



ACADÉMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITÉ DE LIÈGE
FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE PHYSIQUE

Les effets délétères métaboliques et oxydants induits lors d'un sepsis sur la fonction rénale

Application sur un modèle *in vitro*
d'un stress endotoxinique sur des cellules rénales

Dissertation présentée par
Caroline Quoilin
en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Année académique 2013-2014

Membres du jury :

Pr. P. Dauby, Université de Liège, Belgique

Dr. M.-P. Fontaine-Aupart, CNRS et Université Paris-Sud, France

Dr. T. Franck, Université de Liège, Belgique

Pr. Ph. Ghosez (Président), Université de Liège, Belgique

Dr. A. Harrois, Hôpitaux Universitaire Paris-Sud, France

Pr. M. Hoebeke (Promoteur), Université de Liège, Belgique

Dr. A. Mouithys-Mickalad (Secrétaire), Université de Liège, Belgique

Les recherches décrites dans cette thèse ont été financées par le Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS), le patrimoine de l'Université de Liège et la Fondation LEAR.

*À mon vieux Bon Papa,
Pour qui la physique était une réelle passion
Et la biologie un véritable mystère...*

Remerciements

Cette thèse de doctorat est l'aboutissement de plusieurs années de recherches menées au sein du Laboratoire de Spectroscopie Biomédicale et en collaboration avec d'autres laboratoires belges et étrangers. Elle est en grande majorité le fruit de mon investissement permanent, tant au niveau de la planification, de la mise au point des techniques, des analyses, du traitement de données et de la rédaction. Cependant, elle n'aurait jamais vu le jour sans ces personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation.

Tout d'abord, je tiens à remercier ma promotrice, le Professeur Maryse Hoebeke, pour sa confiance et ses conseils dans la réalisation de ce projet. Elle m'a toujours octroyé une complète liberté ainsi qu'une grande autonomie dans cette aventure scientifique, me soutenant à chaque fois que je décidais d'exporter ma thèse vers des laboratoires étrangers.

Un tout grand merci aux Drs. Ange Mouithys-Mickalad et Marie-Pierre

Fontaine-Aupart pour leur disponibilité et leurs compétences scientifiques respectives. Sans eux, cette thèse n'aurait pas pu être ce qu'elle est. Ils se sont tout de suite sentis concernés par le projet, répondant toujours positivement lorsque que j'avais besoin d'un conseil, d'une idée ou d'une relecture.

Ange, merci pour ton aide dans la mise au point des protocoles expérimentaux, pour tes explications toujours claires des processus biochimiques et pour tes relectures. Mais surtout, merci pour ton calme et ta patience lorsque le projet n'avancait pas assez vite à mon goût.

Marie-Pierre, merci pour ton accueil chaleureux lors de mes séjours à Orsay. Tu as toujours trouvé du temps à me consacrer pour faire le point et tes conseils pertinents ont permis d'améliorer le travail. Merci aussi pour tous tes appels téléphoniques, ils sont toujours arrivés lorsque j'avais besoin d'un petit coup de « boost ».

Merci au Dr. Jacques Durenteau qui fut le premier à nous exposer l'enjeu clinique de l'IRA septique dans les unités de soins intensifs. Lors de nos réunions au CHU du Kremlin-Bicêtre de Paris, il nous a offert son point de vue de clinicien sur la problématique de cette thèse. Merci aussi à Anatole Harrois pour avoir apporté son regard critique de médecin sur les deux premiers chapitres de ce manuscrit.

Je remercie également le Pr. Bernard Gallez qui m'a gracieusement accueillie dans son laboratoire lorsque nous étions en panne de RPE au début de cette thèse.

Par ailleurs, cette thèse n'aurait pu être menée à bien sans l'aide des personnes qualifiées dans les diverses techniques utilisées. Merci à Ariane Niesen pour l'oxygraphie, à Pierre Danhier pour l'oxymétrie de RPE, à Sandrine Lécart pour la microscopie confocale, à Laurent Dupic pour les mesures de co-localisation, à Nahla Issa pour la technique western blot, à Carolina Centeno Baez pour la méthode qPCR et à Raafat Stephan pour la cytométrie

en flux.

Mes envies d'ailleurs n'auraient pu être possibles sans les bourses de voyage qui m'ont été accordées par le FNRS et le patrimoine de l'ULg pour mon séjour à Singapour (2012) ainsi que par le FNRS et la fondation Lear pour mon séjour au Canada (2013). J'en profite pour remercier l'ensemble des membres des groupes de recherche du Immunology Lab de l'université technologique de Nanyang et du Laboratoire du Pr. André Marrette de l'université Laval qui, à un moment ou à un autre, m'ont apporté leur soutien scientifique, technique et personnel.

Je remercie également tous mes amis qui m'ont permis de décrocher de temps en temps de mes histoires de « rein ». Tout particulièrement, merci à Anne-Sophie, Valérie et Marina. Votre amitié m'est précieuse.

Angeliki et Pierre-Henri, c'est peut être un peu grâce à vous que j'ai eu cette idée folle d'entreprendre une thèse de doctorat. Votre accueil chaleureux lors de la réalisation de mon mémoire a sûrement contribué à mon envie de continuer dans le monde de la recherche. Bien plus que des collègues, ce sont deux amis que j'ai découverts en vous.

Ces années de thèse auraient eu un tout autre goût sans ces personnes qui ont animé mon quotidien à l'université. Je remercie tout particulièrement Charles pour nos temps de midi passés ensemble et l'amitié qui en est ressortie ainsi que Simon pour nos discussions philosophiques et nos parties de batailles corses. Je finirai par gagner ! Merci aussi à François pour son écoute et à Innocent parce que tu vas de paire avec Arnaud.

Arnaud, il y a un an, nous étions deux électrons non appariés et notre rencontre a fait des étincelles ! Tu m'as permis de me retrouver et d'apprécier à nouveau les bonheurs simples. Ensemble, nous avons traversé cet épisode de vie qu'est la fin de thèse et j'attends avec impatience la suite ! Tout simplement, merci d'être là pour moi aujourd'hui.

Last but not least, je remercie tout particulièrement les membres de ma famille. Papa, Maman, Papy, Mamy, Sandrine, Christophe, François, Marion et Gabriel, pour tout ce que vous représentez pour moi, pour ce que je suis aujourd'hui, pour votre amour, merci.

Table des Matières

Résumé	1
Abstract	5
Introduction	9
I État de l'art	13
1 Le sepsis chez l'homme	15
1.1 Description clinique du sepsis	17
1.1.1 Trois états septiques	17
1.1.2 Deux phénomènes cliniques comme origine	18
1.1.3 Une réponse dérégulée	20
1.2 Mécanismes impliqués dans l'inflammation	21

1.2.1	La détection du LPS par TLR4	22
1.2.2	Les voies de signalisation cellulaire activées par TLR4	26
1.3	Physiopathologie du sepsis	28
1.3.1	Amplification du signal	29
1.3.2	Défaillance des organes	33
2	La défaillance du rein	35
2.1	Physiopathologie de l'IRA	37
2.1.1	Structure et fonction du néphron	37
2.1.2	Défaillance du rein	43
2.2	·NO et perturbations vasculaires	45
2.2.1	Pouvoir vasodilatateur du ·NO	45
2.2.2	Altération de l'endothélium	46
2.2.3	Altération du flux sanguin rénal	47
2.3	ROS et lésions tubulaires	49
2.3.1	Espèces réactives de l'oxygène	49
2.3.2	Défenses cellulaires contre les ROS	54
2.3.3	Cytotoxicité du stress oxydant	56
2.3.4	Stress oxydant et IRA	58
2.4	Cytokines et inflammation	62
2.4.1	TNF- α et IL-1	62
2.4.2	Endothéline	63
II	Présentation synoptique des résultats	65
3	Dysfonctionnement du métabolisme énergétique	67
3.1	Avant-propos	69
3.1.1	Métabolisme et énergie	69
3.1.2	Respiration cellulaire aérobie	70
3.1.3	Objectif de l'étude	71
3.2	Méthodes expérimentales	72
3.2.1	Mise en place du modèle de stress cellulaire	72
3.2.2	Respirométrie de haute résolution	73

3.2.3	Oxymétrie par RPE	76
3.2.4	Mesure de la production d'ATP	79
3.2.5	Analyse du type de mort cellulaire	80
3.2.6	Analyse statistique des données	81
3.3	Résultats	81
3.3.1	Étude de la vitesse de respiration basale des cellules	81
3.3.2	Étude de la réversibilité du phénomène	85
3.3.3	Altération dans la production d'ATP	85
3.3.4	Mort cellulaire par apoptose	85
3.4	Discussion et conclusion	87
4	Altérations fonctionnelles des mitochondries	91
4.1	Avant-propos	93
4.1.1	Respiration mitochondriale	93
4.1.2	Dysfonction mitochondriale et sepsis	97
4.1.3	Objectif de l'étude	99
4.2	Méthodes expérimentales	100
4.2.1	Microscopie confocale et cytométrie en flux	100
4.2.2	Co-localisation des marqueurs fluorescents	104
4.2.3	Méthodes biochimiques	108
4.3	Résultats	110
4.3.1	Effet du LPS sur le réseau mitochondrial	110
4.3.2	Effet du LPS sur l'activité de la chaîne de transport des électrons	110
4.3.3	Effet du LPS sur la phosphorylation oxydative	115
4.4	Discussion et conclusion	118
5	Stress oxydant cytosolique et impact mitochondrial	123
5.1	Avant-propos	125
5.1.1	Stress oxydant et dysfonction mitochondriale	125
5.1.2	Source extra-mitochondriale de ROS	127
5.1.3	Objectif de l'étude	131
5.2	Méthodes expérimentales	132
5.2.1	Détection de protéines	132

5.2.2	Spectroscopie	135
5.2.3	Utilisation d'antioxydants	139
5.3	Résultats	140
5.3.1	Le LPS induit l'expression de iNOS et la production de $\cdot\text{NO}$	140
5.3.2	Le LPS induit l'expression de NOX 4 et la production d' O_2^-	142
5.3.3	Les antioxydants rétablissent l'activité mitochondriale	145
5.4	Discussion et conclusion	148
 Conclusions générales		157
 Annexes		167
A Une thèse active et internationale		167
B Liste des Abréviations		171
C Références bibliographiques		175

Résumé

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est une complication fréquente du sepsis qui peut augmenter la mortalité du patient jusqu'à 70 %. L'effondrement de la perfusion rénale globale a longtemps été considéré comme le facteur essentiel d'apparition de lésions cellulaires hypoxiques à l'origine de la défaillance du rein. Cependant, de nouvelles recherches ont suggéré que ce paradigme était trop simpliste et il est maintenant admis que l'origine des lésions rénales est multifactorielle. Les mécanismes qui sous-tendent l'apparition d'une telle défaillance sont complexes et impliquent la dérégulation de la réponse inflammatoire, l'altération de la microcirculation rénale et la perturbation des processus bioénergétiques.

Pour déterminer les mécanismes mis en jeu dans la modulation respiratoire des cellules rénales lors d'un sepsis, nous avons développé un modèle *in vitro* d'IRA septique qui consiste à soumettre des cellules tubulaires rénales humaines (HK-2) à une endotoxine (lipopolysaccharide, LPS). Par l'utilisation

des deux techniques de respirométrie de haute résolution et de spectroscopie de résonance paramagnétique électronique, nous avons alors montré que l'incubation des cellules HK-2 avec le LPS induit une diminution significative de leur consommation en oxygène. Étonnamment, le retour dans un environnement sans endotoxine ne s'accompagne pas d'un rétablissement de l'activité respiratoire des cellules. Nous avons donc émis l'hypothèse que cette décroissance irréversible dans la consommation en oxygène des cellules rénales traitées au LPS serait due à une sous-régulation métabolique pathologique se traduisant par l'incapacité des cellules à utiliser l'oxygène disponible pour produire de l'ATP.

Pour confirmer cette hypothèse d'hypoxie cytopathique, nous avons démontré que cette altération de la respiration des cellules HK-2 provient surtout d'un dysfonctionnement de l'activité métabolique des mitochondries. À la suite du traitement LPS, la phosphorylation oxydative est interrompue consécutivement à l'inhibition de l'activité de la cytochrome c oxydase. Par conséquent, le flux d'électrons et le pompage des protons sont perturbés au niveau de la chaîne respiratoire, conduisant à une chute du potentiel de membrane mitochondrial, une libération de facteurs pro-apoptotiques et une diminution de la production d'ATP. À long terme, cette perturbation métabolique conduit les cellules vers une mort majoritairement apoptotique.

Pour clarifier le mécanisme par lequel le LPS provoque des altérations mitochondriales, nous avons étudié la possible génération d'un stress oxydant au sein des cellules HK-2. De façon intéressante, nous avons révélé que l'induction d'un stress oxydant dans le cytosol des cellules HK-2 traitées au LPS est un événement qui apparaît avant la dysfonction mitochondriale. Cet état redox primaire est notamment dû à l'activation des deux enzymes NADPH oxydase 4 (NOX 4) et NO synthase inductible (iNOS). La production concomitante de leurs sous-produits, à savoir l'anion superoxyde et le monoxyde d'azote, suggère fortement la formation du peroxyde d'azote, puissant oxydant relativement stable qui peut diffuser dans les compartiments mitochondriaux et y induire des réactions cytotoxiques. À notre connaissance, notre modèle révèle pour la première fois la contribution de l'anion

superoxyde originaire de NOX 4 dans les lésions tubulaires rénales.

Par ailleurs, après avoir été la cible du stress oxydant, les mitochondries deviennent elles-mêmes par la suite génératrices d'espèces réactives de l'oxygène qui perpétuent le dysfonctionnement mitochondrial. Il semble donc qu'un mécanisme de cycle redox induit par un stress oxydant soit la cause principale de l'altération de la fonction mitochondriale des cellules HK-2 traitées au LPS. Le rôle des espèces oxydantes dans le dysfonctionnement mitochondrial induit par le LPS a d'ailleurs été confirmé avec l'utilisation d'inhibiteurs de la iNOS ou d'antioxydants qui préservent l'activité de la cytochrome c oxydase et empêchent la dissipation du potentiel de membrane mitochondrial.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'IRA induite par le sepsis ne doit pas seulement être considérée comme une défaillance de l'énergétique cellulaire, mais plutôt comme une réponse intégrée qui comporte une signalisation intracellulaire redox, une perturbation de l'activité mitochondriale et une réorientation métabolique tels que l'apoptose.

Abstract

Acute kidney injury (AKI) is a frequent complication of sepsis that can increase mortality as high as 70%. The pathophysiology of this kidney failure was previously believed to be secondary to decreased global renal perfusion causing hypoxia-induced injury. However, new research suggests this paradigm is overly simplistic, and injury is now considered multifactorial in origin. Mechanisms that contribute to kidney injury mainly include inflammation, alterations in microvascular renal blood flow and changes in bioenergetics.

To study the mechanism of oxygen regulation in acute kidney injury during sepsis, we developed a sepsis-induced *in vitro* model using proximal tubular epithelial cells (HK-2) exposed to a bacterial endotoxin (lipopolysaccharide, LPS). Our first investigation, by using both high-resolution respirometry and electron spin resonance spectroscopy, showed that HK-2 cells exhibit a decreased oxygen consumption rate when treated with LPS. Surprisingly,

this cellular respiration alteration persists even after the stress factor is removed. We suggested that this irreversible decrease in renal oxygen consumption after LPS challenge is related to a pathologic metabolic down-regulation such as a lack of oxygen utilization by cells for ATP production. In the long term, this metabolic disturbance leads cells to a predominantly apoptotic death.

To confirm this hypothesis of cytopathic hypoxia, we demonstrated that this alteration in the renal respiratory function is mainly due to an impairment in the metabolic activity of HK-2 cell mitochondria. Following LPS treatment, the oxidative phosphorylation is interrupted because of the inhibition of cytochrome c oxidase activity. As a consequence, disruptions in the electron transport and the proton pumping across the system occur, leading to a decrease of the mitochondrial membrane potential, the release of apoptotic-inducing factors and a decrease in ATP production.

To clarify the mechanism by which the LPS induces mitochondrial alterations, we studied the oxidative stress generation in HK-2 cells. Interestingly, we revealed that the induction of a cytosolic oxidative stress is an event that appears before mitochondrial dysfunction in the LPS-treated HK-2 cells. This primary redox state is notably due to the activation of the two enzymes NADPH oxidase 4 and inducible NO synthase. The simultaneous production of anion superoxide and nitric oxide strongly suggests the formation of peroxynitrite, a relative stable powerful oxidant that can diffuse through mitochondrial compartments and undergo cytotoxic reactions. To our knowledge, our model reveals for the first time the role of NADPH oxidase-derived cytosolic ROS in triggering tubular cell damage.

Moreover, after being first target of the oxidative stress, mitochondria become in turn producer of reactive oxygen species that carry on mitochondrial dysfunction. It seems thus that a mechanism of oxidative stress-induced redox cycling is a main cause of the mitochondrial dysfunction of LPS-treated HK-2 cells. The role of oxidants in mitochondrial dysfunction was further confirmed by the use of iNOS inhibitors or antioxidants that preserve cy-

tochrome c oxidase activity and block mitochondrial membrane potential dissipation.

Overall, these results suggest that sepsis-induced AKI should not only be regarded as failure of energy status but also as an integrated response, including transcriptional events, ROS signaling, mitochondrial activity and metabolic orientation such as apoptosis.

Introduction

Le sepsis est l'un des plus anciens et des plus insaisissables syndromes de la médecine clinique. Souvent décrit comme un « empoisonnement du sang », il fut longtemps considéré comme une infection systémique, résultat de l'invasion par des organismes pathogènes de la circulation sanguine du patient. Cependant, avec l'avènement des antibiotiques modernes, cette théorie microbienne ne permettait pas d'expliquer entièrement la pathogenicité du sepsis. En effet, de nombreux patients septiques mourraient malgré l'éradication complète de l'agent pathogène initiateur. Les chercheurs suggérèrent dès lors que l'origine du sepsis proviendrait du patient lui-même plutôt que du micro-organisme. C'est en 1992 que le sepsis fut finalement défini comme le syndrome de réponse inflammatoire systémique lié à une infection, devenant sepsis sévère lorsqu'il est accompagné d'une défaillance d'au moins un organe [1].

Depuis, des progrès considérables dans la connaissance de la physiopatho-

logie du sepsis ont été réalisés mais la mortalité liée à ce syndrome reste toujours trop importante [2]. L'échec des études visant à améliorer le pronostic des patients septiques, en augmentant la délivrance systémique en oxygène, a entraîné la prise de conscience qu'une « macrocirculation normale » n'était pas forcément une garantie d'une « oxygénation adéquate » des tissus [3, 4]. Cela a ouvert le champ à une expérimentation de plus en plus étoffée et poussée sur les atteintes microcirculatoires et cellulaires au cours du sepsis sévère. Vers le milieu des années 1990, le groupe de M. Fink montrait que le sepsis induit chez le porc par une injection de LPS s'accompagnait d'une perturbation métabolique de la muqueuse intestinale alors que la pression partielle en oxygène tissulaire restait élevée [5]. Ces observations ont permis d'introduire le concept de défaut d'utilisation de l'oxygène par les mitochondries des cellules ou « hypoxie cytopathique » comme responsable de la défaillance d'organes et le décès des patients septiques [6].

C'est dans ce contexte médical que se place cette thèse de doctorat qui s'est intéressée à la dysfonction rénale induite lors du sepsis. En mettant en place un modèle cellulaire d'inflammation, elle a cherché à vérifier si cette hypothèse d'hypoxie cytopathique pouvait expliquer l'apparition d'une défaillance rénale au cours du sepsis. En particulier, elle a essayé de préciser le lien qui existe entre respiration cellulaire, dysfonction mitochondriale et stress oxydant. Ces phénomènes sont en effet des facteurs essentiels du développement d'atteintes tubulaires rénales. L'objectif du travail a été de déterminer les mécanismes métaboliques et oxydants qui sous-tendent le dysfonctionnement mitochondrial des cellules rénales soumises à un stress endotoxinique.

Ce manuscrit s'articule dès lors en deux parties. La première propose un état de l'art sur le sepsis et la défaillance rénale et se décompose en 2 chapitres. La seconde expose l'ensemble des résultats obtenus lors de la mise en place du modèle expérimental et se décompose en 3 chapitres.

Le chapitre 1 propose une revue générale du sepsis en s'intéressant notamment à son étiologie, ses mécanismes et ses conséquences. Ce syndrome clinique est aujourd'hui considéré comme une réponse dérégulée du système immunitaire du patient face à une infection. La reconnaissance des micro-organismes pathogènes par les récepteurs de type Toll déclenche une production massive de cytokines qui aboutit à un état pro-inflammatoire et pro-coagulant à l'origine de l'apparition du syndrome de défaillance multiviscérale. Depuis quelques années, il est d'ailleurs apparu que le sepsis était un facteur de risque important d'apparition de l'insuffisance rénale aiguë.

Le chapitre 2 rappelle brièvement quelques aspects de la physiologie du rein qui permettent d'exposer, par la suite, les mécanismes connus impliqués dans la défaillance rénale lors d'un sepsis. En particulier le rôle du monoxyde d'azote dans la diminution de la perfusion rénale, ainsi que le rôle des espèces réactives de l'oxygène dans l'apparition des lésions tubulaires rénales sont mis en avant. En effet, le mécanisme le plus souvent proposé aujourd'hui pour expliquer l'altération de la fonction rénale est l'apparition de lésions ischémiques induites par la vasoconstriction rénale. Cependant, depuis quelques années, un nouveau mécanisme a émergé et propose d'expliquer cette défaillance par un déficit de l'extraction de l'oxygène par les cellules rénales.

Le chapitre 3 expose l'étude mise en place pour vérifier cette hypothèse de dysoxie tissulaire par l'utilisation d'un modèle cellulaire d'inflammation du rein induite par une endotoxine bactérienne. Il est apparu que sous stress inflammatoire, les cellules rénales tentent effectivement de se préserver dans un premier temps en réduisant leur activité métabolique, en utilisant moins d'oxygène et en produisant moins d'ATP. Cependant, à long terme, ce mécanisme de défense ne suffit plus et les cellules finissent par mourir par apoptose.

Le chapitre 4 montre que l'investigation a permis de déterminer les effets du sepsis sur la fonction mitochondriale des cellules rénales. En effet, bien qu'il existe de plus en plus de preuves que la mitochondrie joue un rôle central

dans le sepsis, la nature des défauts mitochondriaux et leurs conséquences sur les processus énergétiques des cellules rénales n'ont pas encore été bien caractérisées. Il est alors apparu que l'interruption de la phosphorylation oxydative des mitochondries est effectivement à l'origine de l'incapacité des cellules rénales à utiliser l'oxygène pour produire l'ATP nécessaire à son métabolisme.

Le chapitre 5 présente les voies de signalisation intracellulaire possibles qui sous-tendent l'action du LPS sur les mitochondries et qui conduisent à une altération de la respiration des cellules HK-2. Il révèle notamment que les espèces réactives de l'oxygène semblent être un des médiateurs principaux dans la signalisation intracellulaire. Cette dernière semble s'effectuer en deux temps : tout d'abord, une initiation cytosolique d'un stress oxydant induit par les enzymes pro-inflammatoires NADPH oxydase 4 et NO synthase inducible, suivi d'un maintien de cet état redox par la production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène.

En conclusion, nous proposons un schéma qui résume l'ensemble des effets délétères métaboliques et oxydants induits par le LPS sur la fonction respiratoire des cellules rénales.

Première partie

État de l'art

Le sepsis chez l'homme

Le sepsis décrit un syndrome clinique complexe qui résulte d'une réponse inappropriée et nuisible du système immunitaire du patient face à une infection. Dans ce cas, la plupart des composants de la réponse immunitaire innée qui participent normalement à la défense de l'hôte peuvent, sous certaines conditions, causer des dommages cellulaires et tissulaires et entraîner un dysfonctionnement d'un ou de plusieurs organes. Le syndrome de défaillance multi-viscérale s'établit alors et une prise en charge rapide par le corps médical devient nécessaire.

Ce chapitre tente de donner une vision globale des mécanismes biochimiques et immunologiques qui se mettent en place lors du dérèglement de la réponse inflammatoire associée au sepsis. Notamment, la découverte des récepteurs de type Toll a permis une avancée majeure dans la compréhension de la voie

de signalisation qui conduit à l'expression de médiateurs pro-inflammatoires. Ainsi, ce sont les états pro-inflammatoire et pro-coagulant présents lors du sepsis qui favorisent largement l'apparition de défaillance d'organes.

Sommaire

1.1	Description clinique du sepsis	17
1.1.1	Trois états septiques	17
1.1.2	Deux phénomènes cliniques comme origine . .	18
1.1.2.1	Infection	19
1.1.2.2	SRIS	19
1.1.3	Une réponse dérégulée	20
1.2	Mécanismes impliqués dans l'inflammation . . .	21
1.2.1	La détection du LPS par TLR4	22
1.2.1.1	PAMPs et PRRs	22
1.2.1.2	TLRs	23
1.2.1.3	TLR4, récepteur du LPS	24
1.2.2	Les voies de signalisation cellulaire activées par TLR4	26
1.2.2.1	La voie dépendante de MyD88	26
1.2.2.2	La voie indépendante de MyD88	27
1.3	Physiopathologie du sepsis	28
1.3.1	Amplification du signal	29
1.3.1.1	État pro-inflammatoire	29
1.3.1.2	État pro-coagulant	31
1.3.2	Défaillance des organes	33

1.1 Description clinique du sepsis

1.1.1 Trois états septiques

Le concept de sepsis est aujourd'hui largement admis par les cliniciens, les médecins et les chercheurs bien qu'il s'agisse d'un phénomène complexe difficile à définir. Le sepsis apparaît lorsque la réponse immunitaire du patient face à une infection, initialement régulée, n'est plus contrôlée et s'amplifie. Bone *et al.* ont proposé de classifier l'état septique clinique en trois catégories :

1. Le « sepsis » est un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) lié à une infection.
2. Le « sepsis sévère » est un sepsis avec dysfonction d'au moins un organe et hypotension artérielle¹.
3. Le « choc septique » est un sepsis sévère avec hypotension artérielle persistante en dépit d'une expansion volémique adaptée² [1].

Il est fondamental que les cliniciens et les chercheurs disposent de critères diagnostiques qui permettent de conclure sur l'état septique du patient. Malheureusement, ces critères sont nombreux et jamais spécifiques au sepsis. Les signes d'une défaillance précoce d'organe pourraient être utilisés comme premiers symptômes de cette évaluation, mais ce diagnostic ne serait alors conclu que trop tard, lorsque la sévérité du cas a augmenté. Généralement, des éléments tels que l'instabilité hémodynamique, l'hypoxémie et la coagulopathie sont des critères employés pour établir le diagnostic de sepsis [7].

Quel que soit l'état septique du patient, une prise en charge médicale rapide est nécessaire. En effet, une étude épidémiologique effectuée par Angus *et al.* au début des années 2000 en Amérique du Nord a montré que la mortalité

1. La pression artérielle est anormalement basse. Typiquement, le seuil de pression artérielle systolique est habituellement inférieur à 90 mmHg.

2. L'expansion volémique est une technique médicale qui consiste à perfuser un soluté dans la circulation sanguine par voie veineuse afin d'augmenter la volémie.

1.1. Description clinique du sepsis

liée au sepsis atteignait approximativement 30% et augmentait avec la sévérité du syndrome, atteignant jusqu'à 50% pour les cas de sepsis sévère et 70% pour les cas de choc septique [2]. Ces taux sont d'autant plus alarmants qu'ils concernaient des patients ayant reçu les meilleurs soins possibles dans les unités de soins intensifs des hôpitaux.

La complexité dans le traitement du sepsis provient du fait que la morbidité peut provenir de l'infection et/ou de la réponse à l'infection. Ainsi, les interventions thérapeutiques visant à moduler la réponse inflammatoire peuvent avoir un impact défavorable sur l'évolution de l'infection. Inversement, les interventions thérapeutiques visant à moduler l'infection seront peu efficaces si la morbidité dépend de la réponse de l'hôte à l'inflammation [7].

1.1.2 Deux phénomènes cliniques comme origine

Le sepsis est donc le syndrome clinique qui naît de la coexistence de deux phénomènes cliniques, à savoir une infection et une réponse inflammatoire systémique. Ceci est illustré dans la Fig. 1.1.

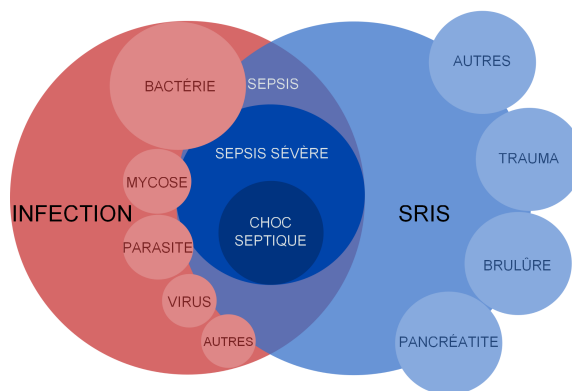


Fig. 1.1 – Illustration des relations existantes entre SRIS et infection. C'est uniquement lorsqu'un SRIS apparaît au cours d'une infection, qu'un sepsis, sepsis sévère ou choc septique est diagnostiqué suivant la sévérité de la maladie. Illustration inspirée de [1].

1.1.2.1 Infection

L'infection se définit comme un processus pathologique provoqué par l'invasion de l'organisme par des micro-organismes pathogènes ou potentiellement pathogènes. Ses manifestations cliniques résultent du conflit entre virulence du germe et capacité de résistance de l'hôte. Le site, le type et l'ampleur de l'infection ont alors un impact significatif sur le pronostic³. La réponse de l'hôte est donc différente suivant que l'agent pathogène est une bactérie à Gram positif ou à Gram négatif.

L'étude d'Angus *et al.* a montré que les principaux sites d'infection à l'origine d'un sepsis sont les poumons, la cavité abdominale, l'appareil urinaire et le système sanguin [2]. Dans la moitié des cas, l'infection microbienne est diagnostiquée et, dans 60% de ces cas, les bactéries à Gram négatif en sont l'origine [2, 8]. C'est pourquoi cette thèse s'intéresse au sepsis dont l'origine est une infection par les bactéries à Gram négatif.

1.1.2.2 SRIS

L'activation systémique de la réponse inflammatoire innée du patient n'est pas spécifique au sepsis et peut être déclenchée par une variété de conditions infectieuses et non infectieuses (Fig. 1.1). Le diagnostic du SRIS associé est alors établi lorsque le patient présente au moins deux des signes cliniques suivants :

- hyper- ou hypo- thermie : température corporelle $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$;
- tachycardie : fréquence cardiaque $> 90 \text{ min}^{-1}$;
- hyperventilation : fréquence respiratoire $> 20 \text{ min}^{-1}$;
- hyper- ou hypo- leucocytose : $> 12000 \mu\text{L}^{-1}$ ou $< 4000 \mu\text{L}^{-1}$.

3. Prédiction concernant l'évolution future de l'état du patient et les chances éventuelles de guérison.

Cependant, ces critères cliniques sont trop peu spécifiques et doivent souvent être complétés par des marqueurs biochimiques et/ou immunologiques plus concrets, tels que le taux de protéines pro-inflammatoires. Malheureusement, à ce jour, il n'existe pas encore de caractérisation clinique absolue du SRIS [7].

1.1.3 Une réponse dérégulée

Le sepsis correspond donc à une dissémination à l'ensemble de l'organisme d'une réaction inflammatoire initiée au niveau d'un site local infecté. Les cellules de la zone infectée, bien que n'étant pas des cellules immunitaires, ont néanmoins la capacité de répondre à la présence du pathogène par l'activation d'une réaction de défense. Sa principale caractéristique est une relation de proportionnalité entre, d'une part, l'amplitude et la durée d'exposition aux pathogènes et, d'autre part, l'amplitude et la durée de la réponse des cellules hôtes non immunitaires. Le but de cette première réponse est de permettre à toute cellule de l'organisme de se défendre contre les pathogènes par des mécanismes non spécifiques en attendant la mise en jeu de la reconnaissance de l'infection par le système immunitaire [9].

Après la mise en place de la réponse immunitaire, si les micro-organismes persistent et prolifèrent, la réponse inflammatoire continue, s'amplifie et va bloquer les pathogènes par la formation d'abcès. Si l'hôte ne parvient toujours pas à limiter la multiplication des pathogènes à une phase initiale, une réponse systémique s'établit et se caractérise par un processus d'amplification [10]. Les mécanismes à l'origine de cette amplification ne sont toujours pas connus. À la fois la virulence du pathogène et la résistance de l'hôte régulent la gravité de la réponse inflammatoire. La virulence du pathogène dépend du type, du nombre et de la localisation des micro-organismes envahisseurs. La résistance de l'hôte est déterminée par plusieurs facteurs dont l'âge, le sexe, la prédisposition génétique, la nutrition, les médicaments et certaines maladies telles que le cancer ou le diabète [11].

1.2 Mécanismes impliqués dans l'inflammation

Le dérèglement de la réponse immunitaire est donc inhérent au sepsis. Pour déterminer la physiopathologie du sepsis, il faut s'intéresser particulièrement aux mécanismes physiologiques qui régulent la réaction du patient vis-à-vis d'une agression par un agent pathogène [12]. Cette réaction consiste essentiellement en la reconnaissance rapide du danger potentiel et à la mise en place d'une défense anti-microbienne organisée. Le système immunitaire inné apporte une défense quasi-immédiate contre l'agent infectieux et déclenche la réponse immunitaire adaptative qui permet d'amplifier la réponse immunitaire et de fournir une réponse spécifique à l'antigène [13].

Les études scientifiques se sont tout d'abord largement intéressées aux mécanismes impliqués dans la réponse spécifique à l'agent infectieux apportée par le système immunitaire adaptatif. Cependant, il ne permet pas à lui seul de contrôler les infections. En effet, l'amplification clonale des lymphocytes naïfs⁴ et leur différenciation en cellules effectrices prennent plusieurs jours, alors que de nombreux micro-organismes agissent sur l'organisme en quelques dizaines de minutes [14]. Des mécanismes de défense doivent donc se mettre en place pour combattre quasi-immédiatement l'invasion des micro-organismes. Ce rôle est joué par le système immunitaire inné. Il agit en ligne de front et neutralise les micro-organismes par la phagocytose et l'action de molécules telles que les peptides antimicrobiens, le système du complément et les radicaux libres. En parallèle, il va également déclencher et orienter la réponse immunitaire adaptative en contrôlant l'expression de cytokines et de molécules costimulatrices [14].

Cette réponse innée est déclenchée par la détection des micro-organismes par une famille de récepteurs, les récepteurs de type Toll. La découverte récente de ces récepteurs représente une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction hôte-pathogène [15]. En effet, ceux-ci peuvent reconnaître les structures moléculaires associées

4. C'est-à-dire l'expansion clonale des lymphocytes dont les récepteurs reconnaissent un antigène exprimé par l'agent infectieux.

1.2. Mécanismes impliqués dans l'inflammation

aux pathogènes et initier une réponse inflammatoire systémique. En particulier, c'est le récepteur TLR4 qui, en détectant les lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif, reconnaît leur caractère toxique et initie la réaction de l'hôte vis-à-vis de ces micro-organismes [12].

1.2.1 La détection du LPS par TLR4

1.2.1.1 PAMPs et PRRs

Le processus inflammatoire lié au sepsis est déclenché par la détection de motifs structuraux, caractéristiques des pathogènes, par le système immunitaire de l'hôte. Ces motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) sont véritablement la signature moléculaire spécifique de groupes de micro-organismes et sont caractérisés par les trois propriétés suivantes [16, 17] :

1. Ils sont absents des cellules de l'hôte.
2. Ils sont communs à de nombreuses espèces de micro-organismes, ce qui permet de reconnaître l'énorme diversité des microbes par un nombre restreint de récepteurs.
3. Ils sont essentiels à la survie des micro-organismes, ce qui limite l'apparition de mutants échappant à la reconnaissance.

Les PAMPs sont reconnus par le système immunitaire inné grâce à des récepteurs qui leur sont complémentaires, à savoir les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs). Cette reconnaissance est indispensable et permet de fournir une réponse rapide en agissant directement sur l'agent pathogène [16, 17]. Il existe deux grandes classes de PRRs qui se distinguent par leur localisation :

1. Les PRRs solubles se trouvent dans le plasma sanguin et se lient aux pathogènes soit pour favoriser leur phagocytose soit pour les détruire directement.
2. Les PRRs membranaires sont présents à la surface des cellules du système immunitaire inné mais également à la surface de certaines cellules

ayant un contact avec le milieu extérieur (cellules épithéliales pulmonaires, cellules digestives, cellules de l'épiderme, *etc*). Ils permettent la reconnaissance des pathogènes et leur phagocytose sans induire de réaction inflammatoire [18].

1.2.1.2 TLRs

À la fin des années 1990, une nouvelle famille de récepteurs membranaires, dont le principal membre est le récepteur Toll, a été identifiée chez la drosophile et joue un rôle essentiel dans la réponse anti-infectieuse [19]. À la suite de la détection d'un pathogène, ces récepteurs sont capables d'induire une cascade de signalisation intracellulaire qui aboutit à la transcription de gènes de l'inflammation et à la synthèse de peptides anti-microbiens. La découverte d'autres récepteurs similaires à Toll et la démonstration de leur rôle respectif dans la défense anti-microbienne ont définitivement confirmé l'importance de cette famille de récepteurs dans l'immunité innée des insectes. La découverte de récepteurs homologues au Toll de la drosophile chez l'homme a permis d'étendre ces conclusions aux mammifères [20].

Les homologues de Toll chez l'homme sont appelés récepteurs de type Toll (TLRs). Ces récepteurs sont de type transmembranaire. Ils possèdent un domaine extracellulaire composé de la répétition de motifs riches en leucines, une courte portion transmembranaire et un domaine intracellulaire qu'ils partagent avec les membres de la famille des récepteurs de l'interleukine 1 (domaine TIR). Le domaine extracellulaire diffère d'un TLR à l'autre et est directement impliqué dans la reconnaissance et la fixation des PAMPs. Quant au domaine intracellulaire, il est commun à l'ensemble des TLRs et cible l'activation du facteur de transcription nucléaire kappa B (NF- κ B) qui induit l'expression de gènes pro-inflammatoires.

Actuellement, dix récepteurs de type Toll ont été identifiés (TLR1-TLR10) et reconnaissent une large gamme de motifs moléculaires spécifiques associés aux protéines bactériennes, virales et fongiques (Tab. 1.1).

1.2. Mécanismes impliqués dans l'inflammation

PAMP	Pathogènes	TLR
Lipoprotéine	Eubactéries	1, 2 & 6
Peptidoglycane	Bacilles à Gram positif	2 & 6
ARN double brin	Virus	3
LPS	Bacilles à Gram négatif	4
Flagelline	Bactéries à flagelles	5
Zyosan	Levures, Champignons	6
ARN simple brin	Virus	7 & 8
Imidazoquinoline	Virus	7 & 8
ADN	Eubactéries	9
<i>Inconnu</i>	Micro-organismes	10

Tab. 1.1 – Exemples de PAMPs et TLRs correspondant [12, 13, 14, 15]

1.2.1.3 TLR4, récepteur du LPS

Comme nous l'avons signalé dans la sous-section 1.1.2.1, la grande majorité des cas septiques apparaissent à la suite d'une infection par les bactéries à Gram négatif. Le principal PAMP associé à ce micro-organisme est le lipopolysaccharide (LPS). Cette endotoxine est ancrée par sa partie lipidique, le lipide A, dans la bicouche phospholipidique de la membrane externe de la paroi bactérienne (Fig. 1.2). C'est en fait cette partie lipidique de l'endotoxine qui est détectée par le système immunitaire et qui est responsable de la toxicité des bactéries à Gram négatif. Le LPS est d'ailleurs souvent utilisé dans les modèles expérimentaux pour induire le sepsis [21, 22].

Lors d'une invasion bactérienne de l'organisme, le LPS est reconnu par un récepteur membranaire spécifique, à savoir le cluster de différenciation 14 (CD14). L'importance de cette protéine dans la réponse cellulaire induite par le LPS a été mise en évidence à l'aide de souris génétiquement modifiées (souris *knock-out*). Il a ainsi été montré que l'injection d'une dose de LPS, habituellement létale chez la souris, est sans effet chez des souris qui n'expriment pas le CD14 [23]. Cependant, cette protéine n'a pas d'action directe sur la signalisation intracellulaire induite par le LPS. En effet, elle est

ancrée sur la partie externe de la membrane cytoplasmique par une queue lipidique mais ne possède pas de domaine cytosolique susceptible d'induire une signalisation. De nombreuses études génétiques ont permis de montrer que le corécepteur du CD14, capable d'induire une signalisation cellulaire au travers de la membrane et d'activer les cellules, est le TLR4 [24]. Ainsi, l'absence ou l'inactivation du TLR4 supprime totalement la sensibilité au LPS [25, 26].

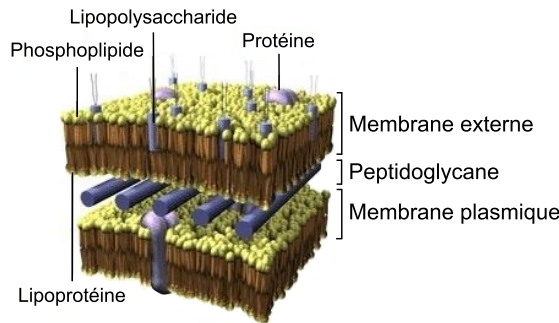


Fig. 1.2 – La paroi des bactéries à Gram négatif montre une structure en 3 couches : la membrane externe (bicouche phospholipidique incluant des protéines et les lipopolysaccharides), le peptidoglycane et la membrane plasmique. Illustration tirée de [27].

Néanmoins, si la présence de TLR4 est nécessaire pour induire un signal cellulaire, elle n'est pas suffisante. Une deuxième protéine, appelée protéine 2 de différenciation myéloïde (MD2), est également nécessaire. Ainsi, ce n'est qu'en transfectant⁵ les gènes TLR4 et MD2 dans des cellules qui ne les expriment pas naturellement que celles-ci deviennent tout à fait réactives à l'endotoxine [28]. Ensemble, TLR4, MD2 et CD14 forment le complexe de reconnaissance du LPS (Fig. 1.3).

Il est important de signaler qu'il subsiste toujours des incertitudes quant aux mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des TLRs. En particulier, il n'y a pas encore de preuves biophysiques solides que les TLRs interagissent directement avec les PAMPs.

⁵ La transfection est le processus de transfert de gènes qui consiste à introduire de l'ADN exogène dans des cellules eucaryotes.

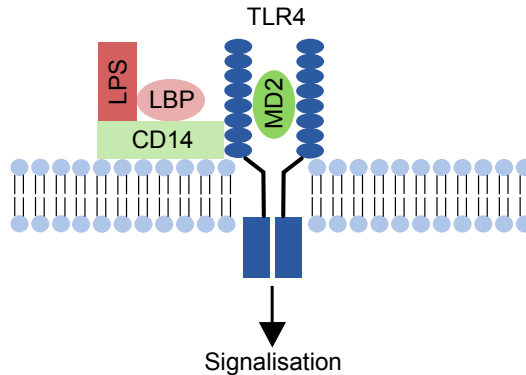


Fig. 1.3 – Le complexe de reconnaissance du LPS aboutit à la signalisation intracellulaire. Le LPS, souvent aidé d'une protéine (*LPS-binding protein*, LBP), se fixe à CD14 au niveau de la membrane cellulaire. Ce complexe s'associe alors avec MD2/TLR4 pour activer les voies de signalisation de ce récepteur. *Illustration inspirée de [12, 15].*

1.2.2 Les voies de signalisation cellulaire activées par TLR4

La reconnaissance du LPS par TLR4 s'accompagne d'une cascade de signalisation intracellulaire dont une des voies finales majeure est l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui régule l'expression inductible des cytokines nécessaires à l'inflammation, telles que le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), l'interleukine-1 (IL-1) ou l'interleukine-6 (IL-6), et des molécules costimulatrices (CD80 et CD86) qui activent la réponse immunitaire adaptative.

