupe macitentan pour les différents paramètres évalués aux jours 5, 10 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak.

5. La prolifération cellulaire

	Jour 5		Jour 10		Jour 20	
	Contrôle	**Macitentan**	**Contrôle**	**Macitentan**	**Contrôle**	**Macitentan**
Cellules interstitielles positives au PCNA	5,1 ± 1,2	3,9 ± 0,6	5,4 ± 1,3	4,2 ± 0,7	4,3 ± 1,0	3,6 ± 0,6
Cellules tubulaires positives au PCNA	1,4 ± 0,5	0,8 ± 0,2	1,5 ± 0,5	0,8 ± 0,2	1,3 ± 0,5	0,7 ± 0,1

Tableau 9. Tableau reprenant la comparaison entre le groupe contrôle et le groupe macitentan pour les différents paramètres évalués aux jours 5, 10 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak.

6. Inflammation

	Jour 5		Jour 10		Jour 20	
	Contrôle	Macitentan	Contrôle	Macitentan	Contrôle	Macitentan
ARNm *MCP-1*	1 ± 0,4	0,5 ± 0,1	1,1 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,4	0,5 ± 0,1
ARNm *TNF-α*	1 ± 0,2	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,1
ARNm *IL-1β*	0,999 ± 0,2	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,3	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,3	0,6 ± 0,1
Concentration MCP-1 intrarénale	5,1 ± 1,2	3,9 ± 0,6	5,4 ± 1,3	4,3 ± 0,7	4,3 ± 1,0	3,571 ± 0,6
Lymphocytes	1,9 ± 0,5	2,1 ± 0,3	1,9 ± 0,5	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,5	2,2 ± 0,3
Macrophages	2,2 ± 0,9	2,2 ± 0,6	2,2 ± 0,9	1,8 ± 0,6	2,2 ± 0,9	2,3 ± 0,8

Tableau 10. Tableau reprenant la comparaison entre le groupe contrôle et le groupe macitentan pour les différents paramètres évalués aux jours 5, 10 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak.

7. Fibrose

	Jour 5		Jour 10		Jour 20	
	Contrôle	Macitentan	Contrôle	Macitentan	Contrôle	Macitentan
ARNm *Périostine*	1 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,3
ARNm *CTG-F*	1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2
ARNm *PA-1*	1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1
ARNm *TGF-β*	1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1
ARNm *COL I*	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2
ARNm *COL III*	0,9 ± 0,5	1,4 ± 0,7	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2	1,2 ± 0,5	1,6 ± 0,8
Rouge picrosirius	1,9 ± 0,3	2,2 ± 0,4	1,9 ± 0,3	1,9 ± 0,4	2,1 ± 0,4	2,5 ± 0,4

Tableau 11. Tableau reprenant la comparaison entre le groupe contrôle et le groupe macitentan pour les différents paramètres évalués aux jours 5, 10 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à une analyse de type 2 suivie d'un test de comparaison multiple de Holm-Sidak.

Bibliographie

Bibliographie

Anguiano, L., Riera, M., Pascual, J., & Soler, M. (2015). Endothelin Blockade in Diabetic Kidney Disease. *Journal of Clinical Medicine*, *4*(6), 1171–1192. http://doi.org/10.3390/jcm4061171

Anzai, N., Kanai, Y., & Endou, H. (2006). Review Organic Anion Transporter Family : Current Knowledge. *Journal of Pharmacological Sciences*, *100*, 411–426.

Arlt, V. M., Stiborova, M., & Schmeiser, H. H. (2002). Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies : a review. *Mutagenesis*, *17*(4), 265–277.

Babu, E., Takeda, M., Nishida, R., Noshiro-kofuji, R., Yoshida, M., & Ueda, S. (2010). Interactions of Human Organic Anion Transporters With Aristolochic Acids. *J Pharmacol Sci*, *196*, 192–196. http://doi.org/10.1254/jphs.09339SC

Bakhiya, N., Arlt, V. M., Bahn, A., Burckhardt, G., Phillips, D. H., & Glatt, H. (2009). Molecular evidence for an involvement of organic anion transporters (OATs) in aristolochic acid nephropathy. *Toxicology*, *264*, 74–79. http://doi.org/10.1016/j.tox.2009.07.014

Barton, L. L. (2003). Aristolochic Acid , an Herbal Carcinogen , Sold on the Web after FDA Alert. *The New England Journal of Medecine*, 1576–1577.

