

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté de Médecine et de Pharmacie)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale « *Sciences Biologiques & Santé* »

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présentée par :

Thomas PELE

Étude des effets potentiels du récepteur MerTK sur le développement des lésions liées à une ischémie/reperfusion rénale chez le rat

Directeur de Thèse : Pr Omar BENZAKOUR
Co-Directeur de Thèse : Dr Fatima DKHISSI
Co-Directeur de Thèse : Dr Sébastien GIRAUD

Soutenue le 18 décembre 2019

devant la Commission d'Examen

JURY

Dr Elise CHIFFOLEAU	CR, Université de Nantes	Rapporteur
Pr Alexandre HERTIG	PU-PH, Hôpital Universitaire Tenon Paris 6	Rapporteur
Pr François SEGUIN	PU, Université de Poitiers	Examineur
Pr Omar BENZAKOUR	PU, Université de Poitiers	Directeur de thèse

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté de Médecine et de Pharmacie)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale « *Sciences Biologiques & Santé* »

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présentée par :

Thomas PELE

Étude des effets potentiels du récepteur MerTK sur le développement des lésions liées à une ischémie/reperfusion rénale chez le rat

Directeur de Thèse : Pr Omar BENZAKOUR
Co-Directeur de Thèse : Dr Fatima DKHISSI
Co-Directeur de Thèse : Dr Sébastien GIRAUD

Soutenue le 18 décembre 2019

devant la Commission d'Examen

JURY

Dr Elise CHIFFOLEAU	CR, Université de Nantes	Rapporteur
Pr Alexandre HERTIG	PU-PH, Hôpital Universitaire Tenon Paris 6	Rapporteur
Pr François SEGUIN	PU, Université de Poitiers	Examineur
Pr Omar BENZAKOUR	PU, Université de Poitiers	Directeur de thèse

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	1
LISTE DES TABLEAUX	3
ABREVIATIONS.....	5
INTRODUCTION.....	7
Chapitre I : Transplantation rénale et ischémie/reperfusion	9
I. Transplantation rénale	9
1. Pathologie.....	9
2. Généralités	9
3. Donneurs	10
II. Reins	11
1. Anatomie	11
2. Néphron.....	12
3. Espace interstitiel rénal	15
4. Vascolarisation rénale	15
5. Filtration du sang.....	16
6. Tension artérielle.....	17
III. Ischémie-Reperfusion (I/R)	18
1. Ischémie-Reperfusion rénale.....	18
2. Biomarqueurs d'ischémie-reperfusion	18
3. Mitochondrie	20
4. Stress oxydant	20
5. Apoptose/Nécrose/Microparticules	21
6. Inflammation	23
Chapitre II : Microparticules (MPs)	31
I. Généralités	31
II. Formation des MPs.....	32
III. Caractérisation des MPs	34
IV. Effets biologiques des MPs	35
1. Coagulation.....	36
2. Stress oxydatif	36
3. Inflammation	37
4. Autres	37
V. MPs et les pathologies.....	38

1.	Biomarqueurs	38
2.	MPs et l'I/R	38
3.	MPs et les reins.....	39
VI.	Clairance des MPs.....	39
	Chapitre III : Protéine S/MerTK.....	41
I.	Protéine S.....	41
1.	Structure.....	41
2.	Protéine S, protéine vitamine K dépendante	42
3.	C4BP.....	43
4.	Gas6, protéine jumelle	44
5.	Coagulation.....	44
6.	Pathologies	46
II.	MerTK	48
1.	Généralités	48
2.	Hémostase	49
3.	MerTK et la phagocytose.....	51
4.	MerTK et l'inflammation.....	54
5.	MerTK soluble.....	56
	OBJECTIF et MODELE de L'ETUDE.....	59
	Objectif de l'étude.....	61
	Modèle d'étude.....	63
	MATERIEL et METHODES.....	65
I.	Chirurgie : Ischémie-reperfusion bilatérale rénale	67
1.	Modèle animal.....	67
2.	Groupes expérimentaux.....	67
3.	Protocole chirurgical.....	68
4.	Traitement des échantillons récupérés sur les rats.....	69
II.	Dosage des microparticules par cytométrie en flux.....	70
III.	Extraction protéique rénale	71
IV.	Dosage protéique	71
V.	Western Blot	72
VI.	Analyses biochimiques	73
VII.	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	73
VIII.	Analyses histologiques	74
1.	Coloration à l'acide périodique et l'hématoxyline éosine -safran.....	74
2.	Immunohistochimie : infiltration leucocytaire CD68 positive	75

IX.	Génotypage des rats	76
X.	Phagocytose <i>in vitro</i>	76
XI.	Analyses statistiques	77
	RESULTATS	79
I.	Validation de la mutation chez les rats RCS	81
II.	Évaluation de l'impact de MerTK dans un modèle d'I/R rénale de rat RCS (ischémie de 1 h)	82
	1. Évaluation de la cinétique des biomarqueurs plasmatiques de fonction et de lésions rénales suite à 1 h d'ischémie rénale.....	82
	2. Analyses des lésions histologiques suite à 1 h d'ischémie rénale	87
	3. Évaluation de l'infiltration leucocytaire au sein du tissu suite à 1 h d'ischémie rénale	90
	4. Évaluation des marqueurs pro-inflammatoires suite à 1 h d'ischémie rénale	99
	5. Identification et quantification des microparticules plasmatiques suite à 1 h d'ischémie rénale	104
III.	Évaluation de l'impact de MerTK dans un modèle d'I/R rénale de rat RCS (ischémie de 30 min)	109
	1. Évaluation de la cinétique des biomarqueurs plasmatiques de fonction et de lésions rénales suite à 30 min d'ischémie rénale	109
	2. Analyses des lésions histologiques suite à 30 min d'ischémie rénale	114
	3. Évaluation de l'infiltration leucocytaire au sein du tissu suite à 30 min d'ischémie rénale	116
	4. Évaluation des marqueurs pro-inflammatoires suite à 30 min d'ischémie rénale	122
	5. Identification et quantification des microparticules plasmatiques suite à 30 min d'ischémie rénale	125
IV.	Phagocytose <i>in vitro</i>	127
	DISCUSSION et CONCLUSION	133
	BIBLIOGRAPHIE	147

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du rein humain en coupe sagittale	12
Figure 2 : Structure du glomérule (A). Représentation schématique d'un néphron (B).....	14
Figure 3 : Représentation schématique de la vascularisation du néphron.....	16
Figure 4 : Représentation schématique de l'impact de l'apoptose et de la nécrose sur la réponse inflammatoire	23
Figure 5 : Principales conséquences cellulaires et cliniques de l'I/R rénale.....	25
Figure 6 : Représentation schématique de la NETose dans l'I/R rénale.....	27
Figure 7 : Formation des différents types de vésicules	32
Figure 8 : Stimuli identifiés pour l'émission de MPs d'origines plaquettaire, endothéliale et leucocytaire.....	33
Figure 9 : Mécanismes impliquées dans l'émission des MPs suite à un stimulus	34
Figure 10 : Représentation schématique de la structure de la protéine S et de ses domaines d'interactions	42
Figure 11 : Schéma représentant la γ -carboxylation et le cycle de vitamine K.....	43
Figure 12 : Modèle schématique de l'interaction entre de la protéine S avec son récepteur membranaire d'un côté et avec la protéine C4BP de l'autre côté.....	44
Figure 13 : Représentation schématique de la cascade de coagulation	46
Figure 14 : Schéma de la structure du récepteur MerTK.....	49
Figure 15 : Schéma représentatif de la stabilisation des plaquettes et le recrutement des leucocytes régulés par les TAM.....	50
Figure 16 : Représentation schématique de la liaison de la protéine S avec son récepteur MerTK d'une part et avec les cellules apoptotiques d'une autre part pour l'initiation de la phagocytose de ces derniers par les phagocytes.....	53
Figure 17 : Réarrangement du cytosquelette lors de la phagocytose	54
Figure 18 : Régulation du cycle de l'inflammation par les récepteurs TAM.....	56
Figure 19 : Validation de la mutation génétique des rats RCS par génotypage et expression protéique de MerTK par Western Blot.....	81
Figure 20 : Étude des biomarqueurs plasmatiques de fonction et de lésions rénales suite à une ischémie rénale bilatérale de 1 h.....	85
Figure 21 : Étude histologique de l'intégrité des structures rénales suite à une ischémie de 1 h.....	89
Figure 22 : Étude, par immunohistochimie, de l'infiltration leucocytaire dans le rein suite à une ischémie de 1 h.....	92
Figure 23 : Quantification, par Western Blot, de CD68 tissulaire suite à une ischémie de 1 h.....	94
Figure 24 : Quantification, par Western Blot, de MPO tissulaire suite à une ischémie de 1 h.....	95
Figure 25 : Quantification, par Western Blot, de iNOS tissulaire suite à une ischémie de 1 h.....	96
Figure 26 : Quantification de H3a tissulaire par Western Blot suite à une ischémie de 1 h.....	98
Figure 27 : Quantification de MCP-1 tissulaire et plasmatique, par Western Blot et par ELISA, suite à une ischémie de 1 h	101
Figure 28 : Quantification, par Western Blot et par ELISA, du niveau du TNF- α tissulaire et plasmatique après une ischémie de 1 h.....	103
Figure 29 : Quantification de MIP2 plasmatique, par ELISA, suite à une ischémie de 1 h.....	103
Figure 30 : Identification et quantification des MPs plasmatiques, par cytométrie en flux, suite à une ischémie de 1 h.....	107

Figure 31 : Étude des biomarqueurs plasmatiques de fonction et de lésions rénales suite à une ischémie rénale bilatérale de 30 min.....	112
Figure 32 : Étude histologique de l'intégrité des structures rénales suite à une ischémie de 30 min.....	116
Figure 33 : Étude, par immunohistochimie, de l'infiltration leucocytaire dans le rein suite à une ischémie de 30 min.....	118
Figure 34 : Quantification, par Western Blot, de CD68 tissulaire suite à une ischémie de 30 min.....	118
Figure 35 : Quantification, par Western Blot, de MPO tissulaire suite à une ischémie de 30 min.....	119
Figure 36 : Quantification, par Western Blot, de iNOS suite à une ischémie de 30 min.....	120
Figure 37 : Quantification, par Western Blot, de H3a suite à une ischémie de 30 min.....	121
Figure 38 : Quantification de MCP-1 tissulaire et plasmatique, par Western Blot et par ELISA, suite à une ischémie de 30 min.....	122
Figure 39 : Quantification TNF- α tissulaire et plasmatique, par Western Blot et par ELISA, suite à une ischémie de 30 min.....	124
Figure 40 : Quantification de MIP2 plasmatique, par ELISA, suite à une ischémie de 30 min....	124
Figure 41 : Identification et quantification des MPs plasmatiques, par cytométrie en flux, suite à une ischémie de 30 min.....	126
Figure 42 : Étude, par cytométrie en flux, des capacités de phagocytose des corps apoptotiques NRK-52 par les leucocytes sanguins CD45 positifs provenant du sang de rat RCS.....	129
Figure 43 : Étude, par microscopie confocale, des capacités de phagocytose des corps apoptotiques NRK-52 par les leucocytes sanguins CD45 positifs provenant du sang de rat RCS.....	131

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Évolution de la liste en attente de greffe rénale selon l'agence de Biomédecine, 2018	10
Tableau 2 : Les différentes méthodes pour caractériser et quantifier les MPs.....	35
Tableau 3 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés pour le Western Blot.....	73
Tableau 4 : Récapitulatif des anticorps secondaires utilisés pour le Western Blot.....	73
Tableau 5 : Molécules cibles recherchées par la technique ELISA.....	73