1.2.2.1 La voie dépendante de MyD88

Après avoir été stimulé par le LPS, le récepteur TLR4 interagit par l'intermédiaire de son domaine TIR avec une molécule cytoplasmique qui contient également un domaine TIR, le facteur de différenciation myéloïde 88 (MyD88). Cette protéine est en fait essentielle à la signalisation de tous les TLRs. Son rôle fondamental dans la signalisation intracellulaire a été mis en évidence par des souris *knock-out* MyD88^{-/-}. Celles-ci, ne pouvant pas exprimer

MyD88, se trouvaient alors dans l'incapacité de répondre à une invasion de micro-organismes et de produire des cytokines pro-inflammatoires [29].

La liaison TLR/MyD88 permet d'activer par phosphorylation une kinase IRAK1 par l'intermédiaire d'une autre kinase IRAK4 qui forme un complexe avec MyD88. IRAK1 se lie alors au facteur TRAF6 et le complexe IRAK1/TRAF6 interagit avec la kinase TAK1 à l'aide de deux protéines de liaisons TAB1 et TAB2. Une fois activée, TAK1 phosphoryle les kinases IKK α , IKK β et IKK γ . Celles-ci forment alors un complexe et phosphorylent à leur tour la protéine inhibitrice I κ B, provoquant sa dégradation et la libération de NF- κ B (Fig. 1.4 A). Ce dernier facteur peut alors migrer dans le noyau et exercer son activité transcriptionnelle en activant, notamment, l'expression des gènes codants pour la cytokine TNF- α et l'enzyme NO synthase inductible [30, 31].

1.2.2.2 La voie indépendante de MyD88

MyD88 fonctionne véritablement comme un adaptateur entre le récepteur TLR4 à domaine TIR et les kinases impliquées dans la signalisation en aval. Cependant, l'utilisation de souris *knock-out* MyD88^{-/-} a révélé l'existence d'une voie de signalisation indépendante de MyD88 en aval de TLR4. En effet, l'induction de NF- κ B par le LPS n'est pas complètement abolie chez ces souris mais seulement retardée. Il s'avère que TLR4 peut utiliser une autre molécule à domaine TIR, le facteur TRIF, pour activer le facteur de transcription NF- κ B (Fig. 1.4 B). Ainsi, ce n'est qu'en inhibant à la fois MyD88 et TRIF que l'activation de NF- κ B est totalement supprimée à la suite de la stimulation de TLR4 [32].

TRIF induit également le facteur 3 de régulation de l'interféron (IRF3) qui régule l'expression de la cytokine inflammatoire interféron- β (IFN- β). Cette voie fait intervenir les kinases IKK ϵ et TBK1 qui phosphorylent IRF3, permettant ainsi sa migration dans le noyau (Fig. 1.4 B) [31].

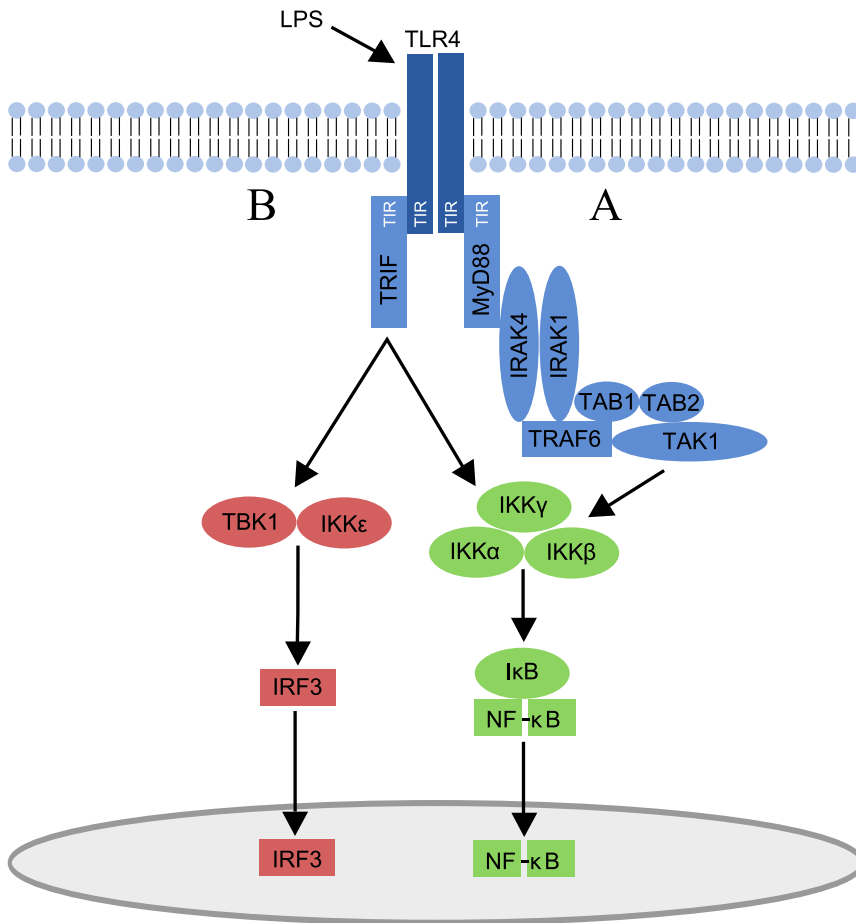


Fig. 1.4 – L’interaction LPS/TLR4 induit deux voies de signalisation qui conduisent à l’activation de NF- κ B. A : La première fait intervenir MyD88 dont le domaine TIR s’hétérodimérise avec celui du récepteur TLR4 et est responsable de l’expression de cytokines pro-inflammatoires. B : La deuxième fait intervenir TRIF, un autre adaptateur à domaine TIR, qui active non seulement NF- κ B mais également le facteur de transcription IRF3 qui induit l’expression de l’IFN- β . Illustration inspirée de [12, 14, 15, 33, 30].

1.3 Physiopathologie du sepsis

La découverte du rôle des récepteurs de type Toll a constitué une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes de signalisation de l’im-

munité innée. Leur action dans la reconnaissance du pathogène et dans le déclenchement de la réponse inflammatoire suggère un rôle possible dans la physiopathologie du sepsis. En effet, cette réaction de défense initialement contrôlée peut s'emballer et mener au développement du syndrome de réponse inflammatoire systémique responsable d'une souffrance cellulaire.

1.3.1 Amplification du signal

La réponse inflammatoire mise en place à la suite d'une infection fait intervenir de nombreux composants humoraux et cellulaires, tels que les cytokines, les chemokines, les médiateurs lipidiques et les espèces réactives de l'oxygène. La complexité de cette réponse provient du fait que la plupart de ces médiateurs ont de multiples cibles, provoquent leurs effets par différents mécanismes parallèles et sont impliqués dans la régulation des autres sous-produits inflammatoires. Par exemple, le monoxyde d'azote possède des propriétés antimicrobiennes directes mais peut également modifier la dilatation des vaisseaux sanguins et provoquer l'apoptose des macrophages [34, 35]. Par ailleurs, le TNF- α amplifie la régulation des NO synthases, l'IL-18 induit IFN- γ qui active en retour les macrophages, tandis que l'IL-10 est un suppresseur global de la fonction des macrophages [36, 37]. Dès lors, il devient compliqué de prédire les conséquences cellulaires induites par le blocage d'une des voies de ce réseau complexe et finement régulé.

1.3.1.1 État pro-inflammatoire

Comme nous venons de le voir dans la section 1.2, au cours du sepsis, le processus inflammatoire est initié suite à l'interaction d'un élément pathogène avec les récepteurs membranaires de type Toll. Dans ce cas, la signalisation intracellulaire initiée à la surface de la cellule aboutit à la production de médiateurs pro-inflammatoires. Parmi ceux-ci, les cytokines jouent un rôle critique dans la physiopathologie du sepsis car elles déclenchent une production massive de médiateurs qui contribuent directement au processus

inflammatoire.

Cette production massive de cytokines n'est cependant pas spécifique au sepsis. Les traumatismes multiples, les lésions d'ischémie-reperfusion, les rejets de greffes, ainsi que tout autre état inflammatoire aigu initient la même cascade de cytokines et donnent lieu à des processus inflammatoires locaux et systémiques. Mais l'état inflammatoire lié au sepsis est particulièrement considéré étant donné qu'aucune autre maladie n'est associée à un taux de mortalité aussi élevé malgré la prise en charge médicale du patient [38].

Les cytokines sont des molécules messagères qui comprennent les facteurs de nécrose tumorale, les interleukines, les chemokines, les interférons et les facteurs de stimulation des colonies. Les cytokines pro-inflammatoires recrutent et activent les cellules du système immunitaire et induisent la production d'un grand nombre d'autres médiateurs. Elles participent notamment à l'activation et à la prolifération des lymphocytes B et T. Par contre, les cytokines anti-inflammatoires atténuent le processus inflammatoire en inhibant ou en empêchant ces effets [37].

Dans les cytokines pro-inflammatoires, le TNF- α et l'IL-1 participent particulièrement à l'amplification de l'inflammation dans les cas de sepsis par leurs propriétés hypotensives. Chez les animaux de laboratoire, leur relargage dans la circulation induit l'hypotension et, lorsque les capacités de régulation de l'organisme sont dépassées, provoque l'état de choc qui est létal [39]. Par ailleurs, des modèles *in vivo* d'inflammation systémique ont montré que le TNF- α et l'IL-1 semblent agir en synergie. En effet, le blocage spécifique d'une des deux cytokines conduit à une réduction significative de la sévérité de l'inflammation ; le blocage simultané des deux cytokines induit une réduction encore plus grande de la sévérité de l'inflammation [40].

Cependant, la propriété fondamentale du TNF- α et de l'IL-1 dans la pathogénicité du sepsis est leur activité transcriptionnelle. Une fois produites, ces cytokines contribuent à entretenir leur propre production et vont induire une deuxième cascade inflammatoire qui comporte d'autres cytokines, des médiateurs lipidiques, des espèces réactives de l'oxygène, mais égale-

ment des molécules d'adhésion cellulaire qui initient la migration des cellules immunitaires dans le tissu infecté [39]. Ces seconds médiateurs pro-inflammatoires sont importants car ils orchestrent un ensemble complexe de réponses secondaires, à la fois tissulaires et humorales. Par exemple, l'IFN- γ augmente l'activité antimicrobienne des macrophages et promeut la production de cytokines et de radicaux libres par les cellules exposées aux stimuli pro-inflammatoires. En parallèle, l'IL-12 régule à la hausse la production d'IFN- γ par les cellules T et NK. Réciproquement, l'IFN- γ favorise le relargage de l'IL-12 par les macrophages induisant, par ce fait, une boucle de rétroaction positive critique pour la phagocytose des micro-organismes pathogènes [37].

Il est important de signaler que même si le sepsis est associé à une production exacerbée de produits pro-inflammatoires, il ne faut pas oublier que la majorité de ces médiateurs sont essentiels à la mise en place de la réponse anti-infectieuse. Ainsi, leur neutralisation totale à des fins thérapeutiques pourrait s'avérer délétère dans la perspective d'une maîtrise de l'invasion microbienne, rendant ainsi la prise en charge médicale du patient septique d'autant plus complexe.

1.3.1.2 État pro-coagulant

Des troubles de la coagulation sont également très fréquents lors du sepsis. 30 à 50% des patients développent une forme clinique très sévère, la coagulation intravasculaire disséminée, au cours de laquelle des microthrombi se forment dans les vaisseaux sanguins de l'organisme.

En fait, il s'est avéré que le sepsis perturbe l'équilibre homéostatique existant entre les mécanismes pro-coagulant et anti-coagulant (Fig. 1.5). L'augmentation de l'expression du facteur tissulaire par le LPS induit une surproduction de thrombine. La fibrine, protéine filamenteuse issue du fibrogène, est alors produite en excès et la coagulation sanguine augmente. Cet effet est amplifié par la surexpression simultanée de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 qui perturbe alors la fibrinolyse, mécanisme par lequel la

1.3. Physiopathologie du sepsis

fibrine est dégradée. De ces deux mécanismes en résulte un environnement pro-coagulant avec formation de microthrombi intravasculaires qui altèrent l'oxygénation des tissus [36, 38].

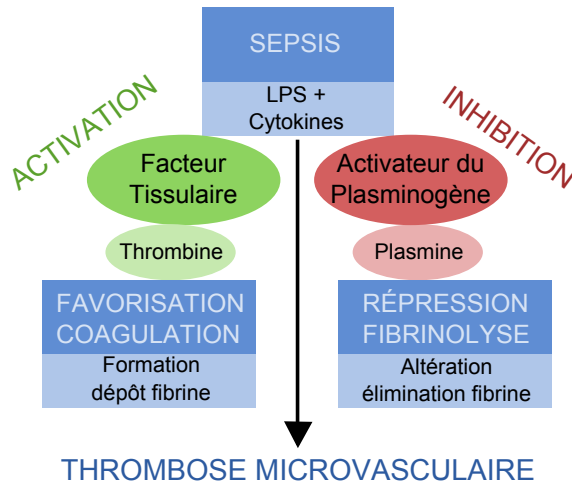


Fig. 1.5 – Mécanismes expliquant l'état pro-coagulant du sepsis. L'homéostasie est perturbée de deux façons différentes : par une surexpression de la voie pro-coagulante et par une inhibition de la voie anti-coagulante. *Illustration inspirée de [36, 38].*

De nouveau, les cytokines jouent un rôle important dans cet état pro-coagulant. En particulier, l'IL-1 et l'IL-6 sont de puissants inducteurs de coagulation tandis que l'IL-10 régule la coagulation en inhibant l'expression du facteur tissulaire [36, 38].

L'état pro-coagulant du sepsis provient également de la sous-régulation de trois protéines naturellement anti-coagulantes, à savoir l'anti-thrombine, la protéine C et l'inhibiteur du facteur tissulaire. Comme ces trois protéines ont normalement un effet sur le relargage du TNF- α en inhibant l'activation de NF- κ B, leur inhibition participe également à l'état pro-inflammatoire du sepsis [38].

1.3.2 Défaillance des organes

La cause ultime de mortalité chez les patients septiques est due à l'apparition du syndrome de défaillance multi-viscérale (SDMV) : les patients développent progressivement des défaillances au niveau de plusieurs organes. Il existe une relation étroite entre le nombre d'organes défaillants, leur sévérité et le taux de mortalité chez le patient. Si quatre ou cinq organes sont défaillants, la mortalité atteint alors plus de 90%, indépendamment du traitement suivi. La prévention du SDMV passe donc par une prise en charge réanimatoire et anti-infectieuse (antibiothérapie, éviction du foyer infectieux) précoces [41].

À l'heure actuelle, la stratégie thérapeutique du sepsis sévère et du choc septique repose avant tout sur le contrôle du processus infectieux sous-jacent et sur des mesures de réanimation cardio-pulmonaire visant tout particulièrement à assurer un état hémodynamique correct. Pour ce qui concerne les traitements spécifiques du sepsis sévère et du choc septique, en dépit d'hypothèses physiopathologiques solides, l'immense majorité des essais thérapeutiques avec des molécules spécifiques ont échoué à démontrer un bénéfice. Cependant, de multiples perspectives thérapeutiques existent, les grands axes physiopathologiques de développement étant le contrôle de la réponse inflammatoire au travers de l'endotoxine et de la cascade des cytokines, la maîtrise de l'activation de la coagulation mais aussi l'immuno-modulation au sens large [42].

D'autres stratégies thérapeutiques ont émergé également à la suite de la prise de conscience que l'hypoxie des tissus jouerait également un rôle majeur dans l'apparition de la défaillance multi-viscérale [43, 44]. Aujourd'hui, deux grandes hypothèses s'affrontent pour expliquer ce phénomène : l'« hypoperfusion tissulaire » et l'« hypoxie cytopathique » [45, 46]. Celles-ci sont présentées en détail dans le chapitre suivant qui traite de la défaillance rénale au cours d'un sepsis.

La défaillance du rein

Depuis quelques années, il est apparu que le sepsis était un facteur de risque important dans l'apparition d'une insuffisance rénale aiguë (IRA) chez le patient. En effet, la défaillance rénale est constatée dans 19% des cas de sepsis, 23% des cas de sepsis sévère et 51% des cas de choc septique [47]. Bien qu'on ignore toujours si l'IRA joue un rôle important dans le développement ultérieur du syndrome de défaillance multi-viscérale (SDMV) par ses effets sur l'homéostasie métabolique ou bien si l'IRA est simplement une manifestation du SDMV, cette complication augmente sévèrement la mortalité du patient, atteignant malheureusement les 70%. Cette incidence toujours trop élevée s'explique par un manque de thérapies spécifiques lié à une connaissance toujours limitée des mécanismes impliqués dans l'IRA septique.

L'IRA septique a longtemps été considérée comme une maladie hémodynamique induite par une ischémie rénale. Cependant, des recherches récentes ont souligné l'importance d'autres mécanismes tels que l'apoptose des cellules tubulaires rénales ou la perte de la fonction tubulaire [48, 49]. Les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à l'apparition d'une défaillance rénale lors d'un sepsis sont en fait très nombreux et peuvent être divisés en quatre grands domaines : la perfusion rénale, les mécanismes cellulaires, l'inflammation et la coagulation [50, 51]. Ce chapitre se propose de les passer en revue.

Sommaire

2.1	Physiopathologie de l'IRA	37
2.1.1	Structure et fonction du néphron	37
2.1.1.1	Vascularisation intrarénale	38
2.1.1.2	Filtration du sang	39
2.1.1.3	Transformation du filtrat en urine	41
2.1.2	Défaillance du rein	43
2.1.2.1	Définition de l'IRA	44
2.1.2.2	IRA fonctionnelle et NTA	44
2.2	·NO et perturbations vasculaires	45
2.2.1	Pouvoir vasodilatateur du ·NO	45
2.2.2	Altération de l'endothélium	46
2.2.3	Altération du flux sanguin rénal	47
2.3	ROS et lésions tubulaires	49
2.3.1	Espèces réactives de l'oxygène	49
2.3.2	Défenses cellulaires contre les ROS	54
2.3.2.1	Systèmes antioxydants enzymatiques	54
2.3.2.2	Systèmes antioxydants non enzymatiques	56
2.3.3	Cytotoxicité du stress oxydant	56
2.3.3.1	Peroxydation lipidique	57
2.3.3.2	Oxydation des protéines	58
2.3.3.3	Domages oxydatifs de l'ADN	58
2.3.4	Stress oxydant et IRA	58

2.3.4.1	Production excessive de ROS	59
2.3.4.2	Diminution des antioxydants endogènes	60
2.3.4.3	Lésions tubulaires	60
2.3.4.4	Apoptose et nécrose	61
2.4	Cytokines et inflammation	62
2.4.1	TNF- α et IL-1	62
2.4.2	Endothéline	63

2.1 Physiopathologie de l'IRA

Avant de décrire les mécanismes impliqués dans la défaillance rénale lors d'un sepsis, il est nécessaire de rappeler quelques aspects de la physiologie rénale qui jouent un rôle important dans la pathogénicité de cette défaillance dont les deux formes les plus fréquentes sont l'insuffisance rénale aiguë fonctionnelle et les nécroses tubulaires aiguës.

2.1.1 Structure et fonction du néphron

La fonction principale du rein est d'épurer le sang, c'est-à-dire d'extraire les déchets métaboliques pour les rejeter à l'extérieur sous forme d'urine. Le rein comporte deux régions distinctes : un cortex externe et une médulla interne (Fig. 2.1 A). Ces deux régions sont remplies de tubules excréteurs microscopiques associés à des vaisseaux sanguins (Fig. 2.1 B). L'élément structural et fonctionnel du rein est le néphron et correspond à un seul long tubule dont l'une des extrémités forme un réceptacle sphérique et creux, appelé capsule glomérulaire, qui entoure une boule de capillaires, nommée glomérule (Fig. 2.1 C) [52].

2.1. Physiopathologie de l'IRA

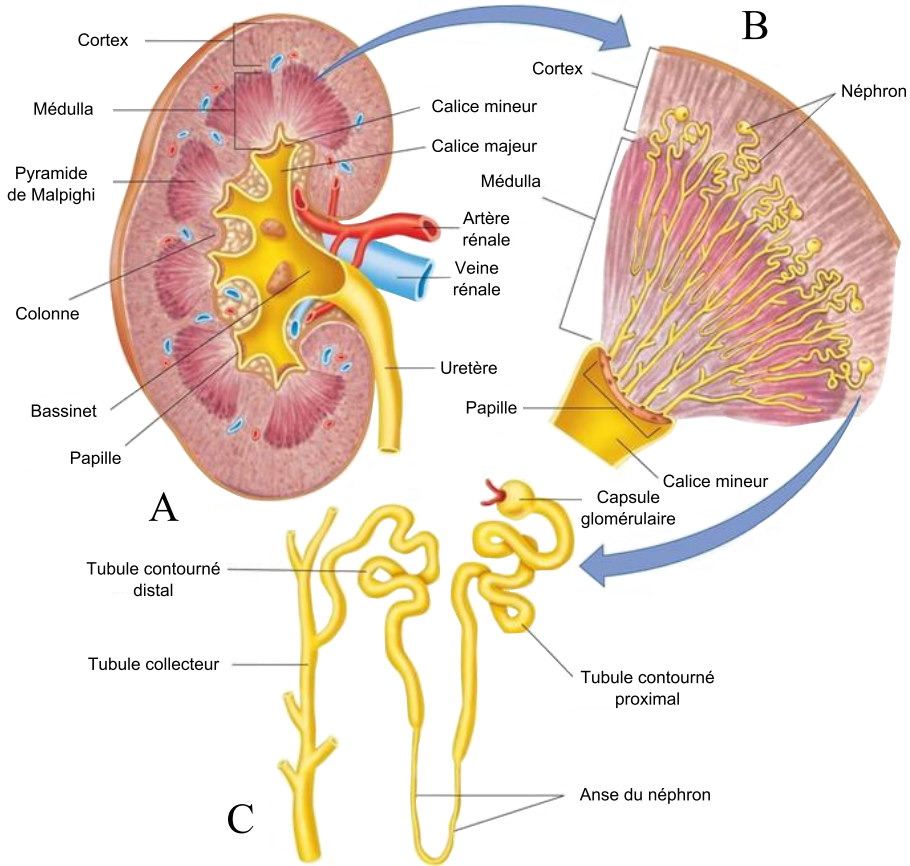


Fig. 2.1 – Système urinaire humain vu de l'échelle macroscopique à l'échelle microscopique. *Illustration tirée de [52].*

2.1.1.1 Vascularisation intrarénale

Le rein est un organe très richement vascularisé qui reçoit environ un quart du débit cardiaque. L'artère rénale se divise en artères interlobaires donnant naissance aux artérioles afférentes qui fournissent les capillaires glomérulaires. À leur sortie de la capsule glomérulaire rénale, les capillaires convergent en une artériole efférente. Ce vaisseau se subdivise à son tour en un réseau secondaire de capillaires, les capillaires péri-tubulaires, qui s'enchevêtrent avec les tubules contournés proximal et distal du néphron. D'autres

capillaires s'allongent vers le bas pour former la vasa recta, un réseau capillaire qui entoure l'anse du néphron (Fig. 2.2) [52].

La perfusion du rein est assez hétérogène selon la zone considérée. Le cortex reçoit trois quarts du débit rénal total associé à une forte pression partielle en oxygène (pO_2) alors que la médulla ne reçoit qu'un quart de ce débit rénal total avec une pO_2 très basse. Une des causes de cette pO_2 basse dans la médulla est le besoin énergétique important des cellules tubulaires de cette région pour leur activité métabolique impliquée dans le transport actif du sodium *via* la $Na^+-K^+-ATPase$ [53].

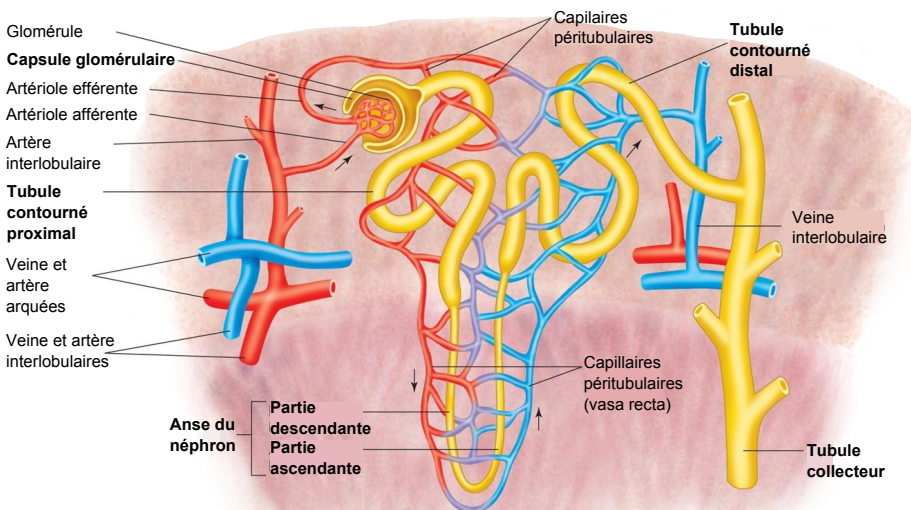


Fig. 2.2 – La perfusion rénale. Illustration tirée de [54].

2.1.1.2 Filtration du sang

La filtration commence au niveau de la capsule glomérulaire rénale, la pression artérielle poussant le sang du glomérule vers la cavité (Fig. 2.2). Les parois des capillaires sont perméables à l'eau et aux petits solutés, mais pas aux protéines ou aux cellules sanguines qui restent dans la lumière capillaire. Environ 20% du débit sanguin glomérulaire est ainsi ultra-filtré pour consti-

2.1. Physiopathologie de l'IRA

tuer l'urine primitive qui contient essentiellement des ions, du glucose, des vitamines, des déchets azotés (comme l'urée) et d'autres petites molécules [52].

Le débit de filtration glomérulaire (DFG) est défini par deux facteurs tels que :

$$\text{DFG} = K_f \times \text{PUF}.$$

Le coefficient d'ultrafiltration K_f dépend de la surface et de la perméabilité hydraulique de la paroi capillaire. Ce coefficient est abaissé dans la plupart des maladies rénales. La pression d'ultrafiltration PUF est la pression efficace de filtration dans les capillaires glomérulaires et fait intervenir trois termes de pression tels que :

$$\text{PUF} = P_{\text{glomérule}} - P_{\text{capsule}} - \Pi.$$

La pression hydrostatique glomérulaire $P_{\text{glomérule}}$ dépend de l'activité de la pompe cardiaque et donc de la pression artérielle rénale. La pression hydrostatique capsulaire P_{capsule} est générée par la résistance à l'écoulement de l'urine dans les tubes. La pression oncotique capillaire Π provient du fait que la concentration en protéines dans le plasma des capillaires glomérulaires est beaucoup plus élevée que celle de l'urine primitive [53].

Pour une perfusion rénale globale donnée, la pression hydrostatique glomérulaire dépend du rapport des résistances vasculaires efférentes et afférentes. Lorsque ce rapport augmente, la pression hydrostatique et donc la filtration augmentent et inversement. Ce rapport conditionne donc en partie l'importance de la fraction du flux plasmatique rénal qui subit la filtration glomérulaire et par conséquent la réabsorption tubulaire proximale [53].

Lors d'une hypotension artérielle ou d'une réduction du débit cardiaque, un mécanisme d'autorégulation se met en place pour maintenir le flux sanguin rénal et la filtration glomérulaire. Cette autorégulation fait appel à des variations des résistances vasculaires des artéioles afférente et efférente de

telle sorte qu'une vasodilatation de l'artériole afférente et une vasoconstriction de l'artériole efférente se produisent de façon concomitante quand la pression artérielle diminue. Sur un rein normal, l'autorégulation est effective pour des valeurs de pression artérielle rénale moyenne comprises entre 80 et 170 mmHg. Au-delà de ces valeurs, le débit sanguin rénal et la filtration glomérulaire varient de façon linéaire avec la pression artérielle moyenne [53].

2.1.1.3 Transformation du filtrat en urine

À la sortie de la cavité glomérulaire, le filtrat traverse trois régions du néphron : le tubule contourné proximal, l'anse du néphron et le tubule contourné distal (Fig. 2.2). Celui-ci se déverse finalement dans un tubule rénal collecteur qui reçoit le filtrat de plusieurs néphrons. Les nombreux tubules rénaux collecteurs se déversent ensuite dans le bassinnet qui débouche dans l'uretère, conduit contractile qui achemine l'urine vers la vessie (Fig. 2.1 A) [52].

Tubule contourné proximal

Les processus de sécrétion et de réabsorption dans le tubule contourné proximal modifient considérablement le volume et la composition du filtrat. La fonction principale des cellules de l'épithélium de transport consiste à réabsorber la majorité du NaCl et de l'eau du filtrat initial. Le sel du filtrat diffuse passivement dans les cellules de l'épithélium de transport et les membranes des cellules procèdent au transport actif du Na⁺ vers le liquide interstitiel. À mesure que le sel passe du filtrat au liquide interstitiel, l'eau suit par osmose (Fig. 2.3). Le sel et l'eau diffusent par la suite du liquide interstitiel vers les capillaires péri-tubulaires. En parallèle, d'autres nutriments précieux, tels le glucose, le lactate, les acides aminés et le potassium, sont transportés du filtrat au liquide interstitiel, de manière active ou passive, pour ensuite être acheminés aux capillaires péri-tubulaires (Fig. 2.3).

2.1. Physiopathologie de l'IRA

L'épithélium tubulaire est donc polarisé puisqu'il est capable de créer et de maintenir des gradients de concentration ionique entre, d'une part, l'urine primitive à la sortie glomérulaire et, d'autre part, les capillaires péri-tubulaires et le liquide interstitiel d'autre part. Le domaine apical des cellules épithéliales, en contact avec l'urine primitive, est doté d'une importante bordure en brosse, faite de microvillosités longues et denses, qui contient notamment les cotransporteurs de sodium et les échangeurs $\text{Na}^+\text{-H}^+$ nécessaires à la réabsorption du sel. Le domaine basolatéral des cellules épithéliales, en contact avec le liquide interstitiel, est quant à lui caractérisé par la présence de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ [53].

Partie descendante de l'anse du néphron

Dans cette partie du néphron, l'épithélium de transport est perméable à l'eau mais peu perméable aux sels et aux petits solutés. Comme l'osmolarité du liquide interstitiel augmente graduellement du cortex rénal à la médulla rénale interne, l'eau sort du tubule par osmose et la concentration en solutés augmente dans la partie descendante de l'anse du néphron (Fig. 2.3).

Partie ascendante de l'anse du néphron

Contrairement à la partie descendante, l'épithélium de transport de la partie ascendante de l'anse du néphron est perméable aux ions, mais non à l'eau. Près du fond de l'anse, le NaCl , devenu concentré, traverse le tubule par diffusion facilitée et se retrouve dans le liquide interstitiel. L'exode de sel du filtrat se poursuit lorsqu'on remonte vers le cortex rénal. Cependant, dans cette région, l'épithélium procède au transport actif de NaCl vers le liquide interstitiel. Le filtrat perd donc progressivement du sel sans perdre de l'eau et se dilue progressivement (Fig. 2.3).

Tubule contourné distal

Le tubule contourné distal constitue un autre site important de sécrétion et de réabsorption. Il joue notamment un rôle clé dans la régulation de la concentration du K^+ et du NaCl dans les liquides corporels (Fig. 2.3).

Tubule rénal collecteur

Le tubule rénal collecteur transporte le filtrat à travers la médulla rénale jusqu'au bassinnet. En réabsorbant activement le NaCl, l'épithélium de transport de cette partie du néphron joue un rôle important dans la détermination de la quantité de sel excrété dans l'urine. Parallèlement, presque tous les monosaccharides, les vitamines et les autres nutriments organiques, ainsi que près de 99% de l'eau de ce filtrat, sont réabsorbés et passent dans le sang. Il ne reste alors plus que l'urine à excréter.

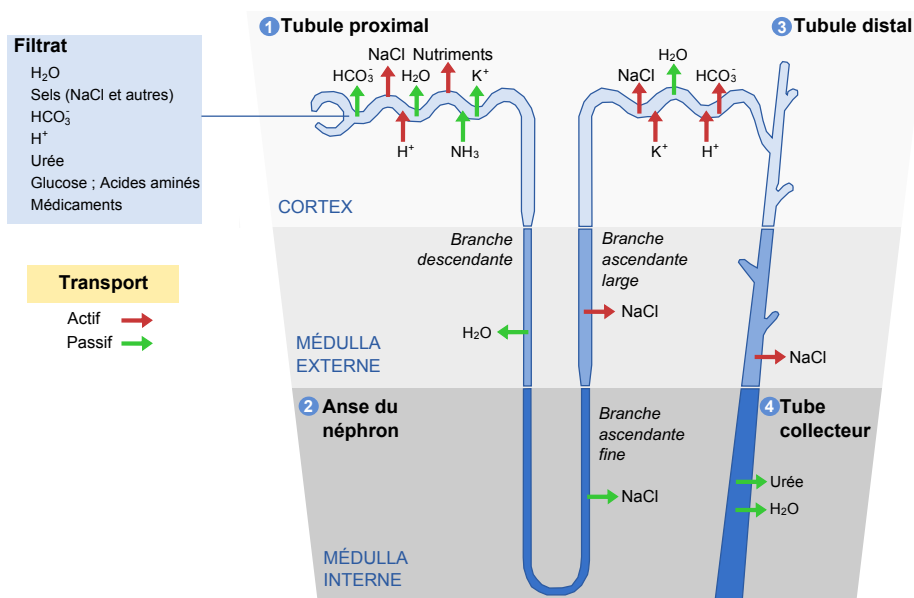


Fig. 2.3 – Le néphron et les fonctions des différentes régions de l'épithélium de transport. Illustration inspirée de [54].

2.1.2 Défaillance du rein

Pour aborder la notion de défaillance d'organe, il est utile de définir, dans un premier temps, les fonctions de cet organe. Concernant le rein, celles-ci sont très souvent partagées ou nécessitent une interaction avec d'autres organes.

2.1. Physiopathologie de l'IRA

Seules deux fonctions lui sont spécifiques, il s'agit de l'excrétion des déchets du métabolisme azoté et la production d'urine. Ce sont ces deux aspects de la fonction rénale qui permettent de définir le syndrome d'insuffisance rénale aiguë [55].

2.1.2.1 Définition de l'IRA

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) désigne un syndrome caractérisé par une diminution brutale des capacités à éliminer les déchets, à réguler le volume extracellulaire et à maintenir l'homéostasie acido-basique et électrolytique. Chez les patients en réanimation, ce syndrome est fréquent et associé à une augmentation de la morbidité et de la mortalité. La majorité des IRA surviennent dans le cadre d'un syndrome de défaillance multi-viscérale. Récemment, une étude a montré que le sepsis était le facteur prédisposant le plus fréquemment associé à la survenue de l'IRA [56].

2.1.2.2 IRA fonctionnelle et NTA

L'IRA fonctionnelle représente 60% des IRA et se définit comme une baisse du débit de filtration glomérulaire consécutive à une diminution de la perfusion rénale due à un trouble circulatoire général situé en amont des reins ; par exemple, un bas débit cardiaque, une hypotension artérielle systémique ou une vasodilatation artérielle. Cette altération de la filtration glomérulaire est instantanément réversible en cas de correction de la perfusion rénale et ne s'accompagne d'aucune lésion cellulaire observable.

L'IRA fonctionnelle traduit surtout une adaptation du rein aux modifications de ses conditions de perfusion. La baisse de la pression de perfusion rénale entraîne la mise en jeu de phénomènes d'autorégulation de la filtration glomérulaire. L'artériole afférente se dilate pour maintenir le débit plasmatique glomérulaire et l'artériole efférente se contracte pour maintenir les pressions hydrostatique et d'ultrafiltration glomérulaires. Ces phénomènes d'adaptation permettent de conserver l'intégrité des fonctions tubulaires, à

savoir la réabsorption d'eau et de sodium et la conservation du pouvoir de concentration des urines.

Si l'hypoperfusion rénale dépasse les capacités d'autorégulation du rein, une ischémie s'installe et va induire alors une nécrose tubulaire aiguë (NTA) ischémique. La déplétion rapide des stocks d'ATP cellulaire qui accompagne l'ischémie conduit à l'apparition de lésion cellulaires irréversibles qui aboutissent à la mort cellulaire. La NTA est caractérisée par une obstruction tubulaire provoquée par des débris cellulaires nécrosés, par une diminution du coefficient de perméabilité de la membrane glomérulaire et par une rétrodiffusion des urines au travers des parois tubulaires. L'ensemble de ces événements conduit à une diminution brutale de la filtration glomérulaire et de la fonction rénale.

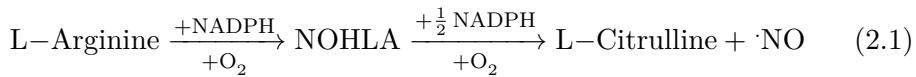
2.2 ·NO et perturbations vasculaires

Les états de sepsis sont caractérisés par une perturbation profonde du système cardiovasculaire avec altération de la fonction cardiaque, redistribution du flux sanguin entre organes et altération microcirculatoire [57]. Cette dernière semble être un véritable moteur de la défaillance rénale, coupant effectivement l'acheminement de l'oxygène et des nutriments aux tissus [50, 51].

2.2.1 Pouvoir vasodilatateur du ·NO

L'endothélium vasculaire, couche la plus interne des vaisseaux sanguins en contact avec le sang, est au centre de la coordination de la perfusion microcirculatoire et donc de la distribution de l'oxygène dans les tissus. Pour satisfaire les besoins métaboliques des cellules, l'endothélium contrôle le tonus artériel pour maintenir la perfusion microcirculatoire [58]. Il y parvient notamment en produisant du monoxyde d'azote (·NO) à partir d'une enzyme, la NO synthase endothéliale (eNOS) [59]. Cette NO synthase (NOS) est présente de manière constitutive dans l'endothélium du glomérule, des

artérioles afférentes et efférentes, des artères intrarénales et des vasa recta médullaires. Elle catalyse l'oxydation de l'acide aminé L-arginine en ·NO et L-citrulline via les deux réactions d'oxygénation suivantes qui font intervenir l'intermédiaire N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHLA) [34, 35] :



Le ·NO ainsi produit diffuse rapidement vers les cellules musculaires lisses vasculaires, qui se situent dans la paroi des vaisseaux sanguins, où il active directement la guanylate cyclase (GC) qui dégrade alors la guanosine-5'-triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (cGMP). Ce second messenger va fermer les canaux à calcium (Ca²⁺) et inhiber la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLCP), de telle sorte que le mécanisme contractile de la myosine est à la fois désensibilisé au calcium et déphosphorylé [35, 60]. Ceci résulte alors en une relaxation vasculaire (Fig. 2.4).

Le ·NO régule donc la pression sanguine et la distribution du flux sanguin dans le rein. Il participe également à la préservation du sang en empêchant l'activation, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes sanguines [35, 58]. Ces propriétés du ·NO vont avoir un rôle majeur dans les processus inflammatoires liés au sepsis.

2.2.2 Altération de l'endothélium

Lors d'un sepsis, l'ensemble de l'endothélium vasculaire est fortement perturbé. Les artères perdent leur capacité à se contracter et les résistances vasculaires systémiques diminuent de manière trop importante, ce qui contribue à un état d'hypotension globale. Par ailleurs, la perméabilité vasculaire augmente et le retour veineux diminue, ce qui induit un état hypovolémique sévère. Le débit cardiaque devient alors insuffisant pour distribuer la quantité d'oxygène nécessaire à tous les organes [57].

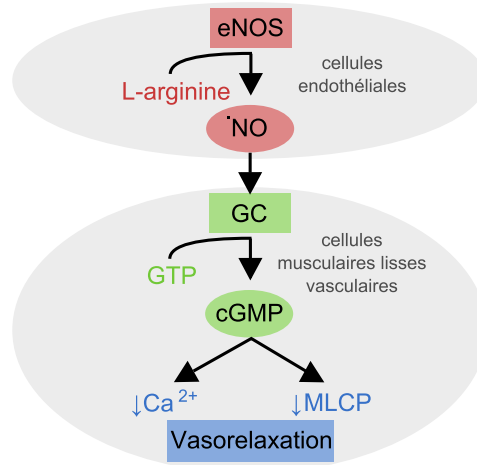


Fig. 2.4 – Le rôle du $\cdot\text{NO}$ dans la relaxation des vaisseaux sanguins. Le $\cdot\text{NO}$, produit par la NOS des cellules endothéliales, augmente le niveau cellulaire de cGMP dans les cellules musculaires lisses qui induit leur relaxation. Illustration inspirée de [35].

La vasodilatation artérielle qui accompagne le sepsis est induite, du moins en partie, par les cytokines qui régulent à la hausse l'expression de la NO synthase inductible (iNOS) dans les vaisseaux par une voie de transcription qui fait intervenir le $\text{NF-}\kappa\text{B}$ similaire à celle décrite dans la section 1.2.2. Cette enzyme induit alors, selon la même réaction décrite en 2.1, une production de $\cdot\text{NO}$, plus importante et plus prolongée que celle activée par eNOS, qui amplifie les conséquences de l'état de choc hypovolémique [61].

2.2.3 Altération du flux sanguin rénal

Malgré la vasodilatation induite par le $\cdot\text{NO}$ et la chute globale de la résistance vasculaire systémique, les modèles *in vivo* de sepsis ont démontré une vasoconstriction de la circulation rénale.

L'implication des NO synthases dans cette altération du flux sanguin rénal a été mise en évidence par l'utilisation d'un inhibiteur de ces NOS chez des rats en état de choc hypovolémique. Le traitement permettait à la fois de prévenir la diminution de la pression sanguine artérielle et de maintenir le

flux sanguin rénal et la filtration glomérulaire [62]. Par la suite, l'implication de iNOS dans cette vasoconstriction rénale a été mise en évidence par l'utilisation de souris *knock-out* iNOS^{-/-} qui ne développaient pas d'IRA après une ischémie-reperfusion [63]. Plus tard, l'activation de iNOS a été effectivement détectée dans les reins de patients en état de choc septique qui présentaient une altération de la fonction tubulaire proximale [64].

D'autres études expérimentales ont montré que l'augmentation de la concentration plasmique de ·NO est associée à une sous-régulation de eNOS dans le rein, contribuant à une vasoconstriction rénale lors du sepsis [65, 66]. L'utilisation de souris *knock-out* eNOS^{-/-} a d'ailleurs montré que l'apparition d'une IRA lors d'une endotoxémie était plus probable chez ces souris que chez les souris sauvages de contrôle. Ces souris *knock-out* eNOS^{-/-}, bien qu'ayant une pression sanguine maintenue, présentaient néanmoins une résistance vasculaire rénale plus importante [66, 67].

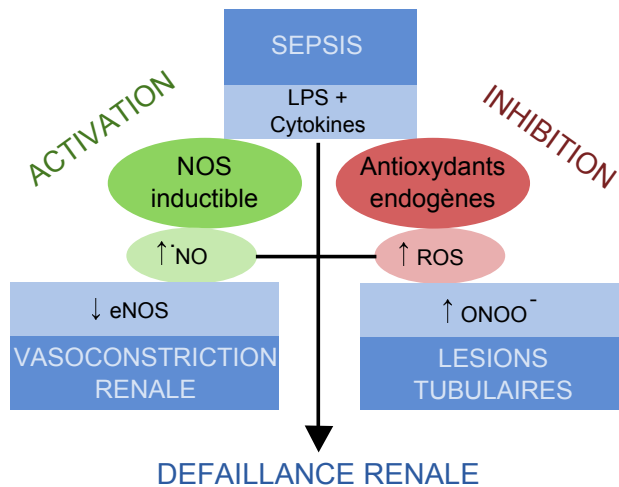


Fig. 2.5 – Les effets délétères du ·NO lors du sepsis. L'induction de iNOS et la génération des ROS provoquent une vasodilatation systémique, une ischémie rénale par une sous-régulation de eNOS et des lésions tubulaires par l'action du ONOO⁻. L'ensemble de ces facteurs participe à l'apparition d'une défaillance rénale. Illustration inspirée de [60, 66].