Benigni, A., & Remuzzi, G. (1999). New drug classes Endothelin antagonists. *The Lancet*, *353*, 133–138.

Boesen, E. I. (2015). Endothelin receptors , renal effects and blood pressure. *Current Opinion in Pharmacology*, *21*, 25–34. http://doi.org/10.1016/j.coph.2014.12.007

Castellano, G., Cafiero, C., Divella, C., Sallustio, F., Gigante, M., Gesualdo, L., … Kim, H.-K. (2013). Immune and inflammatory mechanisms. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *28*(suppl 1), i406–i414. http://doi.org/10.1093/ndt/gft142

Chabrier, P. E., & Braquet, P. (1990). Endothelin. *Horm Res*.

Chan, W., & Cai, Z. (2008). Aristolochic acid induced changes in the metabolic profile of rat urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *46*, 757–762. http://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.11.042

Chen, Y., Chung, J., Wu, H., Bau, D., & Wu, K. (2010). Aristolochic acid suppresses DNA repair and triggers oxidative DNA damage in human kidney proximal tubular cells. *Oncology Reports*, (91), 141–153. http://doi.org/10.3892/or

Cosyns, J. P., Dehoux, J. P., Guiot, Y., Goebbels, R. M., Robert, A., Bernard, A. M., & Van Ypersele De Strihou, C. (2001). Chronic aristolochic acid toxicity in rabbits: A model of Chinese herbs nephropathy? *Kidney International*, *59*(6), 2164–2173. http://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.0590062164.x

Cui, M., Liu, Z. H., Qiu, Q., Li, H., & Li, L. S. (2005). Tumour induction in rats following exposure to short-term high dose aristolochic acid I. *Mutagenesis*, *20*(1), 45–49. http://doi.org/10.1093/mutage/gei007

Davidson, A. (2008). Mouse kidney development. *StemBook*, 1–30. http://doi.org/10.3824/stembook.1.34.1

Debelle, F. D., Vanherweghem, J., & L., N. J. (2008). Aristolochic acid nephropathy : A worldwide problem. *Kidney International*, *74*(June 1990), 158–169. http://doi.org/10.1038/ki.2008.129

Debelle, F., Vanherweghem, J.-L., & Nortier, J. (2009). Néphropathie aux acides aristolochiques : de l ' observation clinique au modèle expérimental NÉPHROPATHIE « AUX PLANTES CHINOISES ». *Flammarion Médecine-Sciences-Actualté Néphrologique*, *74*, 431–436.

Declèves, A.-E., Jadot, I., Colombaro, V., Martin, B., Voisin, V., & Caron, N. (2016). Protective effect of nitric oxide in aristolochic acid-induced toxic acute kidney injury : an old friend with new assets. *Experimental Physiology*, *1*(October 2015), 193–206. http://doi.org/10.1113/EP085333

Dhaun, N., Goddard, J., & Webb, D. J. (2006). The Endothelin System and Its Antagonism in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*, 943–955. http://doi.org/10.1681/ASN.2005121256

Dickman, K. G., Sweet, D. H., Bonala, R., Ray, T., & Wu, A. (2011). Physiological and Molecular Characterization of Aristolochic Acid Transport by the Kidney □. *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, *338*(2), 588–597. http://doi.org/10.1124/jpet.111.180984.

Ding, H., He, Y., Li, K., Yang, J., Li, X., Lu, R., & Gao, W. (2007). Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clinical Immunology*, 227–234. http://doi.org/10.1016/j.clim.2007.01.010

Duffield, J. S. (2014). Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(6), 2299–2306. http://doi.org/10.1172/JCI72267.a

Eddy, A. A. (2000). Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatric Nephrology*, 290–301.