ABREVIATIONS

ADAM17 : <i>ADAM metallopeptidase 17</i>	ETB : Récepteur aux endothélines
ADH : Vasopressine	FACS : <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
AKI : <i>Acute kidney injury</i>	FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
Akt : Protéine kinase B	Gas6 : <i>Growth arrest-specific 6</i>
APC : Protéine C activée	GFR : Débit de filtration glomérulaire
ARE : Anti-oxydant response	HCL : Acide chlorhydrique
ARG1 : Arginase 1	HD : Patients hémodialysés
ARN : Acide ribonucléique	HES : Hématoxyline éosine safran
ATP : Adénosine triphosphate	HIF-1 : Facteur induit par l'hypoxie 1
BAI1 : <i>Brain-specific angiogenesis inhibitor 1</i>	HMGB1 : <i>High-mobility group box 1</i>
BCA : Acide bicinchoninique	HRP : <i>Horseradish peroxidase</i>
BMM : <i>Bone marrow-derived macrophages</i>	HUVECs : <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
BSA : <i>Bovine serum albumin</i>	I/R : Ischémie-reperfusion
C4BP : <i>C4b-binding protein</i>	ICAM : <i>Intercellular adhesion molecule</i>
CCP : Contrôle du complément	IFN : Interféron
CCR2 : <i>C-C chemokine receptor type 2</i>	IFNAR : Récepteur de l'interféron- α/β
CMF-DA : Diacétate de 5-chlorométhylfluorescéine	IFNGR : Récepteur Interféron-gamma
COX : Cyclooxygénases	IGF1 : <i>Insulin-like growth factor-1</i>
CRF : Insuffisance rénale chronique	IL : Interleukine
CX3CL1 : Fractalkine	iNOS : <i>inducible nitric oxide synthase</i>
CXCL7 : <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 7</i>	IRF5 : <i>Interferon regulatory factor 5</i>
CXCR : <i>CXC chemokine receptors</i>	JAK1 : <i>Janus kinase 1</i>
Cys C : Cystatine C	KIM-1 : <i>Kidney injury molecule-1</i>
DAB : 3,3'-Diaminobenzidine	LMPs : MPs leucocytaires
DAMPs : Motifs moléculaires associés aux dégâts	LPS : Lipopolysaccharide
DDAC : Donneurs en état d'arrêt circulatoire	MCP-1 : <i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
DMEM : <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>	MerTK : <i>Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase</i>
DN : Néphropathie diabétique	MIG : <i>Monokine induced by Interferon-gamma</i>
DTT : Dithiothreitol	MLCK : kinase de la chaîne légère de la myosine
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique	MPs : Microparticules
EGF : <i>Epidermal growth factor</i>	MR : <i>Mannose receptor</i>
ELISA : <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	
EMPs : MPs endothéliales	
eNOS : <i>endothelial nitric oxide synthase</i>	

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NET : *Neutrophil extracellular traps*

NF κ B : *Nuclear factor-kappa B*

NGAL : *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*

NO : Monoxyde d'azote

Nrf2 : *Nuclear factor erythroid-2-related factor 2*

NRK-52 : Cellules épithéliales rénales de rat

p53 : *Tumor protein 53*

PAD4 : Peptidyl arginine déiminase 4

PAS : Acide périodique de Schiff

PBS : *Phosphate buffer saline*

PE : Phycoérythrine

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PMPs : MPs plaquettaires

PPP : Plasma pauvre en plaquettes

PRR : *Pattern recognition receptor*

PS : Phosphatidylsérine

PVDF : Polyfluorure de vinylidène

RAAS : Système rénine-angiotensine-aldostérone

Rap1 : *Ras-proximate-1*

RCS : *Royal college surgeon*

Rdy : *Retinal dystrophy*

ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène

RPMI : *Roswell park memorial institute medium*

SH2 : *Src homology 2*

SHBG : *Sex hormone-binding globulin*

SHR : *Spontaneously hypertensive rat*

SOCS : *Suppressor of cytokine signaling protein*

SOD : *Superoxide Dismutase*

SSC : *Side Scatter*

STAT1 : *Signal transducer and activator of transcription 1*

SVF : Sérum de veau fœtal

TACE : *Tumor necrosis factor- α -converting enzyme*

TBS : *Tris buffered saline*

TF : *Tissue factor*

TFPI α : *Tissue factor pathway inhibitor α*

TGF- β : *Transforming growth factor-beta*

TIM-4 : *T-cell membrane protein 4*

TLR : *Toll-like receptors*

TNF- α : *Tumor necrosis factor*

UTP : Uridine triphosphate

VCAM-1 : *Vascular cell adhesion molecule 1*

VKOR : Vitamine K 2, 3-époxyde réductase

INTRODUCTION

CHAPITRE I : TRANSPLANTATION RENALE ET ISCHEMIE/REPERFUSION

I. TRANSPLANTATION RENALE

La transplantation d'organe est une intervention chirurgicale qui consiste à remplacer un organe malade par un organe prélevé sur un donneur sain. Cette technique chirurgicale permet, dans le cas du rein, de suppléer la fonction d'un organe pathologique.

1. PATHOLOGIE

L'insuffisance rénale chronique est une maladie lente et irréversible. Elle peut apparaître suite à un diabète ou une hypertension artérielle. Cette maladie se caractérise par une diminution progressive de la fonction de filtration du sang et de la sécrétion d'hormone. Ces phénomènes engendrent l'accumulation des déchets du métabolisme et de l'eau, l'anémie et des troubles cardiovasculaires. Le développement de l'insuffisance rénale peut être ralenti par des séances de dialyses mais au stade terminal il est nécessaire que le patient subisse une transplantation rénale qui, aujourd'hui, est le meilleur traitement pour contrecarrer l'insuffisance rénale chronique.

2. GENERALITES

La première transplantation rénale a eu lieu en 1954 par le chirurgien Joseph MURRAY qui réussit à contourner les problèmes de rejets en effectuant la transplantation sur des jumeaux [1]. Aujourd'hui, la transplantation rénale s'impose comme un atout thérapeutique indéniable de part, par une qualité de vie retrouvée du patient mais aussi par une prise en charge moins coûteuse en comparatif à la dialyse.

Selon l'agence de Biomédecine, une augmentation progressive de 24,2 % du nombre de greffons rénaux est observée entre 2012 et 2017. En 2018, une diminution de 5 % par rapport à l'année 2017 justifiée par une mortalité liée aux accidents vasculaires cérébraux moindre de 15%. Malgré cette augmentation d'activité entre 2012 et 2017, le nombre de nouveaux inscrits et les patients en attente est aussi à la hausse avec les années. En conséquence, en 2012 il y avait 1 greffon rénal pour 4,4 patients en liste d'attente de transplantation et en 2017 il y avait 1 greffon rénal pour 5 patients en attente de transplantation. Ainsi, il est primordial aujourd'hui d'élargir les critères de sélection du transplant rénal pour réduire cette pénurie de greffons disponibles issus de donneurs.

Tableau 1 : Évolution de la liste en attente de greffe rénale selon l'agence de Biomédecine, 2018

Année	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Greffe rénale	3044	3069	3232	3470	3615	3782	3546
En attente	9089	9892	10818	11807	12541	13513	14291
Nouveaux inscrits dans l'année	4346	4555	4793	4843	5269	5280	/
Candidats pour un greffon	4,4	4,7	4,8	4,8	4,9	5	/

3. DONNEURS

Actuellement il existe plusieurs catégories de donneurs :

- Les donneurs vivants sont une excellente source de transplant par leur qualité. En effet, le donneur vivant est une personne en bonne santé, ayant une fonction rénale normale, ne présentant aucun marqueur de néphropathie et indemne de toute maladie cardiovasculaire. Autre avantage du donneur vivant est que le transplant ne subit pas les conséquences de la mort encéphalique qui est décrit comme un « orage » hormonale et cytokinique provoquant une ischémie tissulaire et le développement d'une réaction inflammatoire [1].
- Les donneurs en état de mort encéphalique ou de mort cérébrale sont des patients dont les activités du cerveau sont arrêtées de façon définitive et irrémédiable. La respiration et les battements peuvent être maintenus artificiellement par des techniques de réanimation
- Les donneurs à critères étendus (ou « élargis » ou « marginaux ») qui se définissent comme des donneurs à risques. Le donneur est considéré à risques quand son âge est supérieur à 60 ans ou entre 50 et 59 ans avec deux des trois critères suivants : hypertension, décès lié à un accident vasculaire cérébral, créatininémie supérieure à 150 $\mu\text{mol/l}$ [1]. Le risque pour le receveur se caractérise par une reprise retardée de la fonction rénale minimale, une non-fonction primaire, une surmortalité post-opératoire ou une survie diminuée du transplant.
- Les donneurs en état d'arrêt circulatoire (DDAC de classes de Maastricht)
 - Catégorie I : Les personnes qui font un arrêt cardiaque en dehors de tout contexte de prise en charge médicalisée et pour lesquelles le prélèvement d'organes ne pourra être envisagé que si la mise en œuvre de gestes de réanimation de qualité a été réalisée moins de 30 min après l'arrêt cardiaque.
 - Catégorie II : Les personnes qui font un arrêt cardiaque en présence de secours qualifiés, aptes à réaliser un massage cardiaque et une ventilation mécanique efficaces, mais dont la réanimation ne permettra pas une récupération hémodynamique.

- Catégorie III : Les personnes hospitalisées pour lesquelles une décision d'un arrêt des traitements est prise en raison de leur pronostic.
- Catégorie IV : Les personnes décédées en mort encéphalique qui font un arrêt cardiaque irréversible au cours de la prise en charge de réanimation.

Pour les greffons issus des donneurs à critères étendus et des DDAC, ces transplants sont plus sensibles aux lésions d'ischémie-reperfusion (I/R). Le prélèvement à cœur arrêté n'est pas une technique récente mais sa pratique donnait de moins bons résultats que les donneurs en état de mort encéphalique marqué par sa non-fonction primaire et une reprise retardée du transplant. Aujourd'hui, les résultats se sont nettement améliorés et ce prélèvement est considéré comme une source de transplant à ne pas négliger.

Le prélèvement rénal à cœur arrêté s'expose à un problème majeur ; la durée de l'ischémie chaude. L'équipe de Teraoka a montré que la survie à un an des transplants rénaux passe de 82-85 % à 66 % quand l'ischémie chaude dépasse 30 min [2]. Une autre étude menée par Gonzales-Segura a démontré que suite à une ischémie chaude fixe de 45 min suivi d'une ischémie froide supérieur à 22 h, la survie des transplants est altérée [3]. Le prélèvement sur cœur arrêté représente une source intéressante de transplant rénal néanmoins il reste à améliorer les techniques de conservation pour limiter les lésions engendrées par l'ischémie du rein.

II. REINS

Les reins sont localisés dans la partie postérieure abdominale et plus précisément dans le rétropéritoine. Ils mesurent en moyenne 12 cm chez l'homme et 3 cm chez un rat de 300g.

La fonction première des reins est la filtration du sang et l'élimination des déchets toxiques (urée, protéines catabolisées, acides uriques, ...) par l'organisme. Chez l'homme, la filtration est d'environ 180 L de plasma par jour, 1,5 à 2 L est éliminé par les reins. Ces derniers jouent aussi un rôle dans l'homéostasie principalement à travers des échanges hydriques et d'électrolytes (sodium, potassium...). Ils produisent des hormones (rénine, érythropoïétine, calcitriol) qui contribuent à réguler la tension artérielle, à produire des globules rouges et à maîtriser le taux de calcium.