Par conséquent, l'activation systémique et rénale de iNOS chez le patient induit une sous-régulation de eNOS dans le rein qui subit alors une vasoconstriction (Fig. 2.5). Ainsi, lors du sepsis, l'hypoperfusion rénale empêche une oxygénation correcte des tissus provoquant une ischémie locale qui devient délétère lorsqu'elle est prolongée dans le temps [66, 68].

2.3 ROS et lésions tubulaires

Le sepsis est connu pour être associé à une production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui participent aux lésions rénales oxydatives [60, 69, 70].

2.3.1 Espèces réactives de l'oxygène

De manière générale, le « stress oxydant » apparaît lorsque l'homéostasie redox est perturbée, soit par une production excessive d'espèces oxydantes, soit par une défaillance des systèmes antioxydants [71]. Dans la cellule humaine, les formes radicalaires initiatrices des phénomènes oxydants sont dérivées de l'oxygène O_2 et de l'azote N. En particulier, l'anion superoxyde (O_2^-) et le monoxyde d'azote ($\cdot NO$) vont être à l'origine d'espèces très oxydantes qui conduisent à la dégradation des molécules biologiques.

L'oxygène fondamental

La molécule d'oxygène, si essentielle au métabolisme de la cellule, possède la particularité d'être une espèce biradicalaire. En effet, elle possède deux électrons non appariés, de spins parallèles, situés sur les deux orbitales moléculaires antiliantes π^* (Fig. 2.6).

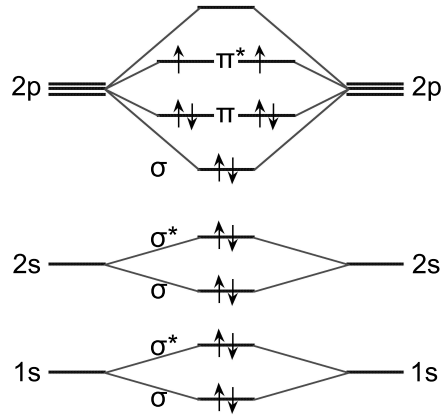
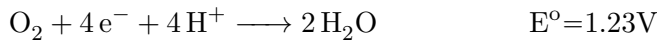


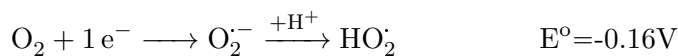
Fig. 2.6 – Représentation des orbitales moléculaires de la molécule d'O₂.

Cette structure confère à la molécule d'O₂ la capacité d'effectuer jusqu'à quatre transferts monoélectroniques successifs, les électrons étant fournis par les sites métalliques des métalloprotéines, aboutissant *in fine* à sa réduction en molécule d'H₂O [71, 72].



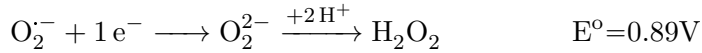
Dans la cellule, cette réduction de l'O₂ se fait essentiellement à travers la chaîne de respiration mitochondriale, de façon progressive et contrôlée. Si cette réduction tétravalente est considérée comme un processus sûr, sa réduction incomplète selon un processus à un électron conduit en revanche à la formation d'espèces radicalaires dotées d'une grande réactivité chimique.

Ainsi, après acceptation d'un e⁻ sur une des orbitales π*, la réduction monoélectronique de l'O₂ aboutit à la production du radical superoxyde O₂⁻ ou sa forme protonnée HO₂ (si pH < 4.8).

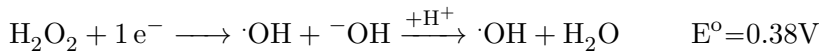


En acceptant un deuxième e⁻ sur son autre orbitale π*, la molécule d'O₂

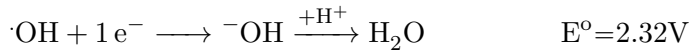
devient l'anion peroxyde O_2^{2-} qui n'est pas une espèce radicalaire puisque les deux orbitales π^* sont saturées avec deux e^- de spins antiparallèles. En milieu aqueux, l' O_2^{2-} est protoné et forme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .



Ajouter un troisième e^- sur l'orbitale moléculaire antiliante σ^* provoque une déstabilisation de la molécule d' O_2 entraînant une rupture de la liaison entre les deux atomes d'oxygène. Cette réduction monoélectronique du H_2O_2 est à l'origine du radical hydroxyle $\cdot OH$ et de l'anion hydroxyle ^-OH .



L'addition d'un quatrième e^- donne naissance à l'anion hydroxyle ^-OH dont la forme protonée est bien sûr l' H_2O .

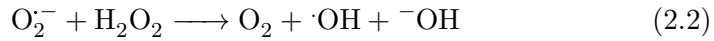


La réduction d'une molécule d' O_2 par quatre e^- conduit donc à la production d'une molécule d' H_2O par l'intermédiaire des ROS. Ceux-ci, de part leur grande réactivité, sont susceptibles d'interagir avec de nombreux substrats biologiques. Leur capacité à réagir et à induire des dégâts dépend surtout de leur pouvoir oxydant, représenté par leur potentiel d'oxydoréduction ainsi que de leurs caractéristiques cinétiques.

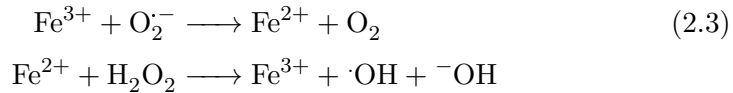
Radical superoxyde

Le radical O_2^- est l'espèce radicalaire la moins réactive sur les substrats biologiques, ses différentes constantes de vitesse étant très faibles ($k \approx 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Il ne réagit donc pas avec les acides nucléiques, les acides aminés ou les acides gras polyinsaturés. Néanmoins, il va réagir avec quelques cibles privilégiées telles que le cytochrome c ($k = 2.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ou la vitamine C ($k = 2.7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Sa cible privilégiée reste cependant la superoxyde dismutase ($k = 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) qui permet son élimination [71].

Par conséquent, la toxicité de l' $O_2^{\cdot-}$ ne peut s'effectuer que de façon indirecte par la génération d'espèces secondaires beaucoup plus délétères. La réaction la plus fréquemment citée est la réaction de Haber-Weiss aboutissant à la production de radicaux $\cdot OH$ à partir de la rencontre de l' $O_2^{\cdot-}$ et du H_2O_2 .



Cependant, la constante de vitesse de cette réaction est trop lente ($k \leq 1 M^{-1}s^{-1}$) pour avoir un impact significatif *in vivo*. En revanche, l'interaction du radical $O_2^{\cdot-}$ avec les cations métalliques de métalloprotéines (hémoglobine, transferrine, *etc*) pourrait expliquer cette réaction *in vivo*. En effet, bien que l'oxydation du Fe^{2+} par le H_2O_2 est assez lente ($k \approx 2-7 \cdot 10^5 M^{-1}s^{-1}$), celle-ci peut être accélérée par la réduction du Fe^{3+} par l' $O_2^{\cdot-}$ ($k = 1.5 \cdot 10^8 M^{-1}s^{-1}$), donnant lieu à une réaction du type Fenton :



La forme protonée HO_2^{\cdot} du radical $O_2^{\cdot-}$ possède un pouvoir oxydant plus élevé et de meilleures constantes de vitesse sur plusieurs substrats organiques. La toxicité de l' $O_2^{\cdot-}$ pourrait donc en partie s'expliquer par sa forme protonée, qui n'est cependant pas prédominante au pH physiologique [71].

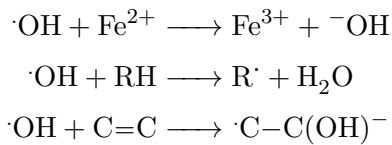
Une autre hypothèse expliquant la toxicité potentielle de l' $O_2^{\cdot-}$ est la formation du peroxy-nitrite $ONOO^-$ à partir de sa réaction biradicalaire avec le $\cdot NO$. Cet oxydant provoque des effets très délétères aux acides aminés, aux acides nucléiques et aux phospholipides [73].

Radical hydroxyle

Le radical hydroxyle $\cdot OH$ est un puissant oxydant puisque son potentiel d'oxydoréduction est élevé, mais aussi parce que ses constantes de vitesse vis-à-vis de la plupart des substrats biologiques sont extrêmement élevées ($k \approx 10^9-10^{10} M^{-1}s^{-1}$). Lorsqu'un radical $\cdot OH$ entre en collision avec un

composant cellulaire, il réagit immédiatement sans nécessiter d'apport énergétique supplémentaire. Ces propriétés expliquent l'extrême réactivité du radical $\cdot\text{OH}$ ainsi que son caractère peu sélectif. En contrepartie, il possède une durée de vie très courte (quelques fractions de microsecondes), ainsi qu'un champ de réaction limité (30 Å) [71].

Le radical $\cdot\text{OH}$ peut oxyder un substrat selon trois mécanismes : l'arrachement d'un e^- , l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur un substrat organique RH et l'addition sur une double liaison.



Les deux derniers mécanismes décrits aboutissent à des réactions au niveau des doubles liaisons contenues notamment dans les cycles des bases des acides nucléiques, de certains acides aminés et des acides gras polyinsaturés. Dans ce dernier cas, une réaction de peroxydation lipidique se déclenche.

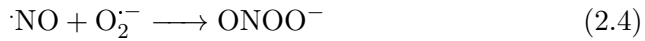
Peroxyde d'hydrogène

Bien qu'il ne soit pas un radical, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est très toxique pour les cellules car il peut facilement traverser les membranes biologiques et se transformer en $\cdot\text{OH}$ extrêmement réactif en présence de complexes actifs métalliques. Les dommages provoqués indirectement par H_2O_2 via l' $\cdot\text{OH}$ ne sont donc pas limités à un seul compartiment cellulaire [71].

Peroxynitrite

Le peroxynitrite ONOO^- , formé à partir de la réaction entre le $\cdot\text{NO}$ et l' O_2^- , est une molécule plus ou moins stable à pH physiologique, sa durée de vie étant de quelques millisecondes [73]. La constante de vitesse de formation de cet ion ($k = 1.6 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) est dix fois supérieure à celle de la réaction de la SOD avec l' O_2^- ($k = 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Le rapport des deux constantes montre clairement que la formation du ONOO^- *in vivo* est hautement pro-

bable là où sont produits simultanément les deux précurseurs $\cdot\text{NO}$ et $\text{O}_2^{\cdot-}$ [71].



Même si le ONOO^- n'est pas une espèce radicalaire, c'est pourtant un très puissant oxydant responsable de réactions d'oxydation. Sa toxicité résulte de son action directe sur des groupements thiols, des centres métalliques ou de la formation secondaire de radicaux libres, tels que $\text{CO}_3^{\cdot-}$ et $\cdot\text{NO}_2$ après réaction avec le CO_2 [73].

2.3.2 Défenses cellulaires contre les ROS

Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les antioxydants cellulaires peuvent être classés en deux catégories : soit enzymatiques, soit non enzymatiques. [71, 74].

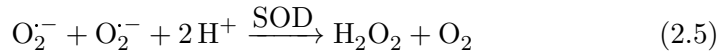
2.3.2.1 Systèmes antioxydants enzymatiques

Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la thiorédoxine.

Superoxyde dismutase

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métallo-enzymes qui catalysent la dismutation de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et O_2 avec une vitesse de réaction 10^4 fois supérieure à celle de la dismutation spontanée au pH physiologique (k

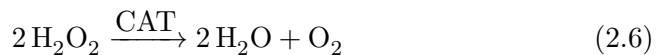
$\approx 2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).



Les SOD existent sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : la SOD mitochondriale (Mn dépendante), la SOD cytoplasmique (Cu et Zn dépendante) et la SOD extracellulaire (Cu et Zn dépendante). La forme mitochondriale permet la dismutation quasi instantanée de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ au niveau de la chaîne de transport des électrons. Si la MnSOD semble indispensable à la vie, ce n'est pas le cas pour la forme cytosolique, même si celle-ci joue un rôle important dans l'élimination des ROS. La SOD extracellulaire se trouve sur la face externe de la membrane plasmique, mais également dans les espaces interstitiels des tissus et dans les liquides extracellulaires [71, 74].

Catalase

La catalase (CAT) est une enzyme qui catalyse la réaction de décomposition du H_2O_2 en O_2 ($k \approx 2\text{-}4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [74].



La CAT est localisée principalement dans le peroxyosome, mais elle se trouve aussi dans le cytoplasme [71, 74].

Glutathion peroxydase

Les glutathion peroxydases (GPx) jouent un rôle central dans le mécanisme d'élimination du H_2O_2 en couplant sa réduction en H_2O avec l'oxydation du glutathion réduit (GSH) ($k \approx 0.6\text{-}1.8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [74].



Ils existent plusieurs isoformes de GPx qui diffèrent par leur localisation

2.3. ROS et lésions tubulaires

cellulaire et leur spécificité au substrat. Par exemple, la GPx1 est la forme la plus abondante, qui se trouve dans presque tous les tissus des mammifères, et a pour substrat le peroxyde d'hydrogène. La GPx4 est également exprimée dans tous les tissus des mammifères, mais à des niveaux plus faibles, et a pour substrat les hydroperoxydes lipidiques [71, 74].

Thiorédoxine

Les thiorédoxines (TRx) sont des petites protéines, présentant un site actif dithiolé, qui possèdent une activité enzymatique antioxydante intrinsèque. Une fois oxydée, la thiorédoxine est réduite par la thiorédoxine réductase (TRxR). Dans les cellules de mammifères, les TRx ont une localisation soit cytosolique (TRx1 et TRxR1) soit mitochondriale (TRx2 et TRxR2).

2.3.2.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques réagissent directement avec les agents oxydants et les désactivent. Par exemple, la vitamine E est fixée aux membranes et stoppe la chaîne de réactions de peroxydation lipidique en capturant un radical lipidique peroxyde $\text{LOO}\cdot$. La vitamine C, quant à elle, peut capter directement $\text{l}'\text{O}_2^-$ et $\text{l}'\text{OH}$. À ces deux vitamines, d'autres antioxydants non enzymatiques peuvent être cités : glucose, albumine, taurine, β -carotène, *etc.*

2.3.3 Cytotoxicité du stress oxydant

La cellule maintient donc son état redox en équilibre par des systèmes d'élimination des ROS. Le stress oxydant apparaît lorsqu'un déséquilibre en faveur de la génération de ROS se produit et conduit alors à une oxydation accrue des composants cellulaires essentiels.

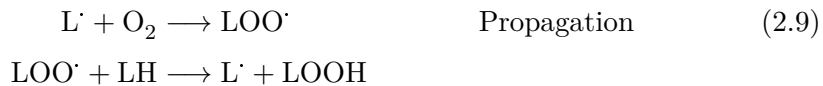
Tous les composés cellulaires, à savoir les lipides, les protéines, les acides nucléiques et les hydrocarbonates peuvent être attaqués par les ROS, ce

qui conduit à une perturbation importante du métabolisme cellulaire. L'un des processus induisant notamment la mort cellulaire est la peroxydation lipidique.

2.3.3.1 Peroxydation lipidique

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation. L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation des lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes. Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN.

La peroxydation lipidique est en fait une réaction en chaîne entre les métabolites réactifs oxydants ($\text{OH}\cdot$ et $\text{HO}_2\cdot$) et les acides gras insaturés constitutifs des lipides localisés principalement dans les membranes cellulaires [74]. Cette réaction présente des étapes séparées d'initiation, de propagation et de terminaison reprises respectivement dans les réactions 2.8, 2.9 et 2.10.



2.3. ROS et lésions tubulaires

Les conséquences cellulaires de cette lipoperoxydation membranaire sont nombreuses et incluent le gonflement et la désintégration des mitochondries, la destruction des lysosomes, l'inhibition des synthèses protéiques, la dénaturation enzymatique et la lyse des membranes conduisant à la mort cellulaire.

2.3.3.2 Oxydation des protéines

Les modifications oxydatives des protéines par les ROS peuvent être classées en deux catégories : d'une part, celles qui cassent les liaisons lipidiques et modifient la chaîne peptidique, et d'autre part, les modifications peptidiques par addition de produits issus de la peroxydation lipidique. De telles modifications conduisent généralement à une perte de la fonction catalytique ou structurale des protéines affectées, perturbant par conséquent le fonctionnement cellulaire [75].

2.3.3.3 Dommages oxydatifs de l'ADN

Il existe au sein de la cellule deux types d'ADN : l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ROS du fait de son potentiel de réparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe à l'une des principales sources de ROS cellulaires, à savoir la chaîne mitochondriale. La modification de l'ADN mitochondrial serait impliquée dans les phénomènes de mort cellulaire en altérant le fonctionnement des mitochondries [76, 77].

2.3.4 Stress oxydant et IRA

Le rein, qui représente moins d'1% de la masse corporelle, consomme relativement une grande quantité d'oxygène, soit environ 10% de la consommation totale du corps. Cet oxygène est autant utilisé par les reins car ils doivent assurer la phosphorylation oxydative et la synthèse d'ATP nécessaires pour

les processus de transport tubulaires. Au cours de ce métabolisme redox, le rein génère de faibles quantités de ROS de façon contrôlée et sans effets secondaires apparents [78]. Cependant, si la production de ROS devient excessive, elle peut participer aux mécanismes impliqués dans l'apparition d'IRA, tels que les lésions et la mort des cellules tubulaires [79].

2.3.4.1 Production excessive de ROS

À ce jour, très peu d'études ont examiné le rôle du stress oxydant dans l'apparition d'une IRA chez les patients septiques. Pourtant, déjà l'étude de Himmerfalb *et al.* avait mis en évidence une augmentation de l'oxydation des protéines du plasma chez les patients présentant une IRA, ce qui suggérait la production massive de ROS par les cellules immunitaires [70]. Par la suite, le rôle des ROS a surtout été étudié dans des modèles d'IRA ischémique qui tentaient de mimer l'hypoperfusion rénale observée lors du sepsis. De nombreux modèles animaux ont démontré que l'utilisation du catalyseur de la dismutation de l' O_2^- (SOD) ou d'un inhibiteur de iNOS (L-NIL) avait un rôle protecteur sur la fonction rénale [80, 81]. L'utilisation simultanée de ces deux antioxydants a également permis de suggérer l'implication du peroxy-nitrite (Fig. 2.5) [81]. D'autres preuves indirectes de la présence de radicaux libres après une ischémie rénale ont été apportées par l'observation de dégâts oxydatifs au niveau du rein, tels que la peroxydation lipidique et les dommages oxydatifs de l'ADN [80, 81]. La présence de ces ROS a également été détectée directement dans une étude *in vitro* de cellules épithéliales tubulaires soumises au phénomène d'hypoxie-réoxygénation sans pour autant en déterminer leurs sources [82].

Par ailleurs, il a été montré que la surproduction de ROS contribuait à la vasoconstriction rénale observée lors du sepsis. En particulier, l' O_2^- peut réagir avec le $\cdot NO$ présent en excès lors du sepsis. Il module ainsi le niveau de $\cdot NO$ et diminue sa biodisponibilité vasculaire, ce qui participe à la vasoconstriction rénale (Fig. 2.5) [69].

2.3.4.2 Diminution des antioxydants endogènes

À cette surproduction possible des ROS, il a été montré que l'IRA septique était associée à une sous-régulation des défenses antioxydantes enzymatiques (Fig. 2.5). Une étude d'IRA ischémique a montré une diminution significative de la quantité d'ARN messagers codant pour la catalase, la superoxyde dismutase cytoplasmique et la glutathion peroxydase [83]. Dans un autre modèle d'IRA septique, les niveaux en ARN messenger et en protéine du complexe enzymatique SOD étaient diminués et les lésions tubulaires ou vasculaires ne pouvaient plus être évitées. Néanmoins, le traitement par des antioxydants exogènes semblait protéger les souris endotoxémiques de la défaillance rénale [69].

2.3.4.3 Lésions tubulaires

Les ROS sont impliquées dans l'apparition de lésions tubulaires qui se manifestent par des modifications structurelles. La perte de polarité et de la bordure en brosse, puis la perte de l'intégrité des jonctions serrées, s'accompagnent de l'apparition d'intégrines à la surface cellulaire de l'épithélium tubulaire. Ces intégrines permettent l'adhésion leucocytaire et participent à la réaction inflammatoire par la synthèse de médiateurs cytotoxiques. Il existe également une redistribution de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ de la membrane basolatérale vers la partie apicale, participant alors à la baisse des transports liés au Na^+ . Finalement, les cellules perdent leurs attaches, se détachent dans la lumière tubulaire et l'obstruent (Fig. 2.7).

Les manifestations cliniques se traduisent alors par une perte de la capacité de concentration urinaire avec la disparition du gradient médullaire, suivie d'une baisse du débit urinaire alors que les tubules se dénudent et s'obstruent [53, 84].

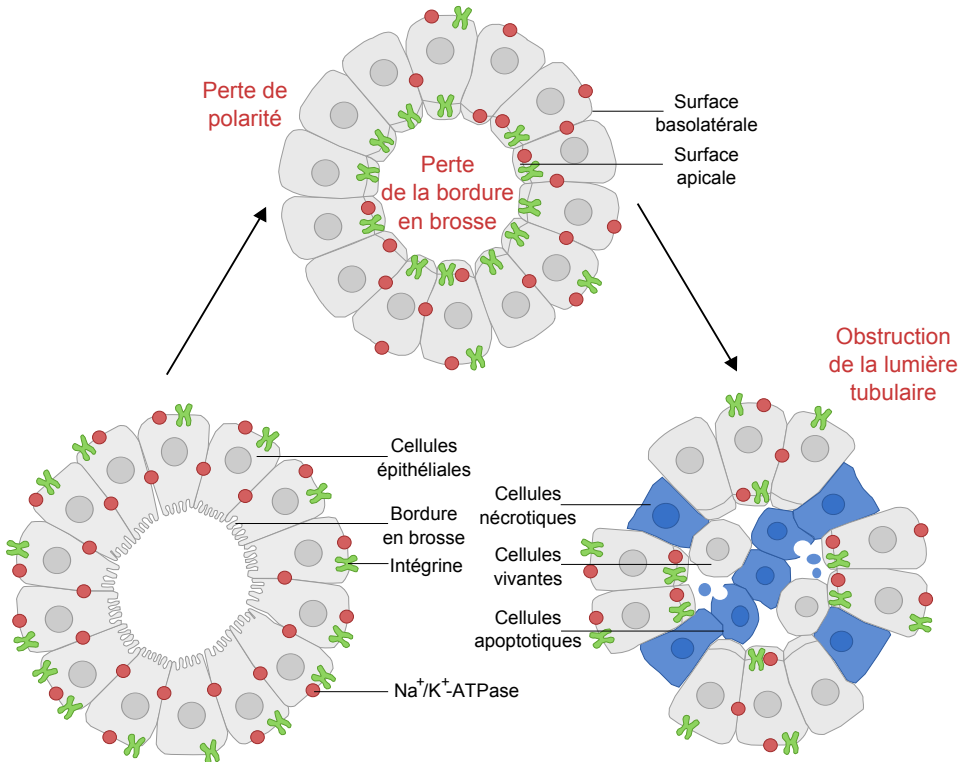


Fig. 2.7 – Modifications structurales des tubules proximaux lors d'une IRA ischémique, comprenant la perte de polarité, la perte de la bordure en brosse et la redistribution des intégrines et des Na⁺-K⁺-ATPase à la surface apicale. Illustration inspirée de [85].

2.3.4.4 Apoptose et nécrose

Il est maintenant établi que les ROS jouent également un rôle majeur dans l'induction de la mort cellulaire dont les deux voies principales sont l'apoptose et la nécrose. Ces deux types de destruction cellulaire se différencient selon les critères morphologiques et physiologiques suivants :

1. L'apoptose est une mort cellulaire qui nécessite de l'énergie et qui met en jeu un programme génétique spécifique. Elle est caractérisée morphologiquement par un rétrécissement cellulaire, une condensation de la chromatine, une fragmentation nucléaire et un bourgeonnement de la membrane plasmique [48].

2. La nécrose apparaît lors d'une diminution sévère d'ATP et est, quant à elle, caractérisée par une rupture brutale et rapide de l'homéostasie cellulaire qui conduit à la libération du contenu intracellulaire dans le compartiment extracellulaire provoquant, *in vivo*, une réaction inflammatoire [48].

Actuellement, il semblerait que les cellules tubulaires rénales meurent à la fois par apoptose et par nécrose (Fig. 2.7), tant dans les modèles animaux d'IRA que chez des patients présentant une nécrose tubulaire aiguë [86]. Il n'est cependant pas encore possible de déterminer la contribution relative de ces deux formes de mort cellulaire dans l'apparition de la défaillance rénale.

2.4 Cytokines et inflammation

Dans le premier chapitre, il a été indiqué que le sepsis était un état pro-inflammatoire accompagné d'une production excessive de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1. Ces facteurs humoraux font partie intégrante de la défaillance rénale septique; le rein étant particulièrement vulnérable aux lésions induites par les cytokines [50, 51].

2.4.1 TNF- α et IL-1

La plupart des lésions rénales induites par les cytokines sont dues au TNF- α et à l'IL-1. En effet, celles-ci déclenchent le relargage d'autres cytokines (section 1.3), la vasoconstriction des tissus (section 2.2), la production de ROS (section 2.3), l'induction du facteur tissulaire (section 1.3) et la promotion de thromboses (section 1.3).

Plus particulièrement, lorsque des animaux sont traités avec le TNF- α et l'IL-1, des lésions rénales apparaissent et le flux sanguin rénal diminue [87]. De plus, il a été montré que le TNF- α induisait la mort par apoptose des cellules endothéliales glomérulaires [88]. Plus récemment, l'effet toxique direct du TNF- α sur le rein a été mis en évidence par Knotek *et al.* L'utilisation

de récepteurs solubles qui neutralisent le TNF- α apporte une protection rénale chez des souris en choc septique [89]. Par ailleurs, des souris déficientes en récepteurs du TNF- α sont résistantes à la défaillance rénale induite par le LPS et présentent moins d'apoptose tubulaire [90]. Le TNF- α est, par conséquent, un médiateur important dans l'apparition de l'IRA septique.

2.4.2 Endothéline

L'endothéline est un peptide sécrété par l'endothélium vasculaire qui a un effet vasoconstricteur puissant sur les cellules musculaires lisses. Sa production est stimulée par les cytokines pro-inflammatoires et permet, dans un premier temps, de maintenir la pression artérielle dans la phase initiale du sepsis. Cependant, sa libération cause de fortes contractions des artérioles afférentes et efférentes du rein, participant ainsi à l'ischémie rénale [87]. L'injection intrarénale d'un sérum anti-endothéline à un modèle de rat septique a d'ailleurs permis de diminuer l'altération de la fonction rénale induite par l'endotoxine [91].

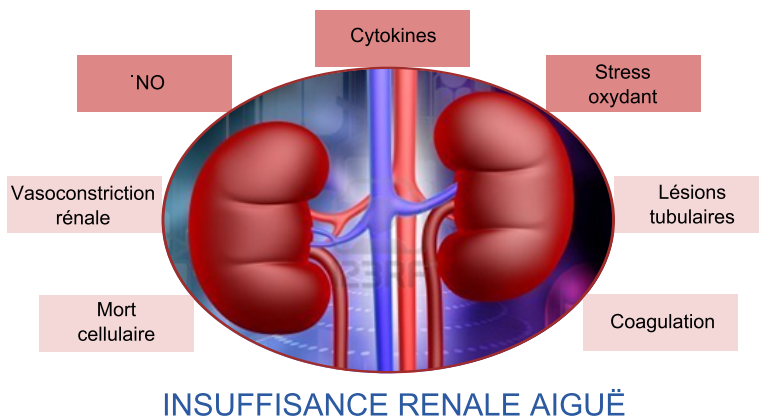


Fig. 2.8 – Mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la défaillance rénale apparaissant lors du sepsis. *Illustration inspirée de [50].*

2.4. Cytokines et inflammation

En conclusion, l'insuffisance rénale aiguë est une complication grave au cours du sepsis. Elle signe un retentissement sévère de la maladie septique et est indépendamment associée à une surmortalité [92]. Sa physiopathologie est en partie liée aux désordres hémodynamiques rénaux induits par le sepsis mais d'autres facteurs sont à prendre en compte, tels que le stress oxydant, l'apoptose cellulaire et l'inflammation (Fig. 2.8), afin de proposer de nouvelles stratégies préventives et/ou thérapeutiques.

Deuxième partie

Présentation synoptique des résultats

Dysfonctionnement du métabolisme énergétique

L'hypoperfusion induite par une vasoconstriction rénale est le mécanisme principal le plus souvent proposé pour expliquer l'apparition d'une insuffisance rénale aiguë (IRA) lors d'un sepsis [22, 66, 68, 93]. Cependant, depuis quelques années, l'altération microcirculatoire ne suffit plus à elle seule pour expliquer ce processus d'IRA. Deux grands essais cliniques mis en place pour optimiser l'oxygénation des tissus chez les patients septiques, avec un syndrome de défaillance multi-viscérale déclaré, n'ont pas eu les effets bénéfiques escomptés dans le rétablissement des patients [3, 4]. Par ailleurs, une étude globale des différents modèles animaux d'IRA septique, effectuée par Langenberg *et al.*, a mis à mal ce paradigme de l'altération hémodynamique.

Elle indique que les mesures du flux sanguin rénal dépendent fortement du modèle expérimental mis en place. Ainsi, bien qu'une diminution de ce flux soit observée dans 62% des études animales recensées, aucune conclusion générale ne peut être tirée quant à l'implication du trouble de la circulation sanguine dans le développement de l'IRA septique [94].

Parallèlement à ces études de flux vasculaire, une diminution de la consommation en O_2 et une élévation de la pression partielle en O_2 au sein des tissus ont été observés chez des patients septiques [95, 96]. Ces phénomènes suggèrent un problème lié à une utilisation inadéquate de l' O_2 plutôt qu'un défaut dans sa distribution. Un nouveau mécanisme a alors été proposé pour expliquer l'apparition de la défaillance rénale au cours du sepsis et repose sur un déficit de l'extraction cellulaire de l' O_2 . Que celui-ci soit acheminé correctement ou non par le système microvasculaire jusqu'au tissu rénal, les cellules n'utiliseraient plus correctement l' O_2 . Ce dysfonctionnement a été nommé par E. Robin « dysoxie tissulaire » [97].

La première partie de cette thèse de doctorat a consisté à vérifier cette hypothèse sur un modèle cellulaire d'inflammation du rein induite par une endotoxine bactérienne, à savoir le lipopolysaccharide. L'utilisation de deux méthodes complémentaires, à savoir l'oxygraphie de haute résolution et la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique, a permis de montrer que les cellules rénales présentaient une vitesse de consommation en O_2 significativement réduite lorsqu'elles étaient traitées avec le LPS, suggérant ainsi une altération du métabolisme cellulaire de l' O_2 .

Sommaire

3.1	Avant-propos	69
3.1.1	Métabolisme et énergie	69
3.1.2	Respiration cellulaire aérobie	70
3.1.3	Objectif de l'étude	71
3.2	Méthodes expérimentales	72
3.2.1	Mise en place du modèle de stress cellulaire	72

3.2.2	Respirométrie de haute résolution	73
3.2.2.1	Principe de la technique	73
3.2.2.2	Précautions	75
3.2.3	Oxymétrie par RPE	76
3.2.3.1	Principe de la technique	76
3.2.3.2	Choix du senseur et calibration	77
3.2.3.3	Protocole	78
3.2.4	Mesure de la production d'ATP	79
3.2.5	Analyse du type de mort cellulaire	80
3.2.6	Analyse statistique des données	81
3.3	Résultats	81
3.3.1	Étude de la vitesse de respiration basale des cellules	81
3.3.1.1	Respirométrie de haute résolution	81
3.3.1.2	Oxymétrie de RPE	82
3.3.2	Étude de la réversibilité du phénomène	85
3.3.3	Altération dans la production d'ATP	85
3.3.4	Mort cellulaire par apoptose	85
3.4	Discussion et conclusion	87

3.1 Avant-propos

3.1.1 Métabolisme et énergie

Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions biochimiques qui gèrent les ressources énergétiques d'une cellule. Il constitue un réseau complexe de réactions dans lequel on distingue le catabolisme de l'anabolisme [52] :

1. Les voies cataboliques sont des processus de dégradation qui libèrent de l'énergie en décomposant des molécules complexes en des composés plus simples.

3.1. Avant-propos

2. Les voies anaboliques, quant à elles, consomment de l'énergie et permettent d'élaborer des molécules complexes à partir de molécules plus simples.

Ce transfert d'énergie entre le catabolisme et l'anabolisme se nomme couplage énergétique et est en grande partie possible grâce à une molécule appelée adénosine-5'-triphosphate (ATP). Lorsque la liaison du phosphate terminal de l'ATP est rompue par hydrolyse, une molécule inorganique P_i est libérée et l'ATP devient alors adénosine diphosphate (ADP). L'énergie libérée par cette réaction est utilisée par la cellule, à l'aide d'enzymes spécifiques, pour des processus endergoniques. La quasi totalité du travail cellulaire repose sur la capacité de l'ATP à activer d'autres molécules en leur transférant des groupements phosphates. La régénération de l'ATP par l'ajout d'un phosphate à de l'ADP étant endergonique, l'apport d'énergie est principalement assuré par la respiration cellulaire [52].

3.1.2 Respiration cellulaire aérobie

La respiration cellulaire aérobie est une des principales voies cataboliques qui décompose le glucose en CO_2 et H_2O . Elle comprend trois stades métaboliques représentés dans la Fig. 3.1.

1. La glycolyse, qui a lieu dans le cytosol, dégrade le glucose en pyruvate. Son rendement net est de deux moles d'ATP et de deux moles de $NADH + H^+$ par mole de glucose.
2. Le cycle de Krebs, qui se déroule dans la matrice mitochondriale, dégrade le pyruvate, d'abord converti en acétyl-CoA, en CO_2 . Le rendement net de ce cycle est d'une mole d'ATP, de quatre moles de $NADH + H^+$ et d'une mole de $FADH_2$ par mole de pyruvate.
3. La chaîne de transport d'électrons, au niveau de la membrane interne des mitochondries, accepte les électrons fournis par la glycolyse et le cycle de Krebs et les transmet à un complexe enzymatique qui les combine à des protons et à l' O_2 pour former de l' H_2O . L'énergie libérée à chaque maillon de la chaîne est alors emmagasinée sous une forme que la mi-

tochondrie peut utiliser pour produire de l'ATP. Près de 90% de l'ATP engendrée par la respiration cellulaire provient de ce mode de synthèse appelé « phosphorylation oxydative ».

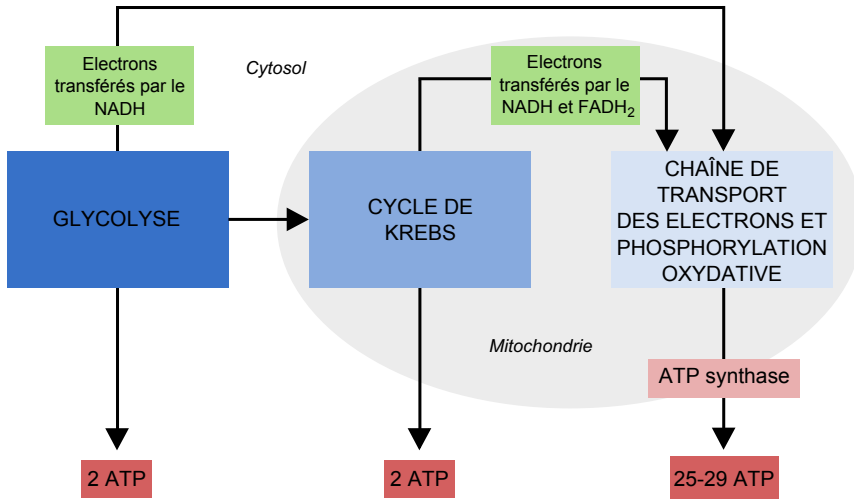


Fig. 3.1 – La respiration cellulaire fournit l'énergie nécessaire à une cellule pour fonctionner en produisant de l'ATP, source d'énergie directement utilisable par la cellule. Illustration inspirée de [52].

3.1.3 Objectif de l'étude

La respiration est donc indispensable au bon fonctionnement de la cellule. Elle utilise l'O₂ pour produire de l'ATP, source d'énergie pour toutes les réactions chimiques du métabolisme. Cette première étude a été conçue et réalisée pour vérifier que l'hypothèse de dysoxie tissulaire était un mécanisme possible de défaillance rénale au cours d'un sepsis. En d'autres mots, elle essaye de déterminer si l'inflammation inhérente au sepsis induit des perturbations dans la respiration des cellules rénales. Pour y arriver, nous avons mis en place un modèle cellulaire d'inflammation du rein et étudié la consommation en O₂ et la production en ATP des cellules.

3.2 Méthodes expérimentales

3.2.1 Mise en place du modèle de stress cellulaire

Les études à partir de modèles animaux de l'IRA septique ne permettent pas de dissocier les effets directs de l'inflammation sur les cellules rénales des effets secondaires liés à la vasoconstriction rénale et à l'hypoperfusion capillaire. Pour mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la défaillance rénale, il nous est donc apparu opportun de mettre en place un modèle cellulaire de l'inflammation du rein susceptible de mimer l'effet *in vivo* (Fig. 3.2).

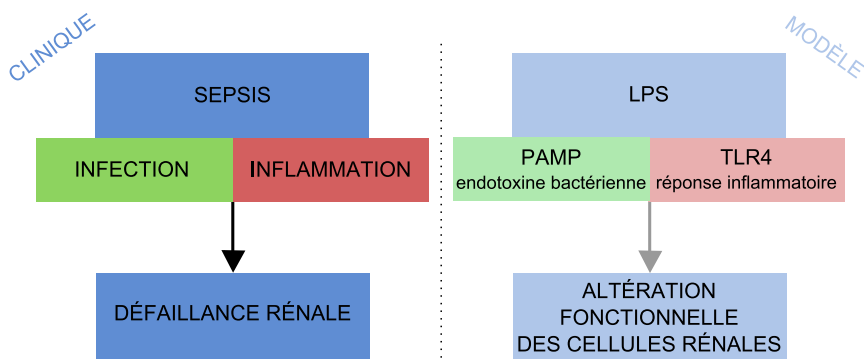


Fig. 3.2 – Parallèle entre le problème clinique et le modèle expérimental mis en place dans cette thèse de doctorat.

Dans ce modèle, le rein est modélisé par des cellules épithéliales tubulaires proximales (PTC) dérivées d'un rein humain normal. Cette lignée cellulaire, appelée HK-2, a été fournie par le centre de ressources biologiques American Type Culture Collection (ATCC, CRL-2190). Il s'agit de cellules bien différenciées, sur la base de leurs propriétés histochimiques, cytochimiques et fonctionnelles, qui sont capables de reproduire des résultats expérimentaux obtenus avec des PTC fraîchement isolées [98]. Compte tenu de ces caractéristiques, les cellules HK-2 semblent être un outil de choix pour l'étude de

la physiopathologie des PTC.

Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Lonza, Belgique) avec 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*, Gibco Laboratories, Belgique), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine (Invitrogen, Belgique). Elles ont été maintenues à 37°C dans un incubateur à CO_2 pour permettre leur bonne croissance.

Le stress inflammatoire a été induit lorsque la culture atteignait 70% de confluence, c'est-à-dire dans sa phase de croissance exponentielle. Toujours sans aucune privation d' O_2 , l'inflammation des cellules a été induite par l'ajout d'une endotoxine bactérienne, à savoir le lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* 055 : B5, Sigma-Aldrich, Belgique), dans le milieu de culture fraîchement renouvelé. Comme une étude préliminaire effectuée par Le Dorze *et al.* a montré que les perturbations induites par le LPS sur les cellules HK-2 étaient indépendantes de la dose utilisée (de 100 ng/ml à 100 $\mu\text{g/ml}$), nous avons décidé de travailler avec une dose fixée à 1 $\mu\text{g/ml}$ et d'étudier l'effet du LPS sur les HK-2 au cours du temps (de 1 h à 24 h) [99].

3.2.2 Respirométrie de haute résolution

3.2.2.1 Principe de la technique

La respirométrie de haute résolution utilise un appareil oxygraphique (Fig. 3.3) pour étudier la respiration d'organismes vivants. Les cellules rénales HK-2 sont placées dans deux chambres fermées hermétiquement et la concentration en O_2 (CcO_2) y est mesurée à intervalles réguliers par une sonde polarographique afin de contrôler la consommation en O_2 de l'échantillon. Ce suivi permet aussi de déterminer la vitesse à laquelle l'échantillon consomme l' O_2 initialement disponible, c'est-à-dire sa vitesse de consommation en O_2 (vO_2) [100, 101].

Les deux chambres de mesure contiennent chacune $1.5 \cdot 10^7$ cellules HK-2

3.2. Méthodes expérimentales

entières, traitées ou non avec l'endotoxine. La suspension cellulaire dans du milieu DMEM sans rouge phénol est maintenu sous agitation à l'aide d'un barreau magnétique pour éviter la formation d'agglomérats. Un thermorégulateur permet également le contrôle précis et constant de la température fixée à 37°C. Tous les composants en contact avec le milieu d'expérimentation doivent être totalement inertes vis-à-vis de l'oxygène. Ainsi, les phénomènes d'absorption et de relargage, respectivement à hautes et basses CcO_2 , doivent être minimisés au risque de rendre les mesures oxymétriques non interprétables. Ces deux types de phénomènes peuvent être corrigés par une calibration effectuée par titration de l' O_2 .

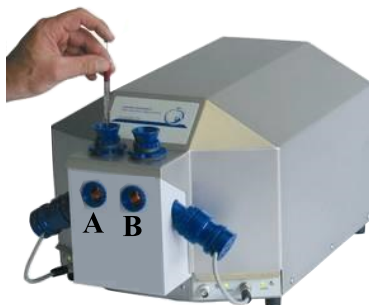


Fig. 3.3 – L'oxygraphe-2k (Oroboros, Autriche) utilisé pour la respirométrie de haute résolution contient deux chambres indépendantes A et B. Dans chacune d'elle, la CcO_2 d'un échantillon cellulaire y est enregistrée en continu par une sonde polarographique. *Illustration tirée de [102].*

Le système de mesure est une sonde polarographique à O_2 de type « électrode de Clark » représenté dans la Fig. 3.4. Il s'agit d'une sonde composée d'une cathode de platine (pôle négatif) entourée d'une anode d'argent (pôle positif) entre lesquelles est maintenue une différence de potentiel ΔV de 0,7 V. Toutes deux sont immergées dans une solution de KCl isolée de la cuve par une membrane de Téflon perméable aux gaz et particulièrement à l' O_2 . Les concentrations en O_2 de part et d'autre de la membrane sont donc en équilibre. Sous l'influence de ΔV , l' O_2 dissous dans la solution de KCl diffuse vers la cathode où il est réduit en H_2O , tandis qu'au niveau de l'anode se produit l'oxydation de l'argent. Il en résulte un courant très

faible, proportionnel à la CcO_2 du milieu dans lequel baigne l'électrode, qui est détecté, amplifié et mesuré. Les données sont ensuite enregistrées et traitées par le logiciel DatLab [101].