Edouard Kunegel. (2013). *L 'Eau Et Liquides De Dialyse Dans Le Traitement De*

L'Insuffissance Rénale Chronique Terminale. Université De Lorraine (Vol. 1). http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Forbes, J. M., Hewitson, T. D., Becker, G. J., & Jones, C. L. (2001). Simultaneous blockade of endothelin A and B receptors in ischemic acute renal failure is detrimental to long-term. *Kidney International*, *59*, 1333–1341. http://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.0590041333.x

Fourcade, J. (2006). *Insuffisance renale aigue.*

Ghosh, A. K., & Vaughan, D. E. (2012). PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol*, *227*(2), 493–507. http://doi.org/10.1002/jcp.22783.PAI-1

Goddard, J., Johnston, N. R., Hand, M. F., Cumming, A. D., Rabelink, T. J., Rankin, A. J., & Webb, D. J. (2004). Endothelin-A Receptor Antagonism Reduces Blood Pressure and Increases Renal Blood Flow in Hypertensive Patients with Chronic Renal Failure: A Comparison of Selective and Combined Endothelin Receptor Blockade. *Circulation*, *109*(9), 1186–1193. http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000118499.69469.51

Godes, M., Mach, A., Herzfeld, S., Wiesner, D., Arck, P. C., & Neumayer, H. (2003). ETA Receptor Blockade Induces Tubular Cell Proliferation and Cyst Growth in Rats with Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*, (11), 367–376. http://doi.org/10.1097/01.ASN.0000042165.63601.65

Helmy, M. M., Helmy, M. W., Abd, D. M., Abo, A. M., & El-din, M. M. M. (2014). Selective ET A receptor blockade protects against cisplatin-induced acute renal failure in male rats. *European Journal of Pharmacology*, *730*, 133–139. http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.03.002

Huang, L., Scarpellini, A., Funck, M., Verderio, E. A. M., & Johnson, T. S. (2013). Development of a Chronic Kidney Disease Model in C57BL / 6 Mice with Relevance to Human Pathology. *Nephron Extra*, 12–29. http://doi.org/10.1159/000346180

Huot, B. (2012). *Intérêt du NGAL comme marqueur biologique précoce d ' insuffisance rénale aiguë dans le sepsis sévère.*

Iglarz, M., Binkert, C., Morrison, K., Fischli, W., Gatfield, J., Treiber, A., … Clozel, M. (2008). Pharmacology of Macitentan , an Orally Active Tissue-Targeting Dual Endothelin Receptor Antagonist. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutocs*, *327*(3), 736–745. http://doi.org/10.1124/jpet.108.142976.2004

Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K., & Masaki, T. (1989). The human endothelin family : Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes.

Proc. Natl. Acad. Sci USA, *86*(April), 2863–2867.

Jokar, Z., Nematbakhsh, M., Moeini, M., & Talebi, A. (2015a). Role of endothelin-1 antagonist ; bosentan , against cisplatin- induced nephrotoxicity in male and female rats. *Advanced Biomedical Research*.

Jokar, Z., Nematbakhsh, M., Moeini, M., & Talebi, A. (2015b). Role of endothelin-1 antagonist ; bosentan , against cisplatin-induced nephrotoxicity in male and female rats. *Advancer Biomedical Research*. http://doi.org/10.4103/2277-9175.156642

Kabanda, a, Jadoul, M., Lauwerys, R., Bernard, a, & van Ypersele de Strihou, C. (1995). Low molecular weight proteinuria in Chinese herbs nephropathy. *Kidney International*, *48*(5), 1571–6. http://doi.org/10.1038/ki.1995.449

Kawanabe, Y., & Nauli, S. M. (2011). Endothelin. *Cellular and Molecular Life Science*, *68*(2), 195–203. http://doi.org/10.1007/s00018-010-0518-0.Endothelin

Khan, M. A., Dashwood, M. R., Mumtaz, F. H., Thompson, C. S., Mikhailidis, P., & Morgan, R. J. (1999). Upregulation of Endothelin A Receptor Sites in the Rabbit Diabetic Kidney : Potential Relevance to the Early Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *Nephron*, 261–267.