1. ANATOMIE

Le rein est un organe complexe qui provient du mésoderme [5] et se distingue par plusieurs parties, de l'extérieur vers l'intérieur : le fascia rénal, la graisse périrénale, la capsule rénale, le

cortex, la médulla et les voies urinaires (figure 1) [6]. Le cortex, de couleur brun rouge, est homogène et abrite les glomérules mais aussi les tubes. Chez l'homme, la médulla est constituée de structures coniques, les pyramides de Malpighi (8 à 18) entre lesquelles s'insinuent les colonnes de Bertin, prolongements du cortex rénale contenant des vaisseaux en provenance du sinus. Chez le rat, il n'existe qu'une seule pyramide. La médulla est composée exclusivement de tubes [7].

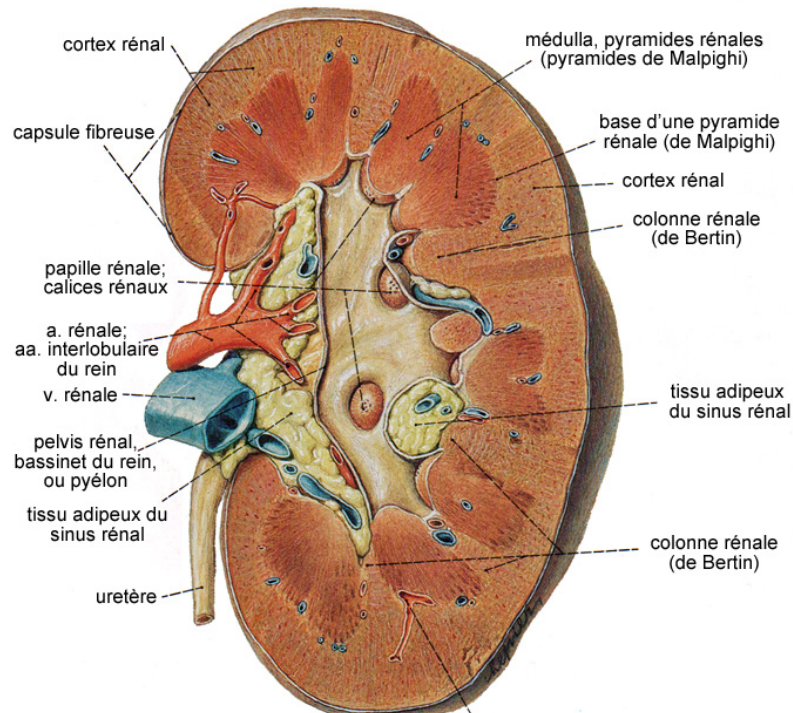


Figure 1 : Structure du rein humain en coupe sagittale

(CorpsHumain.ca)

2. NEPHRON

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein qui permet la filtration du sang, la formation de l'urine primaire et définitive. L'estimation du nombre de néphrons par rein est entre 250 000 à 2 000 000 pour l'homme [8] et entre 30 000 et 35 000 chez le rat [9]. Il existe deux types de néphrons : internes et externes. Les néphrons internes possèdent une anse de Henlé très longue alors que les néphrons externes, leur anse est beaucoup plus petite [7]. La néphrogenèse est complète à la 36ème semaine lors de la gestation chez l'homme [10] et au 8ème jour post-natal pour le rat [11]. Le néphron se compose en deux parties : le glomérule et le tube rénal. Le glomérule se présente comme un réseau de capillaires provenant d'une artériole afférente et se fini par une artériole efférente. Le glomérule se compose aussi de cellules mésangiales qui soutiennent les capillaires et ont des propriétés contractiles leur permettant de moduler l'activité

de l'appareil juxtaglomérulaire. Englobant ces structures, la capsule de Bowman est un feuillet pariétal composé de cellules épithéliales englobant les capillaires du glomérule. Chaque boucle de capillaire est constituée d'une membrane basale d'endothélium fenestrée. Cette membrane est recouverte d'une couche de cellules épithéliales, appelées podocytes. Cette structuration permet de former la barrière de filtration glomérulaire (figure 2A) [12]. Dans le prolongement du glomérule, le tube rénal se divise en plusieurs parties, le tubule proximal contourné puis droit. Ensuite, il y a le segment grêle descendant et ascendant qui forment à eux deux l'anse de Henlé. Ce segment se poursuit par un tubule distal droit puis un tubule distal contourné. Le néphron se termine par un tubule connecteur qui se jette dans un canal collecteur (figure 2B).

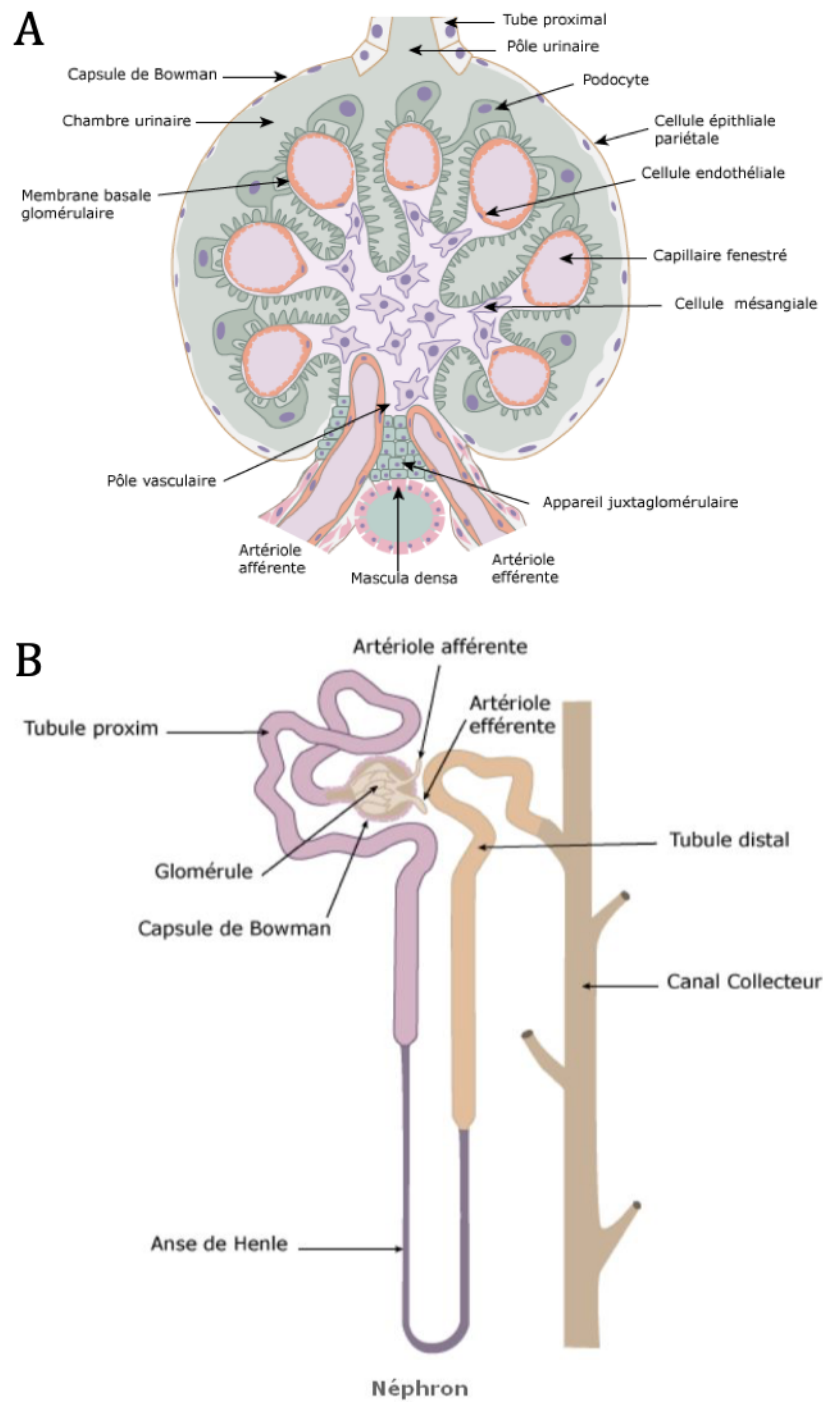


Figure 2 : Structure du glomérule (A). Représentation schématique d'un néphron (B)
(Université Numérique Francophone des Sciences de la Santé et du Sport)

3. ESPACE INTERSTITIEL RENAL

L'espace interstitiel rénal correspond à l'espace délimité par les tubules, les vaisseaux sanguins et les glomérules. Cet espace est composé de cellules, de matrice extracellulaire et du fluide interstitiel. Sa distribution est différente suivant sa localisation dans le rein. Dans le cortex, il occupe environ 8% et dans la médullaire, il est de 40% [13]. Parmi les cellules présentes dans l'interstitium, il est retrouvé des cellules non-immunitaires telles que les fibroblastes ou encore les péricytes mais aussi des cellules immunitaires comme les monocytes et les macrophages. Les macrophages sont la forme mature des monocytes, ils jouent un rôle dans l'immunité innée grâce à leur fonction phagocytaire mais aussi dans l'homéostasie tissulaire par la clairance des débris cellulaires et des microparticules (MPs) [14].

4. VASCULARISATION RENALE

Le rein est vascularisé par l'artère rénale. Celle-ci se divise pour donner naissance au réseau artériel, composé d'artères segmentaires puis au niveau du rein, on retrouve les artères interlobaires qui se suivent par les artères arquées et enfin les artères interlobulaires. Ces artères se ramifient pour donner les artères glomérulaires afférentes où le sang arrive dans le glomérule pour y être filtré, et ressort par l'artériole efférente. Le sang se dirige dans les capillaires, appelés vasa recta, situés dans la médullaire. La proximité de ces capillaires aux tubules permet les échanges entre l'urine et le sang [6]. *Les vasa recta* donnent suite au système veineux parallèle au système artériel (figure 3).

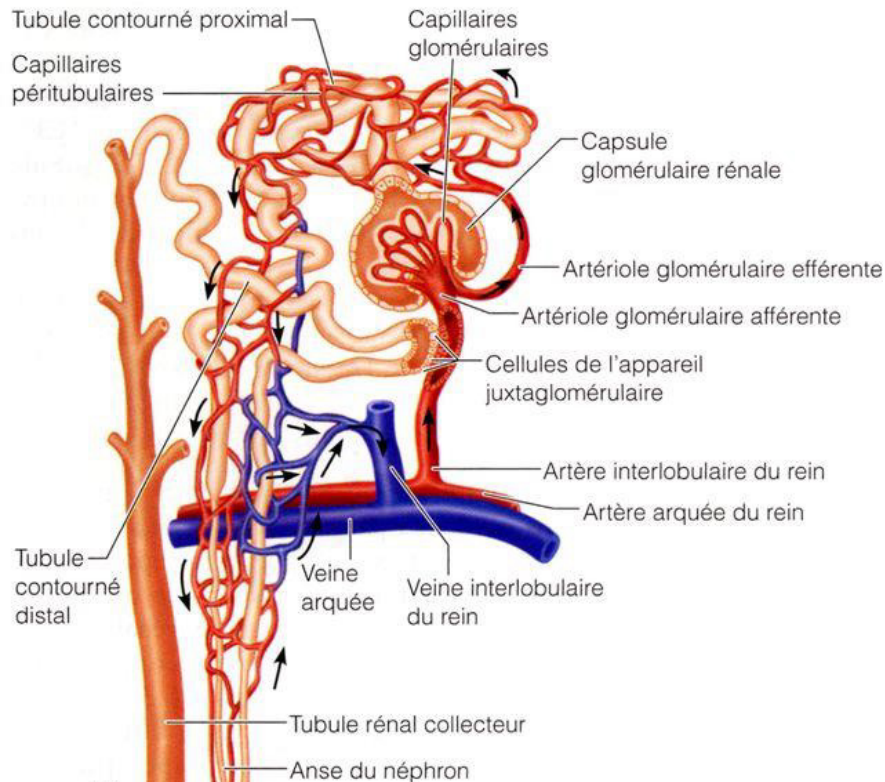


Figure 3 : Représentation schématique de la vascularisation du néphron
(Université de Bourgogne – Physiologie rénale – Marianne Zeller)