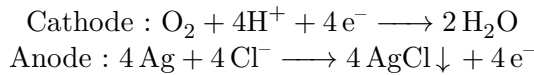
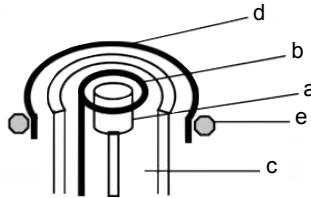


Fig. 3.4 – La sonde polarographique à O_2 est constituée d'une cathode de platine (a) et d'une anode Ag/AgCl (b), toutes deux plongées dans une solution électrolytique de KCl (c) enveloppée d'une membrane de Téflon (d) maintenue en place par un anneau de plastique (e) [103]

3.2.2.2 Précautions

Il faut noter que la CcO_2 mesurée est limitée par la vitesse de renouvellement de l' O_2 sous la membrane. Celle-ci dépend notamment de la teneur en O_2 du milieu où se trouve l'extrémité de l'électrode mais aussi de la vitesse de diffusion de ce gaz au travers de la membrane. Ainsi, un grand nombre de facteurs entrent en jeu et doivent être contrôlés, tels que la température et la viscosité du milieu, l'épaisseur et la perméabilité de la membrane et la vitesse de rotation du barreau magnétique¹ [101].

La réduction de l' O_2 en H_2O est un processus qui consomme lui-même de l' O_2 . Le signal du flux d' O_2 mesuré représente donc la somme des consommations du système de mesure (électrode) et des cellules HK-2. La calibration de l'appareil effectuée avant chaque mesure expérimentale permet de déterminer la consommation en O_2 du système de mesure et de la corriger.

1. Plus l'agitation et la température augmentent, plus la diffusion est rapide, et plus la valeur mesurée est élevée.

3.2.3 Oxymétrie par RPE

3.2.3.1 Principe de la technique

L'oxymétrie par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) est une méthode quantitative qui mesure la respiration cellulaire par la détermination locale de la pression partielle en O_2 [104, 105]. Elle est largement utilisée pour des études oxymétriques à la fois *in vivo* [106, 107, 108] et *in vitro* [103, 109, 110].

L'oxymétrie par RPE se base sur les propriétés paramagnétiques de la molécule d' O_2 qui possède deux électrons non appariés. En solution, ce biradical n'est toutefois pas directement détectable par spectroscopie RPE. Cependant, il va élargir le spectre RPE d'autres radicaux qui sont eux détectables par RPE *via* des interactions d'échange de spin² entre les électrons non appariés et le biradical. La présence d' O_2 influence alors à la fois les temps de relaxation spin-réseau (T_1) et spin-spin (T_2) de ces sondes. À une augmentation de la CcO_2 du milieu étudié correspond alors une diminution des temps de relaxation de la sonde [111, 112]. Par le principe d'incertitude de Heisenberg, la décroissance du T_2 électronique influencée par la présence de l' O_2 entraîne un élargissement de la raie RPE (~ 50 mG) du radical tel que :

$$\Delta B \Delta t \sim 1$$

En pratique, pour faire des mesures d'oxymétrie par RPE, il faut introduire une sonde paramagnétique senseur de l' O_2 dans l'échantillon cellulaire et détecter les modifications de son spectre RPE au cours du temps pour observer la respiration cellulaire.

2. Le principe d'exclusion de Pauli stipule que 2 fermions ne peuvent pas se trouver au même endroit dans le même état quantique.

3.2.3.2 Choix du senseur et calibration

De nombreuses sondes à O_2 ont été développées et utilisées pour mesurer sa concentration *in vivo* et *in vitro*. Ceux-ci doivent posséder les caractéristiques suivantes [112] :

- être très sensible à l' O_2 ,
- présenter une très grande stabilité chimique et physique,
- être non toxique et complètement inerte dans l'échantillon.

La sonde utilisée au cours des expériences d'oxymétrie par RPE est un radical nitroxyde neutre soluble, ^{15}N -4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidine- d_{16} -1-oxyl (^{15}N -PDT, CDN Isotopes, Canada), dont les caractéristiques du spectre, à savoir forme et largeur de raies, sont très sensibles à la présence d' O_2 . Lorsque du ^{15}N -PDT est ajouté à la suspension cellulaire, le nitroxyde se répartit au travers de l'espace extracellulaire et intracellulaire. L'évolution de la largeur des raies caractéristique de son spectre RPE renseigne alors sur la CcO_2 *in situ* [109].

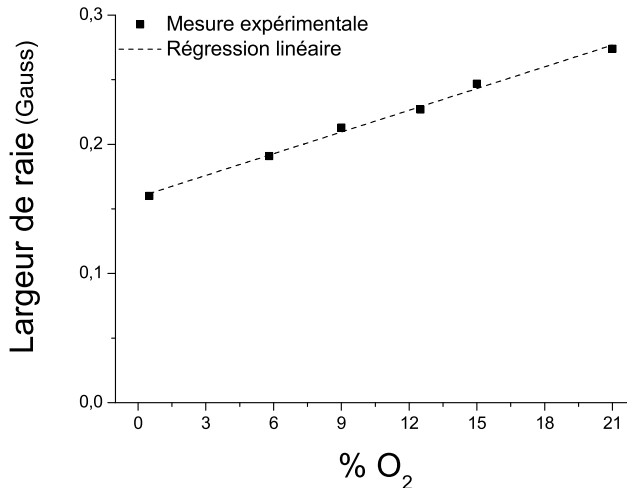


Fig. 3.5 – Courbe de calibration de la largeur de raie RPE du ^{15}N -PDT en fonction de la proportion en O_2 dans du DMEM sans rouge phénol [103].

3.2. Méthodes expérimentales

Les changements dans le spectre RPE de la sonde nitroxyde peuvent être calibrés à partir de concentrations connues en O_2 et ensuite utilisés pour mesurer la quantité d' O_2 présente dans la solution cellulaire en termes de concentration cellulaire CcO_2 ou de pression partielle pO_2 .

$$CcO_2 = pO_2 * \text{solubilité}$$

La sonde (0.2 mM dans du DMEM 10% dextran) est calibrée pour diverses valeurs de pO_2 comprises entre 100% d'azote et 21% d'oxygène (air). Ces mesures permettent d'obtenir la relation existante entre la largeur de raie du nitroxyde et la CcO_2 présente dans l'échantillon. Cette calibration (Fig. 3.5) a été effectuée par le laboratoire de Résonance Magnétique Biomédicale de l'Université catholique de Louvain (Bruxelles, Belgique) [103, 113].

3.2.3.3 Protocole

Les cellules rénales HK-2, incubées au préalable pendant 1 h, 3 h, 6 h ou 18 h avec 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS, sont collectées dans du DMEM contenant 10% de dextran qui permet de les maintenir en suspension. ^{15}N -PDT (0.2 mM) est ajouté à 100 μl de cette suspension cellulaire ($7.5 \cdot 10^6$ cellules/ml). Le mélange est ensuite aspiré dans un tube capillaire fin en verre, fermé hermétiquement aux deux extrémités par de la paraffine de telle sorte qu'aucune bulle d'air y reste piégée. Ces tubes d'échantillons cellulaires scellés sont ensuite placés dans un tube RPE de quartz. L'échantillon est maintenu à 37°C durant tout le temps de la mesure. Les spectres RPE sont enregistrés toutes les minutes jusqu'à stabilisation de la largeur de raie du nitroxyde par un spectromètre de RPE Bruker EMX fonctionnant à 9.5 GHz.

La Fig. 3.6 montre l'évolution de la raie RPE de la sonde ^{15}N -PDT au cours du temps lorsque la sonde se trouve dans un échantillon fermé contenant les cellules HK-2. La largeur de raie diminue au cours du temps traduisant une diminution de la CcO_2 dans la suspension cellulaire. La vitesse de consommation est alors obtenue en utilisant la courbe de calibration reliant

la largeur de raie du ^{15}N -PDT à la CcO_2 (Fig. 3.5) et en déterminant la pente de la droite qui traduit l'évolution de cette concentration au cours du temps [110].

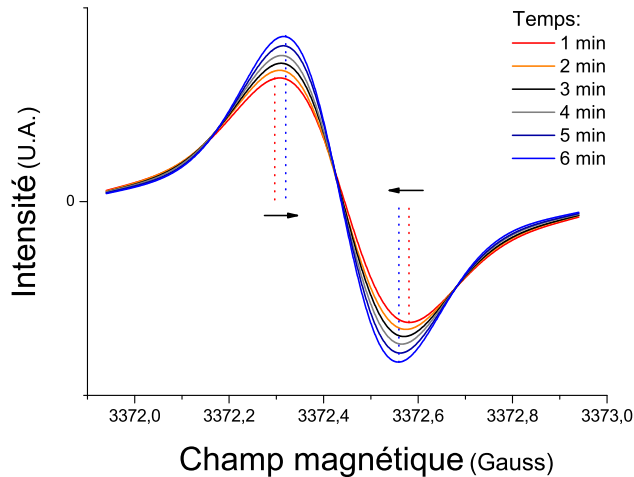


Fig. 3.6 – La largeur de raie RPE du spin ^{15}N -PDT étant liée à la pO_2 dans le milieu DMEM, sa diminution au cours du temps traduit une diminution dans la CcO_2 de l'échantillon cellulaire. Ce suivi temporel permet de déterminer la vitesse de consommation en O_2 des cellules HK-2.

3.2.4 Mesure de la production d'ATP

La production d'ATP par les cellules HK-2 traitées pendant 1 h, 6 h et 24 h avec du LPS a été évaluée et comparée à celle des cellules non traitées (dites contrôles, CTRL). Ce dosage a été effectué à partir d'un kit commercial (ATP bioluminescent assay kit, Sigma-Aldrich, Belgique) qui détecte l'ATP par la réaction avec la luciférine en présence de luciférase et d'oxygène. La réaction produit alors l'oxyluciférine et s'accompagne d'une émission de lumière (560 nm) détectée par un spectrofluoromètre (Fluoroskan Ascent Microplate Fluorometer, Thermo scientific, Belgique).

3.2.5 Analyse du type de mort cellulaire

L'étude de la mortalité cellulaire a été effectuée par cytométrie en flux au GIGA-Imagerie et cytométrie en flux du CHU de Liège (Belgique). L'utilisation d'un kit commercial (Annexin-V-Fluos staining Kit, Roche, Allemagne) a permis de détecter et de quantifier les modes de mort cellulaire entrepris par les cellules HK-2 lors du stress endotoxinique. Ce kit contient deux fluorophores, l'annexine (ANN) et l'iodure de propidium (PI), et permet de distinguer les cellules en apoptose des cellules en nécrose.

Dans les premières étapes de l'apoptose, des changements apparaissent au niveau de la surface cellulaire. Une des altérations de la membrane plasmique provoque l'exposition à la surface de phosphatidylsérine, normalement uniquement présente sur le feuillet interne de la membrane. L'annexine reconnaît cette phosphatidylsérine externalisée et s'y fixe. Dans les dernières étapes de l'apoptose, les membranes se perméabilisent totalement et l'iodure de propidium diffuse dans les cellules pour y colorer leur noyau.

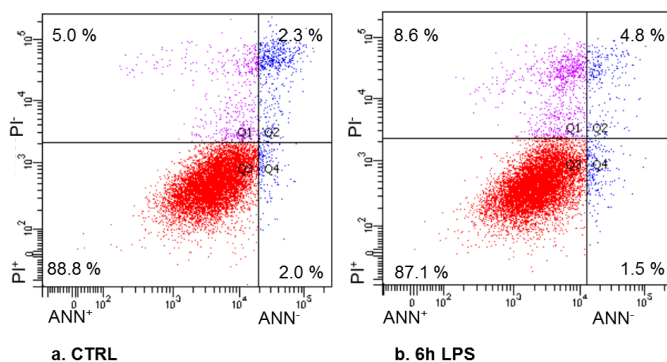


Fig. 3.7 – Répartition des cellules HK-2 en fonction de la fluorescence en ANN et PI sans traitement (a) et après 6 h d'incubation avec le LPS (b).

Par conséquent, les cellules positives à l'annexine sont en apoptose (ANN⁺/PI⁻ et ANN⁺/PI⁺) et les cellules nécrotiques sont uniquement positives à l'iodure de propidium (ANN⁻/PI⁺). Les cellules qui ne sont pas positives à

ces deux fluorophores sont quant à elles vivantes (ANN⁻/PI⁻) (Fig. 3.7).

3.2.6 Analyse statistique des données

Pour les chapitres 3, 4 et 5, les résultats sont exprimés en « moyenne ± écart-type ». Le test t de Student a été utilisé pour comparer deux conditions expérimentales différentes. Les valeurs de P inférieures à 0.05 ont été considérées comme statistiquement significative.

3.3 Résultats

3.3.1 Étude de la vitesse de respiration basale des cellules

3.3.1.1 Respirométrie de haute résolution

La technique de respirométrie de haute résolution a été utilisée pour suivre la CcO₂ (μM) et la vO₂ (pmol O₂/s/10⁶ cellules) des cellules HK-2 isolées dans les chambres de l'oxygraphe (Fig. 3.8).

Les cellules HK-2 intactes consomment l'O₂ initialement présent (160 μM) en 25 min avec une vitesse de respiration basale de 21 pmol O₂/s/10⁶ cellules (Fig. 3.8 A). Le LPS modifie cette vitesse après un temps d'incubation suffisamment long (Fig. 3.8 B). Une incubation d'1 h du LPS avec les cellules n'a aucun effet significatif sur leur vO₂ (P = 0.25). Par contre, lorsque les cellules sont incubées 6 h ou 18 h avec le LPS, leur vO₂ diminue significativement de l'ordre de 20% (P = 0.02 et P = 0.08 respectivement).

Cette première observation faite par respirométrie de haute résolution a ensuite été comparée à celle réalisée par oxymétrie de RPE. En effet, cette dernière méthode étant plus sensible aux mesures de consommation en O₂, elle permet de vérifier si l'altération de la respiration des cellules HK-2 se produit pour des temps d'incubation avec le LPS inférieurs à 6 h [103].

3.3. Résultats

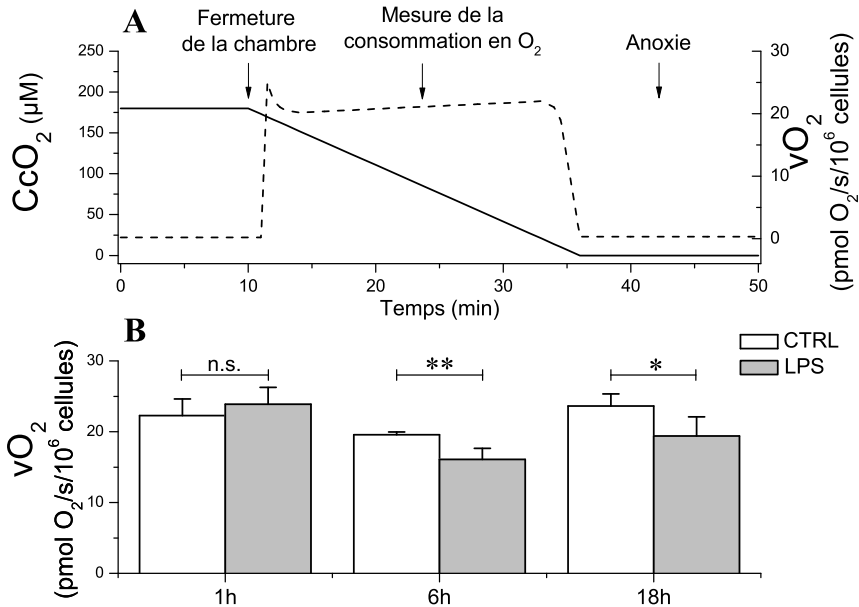


Fig. 3.8 – Variation de la vitesse de consommation en O₂ des cellules HK-2 (7.5 10⁶ cellules/ml) dans du DMEM.

A : Profil schématique de la CcO₂ (ligne continue) et de la vO₂ (ligne discontinue) lors d'une mesure par respirométrie de haute résolution.

B : Influence du temps d'incubation du LPS (1 h, 6 h et 18 h) sur la vO₂ des cellules HK-2.

n = 3 ; n.s., P > 0.05 ; *, P ≤ 0.1 ; **, P ≤ 0.05.

3.3.1.2 Oxymétrie de RPE

Par oxymétrie de RPE, les variations au cours du temps de la CcO₂ des cellules HK-2 incubées ou non avec 1 μg/ml de LPS pendant 1 h, 3 h, 6 h et 18 h sont montrées dans la Fig. 3.9. Aucune modification de la pente n'est observée après 1 h ou 3 h d'incubation avec l'endotoxine. Par contre, une diminution significative de la pente, traduisant un ralentissement de la consommation en O₂ de cellules HK-2, est observée après 6 h et 18 h d'incubation.

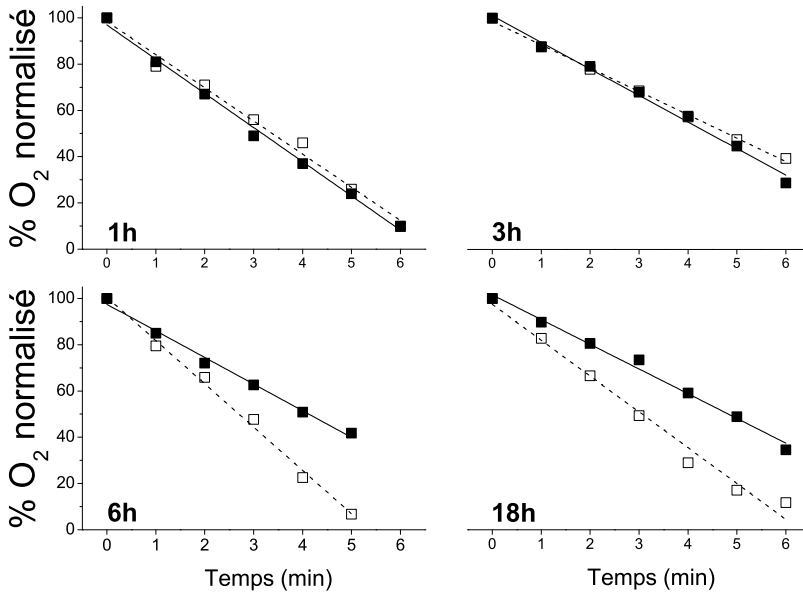


Fig. 3.9 – Mesure par oxymétrie de RPE de la vO_2 des cellules HK-2. $7.5 \cdot 10^6$ cellules ont été incubées en l'absence (\square) et en présence (\blacksquare) de LPS pendant 1 h, 3 h, 6 h et 18 h. Les lignes discontinue et continue respectives correspondent aux approximations linéaires des données expérimentales.

Lorsque ces résultats sont quantifiés, les mêmes observations sont faites que celles effectuées en respirométrie de haute résolution (Fig. 3.10). La vO_2 ne change pas lorsque les cellules sont incubées pour une courte période de temps avec le LPS : 8.8 ± 2.1 /min/ $7.5 \cdot 10^6$ cellules pour les cellules contrôles, 8.2 ± 0.4 /min/ $7.5 \cdot 10^6$ cellules pour les cellules incubées 1 h avec le LPS ($P = 0.5$) et 8.2 ± 2.5 /min/ $7.5 \cdot 10^6$ cellules pour les cellules incubées 3 h avec le LPS ($P = 0.6$).

En revanche, lorsque les cellules sont incubées pour une longue période de temps avec le LPS, la vO_2 diminue significativement à 6.7 ± 1.4 /min/ $7.5 \cdot 10^6$ cellules et 6.0 ± 1.2 /min/ $7.5 \cdot 10^6$ cellules pour les cellules incubées respectivement 6 h ($P = 0.05$) et 18 h ($P = 0.002$) avec le LPS, soit une diminution de 25-30% en comparaison avec les cellules contrôles.

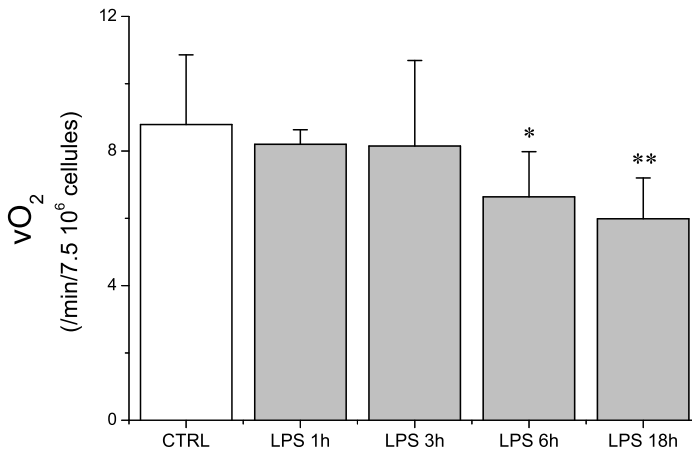


Fig. 3.10 – La vO₂ des cellules HK-2 (7.5 10⁶ cellules/ml) mesurée par oxymétrie de RPE est plus élevée pour les cellules contrôles que pour les cellules traitées 6 h et 18 h avec le LPS. Par contre, elle reste identique pour les cellules traitées 1 h et 3 h avec le LPS.

n = 3 ; *, P ≤ 0.05 ; **, P ≤ 0.005.

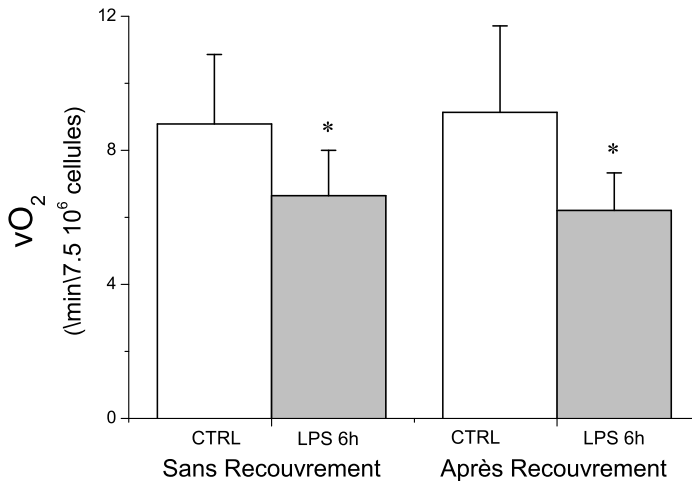


Fig. 3.11 – Les cellules HK-2 n'ont pas la capacité de récupérer une respiration normale même lorsqu'elles passent 24 h dans un environnement non toxique après avoir subi un stress endotoxique durant 6 h.

n = 5 ; *, P ≤ 0.05.

3.3.2 Étude de la réversibilité du phénomène

La réversibilité de cette diminution de vO_2 des cellules HK-2 a été testée en les incubant 6 h avec du LPS, en les rinçant plusieurs fois avec du PBS, et en les laissant récupérer 24 h supplémentaires dans du milieu frais ne contenant pas d'endotoxine avant d'effectuer la mesure. Comme indiqué dans la Fig. 3.11, après ces 24 h de recouvrement dans un environnement sans endotoxine, la vO_2 mesurée par oxymétrie de RPE reste diminuée de 25% : 6.2 ± 1.1 /min/ $7.5 \cdot 10^6$ cellules comparé à 9.1 ± 2.6 /min/ $7.5 \cdot 10^6$ cellules des cellules contrôles ($P = 0.05$).

3.3.3 Altération dans la production d'ATP

Les mesures effectuées par bioluminescence suggèrent une inhibition par le traitement au LPS de la production d'ATP des cellules HK-2 (Fig. 3.12). En effet, une diminution de 30% dans la production d'ATP est observée après 6 h de traitement ($P = 0.004$) en comparaison avec les cellules contrôles. Cette perte de production est maintenue après 24 h de traitement ($P = 0.0007$) mais également à la suite de 24 h de recouvrement dans un environnement sans endotoxine ($P = 0.004$).

3.3.4 Mort cellulaire par apoptose

L'analyse par cytométrie en flux de la fluorescence de l'annexine et de l'iode de propidium a permis de déterminer la proportion de cellules mortes à la suite du traitement au LPS. Il apparaît que le LPS n'induit pas de mortalité significative des cellules HK-2 pendant les premières 24 h du traitement, la proportion de cellules vivantes étant maintenue à 90%. Cependant, après 48 h et 72 h, la proportion de cellules apoptotiques augmente significativement, atteignant respectivement 40% et 55%. La proportion de cellules nécrotiques reste quant à elle faible, de l'ordre de 10%.

3.3. Résultats

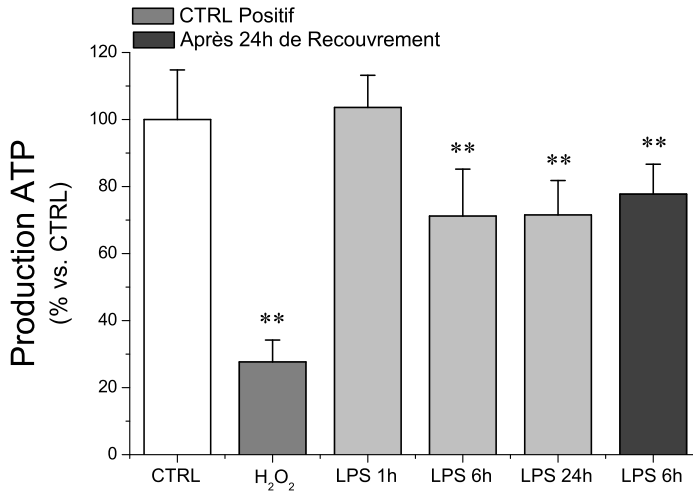


Fig. 3.12 – Détermination du niveau de l'ATP cellulaire dans les cellules HK-2 traitées au LPS par bioluminescence. Le traitement d'1 h des cellules avec le H₂O₂ a été utilisé comme contrôle positif. n = 4-6 ; **, P ≤ 0.005.

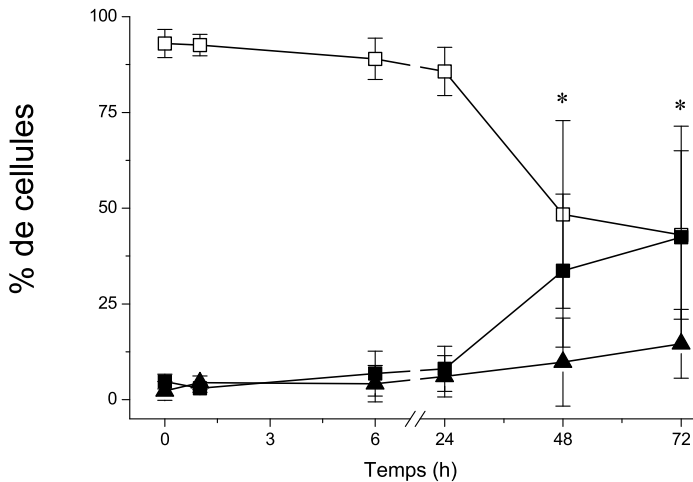


Fig. 3.13 – Effet du LPS sur la mortalité des cellules HK-2. Pourcentage de cellules vivantes (□), apoptotiques (■) et nécrotiques (▲) après le traitement au LPS. n = 3 ; *, P ≤ 0.05.

3.4 Discussion et conclusion

La défaillance énergétique comme cause possible de la défaillance d'organe au cours d'un sepsis n'est pas un concept nouveau. Déjà en 1997, Kanthrow *et al.* rapportèrent une altération de l'utilisation de l'oxygène dans les tissus du foie à partir d'un modèle animal de sepsis [114]. Cette étude et d'autres publiées par la suite [115] ont formé la base de la théorie de l'« hypoxie cytopathique » qui applique le concept de dysoxie tissulaire au sepsis [97]. Un facteur important dans la pathogénicité de la défaillance d'organe serait alors une dérégulation du métabolisme énergétique des cellules qui se manifeste par une altération de leur utilisation de l'oxygène disponible [6, 116].

Les deux études de respirométrie de haute résolution et d'oxymétrie de RPE ont montré que l'incubation des cellules HK-2 avec l'endotoxine LPS induit une diminution de leur consommation en O₂ (20% et 30% respectivement) pour autant que le temps d'incubation soit d'au moins 6 h. Ces résultats sont en accord avec l'étude de James *et al.* qui avait mis en évidence l'influence du LPS sur la vitesse de consommation en O₂ de cellules provenant de cortex rénaux murins [110]. Ces résultats confirment également ceux obtenus préalablement par la technique de quenching de la phosphorescence d'un dérivé de la porphyrine par l'O₂ [99]. Ces travaux ont en effet montré que la consommation en O₂ des cellules HK-2 diminuait lorsqu'elles étaient incubées avec du LPS et que cet effet était indépendant de la dose LPS (100 ng/ml, 1 µg/ml et 100 µg/ml) et du temps d'incubation (6 h et 18 h).

Cette altération dans la fonction respiratoire des cellules HK-2 traitées au LPS pourrait être simplement la traduction d'une décroissance du nombre de cellules vivantes. Cependant, les mesures de mortalité cellulaire effectuées par cytométrie en flux montrent que systématiquement 90% des cellules sont encore vivantes après 24 h de traitement. Cette hypothèse ne peut donc pas être retenue pour expliquer la diminution de la consommation en O₂ des cellules HK-2 traitées 6 h ou 18 h avec le LPS. Dès lors, on peut supposer que cette perturbation provient d'un dysfonctionnement intracellulaire qui

trouve son origine dans la « sous-régulation métabolique » [11, 117, 118].

Cette sous-régulation métabolique ou « conformance » a déjà été décrite pour des cellules hépatocytes et cardiomyocytes en réponse à une diminution de l'apport en oxygène lors d'épisodes hypoxiques ou ischémiques [119, 120]. Les cellules se trouvent alors dans un état d'économie d'énergie, appelé « hibernation », et leur viabilité est préservée en cessant les fonctions non essentielles, ce qui se traduit par une diminution de la consommation en O₂ et par une réduction de l'utilisation de l'ATP. Il est intéressant de noter que ce phénomène était réversible, le retour à la normoxie se traduisant par un retour à une activité métabolique normale [119, 120].

En regard de ces données de la littérature et de nos premiers résultats, on peut émettre l'hypothèse que l'inflammation induite par le LPS provoque un effet direct sur le fonctionnement des cellules rénales. Lors d'un sepsis, le processus énergétique au niveau cellulaire est perturbé non seulement à cause d'une détérioration de la microcirculation et donc de l'acheminement de l'oxygène vers les tissus, mais aussi à cause de l'incapacité des cellules à utiliser l'oxygène disponible pour produire de l'ATP. Dans ce dernier cas, le mécanisme impliqué pourrait bien être un changement dans la fonction mitochondriale, comme décrite par le mécanisme d'hypoxie cytopathique, qui conduit à une inhibition de la chaîne de transport des électrons et de la phosphorylation oxydative [6, 45]. Cette hypothèse sera étudiée dans le chapitre suivant.

Sous stress inflammatoire, il semble que les cellules rénales tentent de se protéger dans un premier temps en réduisant leur activité métabolique. Elles se préservent en utilisant moins d'oxygène et en produisant moins d'ATP. Cependant, à long terme (au-delà de 24 h), ce mécanisme de défense ne suffit plus et les cellules finissent par mourir par apoptose. L'étude *in vitro* d'IRA septique de Pathak *et al.* avait déjà souligné la présence de cellules rénales mortes après 10 h de stress sans pour autant en préciser la nature [121]. Dans ce modèle, la rapide apparition de mort cellulaire provient sûrement du fait que le stress utilisé est plus complet (sérum de patient septique)

qu'un stress uniquement endotoxinique. Cependant, notre modèle montre que la voie apoptotique semble être privilégiée lors de la sous-régulation métabolique des cellules rénales.

Une explication possible de ces phénomènes apoptotiques peut provenir du fait que le mécanisme de défense mis en place n'est pas réversible. En effet, le retour dans un environnement sans endotoxine ne s'accompagne pas d'un rétablissement de l'activité métabolique. Comme mentionné par M. Singer, ce qui semble commencer par une adaptation cellulaire face à des conditions environnementales défavorables évolue finalement vers un processus pathologique [118].

En extrapolant ces résultats au cas clinique, on peut supposer que la défaillance énergétique du rein lors du sepsis peut persister, même si les paramètres hémodynamiques sont rétablis au niveau de l'organe, et conduire malgré tout à la défaillance générale du rein.

Altérations fonctionnelles des mitochondries

Pour expliquer l'apparition d'une défaillance rénale au cours d'un sepsis, l'hypothèse d'une hypoperfusion tissulaire a été écartée au profit d'une dérégulation du métabolisme de l'oxygène au niveau cellulaire appelée hypoxie cytopathique [116]. Que l'oxygène soit correctement acheminé ou non par le système microvasculaire au niveau des tissus, les cellules ne l'utilisent plus correctement.

Aujourd'hui, de plus en plus d'études rapportées dans la littérature scientifique semblent indiquer que la mitochondrie jouerait un rôle central dans la pathogénicité du sepsis [45, 122, 123]. La phosphorylation oxydative mitochondriale étant responsable à 90% de la consommation en O_2 et de la

production d'ATP par le corps humain, il est raisonnable de suggérer qu'une altération de l'activité des mitochondries peut être à l'origine du dysfonctionnement du métabolisme énergétique observé lors du sepsis.

Dans cette partie du travail de thèse, nous avons tenté de déterminer si l'altération de la respiration des cellules rénales, détectée plus tôt, pouvait trouver son origine dans une altération de la fonction mitochondriale. Cette étude, essentiellement basée sur des méthodes de fluorescence et de biochimie, a permis de montrer que la chaîne respiratoire mitochondriale est effectivement perturbée dans les cellules HK-2 traitées au LPS. En particulier, l'inhibition de l'activité de la cytochrome c oxydase semble être à l'origine de l'interruption de la phosphorylation oxydative et donc de la bonne utilisation de l'O₂ par les cellules pour produire de l'ATP. L'hypothèse d'une hypoxie cytopathique semble donc être vérifiée dans notre modèle cellulaire de l'inflammation du rein.

Sommaire

4.1	Avant-propos	93
4.1.1	Respiration mitochondriale	93
4.1.1.1	Structure des mitochondries	93
4.1.1.2	Chaîne de transport des électrons	94
4.1.1.3	Phosphorylation oxydative	97
4.1.2	Dysfonction mitochondriale et sepsis	97
4.1.3	Objectif de l'étude	99
4.2	Méthodes expérimentales	100
4.2.1	Microscopie confocale et cytométrie en flux	100
4.2.1.1	Fluorescence détectée	100
4.2.1.2	Protocole pour la microscopie confocale	102
4.2.1.3	Protocole pour la cytométrie en flux	103
4.2.2	Co-localisation des marqueurs fluorescents	104
4.2.2.1	Conditions expérimentales	104
4.2.2.2	Quantification de la co-localisation	106
4.2.3	Méthodes biochimiques	108

4.2.3.1	Isolement des mitochondries	108
4.2.3.2	Relargage du cytochrome c	109
4.2.3.3	Activité de la cytochrome c oxydase	109
4.3	Résultats	110
4.3.1	Effet du LPS sur le réseau mitochondrial	110
4.3.2	Effet du LPS sur l'activité de la chaîne de transport des électrons	110
4.3.2.1	Complexe I non affecté	110
4.3.2.2	Fuite des électrons	113
4.3.2.3	Relargage cytosolique du cytochrome c	115
4.3.2.4	Inhibition de la cytochrome c oxydase	115
4.3.3	Effet du LPS sur la phosphorylation oxydative	115
4.4	Discussion et conclusion	118

4.1 Avant-propos

4.1.1 Respiration mitochondriale

Les mitochondries sont des organites intracellulaires impliqués dans un grand nombre de voies métaboliques, telles que la β -oxydation des acides gras et le cycle de Krebs, et de voies physiologiques, telles que la thermogénèse et l'apoptose. Cependant, en condition aérobie, leur principale fonction consiste à produire de l'ATP via la phosphorylation oxydative. À ce titre, les mitochondries sont fort justement appelées « centrales énergétiques » de la cellule.

4.1.1.1 Structure des mitochondries

Les mitochondries sont constituées de deux membranes imbriquées, de structure et de fonction distinctes. La membrane externe définit le périmètre externe lisse des mitochondries, tandis que la membrane interne possède de

4.1. Avant-propos

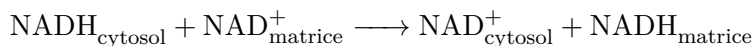
nombreuses invaginations, appelées crêtes, qui augmentent la surface consacrée à la respiration cellulaire. Ces membranes délimitent deux compartiments mitochondriaux : l'espace inter-membranaire et la matrice [52].

La membrane externe contient différents canaux transmembranaires au travers desquels les ions et les petites molécules peuvent facilement passer. Bien que le flux de métabolites à travers la membrane externe limite la vitesse d'oxydation mitochondriale, la membrane interne constitue la principale barrière de perméabilité entre le cytosol et la matrice mitochondriale.

La membrane interne et la matrice mitochondriale sont les sites de la plupart des étapes de la respiration cellulaire dont les trois principales permettent :

1. la réduction de transporteurs d'électrons, à savoir la nicotinamide adénine dinucléotide NAD^+ en NADH et la flavine adénine dinucléotide FAD en FADH_2 , lors de l'oxydation du pyruvate et des acides gras en CO_2 dans la matrice ;
2. le transfert des électrons de NADH et FADH_2 vers l' O_2 dans la membrane interne et son couplage à la création d'une force proton-motrice à travers celle-ci ;
3. l'utilisation de l'énergie stockée dans le gradient électrochimique de protons pour la synthèse d'ATP.

Il est intéressant de souligner que le NADH présent dans la matrice mitochondriale peut également provenir du cytosol. Des transporteurs à électrons, se trouvant dans la membrane interne mitochondriale, peuvent transférer les électrons du NADH cytosolique vers la matrice suivant le bilan net :

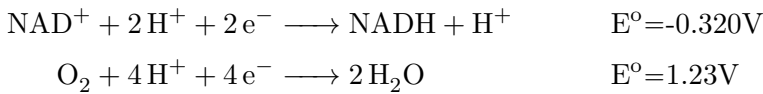


4.1.1.2 Chaîne de transport des électrons

Les mitochondries possèdent au sein de leur membrane interne une chaîne enzymatique spécifique et hautement spécialisée, appelée « chaîne de trans-

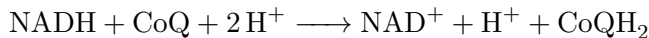
port des électrons » ou simplement « chaîne respiratoire », qui a pour rôle de réoxyder les coenzymes réduits NADH et FADH₂ en transférant leurs électrons vers l'accepteur final qui est l'oxygène.

Cette chaîne de transport des électrons est constituée de quatre complexes protéiques et de deux transporteurs d'électrons mobiles, l'ubiquinone (CoQ) et le cytochrome c (cyt c). Les complexes sont disposés le long de la chaîne en fonction de leur potentiel d'oxydoréduction, de telle sorte que les électrons transitent du composé ayant le plus faible potentiel redox, à savoir le NADH, vers celui ayant le potentiel redox le plus élevé, à savoir l'O₂ (Fig. 4.1) [52].



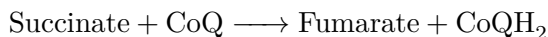
Complexe I : NADH-ubiquinone oxydoréductase

Le complexe I catalyse le transfert de deux électrons du NADH à l'ubiquinone. Cette réaction provoque alors le transport de quatre protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire.



Complexe II : Succinate-ubiquinone oxydoréductase

Le complexe II catalyse le transfert de deux électrons de FADH₂ à l'ubiquinone lors de l'oxydation du succinate en fumarate. Contrairement au complexe I, cette réaction n'est pas couplée à un flux de protons et le complexe II ne sera pas considéré dans la suite de cette étude.

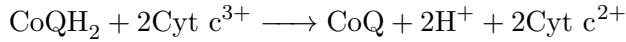


Complexe III : Ubiquinone-cytochrome c réductase

Les ubiquinolins CoQH₂ produits au niveau des complexes I et II transportent les électrons vers le complexe III. Ce dernier transfère les électrons de l'ubiquinol au deuxième transporteur mobile situé dans l'espace inter-

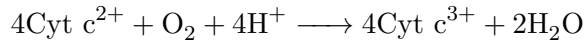
4.1. Avant-propos

membranaire, le cytochrome c. Ce complexe fonctionne comme une pompe à protons et deux protons sont relâchés dans l'espace inter-membranaire.



Complexe IV : Cytochrome c oxydase

Après avoir été réduit par le complexe III, le cytochrome c transporte les électrons jusqu'au complexe IV. Ce dernier catalyse la réduction de l' O_2 en H_2O par quatre électrons. Ce transfert d'électrons consomme quatre protons qui sont libérés dans l'espace inter-membranaire.



Dans des conditions normales, c'est-à-dire dans des tissus complètement oxygénés et en l'absence de pathologie mitochondriale, la cytochrome c oxydase est totalement oxydée.

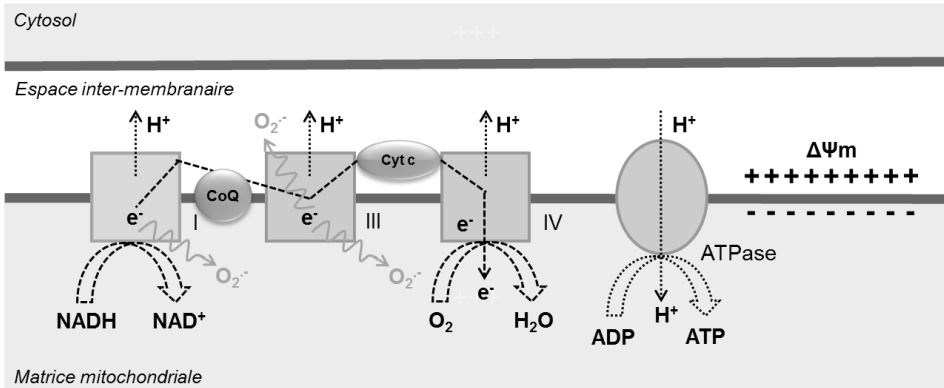


Fig. 4.1 – Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la phosphorylation oxydative. Le passage des électrons au travers des complexes I, III et IV est couplé à la formation d'un gradient de protons. Lorsque celui-ci est consommé par l'ATP synthase, il entraîne la production d'ATP.

4.1.1.3 Phosphorylation oxydative

Au niveau des complexes I, III et IV, le transport des électrons des coenzymes vers l'O₂ est couplé à un mouvement de protons depuis la matrice vers l'espace inter-membranaire. Comme la membrane interne mitochondriale est peu perméable aux protons, cela génère par conséquent un gradient électrochimique. En effet, le mouvement de protons au travers de la membrane interne crée un gradient de pH (la matrice devenant plus basique) et engendre un potentiel de membrane $\Delta\Psi_m$ d'environ -180 mV (la face matricielle de la membrane interne étant chargée négativement). Ce gradient électrochimique représente une force, appelée « force proton-motrice », qui pousse les protons à retourner dans la matrice mitochondriale. Quand ceux-ci passent au travers du complexe ATP synthase (ATPase), l'énergie libérée est utilisée pour phosphoryler l'ADP en ATP (Fig. 4.1) [52]. Ce couplage entre les réactions d'oxydoréduction de la chaîne de transport des électrons et la synthèse d'ATP par la force proton-motrice est à la base de la théorie « chimio-osmotique » émise par Mitchell dès les années 1960 [124].

Dans des conditions normales, approximativement 98% de la consommation en O₂ des mitochondries est directement liée à la production d'ATP, ce qui est communément appelé le « couplage respiratoire ». Quant aux 2% d'O₂ restants, ils aboutissent à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [125]. Ainsi, bien qu'elles soient très efficaces à réduire l'O₂ directement en H₂O, les mitochondries sont responsables de la majeure partie de la production de ROS au sein de la cellule. Des recherches initiées par Chance *et al.* ont par ailleurs montré que les principales sources de ROS dans le chaîne respiratoire sont les complexes I et III (Fig. 4.1) [125, 126].