Ko, G. J., Grigoryev, D. N., Linfert, D., Jang, H. R., Watkins, T., Cheadle, C., … Rabb, H. (2010). Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI-to-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol*, (7), 1472–1483. http://doi.org/10.1152/ajprenal.00619.2009.

Kohan, D. E., Cleland, J. G., Rubin, L. J., Theodorescu, D., & Barton, M. (2012). Clinical trials with endothelin receptor antagonists : What went wrong and where can we improve ? ☆. *Life Sciences*, *91*(13–14), 528–539. http://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.07.034

Kohan, D. E., & Pollock, D. M. (2013). Endothelin antagonists for diabetic and non-diabetic chronic kidney disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *76*(4), 573–579. http://doi.org/10.1111/bcp.12064

Kowalczyk, A., Kleniewska, P., & Goraca, A. (2015). The Role of Endothelin-1 and Endothelin Receptor Antagonists in Inflammatory Response and Sepsis. *Arch Immunol Ther Exp*, 41–52. http://doi.org/10.1007/s00005-014-0310-1

Lacour, B. (2013). Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales. *Revue Francophone Des Laboratoires*, *2013*(451), 25–37. http://doi.org/10.1016/S1773-035X(13)71993-2

Lameire, N. H. (2004). Pathophysiology of ischaemic acute renal failure. *Best*

Practice & Research Clinical Anaesthesiology, *18*(1), 21–36. http://doi.org/10.1016/S1521-6896(03)00076-4

Lebeau, C., Debelle, D., Arlt, V. M., Pozdzik, A., Lebeau, C., Prez, E. G. De, … Nortier, L. (2005). Early proximal tubule injury in experimental aristolochic acid nephropathy : functional and histological studies. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *20*(August), 2321–2332. http://doi.org/10.1093/ndt/gfi042

Lee, S., & Ahn, D. (2008). Expression of Endothelin-1 and Its Receptors in Cisplatin-Induced Acute Renal Failure in Mice. *Korean J Physiol Pharmacol*, *12*, 149–153.

Lee, S., Lee, T., Lee, B., Choi, H., Yang, M., Ihm, C., & Kim, M. (2004). Fanconi ' s syndrome and subsequent progressive renal failure caused by a Chinese herb containing aristolochic acid. *Nephrology*, (April 2002), 126–129.

Li, D., Yang, P., Xiong, Q., Song, X., Yang, X., Liu, L., … Rui, Y. (2010). MicroRNA-125a / b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells. *Journal of Hypertension*, 1646–1654. http://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32833a4922

Liu, Y. (2011). Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nature Reviews. Nephrology*, *7*(12), 684–96. http://doi.org/10.1038/nrneph.2011.149

Lo, S. H., Mo, K., Wong, K., Poon, S., Chan, C., Lai, C., & Chan, A. (2004). Aristolochic acid nephropathy complicating a patient with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *19*(7), 1913–1915. http://doi.org/10.1093/ndt/gfh159

Lord, G. M., Tagore, R., Cook, T., Gower, P., & Pusey, C. D. (1999). N e p h r o p a t hy caused by Chinese herbs in the UK Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma. *Lancet*, *354*, 481–482.

Luciano, R. L., & Perazella, M. A. (2014). Aristolochic Acid Nephropathy : Epidemiology , Clinical Presentation , and Treatment. *Drug Safety*. http://doi.org/10.1007/s40264-014-0244-x

Mael-ainin, M., Abed, A., Conway, S. J., Dussaule, J., & Chatziantoniou, C. (2014). Inhibition of Periostin Expression Protects against the Development of Renal In fl ammation and Fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, *25*, 1724–1736. http://doi.org/10.1681/ASN.2013060664

Maguire, J. J., & Davenport, A. P. (2015). Endothelin Receptors and Their Antagonists. *Seminars in Nephrology*, *35*(2), 125–136. http://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2015.02.002

Meyers, K. E. C., & Sethna, C. (2013). Endothelin antagonists in hypertension

and kidney disease. *Pediatric Nephrology*, *28*(5), 711–720. http://doi.org/10.1007/s00467-012-2316-4

Mishra, J., Dent, C., Tarabishi, R., Mitsnefes, M. M., Ma, Q., Kelly, C., … Shao, M. (2005). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *The Lancet*, 1231–1238.