5. FILTRATION DU SANG

A l'arrivée dans les capillaires glomérulaires, le sang subit une filtration laissant passer les molécules selon leur poids moléculaire mais aussi suivant leur charge électrique pour ainsi donner l'urine primitive. Cette urine est envoyée ensuite dans les tubules. Durant son trajet dans les tubules, l'urine va subir de multiples phénomènes de réabsorption de son contenu par les cellules épithéliales composant les tubules. Certaines parties des tubules comme les tubules proximaux présentent des microvillosités formant la bordure en brosse. Cette dernière permet d'augmenter la surface d'absorption des cellules avec le lumen. Ainsi, les tubules proximaux assurent la partie la plus importante de la réabsorption tubulaire. Par exemple, le sodium subit une réabsorption de 70 % par les tubules proximaux. Les autres cations tels que le potassium, le calcium, le magnésium sont aussi majoritairement réabsorbés par les tubules proximaux et leur réabsorption est isoosmotique, une quantité d'eau adaptée est donc réabsorbée. Les acides aminés et le glucose sont normalement totalement réabsorbés tout comme l'urée sauf si un certain seuil est dépassé. Les petites protéines comme l'insuline sont endocytées et hydrolysées par le système lysosomal des cellules épithéliales. Enfin, les phosphates et bicarbonate sont eux aussi réabsorbés par les tubules proximaux mais suivant un équilibre acide-base. Ces mêmes cellules

ont la capacité de sécréter des protons provenant des bicarbonates ou aussi de l'urée, en faible quantité [7].

6. TENSION ARTERIELLE

Les reins ont la capacité de contrôler la pression sanguine artérielle en jouant sur la régulation du volume sanguin par la réabsorption/excrétion de l'eau et du sel mais aussi par l'action d'hormones. Il a été montré que la pression sanguine augmente lors de maladies chroniques ou aiguës des reins. Des expériences ont permis de mettre en évidence l'importance du rein dans le développement de l'hypertension à travers la transplantation d'un rein de rat souffrant d'une hypertension (SHR) à un rat sain. Ce dernier a développé une hypertension. Le cas inverse permet aussi de rétablir une pression sanguine normale à un rat hypertendu [15][16]. Plusieurs systèmes sont impliqués dans ces phénomènes de réabsorption/excrétion. Le système Rénine-Angiotensine - Aldostérone (RAAS) implique la sécrétion de la rénine par les cellules juxtaglomérulaires en réponse à de multiples stimuli, tel que l'ischémie rénale. Cette protéine va transformer l'angiotensinogène, exprimé dans les tubules proximaux, en angiotensine I qui devient l'angiotensine II après action de l'enzyme de conversion-angiotensine, sécrétée par le foie. L'angiotensine II est un puissant vasoconstricteur sur les artérioles afférentes et participe également à la sécrétion de l'aldostérone, molécule qui induit la rétention de l'eau et du sodium. D'autres molécules, tel que les endothélines, agissent sur le contrôle de la pression sanguine en modulant la tonicité vasculaire, la réabsorption du sodium et l'activité du système nerveux sympathique. L'endothéline 1, synthétisée dans les tubes collecteurs, inhibe la réabsorption du sodium à travers l'activation du récepteur aux endothélines (ETB) [17]. Les prostaglandines sont exprimées dans le rein par l'action de deux isoenzymes cyclooxygénases (COX-1 et COX-2). Dans le néphron distal, la prostaglandine E2 augmente l'excrétion du sodium et de l'eau en limitant la réabsorption de cet ion. Dans le cortex, les prostaglandines ont des propriétés vasodilatatrices qui augmentent le flux sanguin rénal, le GFR (débit de filtration glomérulaire), et stimulent la libération de la rénine. Dans la médullaire, elles sont surexprimées en présence de sel et induisent la natriurèse et la diurèse [18]. Une autre hormone a la capacité de concentrer l'urine avant son excrétion en agissant sur la perméabilité de la membrane apicale à l'eau et à l'urée et stimule la réabsorption du sodium, il s'agit de l'hormone antidiurétique (ADH) [19].

III. ISCHEMIE-REPERFUSION (I/R)

L'ischémie se définit par un arrêt total de la circulation sanguine dans un organe ou un tissu. Les conséquences sont :

- L'arrêt du flux dans le lit vasculaire,
- L'arrêt d'apport en oxygène (appelé hypoxie puis anoxie)
- L'arrêt d'apport en nutriments
- L'arrêt du transport des métabolites

La reperfusion se caractérise par le retour du sang et donc de l'oxygène, des métabolites et des nutriments nécessaires au bon fonctionnement de l'organe.

Néanmoins il est important de souligner que ces deux étapes, l'une comme l'autre, sont néfastes pour l'organe subissant cette séquence. Comme dit plus haut, l'I/R est retrouvée obligatoirement lors d'une transplantation rénale. Lors du prélèvement du greffon chez le donneur, ou lorsque le donneur est en arrêt circulatoire, l'organe rentre en phase d'ischémie, puis lors de la transplantation, l'organe transplanté subit la reperfusion.

1. ISCHEMIE-REPERFUSION RENALE

La cessation d'apport sanguin et par conséquent l'arrêt des apports en nutriments et en oxygène entraîne une multitude de réponses néfastes pour les cellules subissant cette ischémie. De même que le retour brutal de l'oxygène durant la reperfusion a des conséquences dramatiques sur le rein. L'un des effets les plus précoces est le phénomène de *no reflow* qui se définit comme une mauvaise reperfusion et, en soit, prolonge la période d'ischémie. L'activation pro-coagulante de l'endothélium en lien avec une agrégation plaquettaire et/ou de cellules obstruant le lit vasculaire, sont l'une des causes des troubles d'hémostase justifiant ce phénomène. De plus, une balance déséquilibrée des agents vasodilatateurs et vasoconstricteurs crée un dysfonctionnement microvasculaire renforçant l'effet *no reflow* [20].

Les sous-parties suivantes abordent les biomarqueurs évalués et les différents mécanismes intervenant lors d'une I/R rénale.

2. BIOMARQUEURS D'ISCHEMIE-REPERFUSION

La détection des lésions rénales, comme dans le cas de l'insuffisance rénale aiguë ou de l'I/R, est couramment réalisée par le dosage de biomarqueurs dans le sang et l'urine. Les biomarqueurs les plus largement utilisés sont la créatinine et l'urée. La créatinine est un bon marqueur du taux

de filtration glomérulaire mais celui-ci manque de sensibilité dans les valeurs hautes de la filtration glomérulaire. En effet, une diminution jusqu'à 50 % du taux de filtration peut avoir lieu sans augmentation de la créatinine. De plus, sa concentration est influencée par d'autres facteurs, propres à l'individu, que la filtration glomérulaire : âge, sexe, état nutritionnel, volémie du patient ou son excrétion urinaire qui peut varier suivant la prise de médicament [21]. Ainsi, la créatinine et l'urée sont considérées comme des biomarqueurs tardifs pour la détection de l'insuffisance rénale aiguë. Suite à cela, la communauté d'urgence médicale et de néphrologie internationale ont proposé un nouveau concept, les lésions rénales aiguës, pour remplacer le concept d'insuffisance rénale aiguë. De nombreux experts sur le sujet pensent qu'avec des biomarqueurs suffisamment précoces, l'insuffisance rénale aiguë pourrait être détectée, même si le débit de filtration glomérulaire est normal, permettant d'avoir des interventions précoces et d'améliorer le pronostic des patients [22]. Des nouveaux marqueurs ont été mis en évidence : MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*), KIM-1 (*Kidney Injury Molecule-1*), Cys C (Cystatine C), IL-18 (*Interleukin-18*) et NGAL (*Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*). MCP-1 est une chimiokine, impliquée dans une variété de maladies : développement de tumeurs, athérosclérose ou maladies auto-immunes [23]. Sous l'inflammation, les cellules mésangiales, épithéliales tubulaires, endothéliales et podocytes sécrètent MCP-1 [22]. Une étude a montré que les néphropathies diabétiques augmenteraient la concentration de MCP-1 dans le rein et l'urine [24]. NGAL est une protéine de 25 kDa liée à la gélatinase des neutrophiles. Elle est exprimée à basse concentration par les neutrophiles mais aussi par d'autres tissus dont le rein. Son expression est induite lors de l'inflammation ou de lésions épithéliales [70]. Il a été montré que NGAL est détectée 2 h après une ischémie rénale chez la souris dans les urines [25]. Ainsi, NGAL serait suffisamment sensible et spécifique pour l'insuffisance rénale aiguë et permettrait de distinguer l'insuffisance rénale aiguë fonctionnelle pré-rénale de la nécrose tubulaire aiguë et de l'insuffisance rénale chronique [26]. KIM-1 est une protéine transmembranaire d'origine tubulaire indétectable chez le sujet sain. A l'apparition de lésions liées à une ischémie rénale, l'expression de KIM-1 augmente dans les cellules épithéliales tubulaires proximales [21]. Il a été observé une augmentation supérieure à 5 fois la norme dans l'urine dès le premier jour de lésions ischémiques au niveau des tubules alors que la créatinine a été détectée 1 jour plus tard. La cystatine C est un polypeptide de 13 kDa, appartenant à la famille des inhibiteurs cystéine-protéinase. Elle est synthétisée et sécrétée par toutes les cellules nucléées de façon constante. Au niveau du rein, elle est librement filtrée par le glomérule, puis réabsorbée et entièrement catabolisée par les cellules des tubules proximaux contournés. La caractéristique d'être principalement dépendant du taux de filtration glomérulaire en fait une bonne alternative à la créatinine. De plus, il semblerait que la cystatine C est moins influencée par les facteurs externes de l'individu. Son augmentation serait visible 24 à 48 h avant la créatinine [21]. Une étude récente chez le rat a permis de comparer les marqueurs MCP-1, KIM-

1 et Cys C après une ischémie-reperfusion rénale. Elle a mis en évidence que MCP-1 est le marqueur le plus précoce dans le sérum, une augmentation significative est visible 30 min après l'I/R. KIM-1 est significativement détectée dans les urines au bout de 30 min après l'I/R alors que Cys C est augmentée après 2 h d'I/R dans les urines et le sérum. L'équipe a observé que le taux de MCP-1 atteint un maximum à 6 h après l'I/R pour ensuite redescendre alors que celui de KIM-1 continue à augmenter pendant les lésions [22].

3. MITOCHONDRIE

L'ischémie provoque une altération du métabolisme énergétique. La mitochondrie ne peut plus assurer la phosphorylation oxydative traduisant un arrêt de la production d'ATP. La cellule rentre dans un état de métabolisme anaérobie et permet une production minimale d'ATP. Le manque de ce dernier engendre l'inhibition des transporteurs actifs ATP dépendants. Les ions tels que le sodium se retrouvent augmentés en intracellulaire alors que le potassium est en baisse. En parallèle, la baisse du pH, provoquée par l'accumulation de protons suite à l'inhibition des pompes ATPases et de l'hydrolyse de l'ATP, active les échangeurs Na^+/H^+ qui participent aussi à l'augmentation de la concentration de sodium intracellulaire. Cette hausse de sodium intracellulaire déclenche des œdèmes, la désorganisation cellulaire et l'activation des transporteurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Inévitablement, ces événements entraînent l'augmentation du calcium dans le cytoplasme permettant d'activer divers systèmes enzymatiques cytotoxiques dépendants du calcium.