4.1.2 Dysfonction mitochondriale et sepsis

Le rôle joué par les mitochondries dans l'apparition de défaillance des organes vitaux au cours du sepsis est débattu depuis plus de quarante ans. C'est en 1971, qu'une dysfonction mitochondriale fut observée pour la pre-

4.1. Avant-propos

mière fois par Mela *et al.* dans le foie d'animaux en choc endotoxémique [127]. Malheureusement, comme les animaux étaient en hypotension, il était impossible de conclure si la dysfonction observée résultait d'une hypoperfusion tissulaire ou bien des effets cytotoxiques de l'endotoxine.

Sujet	Sepsis	Tissu	Altération	Réf.
Rats	LPS	Intestin	Réduction complexe IV	[128]
Porcs	LPS	Muscles	Réduction complexe IV	[129]
Patients	Sepsis grave ou choc septique	Muscles	Inhibition complexe I Diminution niveau ATP	[122]
Rats	LPS	Cerveau	Inhibition complexe I Inhibition complexe IV	[130]
Chats	LPS	Foie	Inhibition complexe IV	[115]
Rats	CLP	Foie	Inhibition complexe I	[131]
		Muscles	Diminution niveau ATP	
Souris	CLP	Cœur	Inhibition complexe IV	[132, 133]
			Sous-expression complexe IV	
Patients	Morts par sepsis	Foie	Inhibition complexe I Inhibition complexe IV	[134]
Rats	LPS	Diaphragme	Sous-expression complexe IV Sous-expression ATPase	[135]
Rats	CLP	Foie	Inhibition complexe IV	[44]
Rats	CLP	Cerveau	Inhibition complexe I	[136]
Cellules	Sérum patients septiques	Fibroblastes	Inhibition complexe I Inhibition ATPase	[137]
Souris	CLP	Rein	Sous-expression complexe IV	[138]

Tab. 4.1 – Dysfonction des complexes enzymatiques mitochondriaux observée dans différents modèles animaux de sepsis.

Plus récemment, un grand nombre d'études scientifiques ont mis en évidence une réduction significative de l'activité des complexes mitochondriaux I et/ou IV chez des animaux en choc septique (Tab. 4.1). Les différences observées dans la dysfonction mitochondriale proviennent certainement du type de modèle mis en place pour induire le sepsis (animaux utilisés, type de stress induit et sévérité du stress) et du tissu prélevé (muscle, cerveau, foie, *etc.*). De plus, bien qu'une attention toute particulière ait été portée pour

limiter les effets de l'hypoxie tissulaire, cette cause ne peut être totalement exclue dans les modèles *in vivo*.

Il est intéressant de noter que très peu d'études se sont intéressées à caractériser la nature des dysfonctionnements mitochondriaux et leurs conséquences sur les processus énergétiques cellulaires pour un organe tel que le rein. À notre connaissance, l'équipe de P. Mayeux fut la première à signaler une dépolarisation de la membrane mitochondriale ainsi qu'une diminution dans la production d'ATP dans les cellules rénales de souris soumises à un choc septique [139]. Par ailleurs, très récemment, ils ont remarqué une diminution significative de l'activité des complexes I et III au cours du temps dans ces cellules rénales [140].

4.1.3 Objectif de l'étude

Comme nous l'avons rappelé dans le chapitre 3, l'ATP peut être produit par deux voies principales dans les cellules en milieu aérobie : par la glycolyse dans le cytosol et par la respiration dans les mitochondries. Les cellules tubulaires rénales proximales possèdent un système glycolytique minimal et dépendent presque complètement de la phosphorylation oxydative pour la synthèse d'ATP [53]. L'étude préliminaire à cette thèse de doctorat menée par Le Dorze *et al.* a d'ailleurs permis de vérifier que la respiration cellulaire des HK-2 est indépendante de la voie glycolytique, l'ajout de glucose ou de glutamine dans la suspension cellulaire ne modifiant pas la vitesse de consommation en O_2 de ces cellules [99]. Nous proposons donc que l'altération de la consommation en O_2 observée dans les cellules HK-2 soumises au LPS proviendrait d'une altération de la phosphorylation oxydative mitochondriale.

Cette étude essaye d'établir si l'origine du dysfonctionnement du métabolisme énergétique des cellules HK-2 soumises au LPS provient d'une altération de la fonction mitochondriale. Notamment, elle cherche à déterminer si une perturbation au niveau du complexe I et/ou du complexe IV de la chaîne de transport des électrons peut être à l'origine de la baisse de l'utilisation

de l'O₂ et de la production d'ATP observée dans le chapitre 3.

4.2 Méthodes expérimentales

4.2.1 Microscopie confocale et cytométrie en flux

La microscopie confocale et la cytométrie en flux sont particulièrement adaptées à l'étude des modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries. La première technique permet d'obtenir des informations au niveau de la cellule unique tandis que la seconde permet d'analyser une large population de cellules vivantes.

4.2.1.1 Fluorescence détectée

Autofluorescence cellulaire du NADH

Les variations du métabolisme cellulaire sont associées à des variations de la production et de la consommation du coenzyme NAD⁺/NADH, molécule impliquée dans la chaîne énergétique cellulaire, via le système de transfert d'électrons et la constitution du gradient de protons transmembranaire des mitochondries. L'état redox de cette dernière peut alors être contrôlé en suivant l'intensité de fluorescence du coenzyme. En effet, consécutivement à une excitation UV, sa forme réduite (NADH) est fluorescente tandis que sa forme oxydée (NAD⁺) reste non fluorescente. Par conséquent, une augmentation de l'intensité de fluorescence est indicateur d'un déséquilibre de l'état redox du coenzyme vers un état réduit NADH et donc d'une diminution de l'activité de la chaîne de transport des électrons au niveau du complexe I et réciproquement [141].

Notons que le signal d'autofluorescence cellulaire détecté provient à la fois du NADH mitochondrial et du NAD(P)H cytoplasmique [142]. Il faut donc s'assurer par des mesures de co-localisation que l'émission détectée par microscopie confocale provient essentiellement des mitochondries des cellules

HK-2 (section 4.2.2).

Marqueurs cellulaires

Le stress oxydant global produit dans les cellules HK-2 a été étudié par la sonde dichlorofluorescéine diacétate (DCF, Sigma-Aldrich, Belgique). La fluorescence qui découle de son oxydation a longtemps été considérée comme un indicateur spécifique de la présence du H_2O_2 . Cependant, il est maintenant établi que ce marqueur peut être également oxydé par d'autres ROS, telles que $\cdot OH$, $\cdot NO$ et $ONOO^-$ [143, 144]. Les résultats obtenus avec la DCF sont analysés dans le chapitre 5.

Marqueurs mitochondriaux

Différents marqueurs fluorescents (tous de Molecular Probes, Life Technologie, Belgique) ont été utilisés pour sonder l'activité mitochondriale des cellules HK-2 soumises au LPS par microscopie confocale et cytométrie en flux.

La sonde Mitotracker Green (MTG) a été utilisée pour sonder l'organisation des mitochondries au sein des cellules. Elle réagit avec le groupement thiol libre des résidus cystéines des protéines mitochondriales avec une très grande affinité. Par conséquent, la concentration de cette sonde est au moins 300 fois supérieure dans la matrice mitochondriale que dans l'environnement qui entoure cet organite. Le signal de fluorescence détecté permet alors de localiser les mitochondries au sein des cellules HK-2 [145].

Parallèlement, la sonde cationique tétraméthylrhodamine ester (TMRE) a été utilisée pour détecter les variations du potentiel de membrane mitochondrial $\Delta\Psi_m$. Du fait de leur grande perméabilité membranaire et de leur faible liaison aux membranes, ces cations sont attirés par le potentiel négatif de la membrane interne mitochondriale et s'y accumulent d'autant plus que le potentiel est négatif [145]. L'intensité du signal de fluorescence détecté fournit alors une indication globale sur le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons.

4.2. Méthodes expérimentales

Finalement, le marqueur fluorescent MitoSOX Red (MSR) a été utilisé pour révéler les ROS produites au niveau mitochondrial [146, 147]. Comme la localisation cellulaire de ce marqueur a récemment été mise en doute [144], il a été contrôlé par des mesures de co-localisation que l'émission détectée par microscopie confocale était essentiellement originaire des mitochondries des cellules HK-2 (section 4.2.2).

4.2.1.2 Protocole pour la microscopie confocale

Les cellules HK-2 sont cultivées sur des lamelles de verre dans des plaques 6 puits. À 70% de confluence, elles sont incubées avec du LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Après traitement, les cellules sont rincées et incubées à 37°C dans du HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Gibco Laboratories, Belgique) contenant 100 nM de MTG et 5 μM de MSR pendant 20 min ou 20 nM de TMRE et 20 μM de DCF pendant 10 min. De plus, pour inhiber l'activité du complexe I, les HK-2 sont incubées 1 h avec de la roténone qui bloque de manière spécifique l'oxydation du NADH.

Avant les expériences de microscopie, les cellules sont rincées puis plongées dans du DMEM frais pendant 30 min. Les lamelles de verre sont alors récupérées, disposées sur un socle adaptable au système optique (Attofluor cell chamber, Invitrogen, France) et maintenues dans du HBSS. Les cellules sont observées avec le microscope confocal inversé¹ Leica SP5–AOBS (Leica, Allemagne) installé au Centre de Photonique Biomédicale de l'université Paris Sud (Orsay, France).

Le champ d'acquisition des images est obtenu par la mise au point de l'objectif $\times 40$ d'ouverture numérique 1.25 avec un zoom de 1. Une zone de lamelle est choisie de telle sorte qu'un groupe homogène de cellules HK-2 de 5 à 10 unités puisse être observé dans le même plan focal. Après excitation laser, l'intensité de fluorescence de deux sondes (NADH et MTG ou MTG et MSR ou DCF et TMRE) est alors enregistrée séquentiellement.

1. Un bref résumé des principes de fonctionnement du microscope confocal se trouve dans la référence [148].

Le tableau Tab. 4.2 reprend les conditions d'excitation et de détection de la fluorescence des marqueurs. Après acquisition, les images confocales ont une taille de 512×512 pixels enregistrées en 12 bits et sont analysées avec le logiciel Image J.

Marqueurs	NADH	MTG	DCF	MSR	TMRE
Ex./Em.	339/460	490/516	498/522	510/580	549/574
Laser	UV	Argon	Argon	Argon	Argon
$\lambda_{ex,laser}$	364	488	488	516	543
Fenêtre de détection	420-480	495-535	495-535	570-620	570-620
Code couleur	Bleu	Vert	Rouge	Vert	Rouge

Tab. 4.2 – Conditions d'excitation et de détection des marqueurs fluorescents NADH, MitoTracker Green (MTG), Dichlorofluoroscéine (DCF), MitoSOX Red (MSR) et Tétraméthylrhodamine (TMRE) lors des mesures de microscopie confocale. Les valeurs sont exprimées en nm.

4.2.1.3 Protocole pour la cytométrie en flux

Afin de contrôler l'activité mitochondriale des cellules HK-2, des mesures de fluorescence ont été effectuées sur un cytomètre en flux² FACSCalibur (Becton Dickinson, Singapour) installé au laboratoire Immunology Lab de l'université technologique de Nanyang (Singapour).

Comme pour les expériences de microscopie confocale, après le traitement au LPS, les cellules HK-2 sont incubées à 37°C dans du HBSS contenant 100 nM de MTG et 5 μ M de MSR pendant 20 min. Les cellules sont rincées, collectées et remises en suspension dans du HBSS avant d'effectuer l'analyse par cytométrie en flux. Les fluorescences du MTG (FL1) et du MSR (FL2) sont collectées au travers de filtres passe-bande 532/45 et 590/35 respectivement et les données acquises sont analysées avec le logiciel CellQuest.

2. Un bref résumé des principes de fonctionnement du cytomètre en flux se trouve dans la référence [148].

Comme les échantillons contiennent simultanément deux marqueurs fluorescents, le chevauchement de leur spectre d'émission et l'attribution de plages de longueurs d'onde pour la détection de leur fluorescence dans un photomultiplicateur (PMT) nécessitent l'emploi de compensations électroniques de fluorescence afin de soustraire la superposition des deux signaux de fluorescence. Sans compensation de fluorescence, les fluorochromes peuvent émettre de la lumière dans une plage de longueurs d'ondes captée par un PMT qui ne leur est pas destiné. Il en résulte qu'un signal dans un PMT1 peut provoquer un signal dans un PMT2 sans qu'aucun événement ne soit positif pour la couleur destinée au PMT2. Le système de compensation permet alors de soustraire artificiellement la fluorescence détectée dans le PMT2. Chaque pourcentage de compensation est ainsi déterminé par l'analyse des cellules simplement marquées par les différentes sondes. L'ordre de grandeur de ces compensations était typiquement FL1 -5% FL2 et FL2 -25% FL1.

4.2.2 Co-localisation des marqueurs fluorescents

Des mesures de co-localisation ont été effectuées pour s'assurer que les fluorescences du NADH et du MitoSOX Red, détectées par microscopie confocale, provenaient principalement des mitochondries.

Après enregistrement d'images par microscopie confocale, l'évaluation de la co-localisation permet de déterminer si deux marqueurs fluorescents (le NADH ou le MitoSOX Red d'une part et le MitoTracker Green d'autre part) sont détectés au même endroit. Statistiquement, cela signifie qu'à la résolution utilisée, il ne peut être exclu que les deux marqueurs soient au même endroit.

4.2.2.1 Conditions expérimentales

Pour effectuer des expériences de co-localisation, les images enregistrées doivent répondre à deux critères :

1. Être en mode confocal, c'est-à-dire que le diamètre du diaphragme de détection, placé dans le plan focal image de l'objectif du microscope, doit correspondre au diamètre de la tache d'Airy au foyer de l'objectif.
2. Avoir le même signal pour les deux images de fluorescence des deux marqueurs, c'est-à-dire que les images doivent être dans la même gamme d'intensité et que la taille du voxel (pixel tridimensionnel) doit être déterminée à partir des lois d'échantillonnage.

Pour les expériences de co-localisation, les cellules HK-2 sont observées en utilisant un objectif $\times 63$ d'ouverture numérique 1.4. Pour chaque co-localisation, le zoom est optimisé pour obtenir le meilleur échantillonnage par rapport à la résolution du microscope confocal dont la limite principale provient du phénomène de diffraction. D'après le théorème de Shannon-Nyquist et les lois d'Abbe, la résolution latérale d_{xy} et la résolution axiale d_z nécessaires à la prise d'images sont obtenues à partir des équations suivantes :

$$d_{xy} = \frac{0.4 \lambda_{em}}{2.3 \text{ NA}}$$

$$d_z = \frac{1.4 \lambda_{em}}{2.3 \text{ NA}^2}$$

où λ_{em} est la longueur d'onde d'émission de fluorescence et NA, l'ouverture numérique de l'objectif [149]. Ces conditions de co-localisation appliquées aux trois marqueurs fluorescents sont reprises dans le tableau Tab. 4.3.

Co-localisation	NADH/MTG	MSR/MTG
$\lambda_{em,moy}$	480 nm	516 nm
Résolution latérale	$d_{xy} = 68.6$ nm	$d_{xy} = 73.7$ nm
Résolution axiale	$d_z = 149.1$ nm	$d_z = 160.3$ nm
Zoom	7.03	6.63
z-stack	0.15 μm	0.16 μm

Tab. 4.3 – Conditions expérimentales pour la co-localisation des marqueurs NADH et MitoTracker Green (MTG) d'une part et MitoSOX Red (MSR) et MTG d'autre part.

4.2.2.2 Quantification de la co-localisation

L'analyse de la co-localisation est réalisée en utilisant JACoP, un plug-in qui tourne sous le logiciel ImageJ et développé par Bolte et Cordelières [149]. Il s'agit d'une approche statistique globale qui effectue une analyse reposant sur une corrélation d'intensités. Cette méthode statistique est basée sur la détermination du coefficient de Pearson.

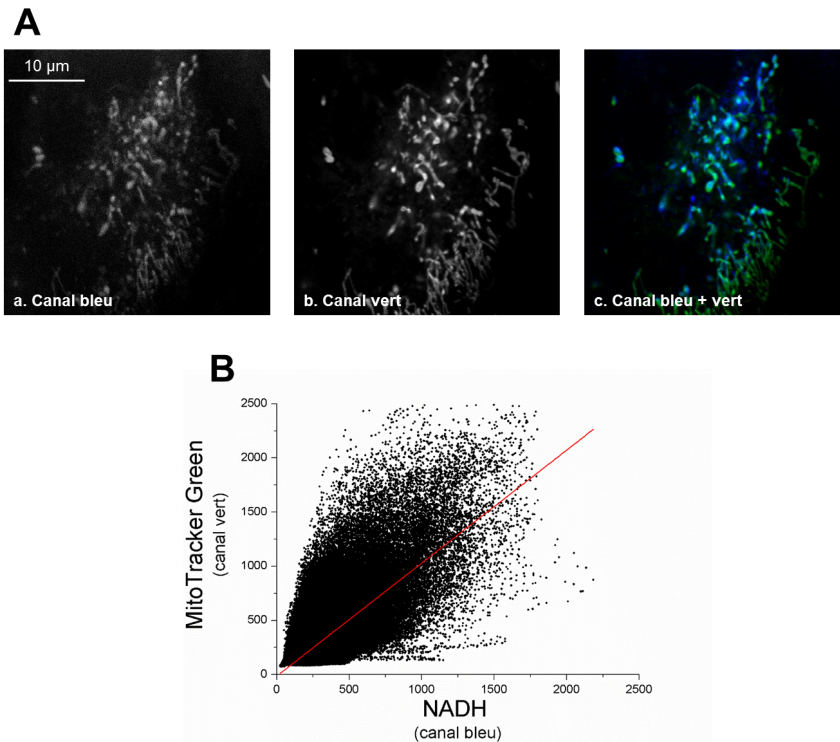


Fig. 4.2 – Construction d'un fluorogramme.

A : Images confocales (zoom 7.03) du réseau mitochondrial des cellules HK-2 utilisées pour la co-localisation du NADH avec le marqueur mitochondrial MTG suivant le canal bleu (a), le canal vert (b) et les deux canaux (c). Les sites de co-localisation apparaissent en cyan dans l'image (c).

B : Dans le fluorogramme, l'intensité d'un pixel du canal bleu est utilisée comme coordonnée x et l'intensité d'un pixel du canal vert est utilisée comme coordonnée y. La droite obtenue à partir de la régression linéaire de la distribution apparaît en rouge sur le graphique.

Coefficient de Pearson

Une manière simple d'évaluer la co-localisation est de tracer les nuances de gris des pixels d'une image (canal bleu pour le NADH et canal rouge pour le MSR) par rapport à l'autre (canal vert pour le MTG). On obtient alors un diagramme de distribution des pixels, appelé fluorogramme, que l'on ajuste avec une fonction linéaire (Fig. 4.2).

L'étendue de la distribution par rapport à son interpolation linéaire est estimée par un coefficient de corrélation, appelé coefficient de Pearson (PC). Bien que la pente de l'approximation linéaire informe sur le taux d'association des deux marqueurs, le coefficient de Pearson nous fournit une estimation sur l'exactitude de cette approximation. Comme la relation existante entre les deux signaux peut avoir une corrélation forte, faible, inexistante, négative ou positive, le coefficient de Pearson varie entre -1 (exclusion), 0 (pas de corrélation) et 1 (co-localisation totale) [150].

L'évaluation de la co-localisation, en se basant uniquement sur le coefficient de Pearson, peut être ambiguë car sa valeur dépend fortement du bruit de fond et des variations dans l'intensité de fluorescence. En pratique, des coefficients compris entre -0.5 et 0.5 ne permettent pas de conclure.

Approche de Costes

L'approche de Costes est une comparaison statistique qui exclut la co-localisation de pixels attribuée à la chance. Cette analyse est basée sur la randomisation de l'image du second signal (canal vert) et sur l'évaluation de son coefficient de Pearson PC_R par rapport à l'image du premier signal (canal bleu) (Fig. 4.3).

En répétant un grand nombre de fois cette étape (2000 fois), il est possible d'obtenir une gaussienne représentant la répartition de toutes les valeurs des PC_R estimées par la chance. Le PC de l'image non randomisée est alors comparé avec ces PC_R et la signification (*p-value*) est calculée. Cette *p-value* est inversement corrélée à la probabilité d'obtenir un tel PC par chance [151]. Ainsi, lorsque la valeur initiale de PC est suffisamment éloignée de

4.2. Méthodes expérimentales

la gaussienne des PC_r (p -value $\geq 95\%$), elle est parfaitement exploitable et quantifie de manière non biaisée la situation de co-localisation des deux marqueurs fluorescents.

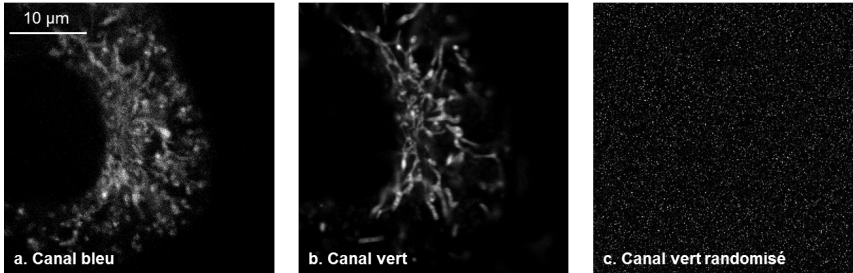


Fig. 4.3 – Principes de la méthode de Costes.

L'image de fluorescence du NADH (a) obtenue par microscopie confocale est comparée à celle obtenue avec le MTG (b) et sa version randomisée (c). Le coefficient de Pearson PC obtenu en comparant l'image du NADH et celle du MTG est de 0.759 tandis que celui obtenu avec l'image randomisée PC_r est de 0. Le coefficient de Pearson PC n'est donc pas dû à la chance (p -value de 100%) et il existe une co-localisation partielle mais forte entre le NADH et le MTG.

4.2.3 Méthodes biochimiques

Les mesures biochimiques de l'activité mitochondriale des cellules HK-2 nécessitent de fractionner les cellules en 3 parties : cytosolique, membranaire (plus débris) et mitochondriale.

4.2.3.1 Isolement des mitochondries

Après le traitement au LPS, les cellules HK-2 sont fractionnées suivant un protocole de centrifugation différentielle. Pour ce faire, les cellules sont rincées, collectées et soumises à des centrifugations à 4°C, de plus en plus rapides, dans du tampon spécifique permettant l'isolement des mitochondries : 1 fois 10 min à $200 \times g$, 1 fois 10 min à $1000 \times g$ et 1 fois 15 min à $14000 \times g$ (suivies de 2×10 min à $14000 \times g$ pour rinçage). Avant la

deuxième centrifugation, les cellules sont broyées sur glace à l'aide d'un potter pour faciliter l'extraction des mitochondries. À la fin du protocole, les fractions contenant le cytosol (fraction 1) et celles contenant les mitochondries (fraction 2) sont conservées à -80°C jusqu'aux prochaines analyses³.

4.2.3.2 Relargage du cytochrome c

Le cytochrome c est un élément essentiel de la chaîne de transport des électrons transférant les électrons entre le complexe III et le complexe IV des mitochondries. Par ailleurs, sa libération dans le cytosol est un indicateur d'une perturbation de l'activité de la chaîne respiratoire et est impliquée dans l'initiation de l'apoptose cellulaire [152].

Les concentrations de cytochrome c dans les fractions 1 et 2 des cellules HK-2 traitées au LPS sont mesurées par immunofluorescence indirecte (Cytochrome c (human) ELISA kit, Enzo Life Science, Belgique). Brièvement, les deux fractions 1 et 2 sont introduites dans une plaque 96 puits coâtée avec un anticorps monoclonal spécifique au cytochrome c. L'anticorps approprié et les substrats sont ajoutés dans chaque puits selon le protocole du kit et la densité optique à 405 nm est lue sur un lecteur de microplaques Multiskan (Thermo scientific, Belgique). Les concentrations en cytochrome c sont ensuite calculées à partir d'une courbe standard.

4.2.3.3 Activité de la cytochrome c oxydase

L'activité de la cytochrome c oxydase est analysée dans la fraction 2 des cellules HK-2 traitées au LPS en utilisant un kit de détection (Cytochrome c oxydase assay kit, Sigma-Aldrich, Belgique). Brièvement, ce dosage colorimétrique est basé sur la quantification de la décroissance au cours du temps de l'absorbance du ferrocyclochrome c due à son oxydation par le complexe IV. La cinétique est suivie sur un lecteur de microplaques Multiskan (Thermo scientifique, Belgique).

3. La fraction contenant les membranes n'est pas utilisée.

4.3 Résultats

4.3.1 Effet du LPS sur le réseau mitochondrial

Les images de fluorescence du marqueur MTG montrent que les mitochondries des cellules HK-2 sont organisées suivant un réseau de forme ovoïde avec une structure multi-ramifiée (Fig. 4.4 A-a). Cette distribution ne semble pas être affectée par le traitement au LPS (Fig. 4.4 A-b).

Par ailleurs, la quantification 2D de l'intensité de fluorescence ne révèle pas de variations significatives du signal de fluorescence obtenu après le traitement au LPS (Fig. 4.4 B). Ceci est confirmé par l'analyse de cytométrie en flux qui ne montre aucune variation dans la quantité totale de mitochondries par cellule après le traitement au LPS, quel que soit le temps d'incubation (Fig. 4.4 C).

4.3.2 Effet du LPS sur l'activité de la chaîne de transport des électrons

4.3.2.1 Complexe I non affecté

L'influence du LPS sur l'activité du complexe I des mitochondries des cellules HK-2 a été étudiée au travers de la détection de l'autofluorescence du NADH par microscopie confocale.

Pour s'assurer que le dispositif expérimental était suffisamment sensible pour quantifier un déplacement de l'équilibre redox NAD^+/NADH , les cellules HK-2 ont été incubées 1 h avec 1 μM de roténone, un inhibiteur spécifique de l'activité du complexe I mitochondrial [153]. Comme l'illustrent les Fig. 4.5 A-b et 4.5 B, l'intensité de fluorescence du NADH est effectivement augmentée de manière significative à la suite du traitement avec la roténone. Cette variation est la conséquence de l'inhibition de l'activité du complexe I et de l'accumulation de l'état réduit du coenzyme NADH.

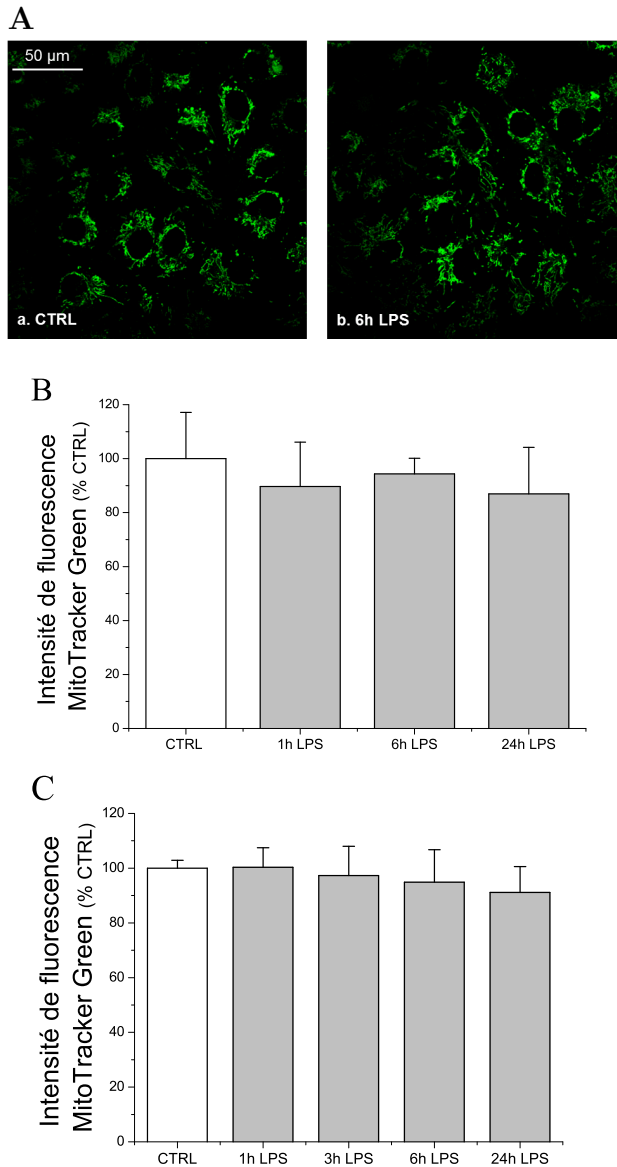


Fig. 4.4 – Effet du LPS sur l'organisation et le nombre des mitochondries dans les cellules HK-2.

A : Images confocales de l'intensité de fluorescence du marqueur MTG dans les cellules HK-2 sans traitement (a) et après 6 h de traitement au LPS (b).

B et C : Évolution de l'intensité du signal de fluorescence du marqueur MTG au cours du temps dans les cellules HK-2 traitées au LPS mesurée par microscopie confocale (110 cellules ont été analysées dans 3 expériences indépendantes) et par cytométrie en flux (n = 6) respectivement.

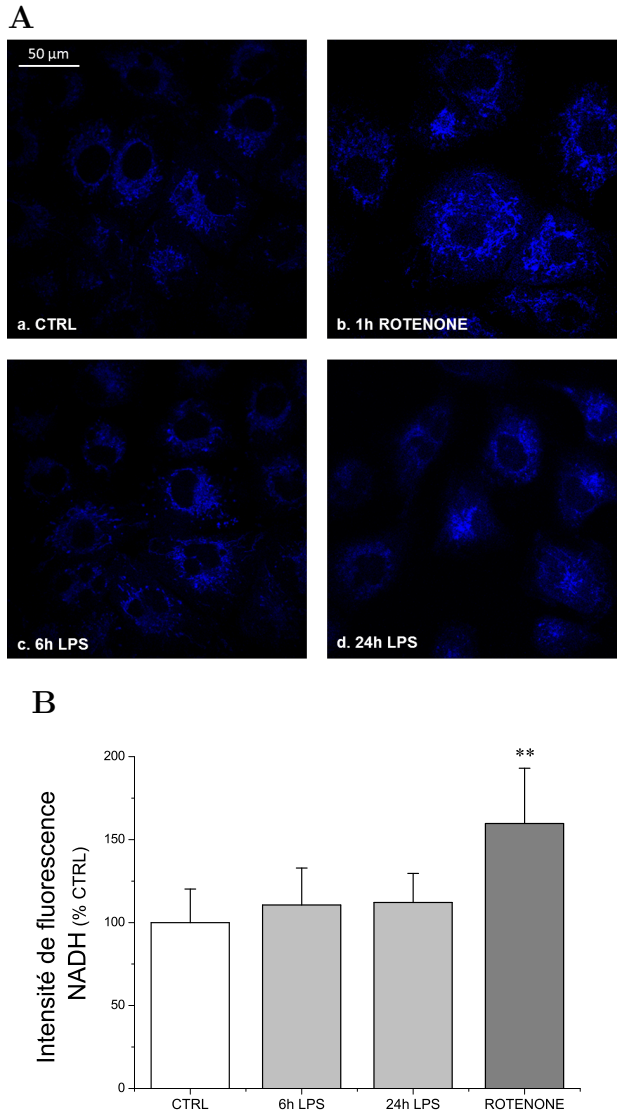


Fig. 4.5 – Évolution de l'état redox des mitochondries des cellules HK-2 traitées au LPS.

A : Images confocales de l'intensité de fluorescence du NADH dans les cellules HK-2 sans traitement (a), après 1 h de traitement avec la roténone (b), après 6 h (c) et 24 h (d) de traitement au LPS.

B : Évolution de l'intensité du signal de fluorescence du NADH au cours du temps dans les cellules HK-2 traitées au LPS mesurée par microscopie confocale. 150 cellules ont été analysées dans 4 expériences indépendantes.

******, $P \leq 0.005$.

Par ailleurs, les mesures de co-localisation montrent qu'il existe une co-localisation partielle forte entre le NADH et le marqueur MTG (Fig. 4.6). En effet, les spectres de fluorescence du NADH et du MTG se recouvrent (code couleur cyan) avec un coefficient de Pearson de 0.75 ± 0.09 (p -value de 100%) dans les cellules contrôles (Fig. 4.6 A-a) et de 0.75 ± 0.07 (p -value de 100%) dans les cellules traitées au LPS (Fig. 4.6 A-b).

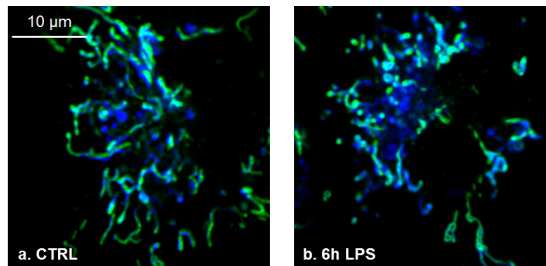


Fig. 4.6 – Réseau mitochondrial des cellules HK-2 observées par microscopie confocale (zoom 7.03) sans traitement (a) et après 6 h de traitement au LPS (b). Les codes couleur bleu et vert utilisés correspondent respectivement à l'émission de fluorescence du NADH et du marqueur MTG . Les sites de co-localisation apparaissent en cyan. 100 cellules ont été analysées dans 4 expériences indépendantes.

Cependant, après 6 h et 24 h de traitement au LPS, aucune variation de l'intensité du signal de fluorescence du NADH n'est observée dans les cellules HK-2 (Fig. 4.5 A-c, Fig. 4.5 A-d et Fig. 4.5 B).

4.3.2.2 Fuite des électrons

L'effet du LPS sur le transport des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale a été étudié en incubant les cellules HK-2 avec le marqueur fluorescent MSR.

Dans un premier temps, les mesures de co-localisation montrent qu'il existe une co-localisation quasi totale entre le marqueur MSR et le marqueur MTG (Fig. 4.7). En effet, les spectres de fluorescence du MSR et du MTG se recouvrent (code couleur jaune) avec un coefficient de Pearson de 0.91 ± 0.03

4.3. Résultats

(*p*-value de 100%) dans les cellules contrôles (Fig. 4.7 A-a) et de 0.92 ± 0.04 (*p*-value de 100%) dans les cellules traitées au LPS (Fig. 4.7 A-b).

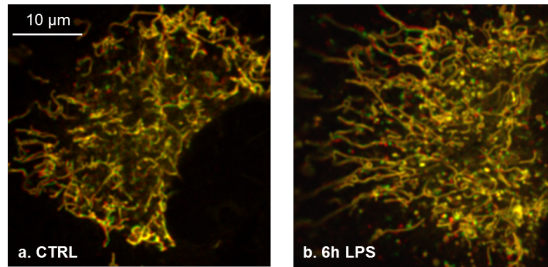


Fig. 4.7 – Réseau mitochondrial des cellules HK-2 observées par microscopie confocale (zoom 6.63) sans traitement (a) et après 6 h de traitement au LPS (b). Les codes couleur rouge et vert utilisés correspondent respectivement à l'émission de fluorescence des marqueurs MSR et MTG. Les sites de co-localisation apparaissent en jaune. 20 cellules ont été analysées dans 2 expériences indépendantes.

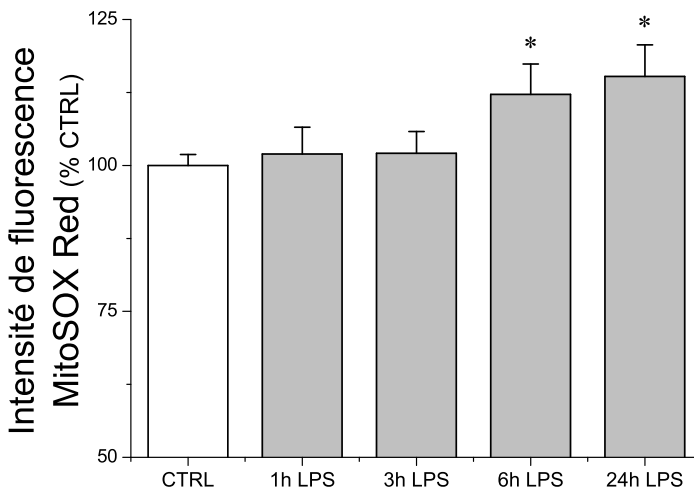


Fig. 4.8 – Évolution de l'intensité du signal de fluorescence du marqueur MSR au cours du temps dans les cellules HK-2 traitées au LPS mesurée par cytométrie en flux. $n = 6$; *, $P \leq 0.05$.

Les mesures de cytométrie en flux ont par ailleurs montré que l'oxydation du MSR est significativement augmentée de 15% dans les cellules traitées 6 h ($P = 0.03$) et 24 h ($P = 0.04$) avec le LPS, révélant ainsi une surproduction de ROS au niveau des mitochondries (Fig. 4.8).

Il est intéressant de noter qu'un signal de fluorescence provenant de MSR est détecté dans les cellules contrôles, suggérant une production basale de ROS par les mitochondries (Fig. 4.7). Ces ROS proviennent sûrement des sous-produits générés par le métabolisme cellulaire [154].

4.3.2.3 Relargage cytosolique du cytochrome c

Après 6 h et 24 h de traitement au LPS, la concentration cytosolique du cytochrome c est significativement plus élevée dans les cellules traitées que dans les cellules contrôles (Fig. 4.9). En effet, elle atteint $7.8 \pm 5.1 \times 10^4$ pg/ 10^7 cellules ($P = 0.05$) et $4.2 \pm 2.4 \times 10^4$ pg/ 10^7 ($P = 0.08$) dans les cellules traitées respectivement 6 h et 24 h avec du LPS, comparé à $1.3 \pm 1.2 \times 10^4$ pg/ 10^7 cellules dans les échantillons contrôles.

4.3.2.4 Inhibition de la cytochrome c oxydase

Corrélativement à ces perturbations détectées au niveau du complexe III, l'activité de la cytochrome c oxydase diminue significativement de 60% dans les cellules HK-2 traitées 6 h ($P = 0.01$) et 24 h ($P = 0.02$) avec du LPS (Fig. 4.10).

4.3.3 Effet du LPS sur la phosphorylation oxydative

Dans le dispositif expérimental mis en place pour la microscopie confocale, les perturbations de la phosphorylation oxydative ont été détectées en suivant les variations dans l'intensité du signal de fluorescence du TMRE.

4.3. Résultats

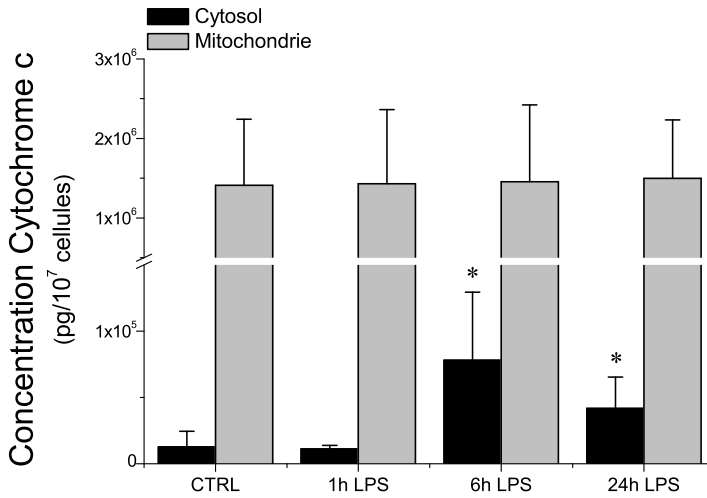


Fig. 4.9 – Concentrations du cytochrome c respectivement détectées dans le cytosol et les mitochondries des cellules HK-2 traitées au LPS.

n = 6 ; *, P ≤ 0.05.

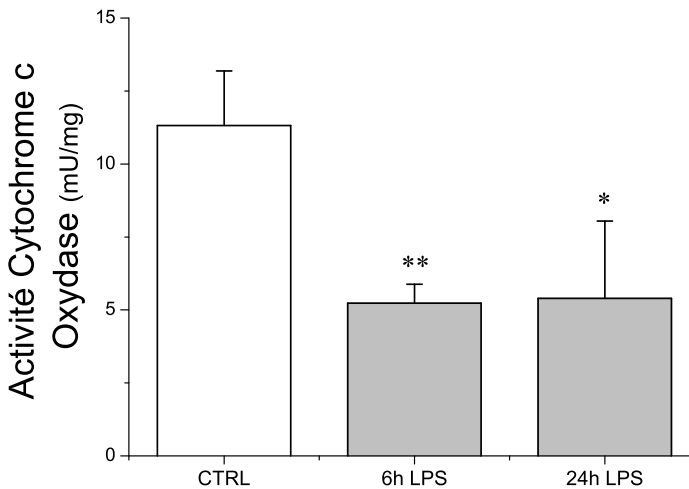


Fig. 4.10 – Analyse de l'activité de la cytochrome c oxydase dans les cellules HK-2 traitées au LPS.

n = 4 ; *, P ≤ 0.05 ; **, P ≤ 0.005.

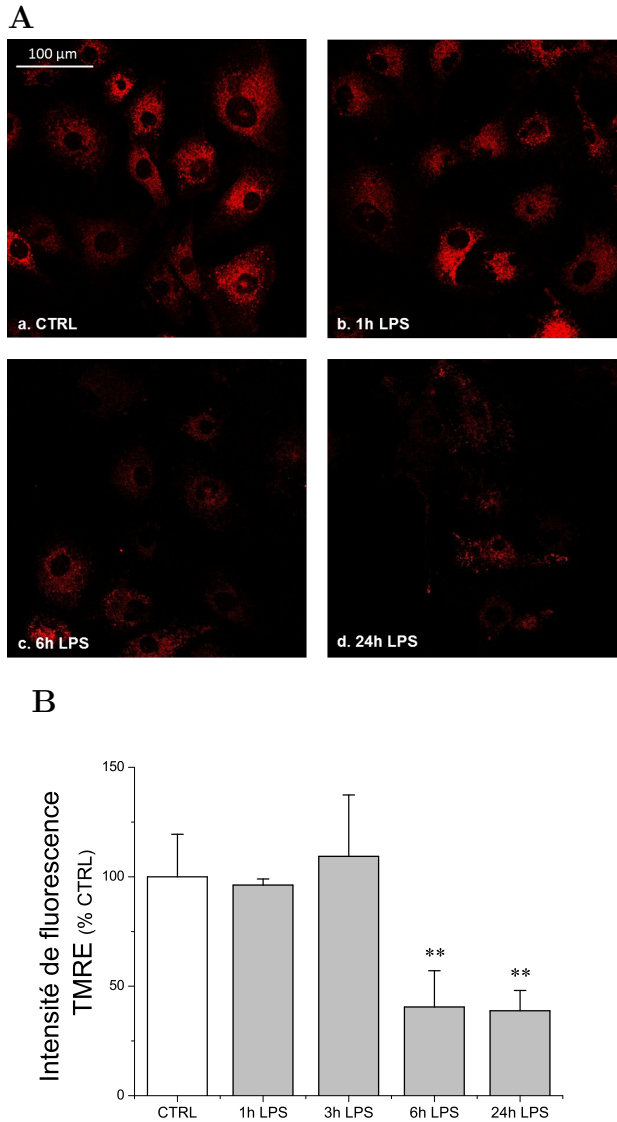


Fig. 4.11 – Effet du LPS sur la polarisation membranaire mitochondriale $\Delta\Psi_m$ des cellules HK-2.

A : Images confocales de l'intensité de fluorescence du marqueur TMRE dans les cellules HK-2 sans traitement (a), après 1 h (b), 6 h (c) et 24 h (d) de traitement au LPS.

B : Évolution de l'intensité du signal de fluorescence du marqueur TMRE au cours du temps dans les cellules HK-2 traitées au LPS mesurée par microscopie confocale. 210 cellules ont été analysées dans 4 expériences indépendantes.

** $, P \leq 0.005$.

Cette investigation a révélé une perte significative de 60% du signal de fluorescence du TMRE dans les cellules HK-2 après 6 h et 24 h de traitement au LPS (Fig. 4.11), traduisant une dépolarisation importante de la membrane interne mitochondriale.