Mishra, J., Mori, K., Ma, Q., Kelly, C., Barasch, J., & Devarajan, P. (2004). Lipocalin : A Novel Early Urinary Biomarker for Cisplatin Nephrotoxicity. *American Journal of Nephrology*, *3039*, 307–315. http://doi.org/10.1159/000078452

Miyagawa, K., Emoto, N., Widyantoro, B., Nakayama, K., Yagi, K., Rikitake, Y., … Hirata, K. (2010). Attenuation of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy by Prevention of Mitochondrial Biogenesis Impairment. *Hypertension*, 738–746. http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.141903

Nortier, J., Pozdzik, A., Roumeguere, T., & Vanherweghem, J. L. (2015). Néphropathie aux acides aristolochiques ("néphropathie aux herbes chinoises"). *Nephrologie et Therapeutique*, *11*(7), 574–588. http://doi.org/10.1016/j.nephro.2015.10.001

Ong, A. C. M., von Websky, K., & Hocher, B. (2015). Endothelin and Tubulointerstitial Renal Disease. *Seminars in Nephrology*, *35*(2), 197–207. http://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2015.03.004

Pena, J. ., Borras, M., Ramos, J., & Montoliu, J. (1996). Rapidly progressive interstitial renal fibrosis due to a chronic intake of a herb (Aristolochia pistolochia) infusion. *Nephrology Dialysis Transplantation*, (September 2016). http://doi.org/10.1093/ndt/11.7.1359

Piechota-polañczyk, A., & Gorca, A. (2012). Influence of specific endothelin-1 receptor blockers on hemodynamic parameters and antioxidant status of plasma in LPS-induced endotoxemia. *Pharmacological Reports*. http://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70941-6

Pinet, F. (2004). À quoi sert le système endothéline ? *Medecine/sciences*, *20*, 339–345.

Pozdzik, A. A., Berton, A., Schmeiser, H. H., Missoum, W., Decaestecker, C., Salmon, I. J., … Nortier, L. (2010). Aristolochic acid nephropathy revisited : a place for innate and adaptive immunity ? *Histopathology*, 449–463. http://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03509.x

Pozdzik, A. A., Salmon, I. J., Debelle, F. D., Decaestecker, C., Branden, C. Van Den, & Verbeelen, D. (2008). Aristolochic acid induces proximal tubule

apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. *Kidney International*, *73*(5), 595–607. http://doi.org/10.1038/sj.ki.5002714

Pozdzik, A. A., Salmon, I. J., Husson, P., Decaestecker, C., Deschodt-lanckman, M. M., Vanherweghem, J., & Nortier, L. (2008). Patterns of interstitial inflammation during the evolution of renal injury in experimental aristolochic acid nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, (April), 2480–2491. http://doi.org/10.1093/ndt/gfn140

Reginster, F., Jadoul, M., & Strihou, C. V. Y. De. (1997). Nephrology Dialysis Transplantation Chinese herbs nephropathy presentation , natural history and fate after transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 81–86.

Remuzzi, G., Perico, N., & Benigni, A. (2002). New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. *Nature*, *1*, 986–1001. http://doi.org/10.1038/nrd962

Rodríguez-pascual, F., Busnadiego, O., & González-santamaría, J. (2014). The profibrotic role of endothelin-1 : Is the door still open for the treatment of fibrotic diseases ? *Life Sciences*, *118*, 156–164. http://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.12.024

Ruetten, H., & Thiermermann, C. (1997). Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages : ET-receptors , signal transduction and inhibition by. *Journal of Physiology and Pharmacology*, *1*(i), 6.