La réintroduction de l'oxygène, au moment de la reperfusion, induit la génération d'espèces radicalaires de l'oxygène due au métabolisme perturbé de la mitochondrie. Ceci entraîne l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale, responsable de plusieurs événements tels que le gonflement de la mitochondrie, l'arrêt de la production d'ATP et le relargage du cytochrome c [20][27].

4. STRESS OXYDANT

Dans des conditions physiologiques, les mitochondries produisent une faible quantité de radicaux libres de l'oxygène tel que le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le monoxyde d'azote (NO) et le radical peroxyde. Certains dérivés oxygénés réactifs sont non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène ou encore le peroxyde nitrite. Ils sont connus pour leur toxicité sur la cellule quand ils sont en excès, mais en quantité plus mesurée, ces radicaux libres participent aux fonctions cellulaires et à la transduction du signal.

Le stress oxydatif est une production excessive de radicaux libres oxygénés qui aboutit à un déséquilibre de l'homéostasie oxydoréductrice cellulaire. Ce déséquilibre est délétère pour un ensemble de molécules biologiques : les acides nucléiques, les lipides et les protéines. Cet effet conduit à des altérations de la signalisation cellulaire et de la transcription [28].

L'afflux brutal de l'oxygène retrouvé par le retour sanguin (reperfusion) provoque une explosion du stress oxydant pour laquelle les systèmes antioxydants sont dépassés. L'échappement des électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale entraîne, catalysés par des oxydases, la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Notamment par l'activation de la xanthine oxydase qui va produire des anions superoxydes suite à l'accumulation de l'hypoxanthine et au retour de l'oxygène. Lors d'une ischémie, l'augmentation du calcium intracellulaire aurait un rôle dans les processus de stress oxydant en activant la xanthine oxydase [20].

Au cours de la séquence d'I/R, eNOS et iNOS (*endothelial et inducible Nitric Oxyde Synthase*) contribuent à la production de NO. Ces radicaux libres, en présence de NO, donnent des ions peroxy-nitrites, molécules ayant un effet cytotoxique, et cette transformation limite la disponibilité du NO pour la vasodilatation [29].

5. APOPTOSE/NECROSE/MICROPARTICULES

D'un point de vue moléculaire, l'ischémie rénale augmente le ratio Bax/Bcl2 faisant pencher la balance en faveur des molécules pro-apoptotiques. Ces dernières sont impliquées dans la perméabilisation mitochondriale activant la voie des caspases, enzymes responsables de l'apoptose [30]. En effet la perte d'intégrité mitochondriale induit la fuite du cytochrome C et donc l'activation de l'apoptose caspases dépendante. De plus, l'augmentation du calcium intracellulaire active des protéases, comme les caspases, provoquant la désorganisation du cytosquelette et la mort cellulaire par apoptose. L'apoptose, aussi appelée la mort programmée des cellules, est un mécanisme important pour maintenir l'homéostasie cellulaire dans les tissus. Ce processus agit aussi comme un mécanisme de défense comme lors d'une réaction immunitaire ou bien quand les cellules sont endommagées par des agents infectieux ou des maladies. L'apoptose peut être déclenchée par divers stimuli que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques [31]. Lors de l'apoptose, la cellule rétrécit et le phénomène de pycnose (condensation de l'ADN) s'observe. Cette réduction cellulaire entraîne la densification du cytoplasme et les organites deviennent plus serrés. Le bourgeonnement de la membrane plasmique suivi de la fragmentation de l'ADN et enfin de la fragmentation cellulaire forment des corps apoptotiques. Ces derniers peuvent être composés de cytoplasme, d'organelles et de fragments nucléaires. Leur membrane

se distingue par l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS). Ces corps apoptotiques sont rapidement reconnus et phagocytés par les macrophages et les neutrophiles (figure 4). Une apoptose excessive ou défective peut être impliquée dans certaines pathologies. En effet, sa dérégulation peut être à l'origine d'une inflammation chronique [32]. Dans un modèle de rein perfusé, il a été montré que les cellules épithéliales du tubule proximal sont les cellules les plus sensibles lors d'une ischémie. Leur mort, par apoptose, réduit considérablement l'absorption des ions et de macromolécules. Les débris cellulaires entrent dans le lumen, s'agrègent et obstruent le tubule impactant directement le GFR [33]. Cette réduction de l'absorption par les tubules proximaux serait compensée par les tubules distaux [33]. Il a été montré que l'utilisation d'agents anti-apoptotiques aurait un effet positif sur la fonction rénale après l'ischémie mettant en évidence l'aspect néfaste de l'apoptose lors de cette séquence d'I/R [34]. Des études ont montré une augmentation de la cytokine TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*) lors d'une ischémie rénale. Cette cytokine est considérée comme un régulateur clé de l'inflammation et de l'apoptose. En effet, son rôle de ligand pour le récepteur TNF- α 1, exprimé sur les cellules endothéliales rénales, induit l'apoptose de ces cellules à travers la voie caspase 8 [33]. Le stress oxydant joue lui aussi un rôle important dans l'apoptose rénale surtout durant la reperfusion, soit par une transduction de signal ou directement en causant des dommages cellulaires notamment par des ROS qui activent l'apoptose à différentes étapes des voies de mort cellulaire [35]. Lors d'une ischémie, une déplétion de l'ATP s'observe au cours du temps. Ainsi, l'apoptose, qui est un phénomène actif nécessitant de l'ATP, se déclare plutôt en début d'ischémie où l'ATP est encore présent.

D'autres vésicules de plus petites tailles peuvent être formées durant le processus d'apoptose, les microparticules. Elles peuvent être aussi formées suivant divers stimuli tels que le stress oxydant et l'hypoxie. Les microparticules peuvent avoir comme origine rénale ; les cellules endothéliales et les podocytes [36].

A la différence de l'apoptose, la nécrose est un phénomène passif qui se manifeste de manière plus tardif durant l'ischémie [37]. La nécrose se caractérise par un gonflement du cytoplasme et mitochondrial avec une perte de l'intégrité de la membrane aboutissant à un relargage de molécules inflammatoires, les motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs). Ces molécules peuvent être composées de protéines chaperonnes, d'ATP, de fragments d'ADN et d'alarmines tel que HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1*) [38]. Ces molécules activent les TLR2 et TLR4 (*Toll-Like Receptors*) à la surface membranaire entraînant une réponse inflammatoire et cytotoxique (figure 4). Des nouvelles preuves ont mis en évidence des morts cellulaires hautement régulées mais non apoptiques gardant la morphologie de la nécrose (rupture de la membrane), la nécrose régulée. Parmi les nécroses régulées, les plus décrites dans le rein sont la nécroptose et la ferroptose mais

d'autres existent comme la pyroptose et la parthanatose [38]. Durant une I/R rénale, la majorité des dommages cellulaires serait causée par la nécrose [39].

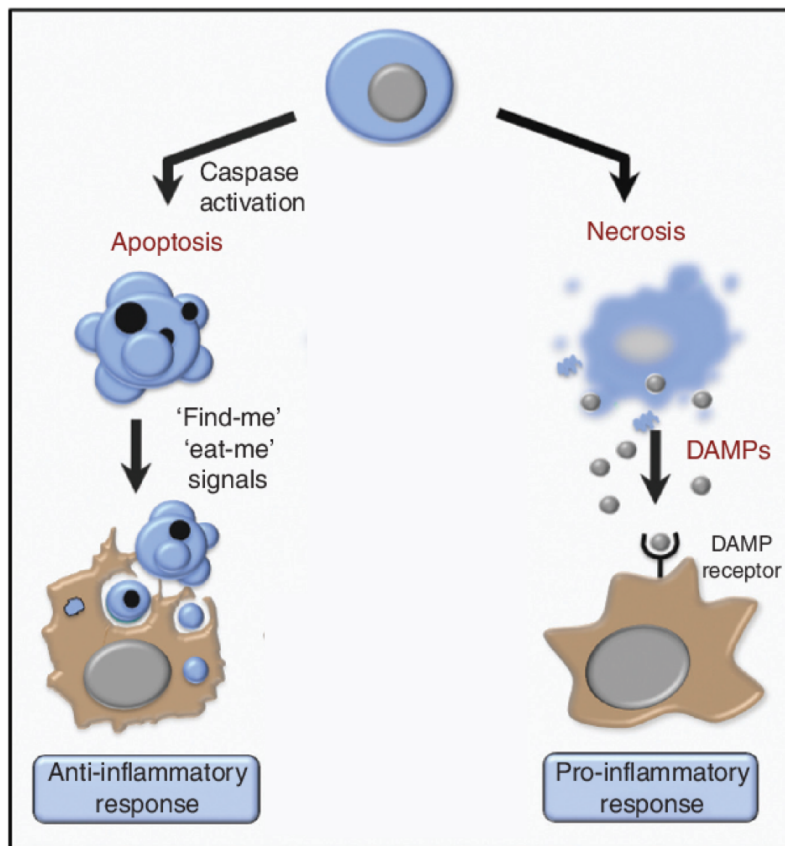


Figure 4 : Représentation schématique de l'impact de l'apoptose et de la nécrose sur la réponse inflammatoire

L'apoptose se caractérise par une fragmentation de la cellule donnant lieu à des vésicules intègres. Ces vésicules exposent des signaux « trouvez-moi » et « mangez-moi » pour être rapidement phagocytées afin d'éviter une réponse inflammatoire. A l'inverse, la nécrose se décrit comme une rupture de la membrane cellulaire provoquant la mise en circulation de molécules DAMPs. A travers leur récepteur, les DAMPs activent la réponse pro-inflammatoire. Adapté de Davidovich et al, 2014

6. INFLAMMATION

L'inflammation se définit comme une réaction du système immunitaire suite à une agression externe ou interne. Le but de ce processus est d'éliminer les pathogènes, de nettoyer le tissu lésé et d'induire la réparation de ce tissu.

L'augmentation du calcium intracellulaire, suite à l'ischémie, est impliquée dans la synthèse des médiateurs lipidiques (ex : prostaglandines) déclenchant le processus inflammatoire. Lors d'une ischémie, des réponses adaptatives sont mises en place. En effet, la diminution en oxygène active un facteur de transcription, bien connu, HIF-1 (Facteur induit par l'hypoxie 1) qui agit sur

l'expression de protéines liées à l'érythropoïèse, l'angiogenèse et à l'adaptation métabolique. De plus, le phénomène d'ischémie stabilise la NF κ B (*Nuclear factor-kappa B*), facteur de transcription et acteur du développement du processus inflammatoire (figure 5).

Les cellules les plus précocement lésées sont les cellules endothéliales qui vont perdre leur fonction de barrière et entraîner l'expression de cytokines/chimiokines, de récepteurs et de molécules d'adhérence. Ces expressions sont essentielles au recrutement leucocytaire et ont une action sur le développement des lésions et la désorganisation cellulaire [20]. La reperfusion déclenche une vague inflammatoire se divisant en deux parties. Au cours de la première semaine de reperfusion, l'immunité innée entraîne le recrutement et l'activation des cellules monocytaires/macrophages, des polynucléaires neutrophiles et des cellules dendritiques. La production de molécules immunoréactives, tels que les DAMPs, les ligands des TLR, ajoutée à la sécrétion de cytokines/chimiokines et à l'expression de molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales, favorisent le recrutement leucocytaire. De plus, le recrutement des leucocytes causé par la mort cellulaire altère le flux sanguin rénal au niveau des capillaires périrubulaires par engorgement de l'infiltration des leucocytes prolongeant ainsi l'ischémie [40].