4.4 Discussion et conclusion

L'hypothèse de l'hypoxie cytopathique semble être de plus en plus privilégiée pour expliquer l'apparition d'une défaillance d'organe lors du sepsis. Elle postule que l'interruption de la phosphorylation oxydative des mitochondries est à l'origine de l'incapacité des cellules à utiliser l'oxygène pour produire l'ATP nécessaire à son métabolisme [45, 116]. Sur la base de la littérature récente, cette hypothèse a déjà été vérifiée lors du sepsis pour des organes essentiels tels que le foie et le cœur mais pas encore pour le rein [115, 132]. Le modèle expérimental élaboré au cours de cette thèse a permis de vérifier cette hypothèse.

Dans un premier temps, l'analyse effectuée par microscopie confocale et cytométrie en flux a démontré que le LPS n'induit pas de perturbation tant dans l'organisation que dans le nombre de mitochondries dans les cellules HK-2 durant les 24 premières heures du traitement. Pourtant, d'autres études ont montré que les mitochondries des cellules de tissus animaux septiques présentaient des dommages ultra-structurels, tels qu'un gonflement ou une raréfaction du nombre de crêtes [115, 138]. La différence entre nos observations et celles des autres études peut s'expliquer par le fait que les observations n'ont pas été faites dans les mêmes conditions de viabilité cellulaire. En effet, dans ces autres études, les altérations structurelles mitochondriales étaient détectées alors que les tissus présentaient une très forte proportion de cellules apoptotiques. Il est maintenant bien établi que l'apoptose est accompagnée de profondes perturbations morphologiques et fonctionnelles au niveau des mitochondries [155, 156]. Il est donc impossible de conclure si les altérations mitochondriales sont dues au stress inflammatoire ou au

déclenchement de l'apoptose. Dans les cellules HK-2 de notre modèle, les altérations mitochondriales ont été examinées avant l'apparition des phénomènes apoptotiques (Fig. 3.13) et peuvent être, dès lors, attribuées au stress induit par le LPS.

Bien qu'aucune modification du réseau mitochondrial n'ait été observée, cette étude a montré néanmoins que l'activité fonctionnelle des mitochondries des cellules HK-2 était altérée par le traitement au LPS. Nous avons alors cherché à localiser et à caractériser les perturbations présentes dans la chaîne respiratoire mitochondriale. En suivant l'intensité du signal de fluorescence provenant majoritairement du coenzyme NADH mitochondrial, il a été montré que l'activité du complexe I ne semble pas être affectée par le traitement au LPS. Par contre, l'activité de la cytochrome c oxydase est significativement inhibée par ce traitement et s'accompagne de la libération du cytochrome c dans le cytosol des cellules HK-2. Le passage du cytochrome c dans le cytosol va déclencher une cascade de réactions qui aboutissent à l'activation de caspases, qui sont des protéines directement responsables du phénomène apoptotique [152]. Cette dernière observation est donc en bonne cohérence avec la détection de cellules HK-2 apoptotiques lors du traitement au LPS.

Corrélativement, une surproduction de ROS (par rapport à un cycle mitochondrial normal) a été détectée au niveau des mitochondries des cellules HK-2 traitées au LPS, révélant ainsi une fuite d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire. Depuis longtemps, les mitochondries sont considérées comme étant la principale source de ROS dans les cellules. Les électrons de la chaîne respiratoire s'échappent des complexes I et III et interagissent avec l' O_2 pour former l'anion superoxyde O_2^- . Celui-ci peut ensuite générer d'autres ROS, telles que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (réaction de dismutation 2.5) et le radical hydroxyle $\cdot OH$ (réaction de type Fenton 2.3) [123, 125, 157]. Comme nous le verrons dans le chapitre 5, ces ROS produites au niveau des mitochondries peuvent participer et maintenir le dysfonctionnement énergétique des cellules HK-2.

Cette production mitochondriale de ROS pourrait expliquer pourquoi le changement de l'état redox du NADH n'a pas pu être détecté au niveau du complexe I des cellules HK-2. Malgré l'inhibition possible du complexe I et l'accumulation associée de sa forme réduite, le coenzyme a pu être oxydé par les sous-produits radicalaires, tels que les radicaux peroxy et thyl [71], empêchant alors l'observation attendue de l'augmentation de l'intensité de fluorescence correspondant à une inhibition du complexe I et à l'accumulation de sa forme réduite.

Le flux d'électrons entre les complexes mitochondriaux I à IV, qui fournit l'énergie nécessaire pour transférer les protons au travers de la membrane interne mitochondriale à l'origine de la production d'ATP, est donc en partie interrompu par le traitement au LPS. Par conséquent, la phosphorylation oxydative est perturbée et se traduit par une baisse significative du potentiel de membrane mitochondrial $\Delta\Psi_m$ ainsi qu'une forte diminution du niveau d'ATP dans les cellules HK-2 stressées. L'ensemble de ces mécanismes est repris dans la Fig. 4.12.

Globalement, l'inhibition de l'activité de la cytochrome c oxydase, la dissipation de $\Delta\Psi_m$ et la diminution de la production d'ATP sont les preuves d'une interruption de la phosphorylation oxydative dans les cellules HK-2 traitées au LPS. Ce résultat est cohérent avec le fait que le LPS induit une diminution de la consommation en O_2 des cellules HK-2. De cette façon, le mécanisme d'hypoxie cytopathique semble tout à fait envisageable pour expliquer l'incapacité des cellules rénales à extraire l'oxygène disponible pour produire de l'ATP pendant une inflammation.

En extrapolant ces résultats au cas clinique, on peut supposer que la défaillance mitochondriale est à l'origine de la défaillance énergétique observée dans le rein lors du sepsis. Par ailleurs, la libération du cytochrome c dans le cytosol des cellules rénales participe à l'initiation des phénomènes apoptotiques observés à un stade ultérieur du traitement au LPS. Cette mort cellulaire est un autre mécanisme à prendre en compte pour expliquer la

survenue des lésions rénales au cours du sepsis.

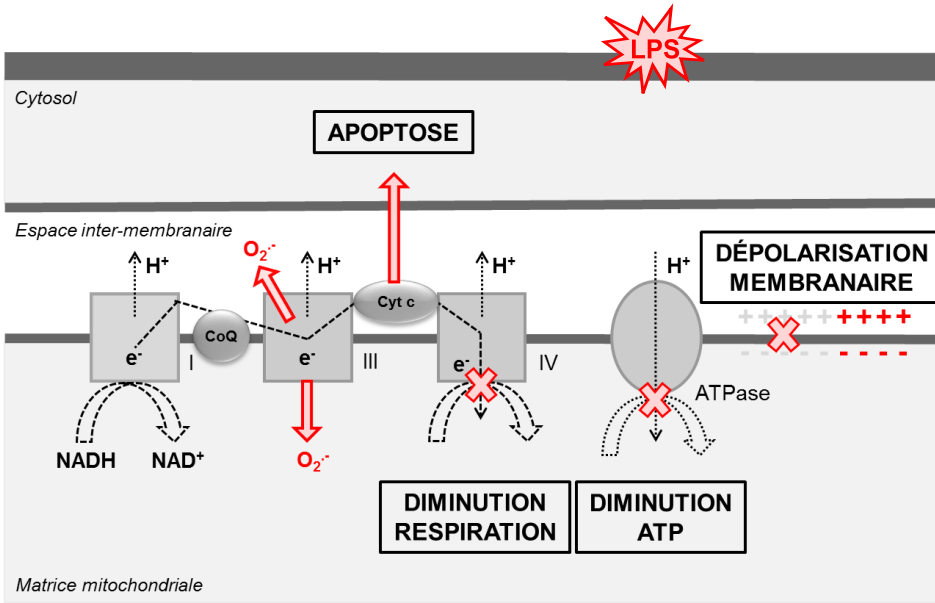


Fig. 4.12 – Représentation schématique du mécanisme d’hypoxie cytopathique appliqué à notre modèle expérimental. Le traitement au LPS induit une interruption de la phosphorylation oxydative des mitochondries des cellules HK-2 qui se traduit par différentes perturbations au niveau du complexe III (fuite des électrons et libération du cytochrome c), du complexe IV (inhibition) et de l’ATP synthase (sous-production d’ATP).

Stress oxydant cytosolique et impact mitochondrial

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont issues de la production initiale d'anion superoxyde (O_2^-) et de monoxyde d'azote ($\cdot NO$). Étant donné leur caractère fort oxydant, leur production est finement régulée pour maintenir leur concentration à un niveau non délétère pour la cellule. En effet, en faibles quantités, ces espèces jouent des rôles centraux dans la signalisation cellulaire. Par contre, lorsque leur production est incontrôlée ou que les systèmes de régulation sont défectueux, la quantité de ROS augmente et une situation communément appelée « stress oxydant » s'installe [71, 158].

Au cours du sepsis, ce stress oxydant apparaît comme un des facteurs essentiels du développement des altérations tubulaires et de la défaillance

rénale [60, 79]. Cependant, les ROS pourraient être également des médiateurs de choix dans le dysfonctionnement de la signalisation cellulaire qui sous-tend l'action du stress inflammatoire vis-à-vis des mitochondries [159]. Les candidats les plus souvent proposés pour endosser ce rôle de messagers intracellulaires sont le $\cdot\text{NO}$ produit par les NO synthases et les ROS générées par les NADPH oxydases [34, 160]. À l'heure actuelle, de nombreuses questions subsistent encore concernant la traduction des réactions radicalaires impliquant le $\cdot\text{NO}$, l' O_2^- et leurs dérivés en un signal de messagerie cellulaire.

Le dernier volet de cette thèse de doctorat a consisté à comprendre comment le stress LPS subit par les cellules HK-2 est transmis aux mitochondries et se traduit par une inhibition de la phosphorylation oxydative. Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle joué par le $\cdot\text{NO}$ et les ROS comme inhibiteurs de la chaîne respiratoire et d'établir une relation entre ce stress oxydant et l'activation d'enzymes spécifiques, telles que la NOS inducible et l'isoforme 4 de la NADPH oxydase [160, 161].

Sommaire

5.1	Avant-propos	125
5.1.1	Stress oxydant et dysfonction mitochondriale	125
5.1.2	Source extra-mitochondriale de ROS	127
5.1.2.1	iNOS	127
5.1.2.2	NADPH oxydase 4	128
5.1.3	Objectif de l'étude	131
5.2	Méthodes expérimentales	132
5.2.1	Détection de protéines	132
5.2.1.1	Électrophorèse et western blot	132
5.2.1.2	qPCR	133
5.2.2	Spectroscopie	135
5.2.2.1	Spectroscopie RPE et piégeage de spin	135
5.2.2.2	Spectrophotométrie	138
5.2.3	Utilisation d'antioxydants	139

5.3 Résultats	140
5.3.1 Le LPS induit l'expression de iNOS et la production de $\cdot\text{NO}$	140
5.3.2 Le LPS induit l'expression de NOX 4 et la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$	142
5.3.3 Les antioxydants rétablissent l'activité mitochondriale	145
5.3.3.1 Récupération de l'activité de la cytochrome c oxydase	145
5.3.3.2 Amélioration de la consommation en O_2	148
5.3.3.3 Rétablissement de la polarisation membranaire mitochondriale	148
5.4 Discussion et conclusion	148

5.1 Avant-propos

5.1.1 Stress oxydant et dysfonction mitochondriale

Si la mitochondrie est considérée comme l'une des principales sources de ROS intracellulaires, elle en est aussi la principale cible. De nombreuses études rapportent l'existence d'une corrélation positive entre d'une part les altérations mitochondriales et d'autre part l'augmentation du stress oxydant dans les tissus endommagés au cours du sepsis (Tab. 5.1). Deux médiateurs ont été le plus souvent retenus et seraient à l'origine du dysfonctionnement mitochondrial induit lors du sepsis : le monoxyde d'azote ($\cdot\text{NO}$) et l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [162, 163].

Le $\cdot\text{NO}$ est reconnu comme étant une molécule de signalisation potentielle dans le contrôle de la respiration cellulaire. Il est capable de l'inhiber en prenant la place de l' O_2 au niveau de la cytochrome c oxydase [164]. La réaction du $\cdot\text{NO}$ avec ce complexe mitochondrial est rapide (de quelques millisecondes à quelques secondes) et réversible. Cependant, à haute concen-

5.1. Avant-propos

tration, le $\cdot\text{NO}$ réagit avec l' O_2^- pour former le peroxynitrite (ONOO^-). Ce dernier peut interagir de manière irréversible avec les différents composants de la chaîne respiratoire et induire des dommages oxydatifs dans l'environnement mitochondrial [73, 164].

Le ONOO^- peut, en effet, inhiber le complexe I, le complexe II et l'ATP synthase par des mécanismes d'action qui ne sont pas encore complètement élucidés. L'inhibition du complexe I impliquerait des réactions de type S-nitrosylation, celle du complexe II serait plutôt la conséquence du déplacement du fer des centres fer-sulfure tandis que l'inactivation de l'ATP synthase s'effectuerait par des réactions de nitration sur des résidus aromatiques [73, 165]. De manière importante, le ONOO^- peut réagir irréversiblement avec les différentes sous-unités de la cytochrome c oxydase en les réduisant et en bloquant ainsi le transfert des électrons nécessaire à la réduction de l' O_2 [166].

Modèle de sepsis	Dysfonction mitochondriale	Méiateur	Réf.
Patients septique	Inhibition complexe I	$\cdot\text{NO}$	[122]
Rats et CLP	Inhibition complexe I	iNOS	[167]
Rats et CLP	Inhibition complexe I Diminution niveau ATP	$\cdot\text{NO}$	[131]
Souris et CLP	Inhibition chaîne respiratoire	iNOS	[168]
Rats et CLP	Inhibition complexe IV Relargage cytochrome c	O_2^-	[44]
Rats et LPS	Dépolarisation membranaire	mitoROS	[43]
Fibroblastes et sérum septique	Inhibition complexe I Inhibition ATPase	H_2O_2	[137]

Tab. 5.1 – Médiateurs de l'altération mitochondriale dans différents modèles de sepsis.
ATPas, ATP synthase; CLP, *Cecal Ligation and Puncture*; mitoROS, ROS mitochondriales.

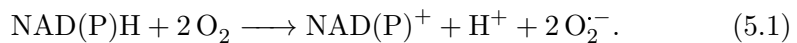
(nNOS), endothéliale (eNOS) et inductible (iNOS). Contrairement aux deux premières qui existent à un niveau basal, iNOS n'est normalement pas exprimée. Son expression est induite par des médiateurs de l'inflammation, tels que les cytokines, le LPS et les ROS. Une fois exprimée, iNOS est continuellement active et stimule, de manière importante, la production de $\cdot\text{NO}$ sur une durée plus longue que ne le font les autres NOS [161].

Caractéristique de iNOS rénale

Contrairement à ce qui est trouvé dans d'autres organes, iNOS est exprimée de façon constitutive dans la médulla rénale et dans les tubules contournés proximaux [170, 172]. Bien que le rôle de cette enzyme n'ait pas encore été étudié dans la régulation du transport des néphrons, il semblerait que l'expression basale de iNOS et sa production associée de $\cdot\text{NO}$ participent au maintien de l'intégrité et de la viabilité des cellules épithéliales rénales [173]. Par contre, lors d'une inflammation, la surexpression de iNOS jouerait un rôle majeur dans l'établissement d'un stress oxydant et l'apparition des altérations tubulaires rénales [22, 64, 121].

5.1.2.2 NADPH oxydase 4

La NADPH oxydase est une enzyme transmembranaire qui catalyse la réduction mono-électronique de l' O_2 en O_2^- suivant la réaction :



D'abord décrite dans les cellules phagocytaires, la NADPH oxydase est un complexe multimérique présent de façon constitutive dans toutes les cellules [171]. Dans les cellules phagocytaires, l'activité de la NADPH oxydase n'existe qu'après une stimulation immunitaire et provoque la libération d' O_2^- à l'extérieur des cellules. Dans les cellules non-phagocytaires, au contraire, il existe une activité basale, souvent d'une moindre importance, qui participe à la génération d' O_2^- dans le cytoplasme des cellules. Ces radicaux semblent jouer un rôle de second messenger qui influence la voie de

signalisation redox des cellules. Cependant, en proportion trop importante, ils contribuent à la génération d'un stress oxydant [174].

Localisation subcellulaire et assemblage

Dans les cellules phagocytaires, la production d' O_2^- par la NADPH oxydase nécessite la formation d'un édifice macromoléculaire qui ne devient actif qu'après l'assemblage de plusieurs protéines sur la composante catalytique de l'enzyme, à savoir le flavocytochrome b_{558} localisé dans la membrane cellulaire. Ce composant membranaire est un hétérodimère, constitué de deux sous-unités $gp91^{phox}$ et $p22^{phox}$, auquel vient s'ajouter au moins quatre autres sous-unités cytosoliques : $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ et Rac (Fig. 5.2 A). C'est au sein de cet assemblage qu'a lieu une succession de transfert d'électrons de part et d'autre de la membrane jusqu'à l'accepteur final, l' O_2 , qui est alors réduit en O_2^- [175].

Il est intéressant de noter que le modèle de formation de la NADPH oxydase dans les cellules phagocytaires est principalement membranaire et ne permet pas d'expliquer la capacité des NADPH oxydases non phagocytaires à produire de manière constitutive une quantité basale d' O_2^- à l'intérieur des cellules non stimulées. Une étude récente sur la NADPH oxydase de cellules endothéliales a permis de fournir des pistes quant à la formation du complexe enzymatique dans les cellules non phagocytaires. Il semblerait que la majorité des sous-unités de la NADPH oxydase soient exprimées et présentes à l'intérieur de la cellule plutôt qu'au niveau de la membrane plasmique. Ces sous-unités, déjà pré-assemblées, seraient fonctionnelles et capables de générer des O_2^- . Dans ce modèle, le cytosquelette fournirait la structure nécessaire au complexe enzymatique pour s'assembler et se stabiliser [176].

Caractéristique de la NADPH oxydase rénale

Dans la NADPH oxydase phagocytaire, $gp91^{phox}$ est la sous-unité catalytique principale de l'enzyme. Ce sont des homologues de $gp91^{phox}$, nommés NOX (pour NADPH oxydase), qui sont exprimés dans les cellules non pha-

5.1. Avant-propos

gocytaires [177]. Notamment, un homologue nommé NOX 4 a été découvert dans le rein. Cette protéine présente 39% de similitude avec gp91^{phox} (nommée également NOX 2) et est une source rénale de production d'O₂⁻ (Fig. 5.2 B).

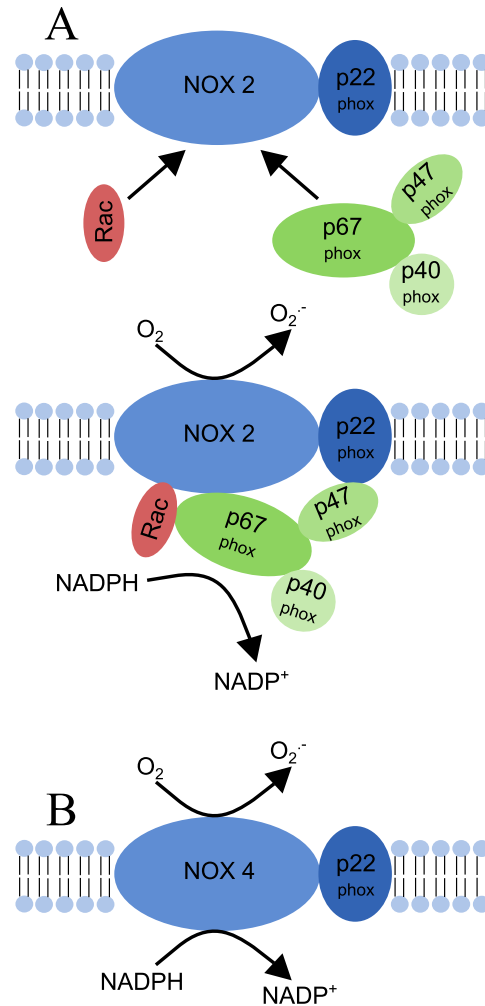


Fig. 5.2 – Représentation schématique de la structure de NOX 2 et NOX 4. A : L'activation de NOX 2 par un stimulus inflammatoire implique la translocation des sous-unités cytosoliques p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} et Rac sur la composante catalytique de l'enzyme constitué des deux sous-unités NOX 2 (gp91^{phox}) et p22^{phox}. B : Les processus d'activation de NOX 4 sont toujours sous investigation. Illustration inspirée de [12, 15].

NOX 4 semble être impliquée à la fois dans la régulation des processus physiologique et physiopathologique du rein. D'un côté, elle interviendrait dans la synthèse d'érythropoïétine et dans la régulation de la prolifération cellulaire, de l'autre, elle serait un médiateur important des phénomènes apoptotiques [171, 178].

Par ailleurs, des études ont montré qu'il existait une interaction directe entre le récepteur TLR4 et la NADPH oxydase dans des cellules de rein embryonnaire humain, la région terminale COOH de NOX 4 interagissant avec le domaine TIR du récepteur [179]. NOX 4 serait donc impliquée dans la transduction du signal par la génération de ROS lors d'un stress cellulaire induit par LPS.

5.1.3 Objectif de l'étude

Malgré les preuves de plus en plus nombreuses montrant que les dommages oxydatifs des mitochondries jouent un rôle important dans le développement de la défaillance rénale induite par le sepsis, les mécanismes sous-jacents n'ont pas encore été entièrement élucidés. Notamment, de nombreuses questions restent ouvertes concernant la relation existant entre la production cellulaire de ROS et le dysfonctionnement mitochondrial des cellules rénales. Il n'a pas encore été montré comment la production de ROS pouvait être traduite en un signal redox à caractère de messenger intracellulaire. Par ailleurs, on ignore toujours si la génération des ROS apparaît avec la dysfonction mitochondriale ou bien si elle la précède et induit cette dysfonction.

L'étude que nous avons menée a exploré les voies de signalisation intracellulaires possibles qui sous-tendent l'action du LPS et qui conduisent à une altération de la respiration des cellules HK-2. Il est apparu, dans un premier temps, que l'induction d'enzymes inflammatoires, telles que iNOS et NOX 4, était reliée à la production cytoplasmique du NO[•] et de l'O₂⁻ à l'origine d'un stress oxydant cellulaire. Par la suite, l'utilisation d'antioxydants a permis de mettre en évidence l'implication de ce stress oxydant dans le dysfonctionnement des mitochondries des cellules HK-2 traitées au

LPS. Finalement, l'ensemble des résultats semblent révéler que le médiateur principal de l'altération mitochondriale est le peroxy-nitrite ONOO^- , espèce oxydante issue de la réaction du NO^\cdot avec l' O_2^- .

5.2 Méthodes expérimentales

5.2.1 Détection de protéines

En biologie moléculaire, l'ADN est le support stable et transmissible de l'information génétique qui définit les fonctions biologiques d'un organisme. Il est transcrit en ARN qui n'a qu'une vie temporaire. Ce dernier assure soit une fonction structurale, soit une fonction enzymatique, ou soit une fonction de transport de l'information génétique. L'ARN de type messenger (ARNm) est traduit en protéines par le ribosome. Après plusieurs modifications structurales, ces protéines peuvent exercer finalement leur activité. La présence d'une protéine dans une cellule peut donc être détectée à plusieurs niveaux de sa synthèse : par sa transcription ARNm, sa traduction protéique ou son activité fonctionnelle.

5.2.1.1 Électrophorèse et western blot

Principe

L'électrophorèse consiste à séparer les protéines cellulaires les unes des autres selon leur poids moléculaire pour déterminer l'identité et la proportion de chacune d'entre elles. Elle se base sur la migration des particules chargées, placées sous l'influence d'un champ électrique, au travers d'un gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE).

Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps, elles sont transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose. Cette dernière est placée face-à-face avec le gel et un courant électrique permet aux protéines chargées de migrer depuis le gel vers la membrane en conservant

l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Ce transfert est ce qui s'appelle communément « western blot » [180].

La détection consiste à sonder la membrane pour la protéine d'intérêt avec des anticorps, liés ensuite à une enzyme émettant un signal photométrique. Généralement, la détection de la protéine d'intérêt s'effectue en deux étapes. L'incubation avec l'anticorps, dit primaire, permet de rechercher spécifiquement la protéine d'intérêt. Le deuxième anticorps, dit secondaire, se lie spécifiquement à l'anticorps primaire et permet de révéler la protéine d'intérêt sur la membrane.

Protocole

Les cellules HK-2 traitées avec le LPS sont récupérées afin d'y rechercher et d'y quantifier les protéines iNOS, NOX 4 et actine (référence) par électrophorèse et western blot. Brièvement, une quantité égale de protéines (20 μg) est séparée dans un gel 7.5% SDS-PAGE puis transférée sur une membrane nitrocellulose. Les parties de la membrane correspondant aux poids moléculaires des protéines d'intérêt sont incubées respectivement avec les anticorps primaires spécifiques. Les anticorps primaires anti-iNOS et anti-NOX 4, produits respectivement chez le lapin et la chèvre, provenaient de Santa Cruz Biotechnology (USA) et les anticorps primaires anti-actine, produits chez la souris, provenaient de Millipore (USA). Après rinçage, les bandes obtenues au western blot sont révélées grâce aux anticorps secondaires HRP conjugués et détectées par une méthode de chimiluminescence. La quantification est ensuite effectuée à l'aide du logiciel Image J.

5.2.1.2 qPCR

Principe

La transcription inverse suivie de réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) est une méthode d'amplification d'ADN qui permet de quantifier l'expression initiale de gènes pris individuellement. Après avoir extrait l'ARN messager d'un tissu à étudier, la réaction de qPCR commence par un

cycle de transcription inverse pour synthétiser l'ADN codon (ADNc) à partir de l'ARNm. Puis, des amorces spécifiques d'un gène servent à amplifier l'endroit du génome auquel on s'intéresse (Fig. 5.3). L'accumulation de ces unités génétiques est alors mesurée en temps réel par l'utilisation de colorants fluorescents ou de la méthode TaqMan qui se base sur la propriété de transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET)¹. À chaque cycle de PCR, l'intensité de fluorescence est lue et enregistrée. Cette méthode quantifie donc le nombre de molécules d'ADN double brin, et par comparaison avec une gamme-étalon, d'en déduire la quantification du nombre de molécules d'ADNc et donc d'ARNm dans l'échantillon [181].

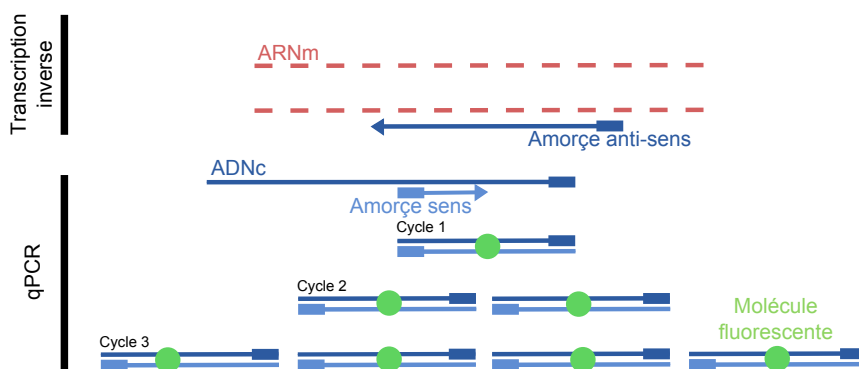


Fig. 5.3 – Principe de la technique de qPCR. Dans une première étape, les ARN messagers sont rétro-transcrits en ADN codons par une transcriptase inverse en présence d'une amorce spécifique. Dans une seconde étape, un petit fragment de l'ADN codon est amplifié par PCR à l'aide d'amorces sens et anti-sens spécifiques en présence de molécules fluorescentes.

Protocole

La quantité d'ARN messagers exprimés pour iNOS a été estimée par des expériences de qPCR. Brièvement, l'ARN total des cellules HK-2 traitées au LPS est purifié en suivant les indications fournies par RNeasy Mini Kit (Quiagen, Canada) puis quantifié par son pic d'absorption UV. L'ARNm

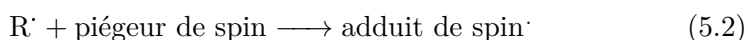
1. Brièvement, la fluorescence d'un colorant est supprimée par transfert d'énergie à une autre molécule fluorescente proche, qui émet alors à une longueur d'onde différente.

est alors rétro-transcrit en suivant les indications fournies par High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Canada). Les amorces spécifiques pour iNOS et pour l'actine (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Canada) sont utilisées pour l'amplification de l'ADNc par Taqman Universal Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Canada). La qPCR est réalisée en 40 cycles de températures successifs (95°C, 15s; 60°C, 60s) dans un thermocycleur (DNA Thermal Cycler, Perkin-Elmer, Canada).

5.2.2 Spectroscopie

5.2.2.1 Spectroscopie RPE et piégeage de spin

La méthode de piégeage de spin consiste à utiliser un composé diamagnétique, le piègeur de spin, qui réagit avec le radical libre de courte durée de vie pour donner naissance à un radical de stabilité plus grande, l'adduit de spin, observable par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) en mode stationnaire :

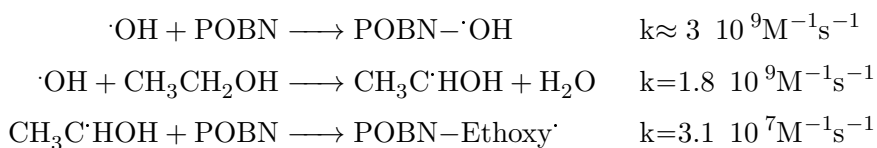


Nous avons utilisé cette méthode pour essayer de détecter et d'identifier les ROS produites par les cellules HK-2 lors du traitement au LPS. Pour être efficace en milieu cellulaire, cette technique doit néanmoins remplir certaines conditions :

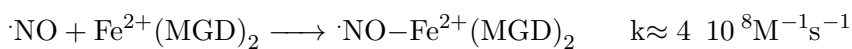
- Le piègeur de spin utilisé doit être lipophile pour pénétrer en grande quantité à l'intérieur des cellules.
- Le piègeur de spin doit également avoir une cinétique de réaction suffisante avec l'espèce à piéger pour ne pas lui laisser le temps de réagir uniquement avec son environnement.
- Le temps de vie de l'adduit de spin formé doit être assez long pour autoriser sa détection.

5.2. Méthodes expérimentales

Pour détecter le radical $\cdot\text{OH}$ très réactif en milieu cellulaire ($k = 10^9\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour toutes cibles cellulaires), nous avons choisi le piègeur de spin α -(4-Pyridyl 1-oxyde)-N-tert-butylnitron (POBN, Enzo Life Sciences, Belgique) pour sa capacité à franchir les membranes cellulaires. Ce piègeur de spin réagit très vite avec le radical $\cdot\text{OH}$ pour former un adduit de spin POBN- $\cdot\text{OH}$ de très courte durée de vie (<1 min). Cependant, en présence d'éthanol, le POBN réagit avec le radical $\cdot\text{OH}$ pour former l'adduit de spin POBN-Ethoxy \cdot de durée de vie beaucoup plus longue. Le spectre RPE apparaît alors sous la forme de 3 doublets ($a_N = 15.7 \text{ G}$; $a_H = 2.7 \text{ G}$).



Pour détecter le radical $\cdot\text{NO}$, nous avons choisi le piègeur de spin N-méthyl-D-glucamine dithiocarbamate (MGD, Enzo Life Sciences, Belgique). En présence de fer, le $\cdot\text{NO}$ forme une liaison de coordination avec Fe^{2+} pour former un complexe stable $\cdot\text{NO}-\text{Fe}^{2+}(\text{MGD})_2$. Le spectre détecté par RPE apparaît sous la forme d'un triplet à température ambiante ($g = 2.04$ et $a_N = 12.5 \text{ G}$) [182].



Tests préliminaires

Pour s'assurer de la sensibilité des piègeurs de spin choisis, les radicaux $\cdot\text{OH}$ et $\cdot\text{NO}$ ont été produits artificiellement en solution aqueuse et en présence des cellules HK-2 non traitées, respectivement par une réaction Fenton et par un donneur spontané de $\cdot\text{NO}$ (SIN-1). Les spectres RPE étaient enregistrés par un spectromètre de RPE Bruker EMX Micro fonctionnant à 9.5 GHz. Les couples POBN/Ethanol et MGD/ Fe^{2+} ont effectivement piégé ces radicaux en milieu aqueux (Fig. 5.4 a et 5.5 a). En présence des cellules, le signal RPE est toujours présent bien que son amplitude soit fortement di-

minuée (Fig. 5.4 b et 5.5 b), ce qui nécessite de travailler à des puissances et des gains électroniques élevés. Le fait que les radicaux soient produits à l'extérieur des cellules alors que les piègeurs de spin diffusent à l'intérieur, peut expliquer cette diminution dans l'amplitude des spectres RPE. Par ailleurs, la durée de vie des adduits de spin est peut être fortement diminuée dans un environnement très oxydant.

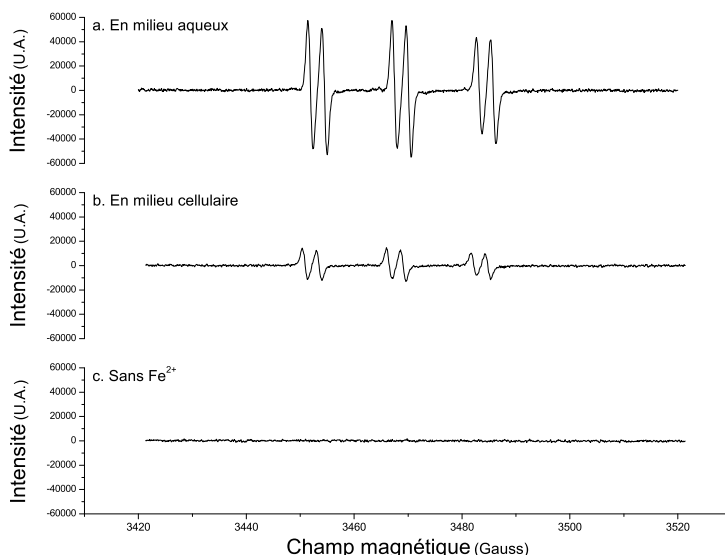


Fig. 5.4 – En présence d'éthanol, le piègeur de spin POBN réagit avec le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$, produit artificiellement par réaction Fenton, en milieu aqueux (a) et en présence des cellules HK-2 (b). Le spectre RPE de l'adduit de spin POBN-Ethoxy apparaît sous la forme de trois doublets. En empêchant la réaction de Fenton de se produire (c), le spectre disparaît.

Gain = 10^3 ; Modulation d'amplitude = 1 G.

Traitement au LPS

L'ajout des piègeurs de spin dans les cellules HK-2, pendant ou après le traitement au LPS, avant ou après la récupération des cellules, n'a pas permis d'obtenir de spectres RPE et donc de détecter les radicaux produits. Le rapport entre les constantes de vitesse de formation des radicaux et des adduits de spin n'est peut-être pas favorable à la détection. Par ailleurs,

5.2. Méthodes expérimentales

la durée de vie des adduits de spin en milieu cellulaire n'est peut-être pas suffisante comparée à la durée du traitement au LPS (1 h à 24 h). Nous avons donc eu recours à d'autres techniques de spectrophotométrie.

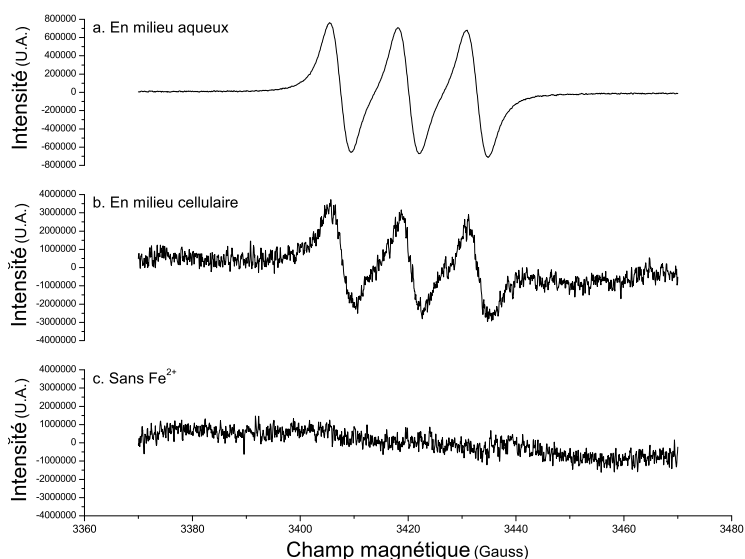
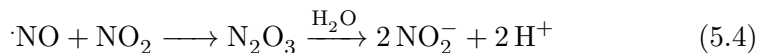
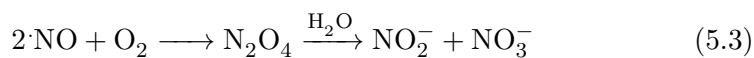


Fig. 5.5 – En présence de Fe^{2+} , le piègeur de spin MGD réagit avec le radical $\cdot\text{NO}$, produit artificiellement à partir du donneur spontané de $\cdot\text{NO}$ SIN-1, en milieu aqueux (a) et en présence des cellules HK-2 (b). Le spectre RPE de l'adduit de spin NO-Fe^{2+} (MGD)₂ apparaît sous la forme d'un triplet. En empêchant la réaction de complexation (c), le spectre disparaît. Gain = $5 \cdot 10^3$ pour (a) ; Gain = 10^5 pour (b) et (c) ; Modulation d'amplitude = 3.5 G.

5.2.2.2 Spectrophotométrie

Test au réactif de Griess

En normoxie, le $\cdot\text{NO}$ réagit avec l' O_2 suivant les réactions :



Les produits finaux stables de ces oxydations en milieu biologique sont l'ion nitrite NO_2^- et l'ion nitrate NO_3^- . La production de $\cdot\text{NO}$ peut donc être indirectement évaluée en détectant ces produits dérivés avec le réactif de Griess.

Brièvement, le milieu dans lequel sont cultivées les cellules HK-2 est collecté à la fin du traitement au LPS pour y déterminer la concentration d'ions NO_2^- . Ce dosage est effectué à partir d'un kit commercial (Nitric Oxide (total) detection kit, Enzo Life Sciences, Belgique). Dans un premier temps, les ions nitrates NO_3^- sont convertis en ions NO_2^- par une nitrate réductase. Les ions NO_2^- sont ensuite révélés par la réaction avec le réactif de Griess qui produit un colorant rouge. L'absorption à 540 nm de cette solution est alors mesurée par un lecteur de microplaques Multiskan (Thermo scientific, Belgique).

Test au Nitro Bleu de Tétrazolium

Après le traitement au LPS, la concentration d' O_2^- produit par les cellules HK-2 est déterminée à partir de la réaction de ce radical avec le Nitro bleu Tétrazolium (NBT) pour former le colorant bleu formazan. L'absorption à 650 nm de cette solution est aussi mesurée par un lecteur de microplaques Multiskan (Thermo scientific, Belgique).

5.2.3 Utilisation d'antioxydants

Pour s'assurer que l'action du LPS sur les cellules rénales HK-2 est corrélée à une surproduction de ROS, nous avons vérifié que l'utilisation d'antioxydants lors du traitement au LPS (de 6 h) permettait un recouvrement partiel de l'activité mitochondriale. Pour ce faire, nous avons investigué, sur l'activité de la cytochrome c oxydase et sur le potentiel de membrane mitochondrial, l'action de trois antioxydants (tous de Enzo Life Sciences, Belgique) :

1. 1400W, un inhibiteur spécifique de iNOS humain ;
2. L-glutathion réduit (GSH), un inhibiteur de l'·OH (et du H₂O₂) [71] ;
3. ebselen (EBS), un inhibiteur de ONOO⁻ (et du H₂O₂) [81].

5.3 Résultats

5.3.1 Le LPS induit l'expression de iNOS et la production de ·NO

La détection de la protéine iNOS par électrophorèse et western blot n'a pas été concluante dans les cellules HK-2 traitées au LPS. Après révélation des bandes, le contraste était assez faible, le bruit trop important et nous n'avons pas pu identifier avec certitude le poids moléculaire des protéines détectées. Nous avons donc décidé d'utiliser la méthode de qPCR pour mesurer la possible expression de iNOS dans les cellules HK-2.

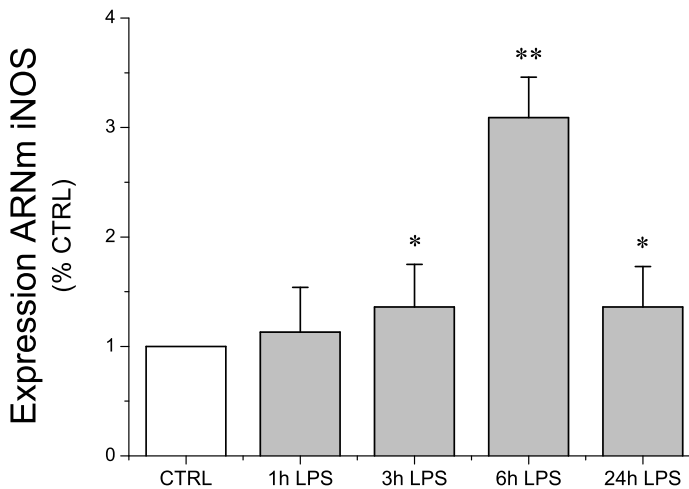


Fig. 5.6 – Induction de l'expression ARNm de l'enzyme iNOS au cours du temps dans les cellules HK-2 traitées au LPS.
n = 5 ; * , P ≤ 0.05 ; ** , P ≤ 0.005.

La Fig. 5.6 montre une induction progressive de l'ARNm de iNOS dans les cellules HK-2 traitées au LPS. L'expression ARNm de cette enzyme est induite après 1 h de traitement, augmente dans le temps jusqu'à atteindre trois fois sa valeur initiale après 6 h de traitement ($P < 0.0001$) puis décroît après 24 h d'incubation avec le LPS ($P = 0.05$).

Ces variations dans l'expression de l'ARNm de iNOS sont corrélées à une augmentation de la production de $\cdot\text{NO}$ au cours du temps. Celle-ci atteint 50% et 70% au bout de respectivement 6 h ($P < 0.0001$) et 24 h ($p < 0.0001$) de traitement au LPS des cellules HK-2 (Fig. 5.7).

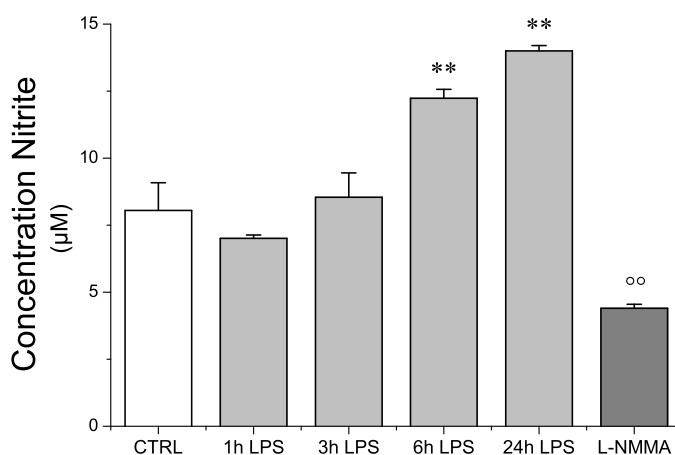


Fig. 5.7 – Quantité totale de $\cdot\text{NO}$ produit par les cellules HK-2 traitées au LPS, mesurée à partir de la concentration en ions NO_3^- et NO_2^- libérés dans le surnageant de la culture cellulaire. L-NMMA (100 μM) a été utilisée comme bloqueur spécifique des NOS et incubée en même temps que le LPS pour les cellules traitées pendant 6 h.

n = 4-6 ; **, $P \leq 0.005$; oo, $P \leq 0.005$ par rapport aux cellules traitées 6 h avec du LPS.