Saleh, M. A., Pollock, J. S., & Pollock, D. M. (2011). Distinct Actions of Endothelin A-Selective Versus Combined Endothelin A / B Receptor Antagonists in Early Diabetic Kidney Disease. *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, *338*(1), 263–270. http://doi.org/10.1124/jpet.111.178988.functional

Sato, N., Takahashi, D., Chen, S.-M., Tsuchiya, R., Mukoyama, T., Yamagata, S., … Ueda, S. (2004). Acute nephrotoxicity of aristolochic acids in mice. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *56*(2), 221–9. http://doi.org/10.1211/0022357023051

Schini, V. B., Vanhoutte, M., Plaza, O. B., & June, A. (1991). Endothelin-1: A Potent Vasoactive Peptide. *Pharmacology & Toxicology*, *69*, 303–309.

Shibutani, S., Dong, H., Suzuki, N., Ueda, S., Miller, F., & Grollman, A. P. (2007). Selective Toxicity of Aristolochic Acids I and II. *Drug Metabolism and Disposition*, *35*(7), 1217–1222. http://doi.org/10.1124/dmd.107.014688.phenanthro-)

Shin, S., Lee, Y., & Tsai, J. (1996). The correlation of plasma and urine

endothelin- 1 with the severity of nephropathy in Chinese patients with Type 2 diabetes. *Scand J Clin Lab Invest*.

Silverthorn, D. U. (2007). *Physiologie humaine.pdf*.

Simonson, M. S., & Ismail-beigi, F. (2011). Endothelin-1 Increases Collagen Accumulation in Renal Mesangial Cells by Stimulating a Chemokine and Cytokine Autocrine Signaling Loop * □. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(13), 11003–11008. http://doi.org/10.1074/jbc.M110.190793

Sorokin, A., & Kohan, D. E. (2003). Physiology and pathology of endothelin-1 in renal mesangium. *American Journal Physiology Renal Physiology*, *84132*.

Stevens, E. J., & Tomlinson, D. R. (1995). Effects of endothelin receptor antagonism with bosentan peripheral nerve function in experimental diabetes. *British Journal of Pharmacology*, 373–379.

Stiborova, M., Frei, E., Arlt, V. M., & Schmeiser, H. H. (2008). Metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid , a risk factor for Balkan endemic nephropathy. *Mutation Research*, *658*, 55–67. http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.07.003

Vanhaelen, M., Vanherweghem, L., Nakajima, K., Hatake, K., & Miyata, T. (1994). Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *The Lancet*, *343*, 174.

Vanherweghem, J., Depierreux, M., Tielemans, C., Abramowicz, D., Dratwa, M., Verbeelen, D., … Vanhaelen, M. (1993). Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *The Lancet*, *341*(8842).

Wen, Y.-J., & Li, X. (2008). Ischemic injury underlies the pathogenesis of aristolochic acid Ⅱ induced acute kidney injury. *Translational Research*, *152*(8), 38–46. http://doi.org/10.1016/j.trsl.2008.05.002

Weng, C., Yu, C., Kuo, M., Chen, B., & Lin, C. (2014). Endothelin-1 induces connective tissue growth factor expression in human lung fibroblasts by ET A R-dependent JNK / AP-1 pathway. *Biochemical Pharmacology*, *88*(3), 402–411. http://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.030

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., … Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide prodcued by vascular endothelial cells. *Nature*.

Yang, L., Li, X., & Wang, H. (2007a). Possible mechanisms explaining the tendency towards interstitial fibrosis in aristolochic acid-induced acute tubular necrosis, (November 2006), 445–456. http://doi.org/10.1093/ndt/gfl556

Yang, L., Li, X., & Wang, H. (2007b). Possible mechanisms explaining the tendency towards interstitial fibrosis in aristolochic acid-induced acute tubular necrosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, (November 2006), 445–456. http://doi.org/10.1093/ndt/gfl556

Yang, L., Su, T., Li, X., Wang, X., Cai, S., Meng, L., … Wang, H. (2011). Aristolochic acid nephropathy : variation in presentation and prognosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, (December 2006), 1–7. http://doi.org/10.1093/ndt/gfr291