Lors d'une transplantation, le recrutement des lymphocytes T et la mise en place de la réponse immunitaire adaptative s'observe dans un second temps, et cette réponse s'amplifie en fonction de l'allogénicité du transplant.

Plus tardivement, l'inflammation chronique et l'activation de voies profibrosantes, comme le TGF- β (*Transforming growth factor-beta*), contribuent au développement des altérations tissulaires par la formation d'un tissu cicatriciel, la fibrose, correspondant à une synthèse accrue de collagène dans le milieu interstitiel [20]. Les cellules nécrotiques ont un rôle particulièrement important dans l'activation de l'inflammation. Comme expliqué précédemment, la nécrose provoque la lésion de la membrane relarguant le contenu dans le milieu extracellulaire. Certaines molécules, comme HMGB1, les histones, les protéines chaperonnes... ont la capacité d'activer les récepteurs TLRs. Ces récepteurs sont exprimés sur les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules dendritiques, les lymphocytes et les monocytes/macrophages [41]. Lors d'une ischémie, les cellules endothéliales et tubulaires sont plus sensibles à la mort cellulaire. La perturbation de leur intégrité initie le processus inflammatoire par le relargage de diverses molécules pro-inflammatoires tels qu'IL-1, IL-6, IL-8, TGF- β , TNF- α , MCP-1... [42][43]. IL-6 a été démontré comme étant un marqueur de facteur de risque dans le sérum chez le patient souffrant d'une lésion aiguë rénale (AKI) [44]. En réponse à HMGB1, TLR-4 est le récepteur responsable de la production d'IL-6 en post-ischémie [45]. Une étude a été faite avec des leucocytes de souris exprimant TLR-4 injectés dans les reins de souris n'exprimant pas TLR-4, l'équipe n'a observé aucune diminution de la fonction rénale après une I/R rénale [45]. TLR-2 est aussi un régulateur

important dans la réponse pro-inflammatoire. Suite à une ischémie aiguë, son expression augmente dans les cellules épithéliales tubulaires rénales. Sur un modèle de souris, son inactivation protège l'animal contre l'ischémie rénale aiguë. De plus un modèle de souris déficient pour TLR-2 a montré une réduction de molécules pro-inflammatoires entraînant une baisse de l'infiltration des neutrophiles [46].

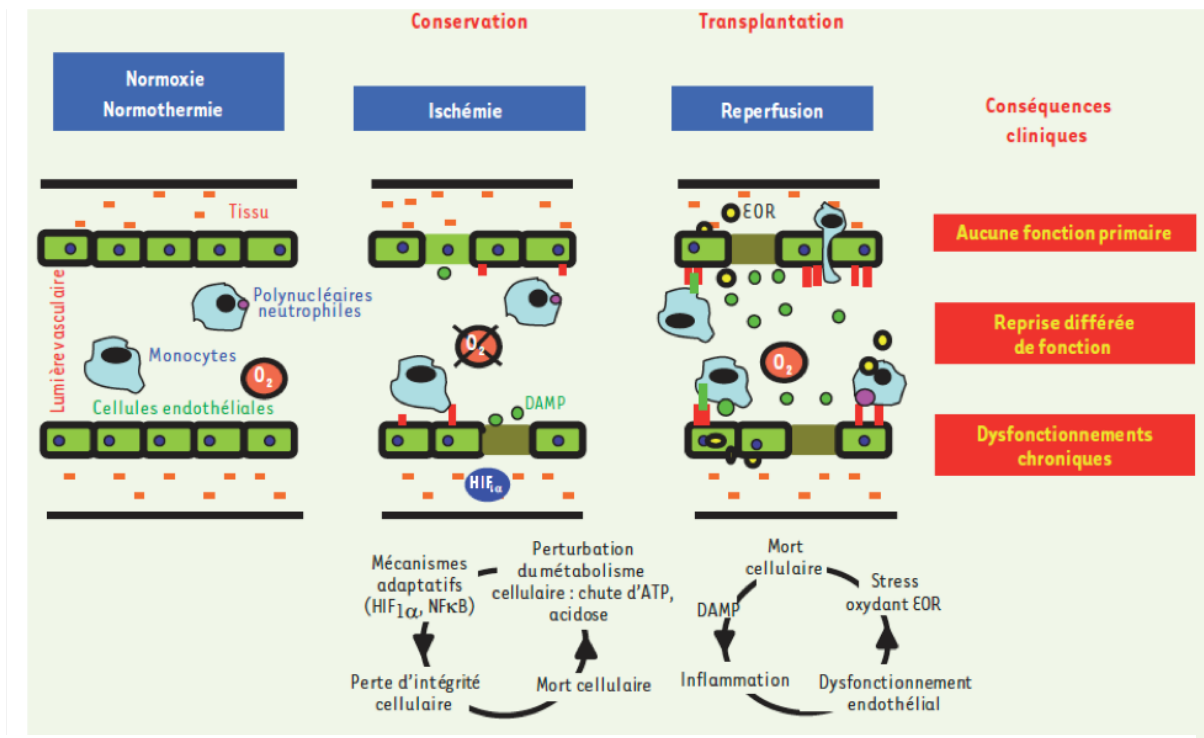


Figure 5 : Principales conséquences cellulaires et cliniques de l'I/R rénale

Lors d'une ischémie rénale, la chute de l'oxygène va activer des mécanismes adaptatifs tels que l'angiogenèse par l'induction du facteur HIF-1 et l'activation de l'inflammation via $NF\kappa B$. Ces phénomènes entraînent la perte de l'intégrité des cellules, notamment les cellules endothéliales, puis la mort cellulaire. Au cours de la reperfusion, le retour de l'oxygène déclenche une explosion du stress oxydant provoquant la mort cellulaire. Les cellules mourantes libèrent des molécules DAMPs, responsables de la réponse inflammatoire et le recrutement leucocytaire. (DAMP : damage-associated molecular pattern, HIF1 α : hypoxia inducible factor 1 α , $NF\kappa B$: nuclear factor κB , εOR : espèces réactives de l'oxygène. Favreau et al, 2013)

a. NEUTROPHILES

Les neutrophiles sont des cellules leucocytaires abondantes dans le sang (50-75 %) chez l'Homme [47]. Ils ont diverses fonctions impliquant la défense contre les bactéries, les champignons et autres infections. Les neutrophiles sont spécialisés dans la phagocytose, l'adhérence, la chimiotaxie et la sécrétion d'activateurs du système immunitaire [48]. A l'inverse des macrophages, les neutrophiles n'existent pas sous la forme « résidente » dans un organe. Ils sont produits en grande quantité dans la moelle osseuse, prêts à être déployés dans la circulation

sanguine. De plus, pour éviter une inflammation excessive, les neutrophiles ont une durée de vie plutôt courte [49]. Dans l'I/R rénale, les neutrophiles sont les premiers à répondre sur le site de lésion, ils produisent diverses cytokines et chimiokines. Les neutrophiles s'accumulent principalement dans l'espace périrubulaire de la médullaire externe après une ischémie. Cette infiltration se fait à l'aide des cellules endothéliales qui expriment des molécules d'adhésion tel que les intégrines [50]. Après de nombreux désaccords dans la communauté scientifique, Awad et son équipe ont mis en évidence, en plus de l'accumulation des neutrophiles dans l'interstitium, que les neutrophiles entraînent la perméabilité vasculaire et des lésions tubulaires endommageant inexorablement le rein [51]. Le processus impliqué, par les neutrophiles, pour induire les lésions tubulaires est appelé la NETose (*Neutrophil Extracellular Traps*), processus découvert par Brinkmann *et al* en 2004 [52]. Durant ce phénomène, les histones sont clivées par l'élastase neutrophile et citrullinées par la peptidyl arginine déiminase 4 (PAD4), permettant la décondensation et le relâchement de la chromatine. Le mélange des composants cytoplasmiques, granulaires et nucléaires est possible grâce à la rupture conjointe des membranes nucléaires et granulaires. la rupture de la membrane plasmique engendre la libération des NET (figure 6) et des molécules pro-inflammatoires tel que IFN- γ (Interféron gamma) [53]. Il a été montré que la nécrose de cellules tubulaires peut amorcer les neutrophiles pour la formation de la NETose et qu'elle-même induit la nécrose des cellules tubulaires formant ainsi un cycle [54]. Plusieurs publications ont montré l'importance de PAD4 dans l'ischémie rénale. En effet, son inhibition lors d'une I/R rénale protégerait contre les lésions aiguës du rein. De plus, PAD4 serait lié, par l'interaction avec NF κ B, pour la production de cytokines pro-inflammatoires. La déficience de PAD4 diminuerait les cytokines pro-inflammatoires tels que : TNF- α , IL-6, IL-8 mais renforcerait l'expression d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire [55][56][57]. Dans les micro-vaisseaux, NET peut attraper les cellules ou des débris cellulaires pour former des "thrombi", cela obstrue le vaisseau et induit une ischémie persistante (figure 6) [58]. Afin de maintenir l'homéostasie, les NET sont ensuite dégradées par l'action de la DNase 1 et par l'endocytose impliquant les macrophages [53].

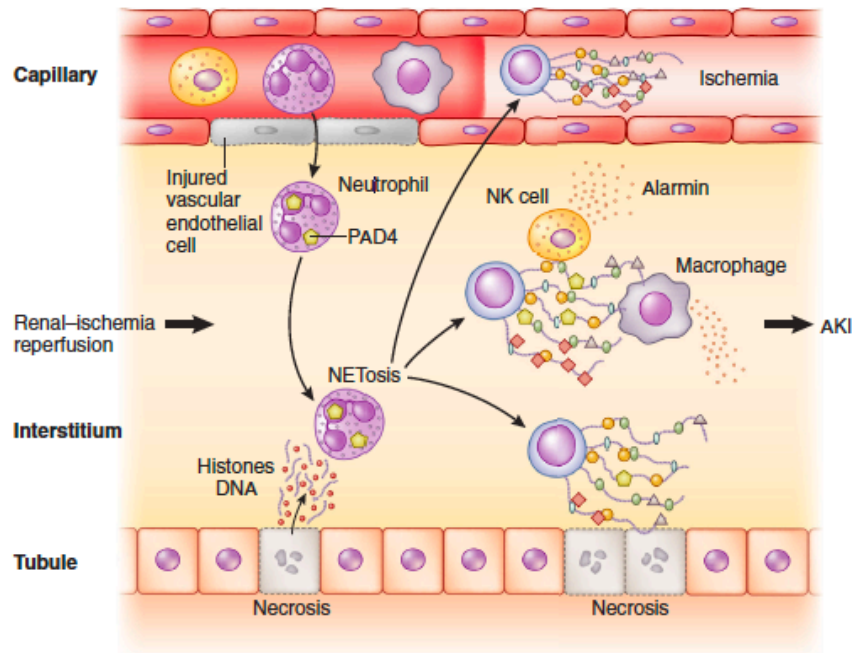


Figure 6 : Représentation schématique de la NETose dans l'I/R rénale

La NETose est un phénomène médié par les neutrophiles. Ces neutrophiles sont recrutés par les lésions cellulaires suite à l'I/R. Une fois sur le site lésé, les neutrophiles libèrent leur contenu cellulaire tel que l'ADN qui est décondensé, notamment par PAD4. Ce phénomène a pour conséquence la libération de molécules pro-inflammatoires mais il entraîne des lésions. Par cette libération, la NETose peut activer les macrophages et les NK cell induisant une production de molécules pro-inflammatoires. La NETose se retrouve aussi dans les micro-vaisseaux et provoque la formation de « thrombi » en piégeant des cellules et des débris cellulaires. Ce phénomène induit une ischémie persistante Liu et al, 2018

b. MACROPHAGES

Les macrophages sont des cellules multifonctionnelles, bien connus pour leur rôle phagocytaire. Ils sont impliqués dans la défense de l'hôte, le développement du tissu, l'homéostasie par la clairance des débris ainsi que la réparation du tissu et de la fibrose [59]. Les macrophages, en général, ont une origine hématopoïétique et proviennent directement des monocytes. Les reins possèdent des macrophages dits « résidents ». Ces macrophages permettent de maintenir la santé et la fonction rénale [60].