Il est important de noter que la production de $\cdot\text{NO}$ induite par le LPS est supprimée par l'addition d'un inhibiteur de NOS (L-NMMA), ce qui suggère fortement l'induction de ce radical par la forme active de iNOS (Fig. 5.7). Par ailleurs, la plus faible concentration de NO_2^- détectée dans

ces conditions expérimentales comparée à celles des cellules contrôles suggère une production basale de $\cdot\text{NO}$ compatible avec l'expression constitutive de iNOS par les cellules rénales contrôles.

5.3.2 Le LPS induit l'expression de NOX 4 et la production d' O_2^-

La Fig. 5.8 montre que l'expression de l'enzyme NOX 4 est régulée à la hausse dès 3 h de traitement des cellules HK-2 avec le LPS. Par rapport aux cellules non traitées, l'augmentation atteint 1.33 ± 0.28 ($P = 0.008$), 1.34 ± 0.28 ($P = 0.008$) et 1.36 ± 0.30 ($P = 0.006$) au bout de respectivement 3 h, 6 h et 24 h de traitement au LPS. Toutefois, la présence d'une concentration suffisante ($20 \mu\text{M}$) de DPI, un inhibiteur des NADPH oxydases, permet aux cellules HK-2 traitées pendant 6 h au LPS de retrouver un niveau d'expression de NOX 4 comparable à celui des cellules non traitées.

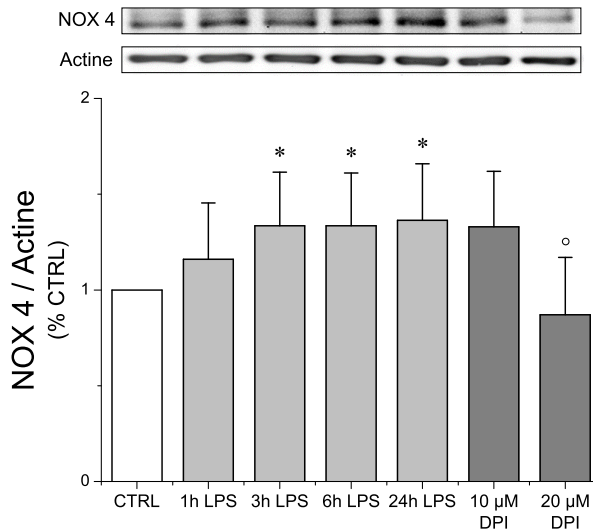


Fig. 5.8 – Analyse densitométrique de l'expression de l'enzyme NOX 4 relativement à l'actine au cours du temps dans les cellules HK-2 traitées par LPS effectuée par western blot.
n = 3-7; *, $P \leq 0.05$; °, $P \leq 0.05$ par rapport aux cellules traitées 6 h avec du LPS.

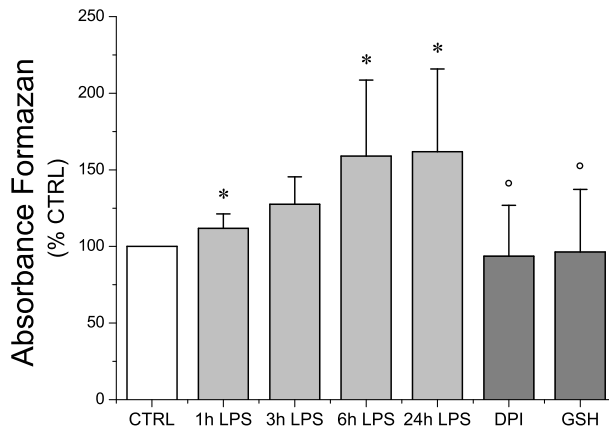


Fig. 5.9 – Évolution de l'absorbance du formazan au cours du temps dans les cellules HK-2 traitées par LPS.
 n = 6 ; *, $P \leq 0.05$; °, $P \leq 0.05$ par rapport aux cellules traitées 6 h avec du LPS.

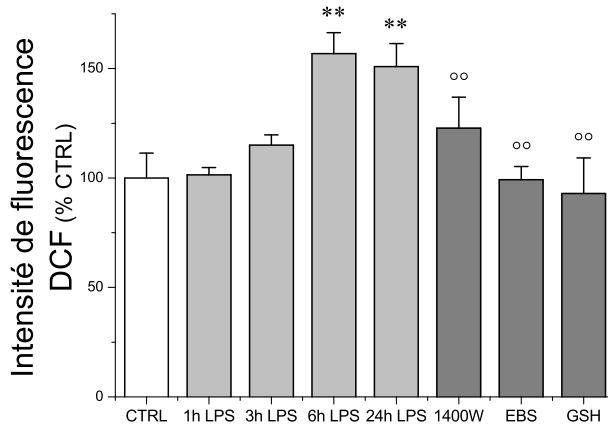


Fig. 5.10 – Évolution de l'intensité du signal de fluorescence du marqueur DCF au cours du temps dans les cellules HK-2 traitées au LPS mesurée par microscopie confocale (section 4.2.1.2). 200 cellules ont été analysées dans 3-4 expériences indépendantes.
 **, $P \leq 0.005$; °°, $P \leq 0.005$ par rapport aux cellules traitées 6 h avec du LPS.

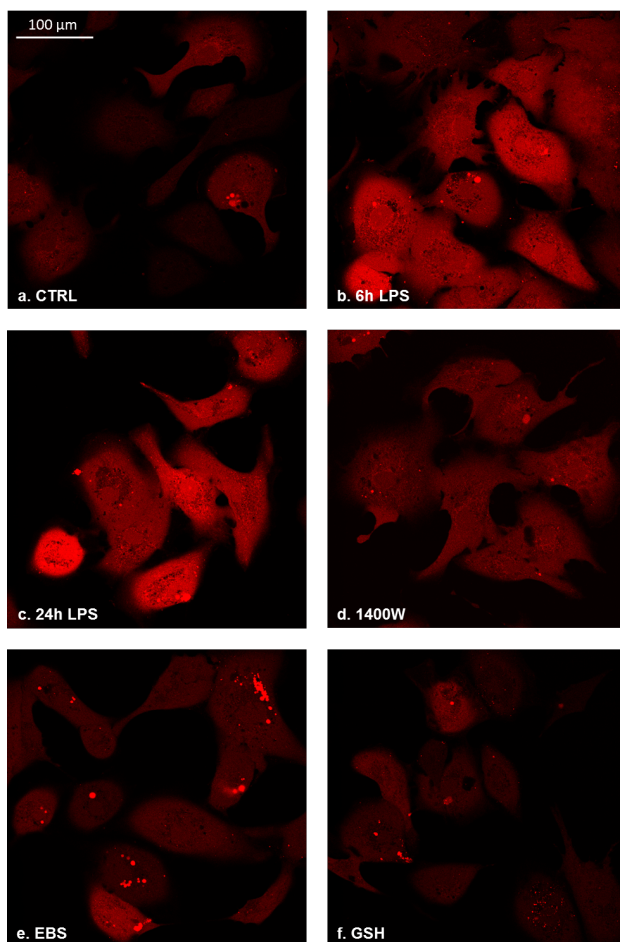


Fig. 5.11 – Images confocales de l'intensité de fluorescence du marqueur DCF dans les cellules HK-2 sans traitement (a), après 6 h (b) et 24 h (c) de traitement au LPS et après 6 h de traitement au LPS en présence de 10 μ M 1400W (d) ou de 10 μ M EBS (e) ou de 100 μ M GSH (f).

Cette induction de l'expression de NOX 4 est corrélée à une augmentation de la production de ROS dans les cellules HK-2 traitées au LPS. En effet, l'absorbance du formazan (Fig. 5.9) ainsi que l'intensité du signal de fluorescence de la DCF (Fig. 5.10 et 5.11) augmentent de manière significative à 6 h et 24 h lorsque les cellules sont traitées avec le LPS. Ce résultat indique une surproduction cellulaire de ROS et en particulier de l' O_2^- .

Cependant, lorsque les antioxydants 1400W, EBS et GSH sont ajoutés à la suspension cellulaire traitée au LPS, l'intensité du signal de fluorescence de la DCF revient à une valeur comparable à celle obtenue dans les cellules non traitées (Fig. 5.10 et 5.11). De même, lors de l'ajout du DPI ou du GSH au LPS, l'absorbance du formazan est similaire à celle mesurée pour les cellules non traitées (Fig. 5.9).

Il est intéressant de noter, par ailleurs, que l'inhibition du signal d'absorbance par le GSH, inhibiteur du radical $\cdot OH$, indique que le test NBT n'est pas uniquement spécifique à l' O_2^- [183].

5.3.3 Les antioxydants rétablissent l'activité mitochondriale

5.3.3.1 Récupération de l'activité de la cytochrome c oxydase

Lors de l'ajout des antioxydants au mélange cellulaire en présence de LPS, la cytochrome c oxydase des cellules HK-2 montre une reprise significative de son activité (Fig. 5.12).

Il est intéressant de noter que l'effet du 1400W est plus important que celui des autres antioxydants. En effet, le 1400W permet une reprise de l'activité de la cytochrome c oxydase de 80% par rapport aux cellules HK-2 traitées 6 h avec le LPS, tandis que l'EBS et le GSH n'induisent qu'une reprise de l'activité de 35%.

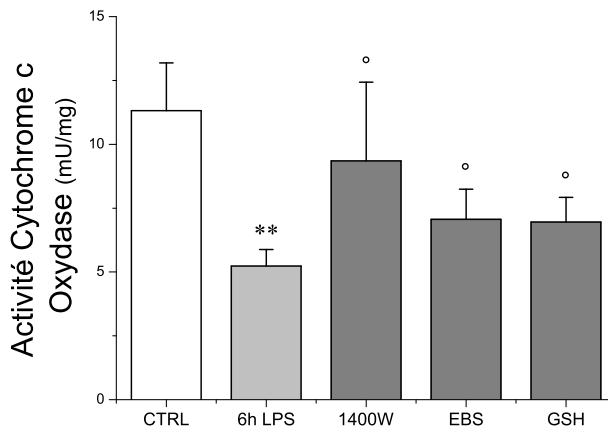


Fig. 5.12 – Effet des antioxydants sur l’activité de la cytochrome c oxydase des cellules HK-2 traitées au LPS.

*****, $P \leq 0.05$; **°**, $P \leq 0.05$ par rapport aux cellules traitées 6 h avec du LPS.

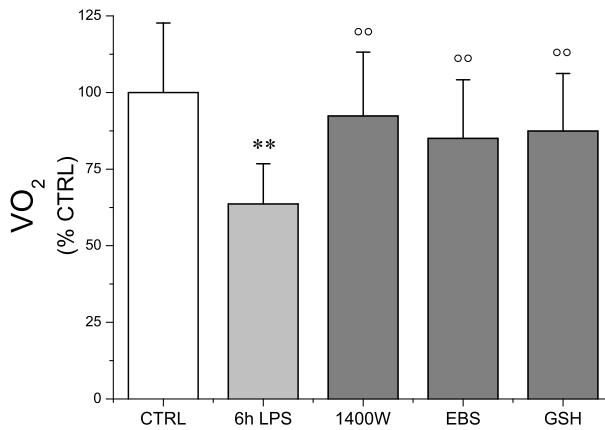


Fig. 5.13 – Effet des antioxydants sur la vitesse de consommation des cellules HK-2 traitées 6 h avec du LPS. Les mesures ont été effectuées par oxymétrie de RPE (section 3.2.3).

******, $P \leq 0.005$; **°°**, $P \leq 0.005$ par rapport aux cellules traitées 6 h avec du LPS.

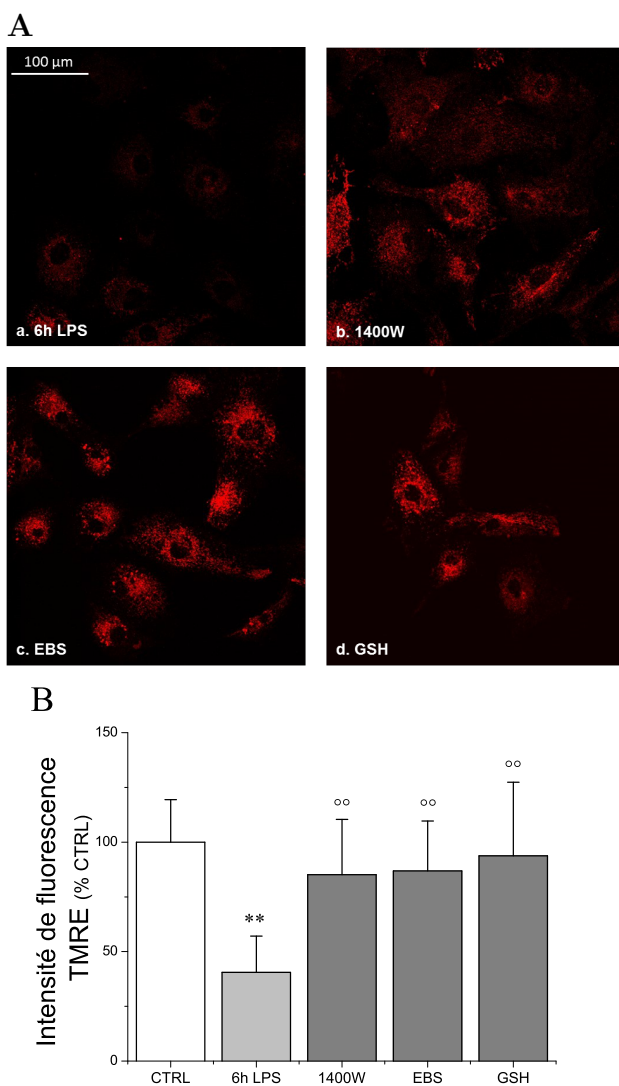


Fig. 5.14 – Effet des antioxydants sur le $\Delta\Psi_m$ des mitochondries.
A : Images confocales de l'intensité de fluorescence du marqueur TMRE dans les cellules HK-2 après 6 h de traitement au LPS (a) et également en présence de 10 μ M 1400W (b) ou de 10 μ M EBS (c) ou de 100 μ M GSH (d).

B : Évolution de l'intensité du signal de fluorescence du marqueur TMRE au cours du temps. 210 cellules ont été analysées dans 4 expériences indépendantes.

** , $P \leq 0.005$; °° , $P \leq 0.005$ par rapport aux cellules traitées 6 h avec du LPS.

5.3.3.2 Amélioration de la consommation en O₂

Les résultats obtenus pour l'activité de la cytochrome c oxydase sont confirmés par les mesures d'oxymétrie de RPE. Comme exposé dans la section 3.2.3, la variation au cours du temps de la consommation en O₂ des cellules HK-2 traitées pendant 6 h avec le LPS a été comparée à celle des cellules également incubées avec les différents antioxydants. Il est apparu que les antioxydants 1400W d'une part et EBS et GSH d'autre part permettent une amélioration de 45% et de 35% respectivement de la respiration des cellules traitées au LPS (Fig. 5.13).

5.3.3.3 Rétablissement de la polarisation membranaire mitochondriale

Lorsque les cellules HK-2 sont simultanément exposées au LPS et aux différents antioxydants, l'intensité du signal de fluorescence du TMRE retrouve une valeur similaire à celle obtenue pour les cellules non traitées (Fig. 5.14).

5.4 Discussion et conclusion

Il est maintenant reconnu que les espèces réactives de l'oxygène prennent part à des processus physiologiques critiques chez l'homme. Au niveau cellulaire, ils participent à la signalisation interne, à la régulation de la croissance et au déclenchement de l'apoptose, tandis qu'au niveau systémique, ils participent à des fonctions complexes telles que la défense immunitaire et la régulation de la pression artérielle. Cependant, l'équilibre entre l'état redox physiologique et le stress oxydant est fragile et dépend des vitesses relatives de production et de dégradation des ROS. Une surproduction de ROS engendre souvent une altération irréversible de la fonction des molécules biologiques provoquant ainsi la majorité des effets cytotoxiques associés à la plupart des pathologies humaines [158].

Dans le cas de la défaillance rénale induite par le sepsis, le lien entre stress

oxydant et dysfonction mitochondriale a déjà été souligné mais les mécanismes sous-jacents n'ont pas encore été entièrement élucidés. Par ailleurs, depuis quelques années, des preuves s'accumulent suggérant l'importance des NADPH oxydases dans la production des ROS chez l'homme [159].

NOX 4 et iNOS, initiatrices du stress oxydant

De manière très intéressante, le modèle *in vitro* d'un stress endotoxinique sur des cellules rénales, mis en place dans cette thèse, révèle pour la première fois que le stress oxydant intracellulaire apparaît avant le dysfonctionnement des mitochondries et que celui-ci est notamment induit par l'activation de deux enzymes cytosoliques, la NADPH oxydase 4 (NOX 4) et la NO synthase inductible (iNOS). Ces observations viennent compléter celles effectuées par l'équipe de P. Mayeux [121, 139]. Dans un modèle *in vitro* de cellules rénales soumises à du sérum murin septique, ils ont mis en évidence l'induction de l'expression de iNOS et la production de $\cdot\text{NO}$ et de son dérivé ONOO^- dans les cellules après 6 h de traitement avec le sérum [121]. Cependant, le suivi de cette production radicalaire durant les 6 premières heures du traitement de même que la production d' O_2^- précurseur de la formation du ONOO^- n'ont pas été détaillés. Dans une autre étude, ces mêmes auteurs ont montré une surproduction d' O_2^- et de ONOO^- consécutivement à la dépolarisation membranaire mitochondriale induite par le sérum septique ; le dysfonctionnement mitochondrial a alors été décrit comme étant l'origine du stress oxydant dans les cellules rénales [139].

Dans notre modèle, le traitement au LPS des cellules HK-2 induit l'expression rapide de iNOS (dès 1 h de traitement) associée à une surproduction de $\cdot\text{NO}$ (au bout de 6 h) comme observée *in vivo* [22, 93] et dans d'autres modèles cellulaires *in vitro* [121, 139]. Ces observations sont également en bonne cohérence avec la surexpression de iNOS détectée dans les reins de patients septiques [64]. Par ailleurs, l'augmentation significative de l'absorbance du formazan et du signal de fluorescence de la DCF (des processus inhibés lors de l'addition au LPS des antioxydants ebselen et L-glutathion) mettent en évidence la génération d' O_2^- et de ses dérivés $\cdot\text{OH}$ et ONOO^- par

les cellules tubulaires rénales traitées au LPS. Ce stress oxydant s'explique par l'induction de l'expression de NOX 4 détectée dans la première heure du traitement au LPS. À notre connaissance, notre modèle révèle pour la première fois la contribution de l' O_2^- originaire de NOX 4 dans les lésions tubulaires rénales.

Le stress oxydant cytosolique, perturbateur de la chaîne respiratoire

Dans notre modèle, un stress oxydant cytosolique apparaît dès la première heure de l'action du LPS, alors que ni la consommation en O_2 ni la polarisation membranaire mitochondriale ne sont encore affectées. Il est ainsi raisonnable de proposer, qu'initialement, les cellules rénales utilisent l' O_2 disponible pour générer des ROS qui contribueront au dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (à partir de 6 h). Cependant, il est utile de s'interroger sur les mécanismes d'action des différents ROS produits dans le cytosol (à savoir l' O_2^- , le $\cdot NO$ et leurs dérivés) sur l'activité des mitochondries. En effet, cette surproduction de radicaux libres est très probablement une cause majeure des effets délétères de la fonction mitochondriale des cellules HK-2 traitées au LPS exposés dans les chapitres précédents.

Rôle de l' O_2^-

Dans un commentaire éditorial dédié à une étude sur les lésions cellulaires induites par l'ischémie-reperfusion cardiaque, R. Brandes a proposé un nouveau rôle pour la NADPH oxydase et la production cytosolique de ROS associée dans la modulation de l'activité des mitochondries [184, 185]. Il stipule que les O_2^- générés dans le cytosol par les NADPH oxydases activent les canaux potassiques ATP dépendant (mtK_{ATP}) de la membrane mitochondriale interne par un mécanisme qui agirait sur les groupes sulfhydryles des protéines constitutives des canaux [186]². L'ouverture de ces canaux mtK_{ATP} entraîne alors un afflux électrophorétique de cations K^+ dans la matrice provoquant la dépolarisation de la membrane mitochondriale et la génération subséquente de ROS mitochondriaux [159]. Dans ce

2. Le mécanisme par lequel l' O_2^- ouvre les canaux potassiques n'est pas encore connu. L' O_2^- pourrait avoir une action directe sur les groupes sulfhydryles des protéines constitutives des canaux [186].

mécanisme, l' O_2^- produit par la NADPH oxydase joue uniquement le rôle de messenger intracellulaire et ne participe pas au stress oxydant mitochondrial car l'utilisation d'un inhibiteur à canaux mtK_{ATP} empêche cette dépolarisation membranaire mitochondriale et la formation de ROS mitochondriaux biologiquement actives [185]. Il aurait pu être intéressant de vérifier ce rôle de la NADPH oxydase et de sa production associée d' O_2^- dans notre modèle en utilisant, par exemple, ce même inhibiteur à canaux mtK_{ATP} et en étudiant son impact sur la polarisation membranaire mitochondriale et sur la formation des ROS mitochondriaux.

En milieu cellulaire, la diffusion de l' O_2^- est cependant fortement limitée par sa dismutation en H_2O_2 ($k \approx 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en présence de SOD). Son temps de vie est donc très court et son rayon de diffusion (estimé à $0.5 \mu\text{m}$) trop limité pour pouvoir agir sur les mitochondries [187]. Le H_2O_2 , quant à lui, est stable et traverse facilement les membranes cellulaires, où il peut initier la cascade de signalisation à travers une variété de réactions redox, telle que l'oxydation des parties sulfhydryles des protéines à l'origine de l'ouverture des canaux mtK_{ATP} [188]. Par ailleurs, sa transformation en radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ par la réaction de type Fenton, en présence de cations métalliques ($k \approx 2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), initie la peroxydation lipidique des membranes cellulaires. Il est donc raisonnable d'attribuer une grande partie de la transduction du signal de l' O_2^- par le H_2O_2 et le $\cdot\text{OH}$. Cette hypothèse est d'ailleurs renforcée par le rétablissement de la polarisation membranaire des mitochondries lors de l'addition du L-glutathion au traitement LPS.

Rôle du $\cdot\text{NO}$

Le $\cdot\text{NO}$ possède des propriétés physiques remarquables : en milieu cellulaire, il possède un temps de vie très long (1-5 s) et est perméable aux membranes. De ces propriétés, il découle que la propagation du $\cdot\text{NO}$ est rapide et non limitée à un seul compartiment cellulaire. Il possède les qualités d'un messenger dont l'effet s'arrête très rapidement dès que la source qui l'émet cesse de fonctionner. Dans notre modèle, la production du $\cdot\text{NO}$ est maintenue au cours du temps, ce qui lui permet d'interagir et d'inhiber la cytochrome c oxydase de la chaîne de transport des électrons [164]. Le rétablissement

de l'activité de la cytochrome c oxydase et de la consommation en O_2 des cellules HK-2 lors de l'addition du 1400W au traitement LPS corrobore ce mécanisme.

Rôle du $ONOO^-$

La production simultanée d' O_2^- et de $\cdot NO$ dans le cytosol des cellules HK-2 favorise très certainement la formation cytosolique du $ONOO^-$, étant donné que sa vitesse de formation est compétitive avec celle de l'élimination de l' O_2^- par la SOD cytoplasmique [71]. Comme la diffusion du $\cdot NO$ s'effectue facilement au travers des membranes tandis que celle de l' O_2^- est limitée par sa réaction avec la SOD, les sites de production du $ONOO^-$ correspondent très certainement aux sites de production de l' O_2^- . Grâce à sa relative stabilité (en milieu cellulaire, temps de vie de 3-5 ms et rayon de diffusion de 3-4 μm supérieur à la taille des mitochondries (2-3 μm) [73, 187, 189]), le $ONOO^-$ peut par la suite diffuser vers les compartiments mitochondriaux et entreprendre rapidement des réactions cytotoxiques.

Le rôle du $ONOO^-$ dans l'altération de la fonction mitochondriale a été mis en évidence par l'utilisation des antioxydants 1400W et ebselen lors du traitement au LPS, qui permettait de rétablir la polarisation membranaire mitochondriale nécessaire à la phosphorylation oxydative des cellules HK-2. Rappelons que la molécule 1400W agit simultanément sur la production du $\cdot NO$ et du $ONOO^-$, tandis que l'ebselen agit plus spécifiquement sur celle du $ONOO^-$. L'effet plus important sur l'activité de la cytochrome c oxydase et sur la consommation en O_2 de 1400 W par rapport à l'ebselen tend à prouver que l'inhibition du complexe IV est en grande majorité attribuée au $ONOO^-$ et dans une moindre mesure au $\cdot NO$.

Rôle du $\cdot OH$

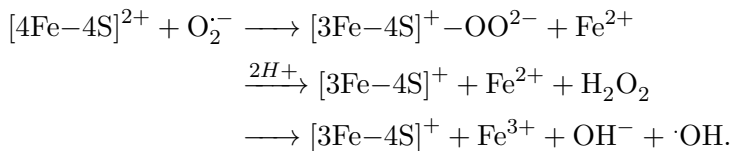
Le radical hydroxyle $\cdot OH$ semble également jouer un rôle dans l'inhibition de la chaîne respiratoire. Ce radical, qui peut être généré à partir de l' O_2^- produit soit par les NOX 4 soit par la fuite des électrons de la chaîne respiratoire, est très réactif et a donc un rayon d'action très limité. Il apparaît dès lors que les radicaux produits dans le compartiment mitochondrial perturbe-

ront localement le fonctionnement de la chaîne respiratoire tandis que ceux produits dans le cytosol participeront plus certainement aux mécanismes conduisant à la mort des cellules par apoptose (chapitre 3), en déclenchant notamment les réactions de peroxydation lipidique.

La mitochondrie, maintien du stress oxydant

La surproduction cytosolique de radicaux libres perturbe donc l'activité métabolique des mitochondries des cellules HK-2 traitées au LPS. Cette étude a notamment fait ressortir que ce stress oxydant (détecté après 1-3 h de traitement, Fig. 5.6 et Fig. 5.8) induisait par la suite une production de ROS par les mitochondries (détectée après 6 h de traitement, Fig. 4.8). Les mitochondries permettent donc de maintenir le stress oxydant par la mise en place probable de différents mécanismes.

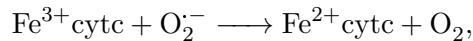
Tout d'abord, les perturbations induites au niveau de la chaîne respiratoire par les ROS produites dans le cytosol engendrent une fuite des électrons (probablement au niveau du complexe III), amplifiant alors la production d' $O_2^{\cdot-}$ et de ses dérivés (H_2O_2 et $\cdot OH$). Ces ROS mitochondriales vont participer au trouble respiratoire sous forme d'une boucle de rétro-action positive. Notamment, il est connu que l' $O_2^{\cdot-}$ mitochondrial peut réagir avec les complexes fer de certains domaines enzymatiques. Par exemple, l'aconitase mitochondriale comporte un noyau $[4Fe-4S]^{2+}$ qui peut être attaqué par l' $O_2^{\cdot-}$, générant ainsi l'aconitase inactive $[3Fe-4S]^+$ et libérant l'ion Fe^{2+} . Ce dernier peut alors réagir avec le H_2O_2 pour former le radical $\cdot OH$ par une réaction de type Fenton [190] :



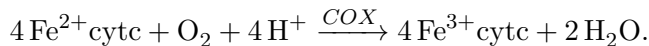
Par ailleurs, la présence concomitante de $\cdot NO$ et d' $O_2^{\cdot-}$ dans les compartiments mitochondriaux suggère fortement la génération de $ONOO^-$ mito-

chondrial. Ce dernier peut alors cibler les pores de transition de perméabilité, qui régulent la perméabilité de la membrane interne mitochondriale, et provoquer leur ouverture et la libération de protéines pro-apoptotiques dans le cytoplasme [73, 163]. Cette transition de perméabilité de la membrane interne pourrait expliquer la libération du cytochrome c dans le cytosol des cellules HK-2 traitées au LPS. Celui-ci peut alors déclencher la cascade de réactions qui aboutit au phénomène apoptotique.

Cette libération du cytochrome c dans le cytosol participe également à la production de ROS au niveau des mitochondries en affaiblissant le système antioxydant mitochondrial. En effet, le cytochrome c est connu pour sa capacité à réagir efficacement avec l' O_2^- formé au niveau de la chaîne respiratoire [154]. Il régule ainsi l'état redox des mitochondries via la réaction :



la forme réduite du cytochrome c ($Fe^{2+}cytc$) étant ensuite oxydée par l' O_2 pour régénérer la forme oxydée du cytochrome c ($Fe^{3+}cytc$) via la réaction catalysée par la cytochrome c oxydase :



L'affaiblissement du système antioxydant mitochondrial est probablement maintenu par l'action du $ONOO^-$. Ce puissant oxydant peut participer à la nitration et à l'inactivation de la SOD mitochondriale qui ne peut plus jouer alors son rôle d'antioxydant, maintenant ainsi le stress oxydant au niveau des mitochondries.

Globalement, il est apparu que deux mécanismes principaux sont à l'œuvre dans la dysfonction mitochondriale à l'origine de la défaillance rénale lors du sepsis. D'une part, les mitochondries sont la cible des ROS produites au niveau du cytosol par NOX 4 et iNOS. L'inhibition des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire, principalement par $ONOO^-$ et $\cdot NO$, interrompt la phosphorylation oxydative et perturbe la production mito-

chondriale d'ATP. D'autre part, après perturbation, les mitochondries deviennent également génératrices de ROS et participent au maintien du stress oxydant au cours du temps. Finalement, la libération du cytochrome c induite par la dépolarisation de la membrane mitochondriale, ainsi que la génération de ROS cellulaires, provoquent dans une phase ultérieure la mort des cellules par apoptose.

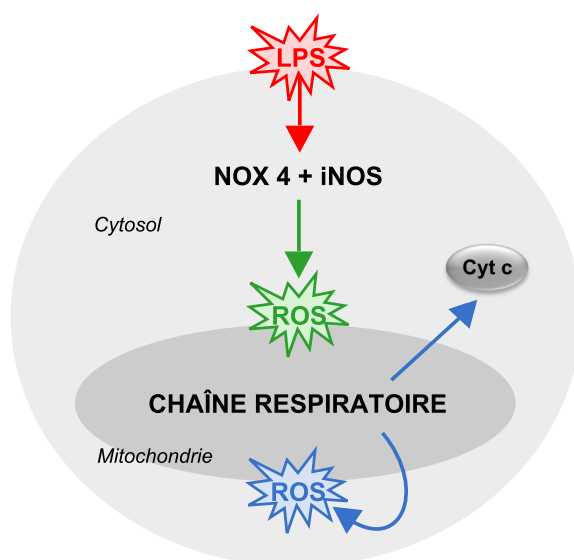


Fig. 5.15 – Représentation schématique de la voie de signalisation oxydante à l'origine du mécanisme d'hypoxie cytopathique appliqué à notre modèle expérimental.

Conclusions Générales

Malgré les progrès de la réanimation, la mortalité des patients en choc septique demeure extrêmement élevée. Cette mortalité est principalement due aux défaillances multi-viscérales qui apparaissent au cours de la phase initiale d'état de choc proprement dit [2, 41]. Le choc septique est le résultat d'interactions complexes entre un pathogène et le système immunitaire du patient. Ce conflit induit une réaction inflammatoire généralisée avec un risque de dysfonctionnement des organes conduisant au syndrome de défaillance multi-viscérale [1].

La grande majorité des cas cliniques de sepsis ont pour origine les bactéries à Gram négatif [2, 8]. Les lipopolysaccharides (LPS), présents dans la membrane externe de la paroi de ces bactéries, constituent le facteur pathogène déclencheur de la réponse cellulaire inflammatoire en activant les récepteurs de type Toll 4 et en provoquant la production massive de cytokines pro-inflammatoires [24, 31].

De nombreuses études épidémiologiques indiquent que le sepsis est aujourd'hui la cause majeure de l'insuffisance rénale aiguë (IRA) dans les unités de soins intensifs. Malgré les progrès dans la prise en charge des patients en état de choc, l'incidence et la mortalité de l'IRA restent élevées [60]. Les raisons pour lesquelles cet état de choc conduit à une défaillance du rein restent encore incertaines. Une des explications est la persistance d'une hypoxie tissulaire malgré la restauration des paramètres hémodynamiques macrocirculatoires (pression artérielle et débit cardiaque) et du transport artériel en oxygène. Cette hypoxie tissulaire peut être due soit à des altérations de la microcirculation [66, 68] soit à une incapacité des cellules à utiliser l'oxygène (hypoxie cytopathique) [6, 45]. Le deuxième facteur est difficile à discriminer du premier dans les modèles *in vivo*. Ainsi, pour étudier spécifiquement les effets de l'inflammation inhérente au sepsis sur le dysfonctionnement des cellules rénales, nous avons développé un modèle *in vitro* d'un stress endotoxinique sur des cellules tubulaires humaines (HK-2).

L'objectif de ce projet de doctorat était d'étudier les effets délétères métaboliques et oxydants induits lors d'un sepsis sur la fonction rénale. L'hypothèse d'une hypoxie cytopathique associée à une dysfonction mitochondriale a fait l'objet de nombreuses investigations pour expliquer l'apparition de défaillance d'organes essentiels tels que le cerveau, le cœur et le foie [115, 130, 132]. Cependant, il est surprenant de constater que le rein n'a pas fait l'objet de telles études alors que sa défaillance augmente drastiquement la morbidité et la mortalité des patients septiques. La compréhension des mécanismes cellulaires mis en jeu dans la modulation de la respiration des cellules rénales soumises au LPS permettrait de mieux cibler les approches thérapeutiques dans les unités de soins intensifs. Les travaux de ce doctorat se sont alors articulés autour de 3 axes : le métabolisme énergétique, la fonction mitochondriale et le stress oxydant.

Notre première investigation a permis de montrer que l'énergétique des cellules HK-2 est irréversiblement perturbée lors du traitement au LPS. L'étude

oxymétrique a mis en évidence que l'incubation des cellules HK-2 avec l'endotoxine LPS induit une diminution significative de leur consommation en O₂ pour des temps d'incubation suffisamment longs (supérieurs à 6 h). Dans des conditions de normoxie, les cellules HK-2 perdent donc leur capacité à utiliser l'oxygène disponible. Cette sous-régulation métabolique se traduit alors par une diminution de la production en ATP, énergie si nécessaire au rein pour exécuter ses fonctions essentielles d'excrétion des déchets du métabolisme azoté et de production d'urine. L'hypoxie cytopathique est donc un mécanisme fondamental à prendre en compte lors de l'altération de la fonction rénale au cours du sepsis. À long terme, cette perturbation de l'homéostasie cellulaire devient délétère car irréversible et les cellules finissent par mourir par apoptose.

De toute évidence, notre modèle cellulaire supporte un rôle pathogène de l'apoptose dans l'IRA septique [191]. Ainsi, le syndrome clinique classique de défaillance rénale, à savoir la nécrose tubulaire aiguë, n'apparaît plus suffisant pour décrire les conséquences du sepsis sur la filtration glomérulaire. La voie apoptotique a sûrement été sous-estimée dans les modèles *in vivo* car, d'une part, les cellules d'un tissu sont assez hétérogènes et l'apoptose n'est pas synchronisée et, d'autre part, les cellules apoptotiques sont rapidement éliminées ou phagocytées par les macrophages et les cellules voisines. Si nous poursuivons notre investigation de la voie apoptotique dans notre modèle *in vitro*, il serait intéressant de détecter, à l'instar de certains modèles d'IRA ischémique, les protéines de régulation des gènes apoptotiques, telles que les caspases et bcl-2 [192, 193].

Comme les mitochondries jouent un rôle clé dans la régulation de l'apoptose par la libération de facteurs pro-apoptotiques et qu'elles sont également au cœur de la respiration cellulaire *via* la phosphorylation oxydative, c'est tout naturellement que nous nous sommes intéressés au rôle qu'elles pourraient jouer dans le dysfonctionnement du métabolisme énergétique des cellules rénales soumises au LPS.

Dans un premier temps, notre analyse par microscopie confocale et cytométrie en flux a montré que les mitochondries ne subissent pas de changement dans leur nombre et dans leur organisation lorsque les cellules HK-2 sont traitées avec le LPS pour des temps d'incubation où le phénomène d'apoptose n'est pas encore observé (inférieurs à 24 h). Cependant, l'étude a clairement démontré que l'activité fonctionnelle des mitochondries est, quant à elle, fortement perturbée par le traitement au LPS. En effet, le potentiel de membrane mitochondrial $\Delta\Psi_m$ est significativement diminué après 6 h de traitement, témoignant d'une atteinte de la chaîne de transport des électrons. Nous avons alors cherché à localiser et à caractériser les perturbations présentes dans la chaîne respiratoire mitochondriale, s'intéressant tout particulièrement aux complexes enzymatiques I et IV qui semblent jouer un rôle majeur dans l'apparition d'une défaillance d'organes (Tab. 4.1).

Dans notre modèle *in vitro* de défaillance rénale, il est apparu que l'inhibition de l'activité de la cytochrome c oxydase est à l'origine du dysfonctionnement énergétique des cellules HK-2 traitées au LPS. Cette perturbation mitochondriale induit une interruption dans le flux d'électrons entre les complexes enzymatiques I à IV et donc dans le pompage des protons au travers de la membrane interne mitochondriale. En conséquence, la phosphorylation oxydative est découplée et les mitochondries ne peuvent plus utiliser l'oxygène disponible pour produire de l'ATP. C'est donc une « hypoxie mitochondriale » qui est à l'origine de l'hypoxie cytopathique. Par ailleurs, la dépolarisation membranaire mitochondriale qui en découle permet la libération du cytochrome c dans le cytosol des cellules HK-2, confirmant le processus d'apoptose détecté plus tard dans le traitement au LPS.

Dans la littérature, de nombreux agents endogènes ont été proposés comme médiateurs à l'origine du dysfonctionnement de la chaîne respiratoire induit lors du sepsis, mais surtout deux ont été retenus : le monoxyde d'azote ($\cdot\text{NO}$) et l'anion superoxyde (O_2^-) [162, 163]. En effet, le $\cdot\text{NO}$ est capable d'inhiber la cytochrome c oxydase en devenant compétitif face à l' O_2 [164]. L' O_2^- pourrait stimuler les canaux potassiques ATP dépendant de la membrane mitochondriale interne et induire une dépolarisation membranaire [184, 185].

Par ailleurs, la présence concomitante de ces deux radicaux dans le même compartiment cellulaire permet la formation du peroxynitrite (ONOO^-). Ce dernier peut interagir de manière irréversible avec les différents composants de la chaîne respiratoire et induire des dommages oxydatifs dans l'environnement mitochondrial [73, 164]. Ainsi, l'induction d'un stress oxydant cytosolique permettrait d'expliquer comment le LPS transmet ces effets au niveau des mitochondries des cellules HK-2.

Nous avons donc cherché à déterminer les mécanismes intracellulaires qui sous-tendent l'action du LPS et qui conduisent à une altération de la respiration des cellules HK-2. Il est maintenant connu que la reconnaissance du LPS par le récepteur de type Toll TLR4 s'accompagne d'une cascade de signalisation intracellulaire qui active le facteur de transcription $\text{NF-}\kappa\text{B}$ [12]. Une des découvertes importante de cette thèse est la mise en évidence de l'induction de l'enzyme cytosolique NADPH oxydase 4, en plus de l'enzyme pro-inflammatoire NO synthase inductible déjà détectée dans des modèles d'IRA septique [93, 121]. L'induction rapide de l'expression de NOX 4 et de iNOS est corrélée à une surproduction cytosolique d' O_2^- et de $\cdot\text{NO}$.

De manière tout à fait intéressante, cette étude a fait ressortir que ce stress oxydant cytosolique (détecté après 1-3 h de traitement) apparaît avant le dysfonctionnement des mitochondries (détecté après 6 h de traitement). L'utilisation d'antioxydants spécifiques lors du traitement LPS a alors permis de rétablir partiellement l'activité mitochondriale. En effet, l'utilisation des inhibiteurs de $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{OH}$ et ONOO^- rétablit en grande partie le potentiel de membrane $\Delta\psi_m$ et la respiration des cellules HK-2. En particulier, elle a révélé que le $\cdot\text{NO}$ et le ONOO^- sont les médiateurs principaux de l'inhibition de la cytochrome c oxydase.

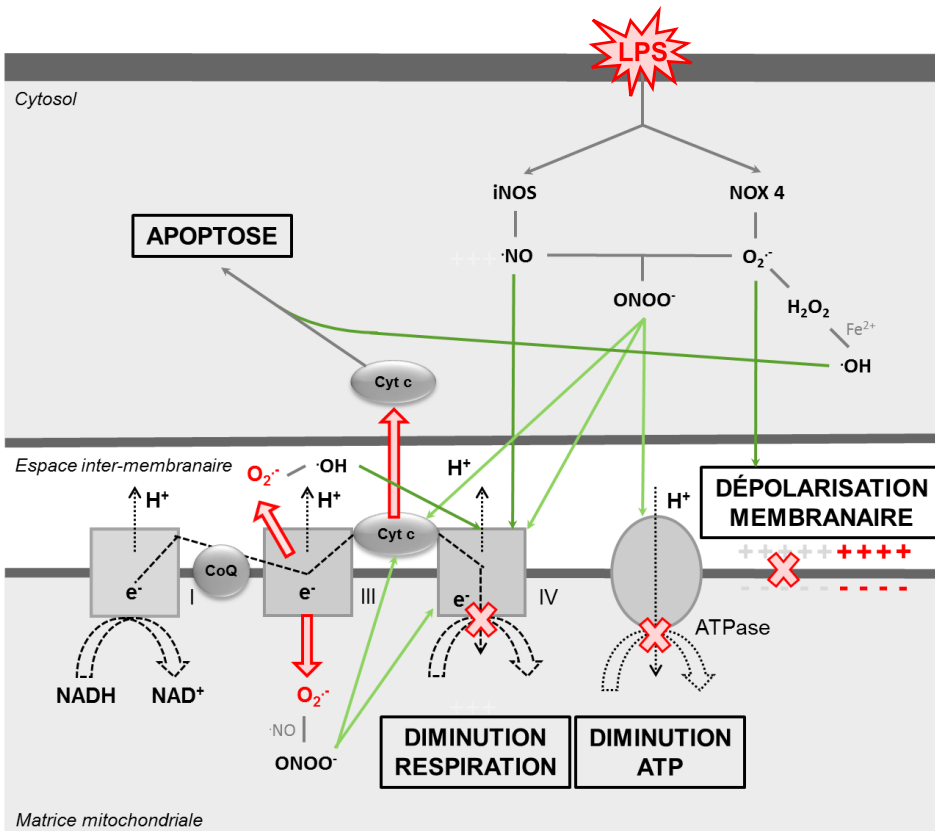
Dans notre modèle, l'équilibre redox des cellules HK-2, nécessaire à son homéostasie, est donc rompue en faveur d'un état pro-oxydant. Il faut néanmoins garder à l'esprit que cet équilibre provient d'une compétition entre la génération et l'élimination des espèces oxydantes. Une ouverture possible

dans la continuation de ces travaux serait de contrôler si ce stress oxydant est également corrélé à une sous-régulation des défenses antioxydantes enzymatiques fournies, entre autres, par la catalase, la superoxyde dismutase cytoplasmique et la glutathion peroxydase.

Par ailleurs, notre modèle a montré, qu'après avoir été la cible des espèces réactives de l'oxygène (ROS), la mitochondrie devient également génératrice de ROS. Cet organite semble maintenir le stress oxydant par différents mécanismes. Les perturbations induites au niveau de la chaîne respiratoire par les ROS cytosoliques engendrent une fuite des électrons (probablement au niveau du complexe III), augmentant ainsi la production d' $O_2^{\cdot-}$ et de ses dérivés H_2O_2 et $\cdot OH$, et maintenant alors le stress oxydant au niveau des mitochondries. Ces ROS mitochondriaux participent ainsi à la perturbation de la chaîne respiratoire à la façon d'une boucle rétro-action positive.