Après une I/R rénale, deux types de macrophages (M1 et M2) interviennent sur les lésions. Les macrophages de type pro-inflammatoires, M1, sont les premiers à arriver sur les lésions. Le principal rôle des macrophages M1 est la défense de l'hôte, médiée par l'activité antimicrobienne et l'expression des gènes pour la présentation de l'antigène. M1 peuvent causer des dommages au tissu mais ils ont un important rôle dans la clairance des cellules apoptotiques et les débris cellulaires après les liaisons permettant l'initiation de la réponse réparatrice [61]. Ils expriment

des médiateurs pro-inflammatoires tels qu'IL-1, IL-12 et iNOS. Ce recrutement implique le relargage de chimiokines tels que MCP-1 et la fractalkine qui agissent sur les récepteurs de surface des monocytes. CCR2 (*C-C chemokine receptor type 2*) est le récepteur chimiokine qui régule le recrutement des monocytes pro-inflammatoires dépendant de MCP-1 médiant des lésions précoces sur les tubules après une I/R rénale [61]. L'utilisation d'un modèle de souris invalidées pour CCR2 (CCR2^{-/-}) a mis en évidence qu'une injection de monocytes CCR2^{+/+} dans le rein de ces souris 24 h après une I/R provoquerait des lésions tubulaires [62][63]. Le microenvironnement généré par une I/R rénale, via les neutrophiles, les DAMPs, les ROS, induit la différenciation des monocytes en macrophages M1 à travers l'activation de STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) et TLR/NFκB par IFNδ et DAMPs respectivement [61]. IFNδ agit à travers le récepteur IFNGR (*Interferon-gamma receptor*) situé à la surface du macrophage. Ce récepteur va activer la voie de signalisation JAK1 (*Janus Kinase*)/2-STAT1 permettant l'expression de molécules pro-inflammatoires : MCP-1, MIG (*Monokine induced by interferon-gamma*). Ces molécules permettent le recrutement des monocytes et des cellules T respectivement sur le site de l'inflammation [64]. IFNδ permet aussi l'expression d'iNOS dans M1, cette enzyme va produire du NO qui va générer, en réagissant avec des ROS, des peroxy-nitrites qui ont un effet cytotoxique [65]. Les DAMPs, produits par les cellules lésées, tels que HMGB1, ATP, les protéines de matrice extracellulaire et nucléiques sont reconnues par les PRR (famille comprenant les TLR) [66]. PRR (*Pattern recognition receptor*) active des voies intracellulaires via des facteurs de transcription tels que NFκB et IRF5 (*Interferon regulatory factor 5*) [67]. Ces facteurs vont induire des réponses inflammatoires complémentaires via IL-1, IL-6, IL-12 et TNF-α.

La phase réparatrice est un mécanisme plus tardif après l'ischémie-reperfusion rénale. Elle est médiée en partie par les macrophages de type M2 dit immunorégulateurs. Ces macrophages possèdent diverses fonctions : cicatrisation, immunosuppression, pro-fibrosant, sensibilité à l'insuline [61]. Le mécanisme par lequel les macrophages M1 évoluent en M2 reste à définir. Néanmoins, il est bien connu que lors de la phagocytose des cellules apoptotiques, l'IL-10, et les prostaglandines altèrent l'expression des molécules pro-inflammatoires des M1 pour promouvoir l'activation des macrophages anti-inflammatoires avec l'augmentation de la production d'IL-10 et du TGF-β [68][69]. Une étude a montré que la stimulation par l'IFNγ de macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMM) permet d'obtenir des macrophages M1. L'injection de ces macrophages dans une souris durant la phase de lésion n'entraîne pas le changement du phénotype du macrophage alors que lorsqu'ils sont injectés durant une phase réparatrice (3 jours post-ischémie), les BMM M1 deviennent des macrophages de type M2, caractérisés par la perte d'expression d'iNOS et l'augmentation des récepteurs de mannose (MR) dans le rein. Le microenvironnement permet une réponse dynamique des macrophages [70]. IRF4 (*Interferon regulatory factor 4*) est un facteur de transcription important pour l'activation des macrophages

M2 dans IR rénale [71]. De même, le facteur de transcription p53 (*Tumor protein 53*), connu pour réguler le cycle cellulaire, l'autophagie ou l'apoptose, serait impliqué dans la suppression des M1 ou l'activation des M2 [72]. Plusieurs sous populations de M2 ont été décrites : M2a, M2b, M2c, M2d [73]. Les macrophages M2 interviennent spécifiquement dans la cicatrisation et sont stimulés par IL-4/IL-13 qui vont activer, par la voie JAK-STAT6, ARG1 (Arginase 1), MR, IGF1 (*Insulin-like growth factor-1*), FIZZ1 et Ym1 [74]. Ces effecteurs vont être impliqués dans la prolifération cellulaire, la synthèse de collagène, la production de matrice extracellulaire. Ces actions permettent la cicatrisation mais une mauvaise régulation de ces mécanismes peut engendrer de la fibrose. Sous des conditions idéales, il existe une fine balance entre l'expression de molécules inflammatoires et anti-inflammatoires pour maximiser la réparation et le retour homéostatique. Malheureusement, une hypoxie prolongée provoque des lésions aiguës du rein entraînant une réparation anormale de l'organe et par conséquent des dysfonctionnements rénaux chroniques [61].

L'I/R est une séquence délétère entraînant la mort cellulaire par apoptose et par nécrose. Ce stress cellulaire génère la formation de microparticules. Ces dernières ont montré leur implication dans la communication intercellulaire notamment dans la réponse inflammatoire.

CHAPITRE II : MICROPARTICULES (MPs)

Les cellules relâchent des vésicules dans le milieu extracellulaire sous des conditions normales ou de stress. Par le passé, ces vésicules étaient considérées comme des débris inertes. Aujourd'hui, il est clair que ces vésicules ont un rôle dans la communication intercellulaire.

I. GENERALITES

Les microparticules (MPs) sont des fragments submicroniques de membrane plasmique ayant un diamètre entre 50 à 1000 nm. Cette vésicule dérivée des cellules se forme par « *blebbing* » de la membrane plasmique et elle est excrétée dans le milieu extracellulaire. Sa composition comprend les protéines membranaires et du matériel cytosolique (enzymes, ARN, microARN) de leur origine cellulaire. La formation des MPs a été observée dans différents types cellulaires : cellules endothéliales, plaquettes, leucocytes, érythrocytes, podocytes ... [75]. Les MPs sont libérées sous des conditions de stress cellulaires tel que l'apoptose mais aussi par l'activation des cellules (cellules endothéliales et plaquettes) [76]. Parmi les vésicules, les MPs se distinguent des exosomes et des corps apoptotiques par leur taille, leur formation et leur contenu. Les exosomes s'identifient par un diamètre variant entre 40 et 100 nm. Le relargage des exosomes s'effectue, dans un premier temps, par un bourgeonnement de la membrane et la formation de ces vésicules. Ils s'accumulent pour former des corps multivésiculaires et fusionnent avec la membrane plasmique pour être ensuite relargués dans le milieu extracellulaire. Les corps apoptotiques ont une taille supérieure aux MPs, 1 à 5 μm . Ils sont formés, lors de l'apoptose, par le rétrécissement de la cellule et la condensation de l'ADN qui se finalise par la fragmentation de l'ADN cellulaire formant les corps apoptotiques. Leur contenu se compose de matériel nucléaire, cytosolique et membranaire ainsi que d'organites cellulaires. Un point commun avec les MPs est l'exposition de la phosphatidylsérine (PS) sur leur membrane (figure 7) [75].

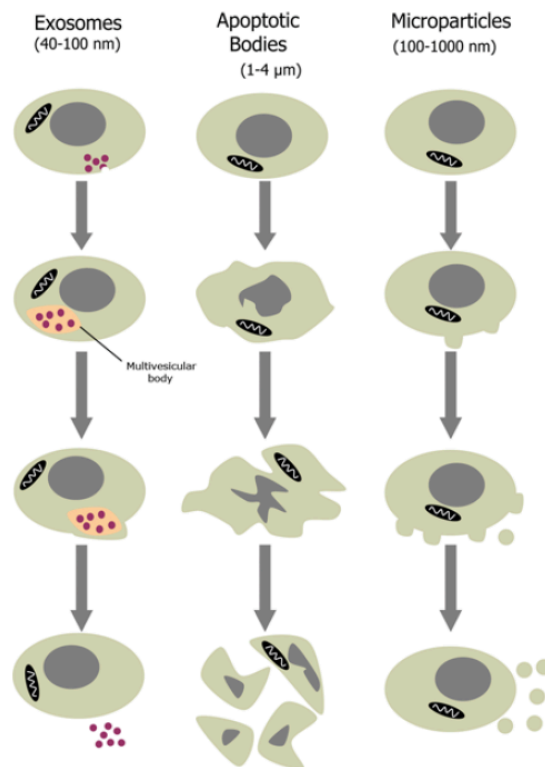


Figure 7 : Formation des différents types de vésicules

Les exosomes s'accumulent pour former des corps multi-vésiculaires au sein de la cellule. Ces corps fusionnent ensuite avec la membrane plasmique pour relarguer les exosomes. La formation des corps apoptotiques est provoquée par la fragmentation de la cellule. Les MPs sont générés par bourgeonnement de la membrane plasmique « blebbing ».Burger et al, 2013

II. FORMATION DES MPs

Le relargage des MPs est contrôlé par une variété de stimuli incluant des stimulations pro-apoptotiques, des forces de cisaillements, des agonistes ou des dommages [77]. Des stimuli ont été identifiés comme régulateurs positifs ou négatifs de la formation des MPs. Par exemple, dans les plaquettes, certaines molécules pro-inflammatoires telles que IL-6, LPS (Lipopolysaccharide) mais aussi la thrombine sont des stimuli qui profitent au relargage des MPs. Dans les cellules endothéliales, une multitude de stimuli ont été évalués positifs à l'émission de MPs : TNF- α , LPS, IL-1 α , ROS, force de cisaillement (*in vivo*) ; alors que le NO ou un traitement par les statines suppriment la production de MPs. Les monocytes peuvent former des MPs, là aussi, par l'action du TNF- α ou du LPS et les macrophages par l'action des ligands des récepteurs TLR 3 et 4 (figure 8) [75].