Normalement, la production mitochondriale d' $O_2^{\cdot-}$ est majoritairement régulée par le système antioxydant MnSOD. Il aurait pu être également intéressant de vérifier si l'activité de cette enzyme était perturbée par le traitement au LPS. Une étude récente (2014) effectuée par l'équipe de P. Mayeux a d'ailleurs mis en évidence, dans un modèle *in vivo* de souris septique, que l'activité de la MnSOD était diminuée par un processus post-transcriptionnel [140].

Pour conclure, l'ensemble des mécanismes qui sous-tendent l'action du LPS sur les mitochondries sont repris dans la représentation schématique ci-après qui tient compte des stress oxydants cytosolique et mitochondrial induits par le LPS et leurs effets cumulatifs sur les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale des cellules rénales.



Représentation schématique du mécanisme d'hypoxie cytopathique appliqué à notre modèle expérimental. Le traitement au LPS induit l'expression des enzymes NOX 4 et iNOS qui génèrent des ROS capables d'inhiber la chaîne respiratoire mitochondriale. Après avoir été la cible des ROS, les mitochondries deviennent également génératrices de ROS, maintenant ainsi le stress oxydant à l'origine de la dysfonction mitochondriale.

Ce projet de recherche a fait ressortir que l'apparition d'une défaillance rénale au cours du sepsis fait intervenir des mécanismes complexes à l'origine d'un stress oxydant, d'une dysfonction mitochondriale et *in fine* d'une défaillance énergétique. Au vu de ces travaux, l'hypoxie cytopathique est une composante majeure de la physiopathologie du sepsis et du syndrome de défaillance multi-viscérale. Ainsi, les stratégies cliniques visant à améliorer la perfusion tissulaire et l'apport en oxygène devraient également tenir compte de cette hypoxie cellulaire. À l'avenir, les efforts thérapeutiques devraient également se concentrer sur des interventions pharmacologiques conçues pour préserver la fonction mitochondriale et la production d'énergie lors du sepsis.

Les thérapies antioxydantes semblent être une alternative de choix mais, malheureusement, elles n'ont pas été particulièrement efficaces chez les patients en état de choc [194]. Une des raisons de cet échec est peut-être leur manque de spécificité à cibler les compartiments cellulaires les plus endommagés par le stress oxydant, à savoir les mitochondries. Actuellement, les recherches se concentrent sur le développement de thérapies antioxydantes qui ciblent les mitochondries [162, 163]. Plusieurs approches sont exploitées : délivrer l'antioxydant aux mitochondries en utilisant une molécule de vectorisation, administrer un antioxydant qui s'accumule naturellement dans les mitochondries ou amplifier les défenses antioxydantes déjà présentes dans les mitochondries [43, 140]. Cependant, le chemin est encore long et les premiers résultats encourageants, récemment obtenus, devront être confirmés, d'une part, dans des conditions vraiment proches de celles qui existent *in vivo*, et d'autre part, dans une prise en charge réaliste des patients septiques.

Annexes

Une thèse active et internationale

Articles acceptés dans des journaux à comité de lecture

En tant que premier auteur

C.Quoilin, A. Mouithys-Mickalad, S. Lécart, M.-P. Fontaine-Aupart, et M. Hoebeke.

Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an *in vitro* model of sepsis-induced kidney injury.

Biochemica et Biophysica Acta - Bioenergetics.

Accepté - En cours de publication

DOI : 10.1016/j.bbabo.2014.07.005

C. Quoilin, A. Mouithys-Mickalad, J. Duranteau, B. Gallez, B, et M. Hoebeke.

Endotoxin-induced basal respiration alterations of renal HK-2 cells : A sign of pathologic metabolism down-regulation.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 423 : 350-354, 2012.

<http://hdl.handle.net/2268/126696>

DOI : 10.1016/j.bbrc.2012.05.128

En tant qu'auteur

A. Grammenos, M. Fillet, M. Collodoro, S. Lécart, C. Quoilin, M.-P. Fontaine-Aupart, M. Hoebeke.

An ESR, mass sepectrometry and fluorecence microscopy approach to study the stearic acid derivatives anchoring in cells.

Applied Magnetic Resonance, 43 : 311-320, 2012.

<http://hdl.handle.net/2268/126963>

DOI : 10.1007/s00723-012-0375-0

Participations à des conférences

C. Quoilin, A. Mouithys-Mickalad, S.Lécart, S, B. Gallez, M.-P. Fontaine-Aupart et M. Hoebeke.

Disruption in energy metabolism and mitochondrial function in a cellular model of inflammation-induced acute kidney injury.

Septembre 2013, *SFRR-Europe 2013 Conference*, Athènes, Grèce.

<http://hdl.handle.net/2268/156635>

C. Quoilin, A. Mouithys-Mickalad, B. Gallez et M. Hoebeke.

ESR spectroscopy for the study of an inflammation-induced AKI cellular model.

Novembre 2012, *11th Young Belgian Magnetic Resonance Scientists*, Spa, Belgique.

<http://hdl.handle.net/2268/137111>

C. Quoilin, A. Mouithys-Mickalad, M.-P. Fontaine-Aupart, C. Ruedl et M.

Hoebeke.

A confocal microscopic study of mitochondrial alterations of renal HK-2 cells exposed to an endotoxic stress.

Septembre 2012, *The 15th European Microscopy Congress*, Manchester, Royaume-Uni.

<http://hdl.handle.net/2268/131109>

A. Grammenos, C. Quoilin, P.-H. Guelluy et M. Hoebeke.

In vitro ESR measurements : powerful tool to study toxic effects on cells.

Octobre 2011, *CELLTOX 1991-2011 Twenty years of in Vitro Toxicology : Achievements and Future Challenges*, Rome, Italie.

<http://hdl.handle.net/2268/101098>

C. Quoilin, A. Grammenos, B. Gallez et M. Hoebeke.

Endotoxin-induced alterations in renal oxygen consumption.

Août 2011, *EUROMAR - Magnetic Resonance Conference*, Francfort-sur-le-Main, Allemagne.

<http://hdl.handle.net/2268/96850>

Collaborations scientifiques

CORD

Université de Liège, Département de Chimie.

Contact : Dr. Ange Mouithys-Mickalad.

Centre de Photonique Biomédicale

Université Paris Sud - Fédération LUMAT - CPBM/CLUPS.

Contact : Dr. Sandrine Lécart et Dr. Marie-Pierre Fontaine-Aupart.

Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay

Université Paris Sud - CNRS.

Contact : Dr. Marie-Pierre Fontaine-Aupart.

Biomedical Magnetic Resonance Group

Université catholique de Louvain, Louvain Drug Research Institute.

Contact : Pr. Bernard Gallez.

Séjours de recherche à l'étranger

Université Laval - Canada

Centre de recherche Hôpital Laval, CRIUCPQ, Laboratoire Pr. André Marelte.

Superviseur : Pr. André Marelte.

De mai à août 2013.

Nanyang Technological University - Singapour

Division of Molecular & Cell Biology, School of Biological Sciences, Immunology Lab.

Superviseur : AP. Christiane Ruedl.

D'avril à août 2012.

Distinctions scientifiques

Prix de la Fondation Lear 2013

Afin d'effectuer un séjour de recherche dans le domaine de la biophysique à l'Université Laval (Québec).

Liste des Abréviations

1400W	:	N-(3-(Aminométhyl)benzyl)acétamidine
$\Delta\psi_m$:	Potentiel de membrane mitochondrial
ATP	:	Adénosine-5'-triphosphate
ATPase	:	ATP synthase
CAT	:	Catalase
CcO ₂	:	Concentration en oxygène
CD14	:	Cluster de différenciation 14
CLP	:	De l'anglais <i>Cecal ligation puncture</i>
CoQ	:	Ubiquinone
CTRL	:	Contrôle
Cyt c	:	Cytochrome c
DCF	:	Dichlorofluorescéine diacétate

DPI	:	Iodure de diphénylène, de l'anglais <i>Diphenylene iodonium</i>
EBS	:	Ebselen
FAD/FADH ₂	:	Flavine adénine dinucléotide
GPx	:	Glutathion peroxydase
GSH	:	Glutathion réduit
H ₂ O ₂	:	Peroxyde d'hydrogène
IFN	:	Interféron
IL	:	Interleukine
IRA	:	Insuffisance rénale aiguë
L-NMMA	:	NG-monométhyl L-arginine
LPS	:	Lipopolysaccharide
MD2	:	Protéine 2 de différenciation myéloïde, de l'anglais <i>Myeloid differentiation 2</i>
MSR	:	MitoSOX Red
MTG	:	MitoTracker Green
mtK _{ATP}	:	Canaux potassiques ATP dépendant
MyD88	:	Facteur de différenciation myéloïde 88, de l'anglais <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NAD ⁺ /NADH	:	Nicotinamide adénine dinucléotide
NF-κB	:	Facteur de transcription nucléaire kappa B, de l'anglais <i>Nuclear factor-kappa B</i>
¹⁵ N-PDT	:	¹⁵ N-4-oxo-2,2,6,6-tétraméthylpiperidine-d ₁₆ -1-oxyl
·NO	:	Monoxyde d'azote
NOS	:	NO synthase
eNOS	:	NO synthase endothéliale
iNOS	:	NO synthase inductible
NOX	:	NADPH oxydase
NTA	:	Nécrose tubulaire aiguë
O ₂ ⁻	:	Anion superoxyde
·OH	:	Radical hydroyle

ONOO ⁻	: Peroxynitrite
PAMP	: Motifs moléculaires associés aux pathogènes, de l'anglais <i>Pathogen associated molecular pattern</i>
pO ₂	: Pression partielle en oxygène
PRR	: Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires, de l'anglais <i>Pattern recognition receptor</i>
ROS	: Espèces réactives de l'oxygène, de l'anglais <i>Reactive oxygen species</i>
RPE	: Résonance paramagnétique électronique
SDMV	: Syndrome de défaillance multi-viscérale
SOD	: Superoxyde dismutase
SRIS	: Syndrome de réponse inflammatoire systémique
TIR	: Récepteur IL-1/Toll, de l'anglais <i>Toll/IL-1 receptor</i>
TLR	: Récepteur de type Toll, de l'anglais <i>Toll-like receptor</i>
TMRE	: Tétraméthylrhodamine ester
TNF- α	: Facteur de nécrose tumorale- α , de l'anglais <i>Tumor necrosis factor-α</i>
vO ₂	: Vitesse de consommation en oxygène

Références bibliographiques

- [1] R. Bone, R. Balk, F. Cerra, R. Dellinger, A. Fein, W. Knaus, R. Schein, and W. Sibbald. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *CHEST Journal*, 101 :1644–1655, 1992.
- [2] D. Angus, W. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, and M. Pinsky. Epidemiology of severe sepsis in the United States : Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*, 29 :1303–1310, 2001.
- [3] L. Gattinoni, L. Brazzi, P. Pelosi, R. Latini, G. Tognoni, A. Pesenti, and R. Fumagalli. A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients. *New England Journal of Medicine*, 333 :1025–1032, 1995.

-
- [4] M. Hayes, A. Timmins, E. Yau, M. Palazzo, D. Watson, and C. Hinds. Oxygen transport patterns in patients with sepsis syndrome or septic shock : Influence of treatment and relationship to outcome. *Critical Care Medicine*, 25 :926–936, 1997.
- [5] T. Vandermeer, H. Wang, and M. Fink. Endotoxemia causes ileal mucosal acidosis in the absence of mucosal hypoxia in a normodynamic porcine model of septic shock. *Critical Care Medecine*, 23 :1217–1226, 1995.
- [6] M. Fink. Bench-to-bedside review : Cytopathic hypoxia. *Critical Care*, 6 :491–499, 2002.
- [7] I. Boyadjiev and C. Martin. Sepsis sévère et choc septique. In Martin and Vincent [195], chapter Définitions du sepsis et concept PIRO, pages 13–22.
- [8] S. Papasian and D. Morrison. *The Sepsis Text*, chapter The pathogenesis of gram-negative sepsis, pages 97–15. Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [9] D. Relman. New technologies, human-microbe interactions, and the search for previously unrecognized pathogens. *Journal of Infectious Diseases*, 186 :S254–S258, 2002.
- [10] C. Nathan. Points of control in inflammation. *Nature*, 420 :846–852, 2002.
- [11] A. Rudiger, M. Stotz, and M. Singer. Cellular process in sepsis. *Swiss Medical Weekly*, 138 :629–634, 2008.
- [12] O. Huet, G. Choukroun, and J.-P. Mira. Toll-like receptor, inflammatory response and sepsis. *Réanimation*, 13 :167–175, 2004.
- [13] S. Opal and P. Cristofaro. Cell signaling pathways of the innate immune system during acute inflammation. In Abraham and Singer [41], pages 35–53.
- [14] J.-L. Imler. *Actualités néphrologiques*, chapter Immunité innée et récepteurs Toll, pages 1–9. Flammarion Médecine-Sciences, 2004.
- [15] A. Aderem and R. Ulevitch. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406 :782–787, 2000.

- [16] R. Medzhitov and C. Janeway. Innate immunity : Impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*, 9 :4–9, 1997.
- [17] R. Medzhitov and C. Janeway. Innate immunity : The virtues of a non clonal system of recognition. *Cell*, 91 :295–298, 1997.
- [18] G. Bancroft. *Immunologie*, chapter Immunité antibactérienne et antimycotique, pages 283–306. Elsevier Masson, 2007.
- [19] B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut, J.-M. Reichhart, and J. Hoffmann. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86 :973–983, 1996.
- [20] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, and C. Janeway. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388 :394–397, 1997.
- [21] M. Tiwari, K. Messer, and P. Mayeux. Inducible nitric oxide synthase and apoptosis in murine proximal tubule epithelial cells. *Toxicological Sciences*, 91 :493–500, 2006.
- [22] L. Wu and P. Mayeux. Effects of the inducible nitric-oxide synthase inhibitor L-NIL on microcirculation and reactive nitrogen species generation in the kidney following lipopolysaccharide administration in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320 :1061–1067, 2007.
- [23] A. Haziot, E. Ferrero, F. Köntgen, N. Hijiya, S. Yamamoto, J. Silver, C. Stewart, and S. Goyert. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of Gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity*, 4 :407–414, 1996.
- [24] J. Chow, D. Young, D. Golenbock, W. Christ, and F. Gusovsky. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 274 :10689–10692, 1999.
- [25] A. Poltorak, X. He, I. Smirnova, M.-Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg,

-
- P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice : Mutations in TLR4 gene. *Science*, 282 :2085–2088, 1998.
- [26] K. Hoshino, O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira. Toll-like receptor 4-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide : Evidence for TLR4 as the LPS gene product. *The Journal of Immunology*, 162 :3749–3752, 1999.
- [27] Biotechnologies Bourgogne. La paroi des bactéries. <http://stl-bjb.ac-dijon.fr/microbio.htm>, 2011.
- [28] R. Shimazu, S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine*, 189 :1777–1782, 1999.
- [29] S. Janssens and R. Beyaert. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 27 :474–482, 2002.
- [30] E. Kopp and R. Medzhitov. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 11 :13–18, 1999.
- [31] Y.-C. Lu, W.-C. Yeh, and P. Ohashi. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42 :145–151, 2008.
- [32] M. Yamamoto, S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301 :640–643, 2003.
- [33] J. Ruland. Return to homeostasis : Downregulation of NF- κ B responses. *Nature Immunology*, 12 :709–714, 2011.
- [34] S. Finney and T. Evans. *The Sepsis Text*, chapter Pathophysiology of sepsis : The role of nitric oxide, pages 211–229. Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [35] J. Carré, M. Singer, and S. Monda. Nitric oxide. In Abraham and Singer [41], pages 77–95.

- [36] J.-M. Cavaillon. Sepsis sévère et choc septique. In Martin and Vincent [195], chapter Médiateurs de l'inflammation, pages 23–49.
- [37] C. Kaech and T. Calandra. Early-onset pro-inflammatory cytokines. In Abraham and Singer [41], pages 55–66.
- [38] J. Cohen. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420 :885–891, 2002.
- [39] C. Dinarello. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *CHEST Journal*, 112 :S321–S329, 1997.
- [40] D. Russell and R. Thompson. Targets for sepsis therapies : Tumor necrosis factor versus interleukin-1. *Current Opinion in Biotechnology*, 4 :714–721, 1993.
- [41] E. Abraham and M. Singer, editors. *Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction and recovery*. Springer Science, 2007.
- [42] D. Angus and T. van der Poll. Severe sepsis and septic shock. *New England Journal of Medicine*, 369 :840–851, 2013.
- [43] D. Lowes, B. Thottakam, N. Webster, M. Murphy, and H. Galley. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ protects against organ damage in a lipopolysaccharide-peptidoglycan model of sepsis. *Free Radical Biology and Medicine*, 45 :1559–1565, 2008.
- [44] P. Zapelini, G. Rezin, M. Cardoso, C. Ritter, F. Klamt, J. Moreira, E. Streck, and F. Dal-Pizzol. Antioxidant treatment reverses mitochondrial dysfunction in a sepsis animal model. *Mitochondrion*, 8 :211–218, 2008.
- [45] A. Harrois, O. Huet, and J. Duranteau. Alterations of mitochondrial function in sepsis and critical illness. *Current Opinion in Anesthesiology*, 22 :143–149, 2009.
- [46] M. Singer. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*, 5 :66–72, 2014.
- [47] M. Rangel-Frausto, D. Pittet, M. Costigan, T. Hwang, C. Davis, and R. Wenzel. The natural history of the systemic inflammatory response

-
- syndrome SIRS : A prospective study. *Journal of the American Medical Association*, 273 :117–123, 1995.
- [48] R. Bonegio and W. Lieberthal. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 11 :301–308, 2002.
- [49] M. Fink and R. Delude. Epithelial barrier dysfunction : A unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level. *Critical Care Clinics*, 21 :177–196, 2005.
- [50] M. Raghavan, R. Venkataraman, and J. Kellum. Sepsis-induced acute renal failure and recovery. In Abraham and Singer [41], pages 393–405.
- [51] F. Antonini, F. Garnier, and C. Martin. Sepsis sévère et choc septique. In Martin and Vincent [195], chapter Défaillance rénale, pages 89–102.
- [52] N. Campbell and J. Reece. *Biology*. Benjamin Cummings, 2002.
- [53] N. Lameire. La physiologie rénale et son implication dans la physiopathologie de l’insuffisance rénale aiguë. In Jacob [196], pages 49–66.
- [54] S. Fox. *Human Physiology*. McGraw-Hill Higher Education, 2011.
- [55] S. Bagshaw and R. Bellomo. Insuffisance rénale aiguë : Définition, épidémiologie et pronostic. In Jacob [196], pages 13–30.
- [56] S. Uchino S., J. Kellum, R. Bellomo, G. Doig, H. Morimatsu, S. Morgera, M. Schetz, I. Tan, C. Bouman, E. Macedo, N. Gibney, A. Tolwani, and C. Ronco. Acute renal failure in critically ill patients : A multinational, multicenter study. *JAMA*, 294 :813–818, 2005.
- [57] D. De Backer. Macrocirculatory disturbances. In Abraham and Singer [41], pages 239–247.
- [58] A. Calver, J. Collier, and P. Vallance. Nitric oxide and cardiovascular control. *Experimental Physiology*, 78 :303–326, 1993.
- [59] R. Palmer, A. Ferrige, and S. Moncada. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327 :524–526, 1987.
- [60] R. Schrier and W. Wang. Acute renal failure and sepsis. *New England Journal of Medicine*, 351 :159–169, 2004.

- [61] J. MacMicking, C. Nathan, G. Hom, N. Chartrain, D. Fletcher, M. Trumbauer, K. Stevens, Q. Xie, K. Sokol, N. Hutchinson, H. Chen, and J. Mudgett. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell*, 81 :641–650, 1995.
- [62] W. Lieberthal, A. McGarry, J. Sheils, and C. Valeri. Nitric oxide inhibition in rats improves blood pressure and renal function during hypovolemic shock. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 261 :F868–F872, 1991.
- [63] H. Ling, C. Edelstein, P. Gengaro, X. Meng, S. Lucia, M. Knotek, A. Wangsiripaisan, Y. Shi, and R. Schrier. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 277 :F383–F390, 1999.
- [64] S. Heemskerk, P. Pickkers, M. Bouw, A. Draisma, J. van der Hoeven, W. Peters, P. Smits, F. Russel, and R. Masereeuw. Upregulation of renal inducible nitric oxide synthase during human endotoxemia and sepsis is associated with proximal tubule injury. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 1 :853–862, 2006.
- [65] D. Schwartz, M. Mendonca, I. Schwartz, Y. Xia, J. Satriano, C. Wilson, and R. Blantz. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 100 :439–448, 1997.
- [66] R. Schrier, E. Zolty, and W. Wang. *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*, chapter Sepsis and Acute Renal Failure, pages 673–679. Springer Science, 2006.
- [67] W. Wang, A. Mitra, B. Poole, S. Falk, M. Lucia, S. Tayal, and R. Schrier. Endothelial nitric oxide synthase-deficient mice exhibit increased susceptibility to endotoxin-induced acute renal failure. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 287 :F1044–F1048, 2004.

-
- [68]] C. Ince. The microcirculation is the motor of sepsis. *Critical Care*, 9 :S13–S19, 2005.
- [69] W. Wang, S. Jittikanont, S. Falk, P. Li, L. Feng, P. Gengaro, B. Poole, R. Bowler, B. Day, J. Crapo, and R. Schrier. Interaction among nitric oxide, reactive oxygen species, and antioxidants during endotoxemia-related acute renal failure. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 284 :F532–F537, 2003.
- [70] J. Himmelfarb, E. McMonagle, S. Freedman, J. Klenzak, E. McMena-min, P. Le, L. Pupim, T. Ikizler, and The PICARD Group. Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15 :2449–2456, 2004.
- [71] B. Halliwell and J. Gutteridge. *Free Radicals in biology and Medicine*. Oxford University Press, 2005.
- [72] P. Wood. The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochemical Journal*, 253 :287–289, 1988.
- [73] R. Radi, A. Cassina, R. Hodara, C. Quijano, and L. Castro. Peroxy-nitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, 33 :1451–1464, 2002.
- [74] G. Rosen, B. Britigan, H. Halpern, and S. Pou. *Free Radicals - Biology and Detection by Spin Trapping*. Oxford University Press, 1999.
- [75] B. Berlett and E. Stadtman. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272 :20313–20316, 1997.
- [76] L. Marnett. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21 :361–370, 2000.
- [77] V.Bohr, T. Stevnsner, and N. de Souza-Pinto. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene*, 286 :127–134, 2002.
- [78] L. Baud and R. Ardaillou. Reactive oxygen species : Production and role in the kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 251 :F765–F776, 1986.

- [79] K. Nath and S. Norby. Reactive oxygen species and acute renal failure. *The American Journal of Medicine*, 109 :665–678, 2000.
- [80] M. Paller, J. Hoidal, and T. Ferris. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *The Journal of Clinical Investigation*, 74 :1156–1164, 1984.
- [81] E. Noiri, A. Nakao, K. Uchida, H. Tsukahara, M. Ohno, T. Fujita, S. Brodsky, and M. Goligorsky. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 281 :F948–F957, 2001.
- [82] M. Paller and T. Neumann. Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation. *Kidney International*, 40 :1041–1049, 1991.
- [83] I. Singh, S. Gulati, J. Orak, and A. Singh. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 125 :97–104, 1993.
- [84] M.-R. Lossner. Rein et sepsis. In Jacob [196], pages 107–126.
- [85] R. Schrier, W. Wang, B. Poole, and A. Mitra. Acute renal failure : Definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 114 :5–14, 2004.
- [86] Kaushal G., Basnakian A., and Shah S. Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney International*, 66 :500–506, 2004.
- [87] D. Kohan. Role of endothelin and tumour necrosis factor in the renal response to sepsis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 9 :S73–S77, 1994.
- [88] U. Meszmer, V. Briner, and J. Pfeilschifter. Tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. *Kidney International*, 55 :2322–2337, 1999.
- [89] M. Knotek, B. Rogachev, W. Wang, T. Ecker, V. Melnikov, P. Gengaro, M. Esson, C. Edelstein, C. Dinarello, and R. Schrier. Endotoxemic renal failure in mice : Role of tumor necrosis factor independent of

-
- inducible nitric oxide synthase. *Kidney International*, 59 :2243–2249, 2001.
- [90] P. Cunningham, H. Dyanov, P. Park, J. Wang, K. Newell, and R. Quigg. Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. *The Journal of Immunology*, 168 :5817–5823, 2002.
- [91] V. Kon and K. Badr. Biological actions and pathophysiologic significance of endothelin in the kidney. *Kidney International*, 40 :1–12, 1991.
- [92] P. Dennen, I. Douglas, and R. Anderson. Acute kidney injury in the intensive care unit : An update and primer for the intensivist. *Critical Care Medicine*, 38 :261–275, 2010.
- [93] L. Wu, M. Tiwari, K. Messer, J. Holthoff, N. Gokden, R. Brock, and P. Mayeux. Peritubular capillary dysfunction and renal tubular epithelial cell stress following lipopolysaccharide administration in mice. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 292 :F261–F268, 2007.
- [94] C. Langenberg, R. Bellomo, C. May, L. Wan, M. Egi, and S. Morgera. Renal blood flow in sepsis. *Critical Care*, 9 :R363–R374, 2005.
- [95] G. Kreymann, S. Grosser, P. Buggisch, C. Gottschall, S. Matthaei, and H. Greten. Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock. *Critical Care Medicine*, 21 :1012–1019, 1993.
- [96] D. Rosser, R. Stidwill, D. Jacobson, and M. Singer. Oxygen tension in the bladder epithelium rises in both high and low cardiac output endotoxemic sepsis. *Journal of Applied Physiology*, 79 :1878–1882, 1995.
- [97] Robin E. Dysoxia : Abnormal tissue oxygen utilization. *Archives of Internal Medicine*, 137 :905–910, 1977.
- [98] M. Ryan, G. Johnson, J. Kirk, S. Fuerstenberg, R. Zager, and B. Torok-Storb. HK-2 : An immortalized proximal tubule epithe-

- lial cell line from normal adult human kidney. *Kidney International*, 45 :48–57, 1994.
- [99] M. Le Dorze. Oxygen consumption by renal tubular cells : In vitro study of cell hypoxia during acute kidney injury. Master's thesis, Université Paris 7, 2009.
- [100] E. Gnaiger, R. Steinlechner-Maran, G. Méndez, T. Eberl, and R. Margreiter. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 27 :583–596, 1995.
- [101] E. Gnaiger. *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*, chapter Polarographic Oxygen Sensors, the Oxygraph, and High-Resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function, pages 325–352. Wiley, 2008.
- [102] E. Hütter, H. Unterluggauer, A. Garedeu, P. Jansen-Dürr, and E. Gnaiger. High-resolution respirometry - A modern tool in aging research. *Experimental Gerontology*, 41 :103–109, 2006.
- [103] C. Diepart, J. Verrax, P. Calderon, O. Feron, B. Jordan, and B. Gallez. Comparison of methods for measuring oxygen consumption in tumor cells *in vitro*. *Analytical Biochemistry*, 396 :250–256, 2010.
- [104] H. Swartz. Direct measurement of the concentration of oxygen in cells and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 9 :S91, 1990.
- [105] H. Swartz, S. Boyer, P. Gast, J. Glockner, H. Hu, K. J. Liu, M. Mousavi, S. Norby, N. Vahidi, T. Walczak, M. Wu, and R. Clarkson. Measurements of pertinent concentrations of oxygen *in vivo*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 20 :333–339, 1991.
- [106] P. James, G. Bacic, O. Grinberg, F. Goda, J. Dunn, S. Jackson, and H. Swartz. Endotoxin-induced changes in intrarenal pO₂, measured by *in vivo* electron paramagnetic resonance oximetry and magnetic resonance imaging. *Free Radical Biology and Medicine*, 21 :25–34, 1996.
- [107] P. James, M. Madhani, W. Roebuck, S. Jackson, and H. Swartz. Endotoxin-induced liver hypoxia : Defective oxygen delivery versus oxygen consumption. *Nitric Oxide*, 6 :18–28, 2002.

-
- [108] O. Karroum, J. Kengen, P. Danhier, J. Magat, L. Mignon, C. Bouzin, J. Verrax, N. Charette, P. Starkel, P. Calderon, P. Sonveaux, O. Feron, V. Grégoire, B. Gallez, and B. Jordan. Tumor reoxygenation following administration of mitogen-activated protein kinase inhibitors : A rationale for combination with radiation therapy. *Radiotherapy and Oncology*, 105 :64–71, 2012.
- [109] H. Hu, G. Sosnovsky, and H. Swartz. Simultaneous measurements of the intra- and extra-cellular oxygen concentration in viable cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1112 :161–166, 1992.
- [110] P. James, S. Jackson, O. Grinberg, and H. Swartz. The effects of endotoxin on oxygen consumption of various cell types *in vitro* : An EPR oximetry study. *Free Radical Biology and Medicine*, 18 :641–647, 1995.
- [111] C. Gallez, C. Baudalet, B. Jordan, and R. Debuyst. Oxymétrie par résonance paramagnétique électronique *in vivo*. *Louvain Médical*, 118 :214–220, 1999.
- [112] M. Šentjerc, M. Čemažar, and G. Serša. EPR oximetry of tumors *in vivo* in cancer therapy. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60 :1379–1385, 2004.
- [113] B. Jordan, V. Grégoire, R. Demeure, P. Sonveaux, O. Feron, J. O’Hara, V. Vanhulle, N. Delzenne, and B. Gallez. Insulin increases the sensitivity of tumors to irradiation : Involvement of an increase in tumor oxygenation mediated by a nitric oxide-dependent decrease of the tumor cells oxygen consumption. *Cancer Research*, 62 :3555–3561, 2002.
- [114] S. Kantrow, D. Taylor, M. Carraway, and C. Piantadosi. Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 345 :278–288, 1997.
- [115] E. Crouser, M. Julian, D. Blaho, and D. Pfeiffer. Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. *Critical Care Medicine*, 30 :276–284, 2002.

- [116] M. Fink. Cytopathic hypoxia : Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Critical Care Clinics*, 17 :219–237, 2001.
- [117] R. Levy. Mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment, and metabolic down-regulation in sepsis. *Schock*, 28 :24–28, 2007.
- [118] M. Singer. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Critical Care Medecine*, 35 :S441–S448, 2007.
- [119] P. Schumacker, N. Chandel, and A. Agusti. Oxygen conformance of cellular respiration in hepatocytes. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 265 :L395–L402, 1993.
- [120] G. Budinger, J. Duranteau, N. Chandel, and P. Schumacker. Hibernation during hypoxia in cardiomyocytes : Role of mitochondria as the O₂ sensor. *Journal of Biological Chemistry*, 273 :3320–3326, 1998.
- [121] E. Pathak and P. Mayeux. *In Vitro* model of sepsis-induced renal epithelial reactive nitrogen species generation. *Toxicological Sciences*, 115 :475–481, 2010.
- [122] D. Brealey, M. Brand, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, R. Smolenski, N. Davies, C. Cooper, and M. Singer. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *The Lancet*, 360 :219–223, 2002.
- [123] E. Crouser. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion*, 4 :729–741, 2004.
- [124] P. Mitchell. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191 :144–148, 1961.
- [125] B. Chance, H. Sies, and A. Boveris. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59 :527–605, 1979.
- [126] A. Boveris, N. Oshino, and B. Chance. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, 128 :617–630, 1972.

-
- [127] L. Mela, L. Bacalzo, and L. Miller. Defective oxidative metabolism of rat liver mitochondria in hemorrhagic and endotoxin shock. *American Journal of Physiology*, 220 :571–577, 1971.
- [128] C. Schaefer, M. Lerner, and B. Biber. Dose-related reduction of intestinal cytochrome aa3 induced by endotoxin in rats. *Circulatory Shock*, 33 :17–25, 1991.
- [129] A. Forget, J. Mangalaboyi, S. Mordon, B. Guery, B. Vallet, F. Fourier, and C. Chopin. Escherichia coli endotoxin reduces cytochrome aa3 redox status in pig skeletal muscle. *Critical Care Medecine*, 28 :3491–3497, 2000.
- [130] Y.-C. Chuang, J.-L. Tsai, A. Chang, J. Chan, C.-W. Liou, and S. Chan. Dysfunction of the mitochondrial respiratory chain in the rostral ventrolateral medulla during experimental endotoxemia in the rat. *Journal of Biomedical Science*, 9 :542–548, 2002.
- [131] D. Brealey, S. Karyampudi, T. Jacques, M. Novelli, R. Stidwill, V. Taylor, R. Smolenski, and M. Singer. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286 :R491–R497, 2004.
- [132] R. Levy, C. Vijayasathy, N. Raj, N. Avadhani, and C. Deutschman. Competitive and noncompetitive inhibition of myocardial cytochrome c oxidase in sepsis. *Shock*, 21 :110–114, 2004.
- [133] J. d’Avila, A. Santiago, R. Amâncio, A. Galina, M. Oliveira, and F. Bozza. Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. *Critical Care Medicine*, 36 :1925–1932, 2008.
- [134] I. Vanhorebeek, R. De Vos, D. Mesotten, P. Wouters, C. De Wolf-Peeters, and G. Van den Berghe. Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insulin in critically ill patients. *The Lancet*, 365 :53–59, 2005.
- [135] L. Callahan and G. Supinski. Downregulation of diaphragm electron transport chain and glycolytic enzyme gene expression in sepsis. *Journal of Applied Physiology*, 99 :1120–1126, 2005.

- [136] C. Comim, G. Rezin, G. Scaini, P. Di-Pietro, M. Cardoso, F. Petronilho, C. Ritter, E. Streck, J. Quevedo, and F. Dal-Pizzol. Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Mitochondrion*, 8 :313–318, 2008.
- [137] T. Raffaella, F. Fiore, M. Fabrizia, P. Francesco, I. Arcangela, S. Salvatore, S. Luigi, and B. Nicola. Induction of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in human fibroblast cultures exposed to serum from septic patients. *Life Sciences*, 91 :237–243, 2012.
- [138] H. Choi, S.-K. Jo, S. Kim, J. Lee, E. Cho, Y. Hyun, J. Cha, Y. Kang, D. Cha, W. Cho, and H. Kim. Glucocorticoids attenuate septic acute kidney injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435 :678–684, 2013.
- [139] E. Pathak, L. MacMillan-Crow, and P. Mayeux. Role of mitochondrial oxidants in an *In Vitro* model of sepsis-induced renal injury. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 340 :192–201, 2012.
- [140] N. Patil, N. Parajuli, L. MacMillan-Crow, and P. Mayeux. Inactivation of renal mitochondrial respiratory complexes and manganese superoxide dismutase during sepsis : Mitochondria-targeted antioxidant mitigates injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 306 :F734–F743, 2014.
- [141] A. Mayevsky and E. Barbiro-Michaely. Use of NADH fluorescence to determine mitochondrial function *in vivo*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41 :1977–1988, 2009.
- [142] A. Mayevsky and B. Chance. Oxidation – reduction states of NADH *in vivo* : From animals to clinical use. *Mitochondrion*, 7 :330–339, 2007.
- [143] X. Chen, Z. Zhong, Z. Xu, L. Chen, and Y. Wang. Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement : Forty years of application and controversy. *Free Radical Research*, 44 :587–604, 2010.

-
- [144] J. Zielonka and B. Kalyanaraman. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation : Another inconvenient truth. *Free Radical Biology and Medicine*, 48 :983–1001, 2010.
- [145] C. Cottet-Rousselle, X. Ronot, X. Leverve, and J.-F. Mayol. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry Part A*, 79A :405–425, 2011.
- [146] P. Mukhopadhyay, M. Rajesh, K. Yoshihiro, G. Haskó, and P. Pacher. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358 :203–208, 2007.
- [147] P. Mukhopadhyay, M. Rajesh, G. Haskó, B. Hawkins, M. Madesh, and P. Pacher. Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nature Protocols*, 2 :2295–2301, 2007.
- [148] C. Quoilin. Diversification des méthodes de microscopie pour l'étude en milieu cellulaire du stress oxydatif induit - impact de la vectorisation médicamenteuse. Master's thesis, Université de Liège, 2010.
- [149] S. Bolte and F. Cordelières. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, pages 213–232, 2006.
- [150] E. Manders, J. Stap, G. Brakenhoff, R. van Driel, and J. Aten. Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *Journal of Cell Science*, 103 :857–862, 1992.
- [151] S. Costes, D. Daelemans, E. Cho, Z. Dobbin, G. Pavlakis, and S. Lockett. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophysical Journal*, 86 :3993–4003, 2004.
- [152] X. Jiang and X. Wang. Cytochrome c-mediated apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*, 73 :87–106, 2004.
- [153] N. Li, K. Ragheb, G. Lawler, J. Sturgis, B. Rajwa, J. Melendez, and J. Robinson. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces

- apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *Journal of Biological Chemistry*, 278 :8516–8525, 2003.
- [154] P. Venditti, L. Di Stefano, and S. Di Meo. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*, 13 :71–82, 2013.
- [155] P. Petit, H. Lecoœur, E. Zoen, C. Dauguet, B. Mignotte, and M.-L. Gougeon. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 130 :157–167, 1995.
- [156] D. Green and J. Reed. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281 :1309–1312, 1998.
- [157] J. Turrens. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports*, 17 :3–8, 1997.
- [158] K. Brieger, S. Schiavone, F. Miller, and K. Krause. Reactive oxygen species : From health to disease. *Swiss Medical Weekly*, 142 :w13659, 2012.
- [159] A. Daiber. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797 :897–906, 2010.
- [160] F. Jiang, Y. Zhang, and G. Dusting. NADPH oxidase-mediated redox signaling : Roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacological Reviews*, 63 :218–242, 2011.
- [161] G. Brown. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1504 :46–57, 2001.
- [162] A. Dare, A. Phillips, A. Hickey, A. Mittal, B. Loveday, N. Thompson, and J. Windsor. A systematic review of experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, 47 :1517–1525, 2009.
- [163] H. Galley. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *British Journal of Anaesthesia*, 107 :57–64, 2011.

-
- [164] G. Brown and V. Borutaite. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 33 :1440–1450, 2002.
- [165] R. Radi, M. Rodriguez, L. Castro, and R. Telleri. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 308 :89–95, 1994.
- [166] M. Sharpe and C. Cooper. Interaction of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase : Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity. *Journal of Biological Chemistry*, 273 :30961–30972, 1998.
- [167] N. Nin, A. Cassina, J. Boggia, E. Alfonso, H. Botti, G. Peluffo, A. Trostchansky, C. Batthyány, R. Radi, H. Rubbo, and F. Hurtado. Septic diaphragmatic dysfunction is prevented by Mn(III)porphyrin therapy and inducible nitric oxide synthase inhibition. *Intensive Care Medicine*, 30 :2271–2278, 2004.
- [168] G. Escames, L. López, F. Ortiz, A. López, J. García, E. Ros, and D. Acuña Castroviejo. Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS Journal*, 274 :2135–2147, 2007.
- [169] P. Wardman. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues : Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biology and Medicine*, 43 :995–1022, 2007.
- [170] K. Ahn, M. Mohaupt, K. Madsen, and B. Kone. *In situ* hybridization localization of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 267 :F748–F757, 1994.
- [171] A. Shiose, J. Kuroda, K. Tsuruya, M. Hirai, H. Hirakata, S. Naito, M. Hattori, Y. Sakaki, and H. Sumimoto. A novel superoxide-producing NADPH oxidase in kidney. *Journal of Biological Chemistry*, 276 :1417–1423, 2001.

- [172] B. Markewitz, J. Michael, and D. Kohan. Cytokine-induced expression of a nitric oxide synthase in rat renal tubule cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 91 :2138–2143, 1993.
- [173] C. Bertocchi, M. Schmid, J. Hasslacher, S. Dunzendorfer, J. Patsch, and M. Joannidis. Differential effects of NO inhibition in renal epithelial and endothelial cells in mono-culture vs. co-culture conditions. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 26 :669–678, 2010.
- [174] J.-M. Li and A. Shah. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase : Potential relevance in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14 :S221–S226, 2003.
- [175] B. Babior, J. Lambeth, and W. Nauseef. The neutrophil NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397 :342–344, 2002.
- [176] J.-M. Li and A. Shah. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277 :19952–19960, 2002.
- [177] G. Cheng, Z. Cao, X. Xu, E. Van Meir, and J. Lambeth. Homologs of gp91phox : Cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*, 269 :131–140, 2001.
- [178] M. Geiszt, J. Kopp, P. Várnai, and T. Leto. Identification of RENOX, an NADPH oxidase in kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 :8010–8014, 2000.
- [179] H. Park, Hye Y. Jung, E. Park, J. Kim, W. Lee, and Y. Bae. Cutting edge : Direct interaction of TLR4 with NAD(P)H Oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF- κ B. *The Journal of Immunology*, 173 :3589–3593, 2004.
- [180] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76 :4350–4354, 1979.
- [181] C. Heid, J. Stevens, K. Livak, and P. Williams. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6 :986–994, 1996.

-
- [182] K. Tsuchiya, J.-J. Jiang, M. Yoshizumi, T. Tamaki, H. Houchi, K. Minakuchi, K. Fukuzawa, and R. Mason. Nitric oxide-forming reactions of the water-soluble nitric oxide spin-trapping agent, MGD. *Free Radical Biology and Medicine*, 27 :347–355, 1999.
- [183] Z. Grozdanovic, G. Nakos, T. Christova, Z. Nikolova, B. Mayer, and R. Gossrau. Demonstration of nitric oxide synthase in marmosets by NADPH diaphorase histochemistry and NOS immunoreactivity. *Acta Histochemica*, 97 :321–331, 1995.
- [184] R. Brandes. Triggering mitochondrial radical release : A new function for NADPH oxidases. *Hypertension*, 45 :847–848, 2005.
- [185] S. Kimura, G.-X. Zhang, A. Nishiyama, T. Shokoji, L. Yao, Y.-Y. Fan, M. Rahman, T. Suzuki, H. Maeta, and Y. Abe. Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II. *Hypertension*, 45 :860–866, 2005.
- [186] D. Zhang, Y.-F. Chen, W. Campbell, A.-P. Zou, G. Gross, and P.-L. Li. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circulation Research*, 89 :1177–1183, 2001.
- [187] J. Beckman and W. Koppenol. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite : The good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology*, 271 :C1424–1437, 1996.
- [188] A. Fisher. Redox signaling across cell membranes. *Antioxidants and redox signaling*, 11 :1349–1356, 2009.
- [189] J. Boczkowski, C. Lisdero, S. Lanone, A. Samb, M. Carreras, A. Boveris, M. Aubier, and J. Poderoso. Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *The FASEB Journal*, 13 :1637–1646, 1999.
- [190] J. Vásquez-Vivar, B. Kalyanaraman, and M.C. Kennedy. Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical : An electron spin resonance investigation. *Journal of Biological Chemistry*, 275 :14064–14069, 2000.

- [191] A. Havasi and S. Borkan. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney International*, 80 :29–40, 2011.
- [192] G. Kaushal, A. Singh, and S. Shah. Identification of gene family of caspases in rat kidney and altered expression in ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 274 :F587–F595, 1998.
- [193] D. Basile, H. Liapis, and M. Hammerman. Expression of bcl-2 and bax in regenerating rat renal tubules following ischemic injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 272 :F640–F647, 1997.
- [194] V. Mishra. Oxidative stress and role of antioxidant supplementation in critical illness. *Clinical Laboratory*, 53 :199–209, 2007.
- [195] C. Martin and J.-L. Vincent, editors. *Sepsis sévère et choc septique*. Springer Science, 2005.
- [196] L. Jacob, editor. *L'insuffisance rénale aiguë*. Springer-Verlag, 2007.