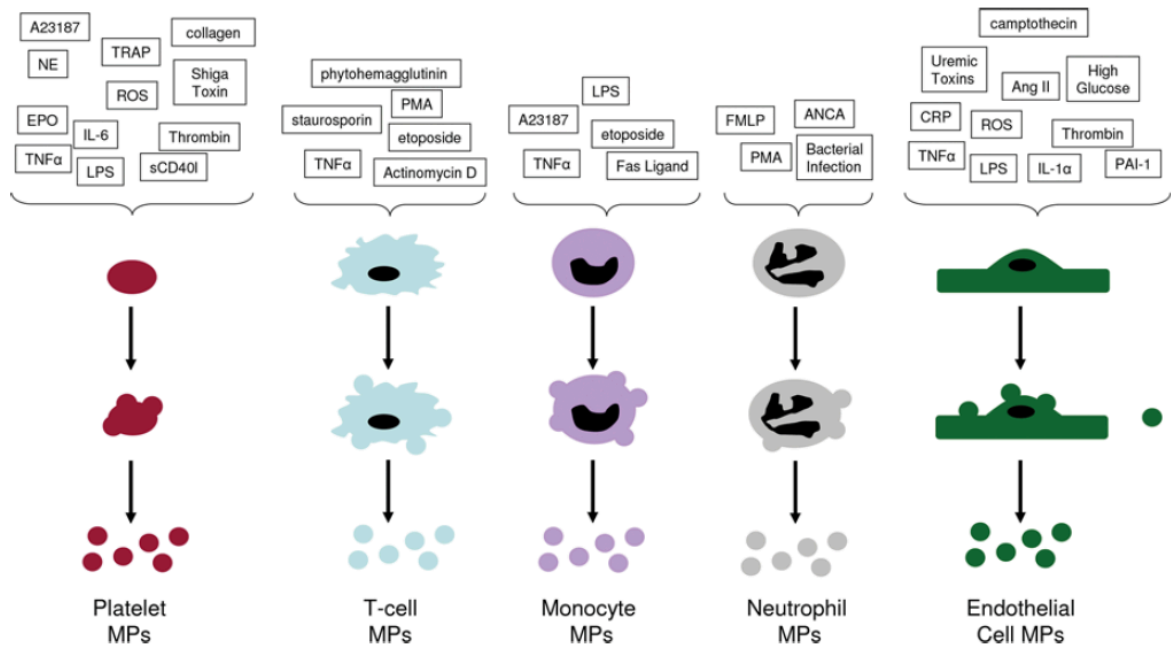


Figure 8 : Stimuli identifiés pour l'émission de MPs d'origines plaquettaire, endothéliale et leucocytaire

Burger et al, 2013

La formation des MPs s'observe par un « *blebbing* » vers l'extérieur faisant intervenir le réarrangement du cytosquelette. Le mécanisme de formation n'est pas encore bien établi mais il semblerait que l'actine soit impliquée pour la formation des MPs. En effet, l'inhibition de sa polymérisation augmente la formation de MPs [78]. Rho kinase, régulateur de MLCK (kinase de la chaîne légère de la myosine), intervient également dans le processus de formation par la contraction de la membrane [79]. De plus, la calpaïne, une protéase à cystéine dépendante du calcium, est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette par le clivage de certaines protéines du cytosquelette tel que la myosine [80]. L'externalisation de la PS fait partie intégrante de la formation des MPs. Ce processus implique 3 types d'enzymes : les floppases, les flippases et les scramblases. Les floppases, en utilisant l'ATP, permettent la translocation des lipides du feuillet cytoplasmique vers le côté extracellulaire contrairement aux flippases qui font ce transport dans la direction opposé. Alors que les scramblases, dépendant du calcium, assurent le mouvement des phospholipides suivant leur gradient de concentration. Suite à un stimulus tel que l'apoptose, le calcium intracellulaire augmente et provoque l'inhibition des flippases et l'activation des floppases et des scramblases. Ces phénomènes engendrent la translocation de la PS sur le feuillet externe de la membrane. L'inhibition des flippases ralentit le transport inverse et entraîne une surcharge lipidique du feuillet externe qui s'observe par la vésiculation, combinée avec la dégradation du cytosquelette, l'effet « *blebbing* » se met alors en place contribuant à la génération des MPs (figure 9).

Des études ont supposé que certaines populations de MPs n'externalisent pas la PS suite à des MPs négatifs au marquage de l'Annexine V mais positifs à un marqueur spécifique de l'origine des MPs tel que CD61, molécule interagissant avec la PS. Cette hypothèse est à prendre en compte, néanmoins, il est aussi à considérer que le niveau de l'externalisation peut être en dessous du seuil de détection [81].

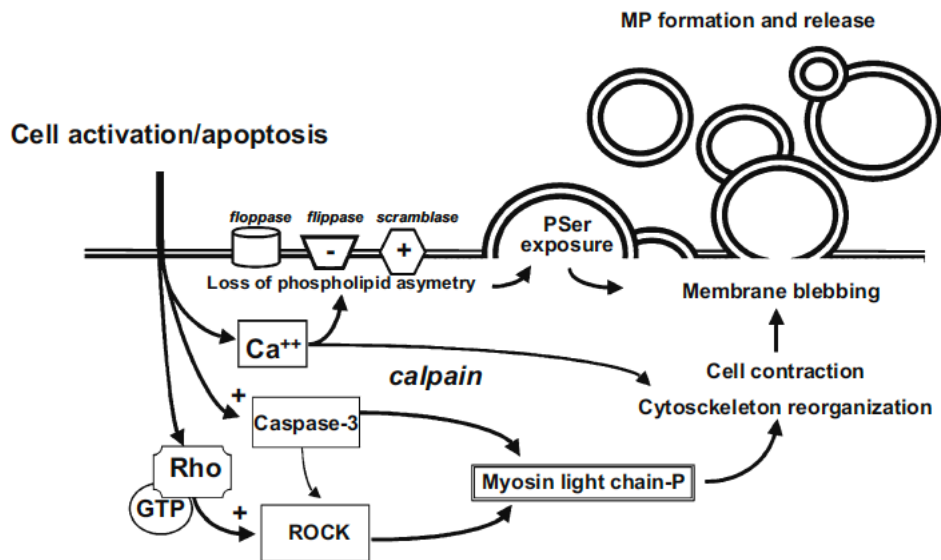


Figure 9 : Mécanismes impliqués dans l'émission des MPs suite à un stimulus

La formation des MPs fait intervenir l'externalisation de la PS. Ce phénomène implique trois types d'enzymes : les floppases, les flippases et les scramblases. L'augmentation du calcium permet un déséquilibre au sein de ces trois enzymes qui se traduit par la translocation de la PS sur le feuillet externe de la membrane. De plus, la formation des MPs demande une réorganisation du cytosquelette déclenchée par le clivage, via la calpaïne de certaines protéines telles que la myosine. Cette réorganisation du cytosquelette est suivie par le bourgeonnement de la membrane plasmique qui permet de générer les MPs. PSer : phosphatidylsérine (PS)
Chironi et al, 2009

III. CARACTERISATION DES MPS

La majorité des études se concentrent sur les MPs isolées d'un échantillon de plasma. Les MPs étudiées sont généralement les MPs d'origine plaquettaires (PMPs), endothéliales (EMPs), leucocytaires (LMPs) ou érythrocytaires. D'autres populations cellulaires peuvent former des MPs mais leur relargage dans l'espace extracellulaire limite leur caractérisation. Néanmoins, différentes populations de MPs peuvent être trouvées dans la salive, les urines, le liquide de lavage broncho-alvéolaire ... [75]. Pour permettre la caractérisation et la quantification des MPs, la technique la plus communément utilisée est la cytométrie en flux. Son principe est basé sur l'utilisation de sondes fluorescentes et la diffusion de la lumière. Cependant, les cytomètres

conventionnels connaissent des limites de tailles détectables, la diffusion de la lumière ne serait pas capable de détecter des MPs possédants un diamètre inférieur à 300-400 nm sous la forme d'unité séparée. Ainsi, un seul évènement peut comprendre plusieurs vésicules. Afin de définir la population des MPs, il est généralement utilisé une solution composée de billes de différentes tailles connues. Par l'utilisation d'anticorps conjugué à un fluorochrome spécifique à un antigène de surface et l'annexine V qui se fixe sur la PS externalisée, la cytométrie en flux permet la détermination de l'origine de la MP mais aussi l'énumération de la totalité des MPs présentes dans la suspension [82].

D'autres alternatives à la cytométrie en flux existent tel que la technique ELISA qui a l'avantage de s'affranchir des restrictions de tailles et de proposer une évaluation semi quantitative des MPs [83]. D'autres techniques, décrites dans le tableau 2, sont utilisées, pour caractériser les MPs.

Tableau 2 : Les différentes méthodes pour caractériser et quantifier les MPs

Traduit de Burger et al, 2013

Protocole	Méthode de quantification	Avantages	Inconvénients
Cytométrie de flux	Utilisation de sondes de fluorescence et de propriétés de diffusion de la lumière des MPs en suspension	Disponible pour la plupart des installations de recherches Rapide Plusieurs antigènes peuvent être analysés dans un seul échantillon MPs analysées individuellement	Limite de taille et impossibilité de détecter des MPs inférieur à 300-400 nm Identification de l'origine cellulaire dépend des anticorps
ELISA	Immunocapture des MPs et quantification basée sur la présence d'antigène de surface	Disponible pour la plupart des installations de recherches Facile, pas de restrictions de taille	Analyse effectuée par lots Aucune détermination de taille possible Quantification sur la base d'un antigène
Essais fonctionnels	Activité procoagulante ou prothrombinase des MPs	Disponible pour la plupart des installations de recherches Fournit une indication de l'activité biologique	Analyse effectuée par lots Aucune détermination de taille possible Mesure de l'activité procoagulante
Microscopie à force atomique	Numérisation des MPs en utilisant un microscope spécialisé	Détection précise de la taille des MPs Permet la détection de la structure 3D des MPs Quantification des MPs	Technologie non universelle Détermination de l'origine des cellules nécessite le développement de surfaces coatés d'anticorps spécialisés Ne convient pas pour un grand nombres d'échantillons
Nanoparticle tracking	Propriétés de diffusion de la lumière des MPs détectées Capture vidéo du mouvement des MPs	Détection de la taille des MPs Quantification des MPs	Technologie peu disponible Temps d'analyse longs Couteux

IV. EFFETS BIOLOGIQUES DES MPs

Par le passé, les MP étaient considérées comme des débris cellulaires inactifs. Aujourd'hui, ce sont des éléments importants à la communication entre les cellules et à la régulation de processus physiologiques et pathologiques.

1. COAGULATION

Une des propriétés les plus décrites des MPs est son activité pro-coagulante. Leur taux élevé dans les troubles hypercoagulants suggère une participation dans ce processus. Cette propriété a été décrite par l'intervention de la PS. Ce phospholipide chargé négativement permet la liaison avec des domaines cationiques de protéines de coagulation qui, à terme et par l'assemblage des facteurs de coagulation, forment la thrombine [84][85]. Le facteur tissulaire (TF) est un élément important dans les phases précoces de la coagulation, il forme le complexe avec FVIIa permettant l'initiation de la coagulation. Ce facteur tissulaire serait présent sur certaines populations de MPs tels que les MPs d'origine de monocytes et d'EMPs [86][87]. Une étude a montré, *in vitro*, que les PMPs sont 50 à 100 fois plus pro-coagulantes que les plaquettes activées [88].

2. STRESS OXYDATIF

Les MPs ont la capacité de produire des ROS notamment les EMPs par la réduction du NO et l'augmentation des anions superoxydes dans les anneaux aortiques de rats [89]. Cependant, une autre étude met en évidence que les MPs préservent l'activité de eNOS dans des conditions physiologiques alors que, dans des maladies cardiovasculaires, les MPs sont délétères pour l'activité de la eNOS [90]. Mahmoud *et al* ont cherché à étudier l'implication des EMPs dans la production des MPs par les cellules endothéliales. Ils ont utilisé un modèle de stress oxydatif *in vitro* (HUVECS) et *ex vivo* (anneaux aortiques de souris) en présence d'acide gras saturé, le palmitate. Cet acide gras induit la production de ROS en augmentant l'activité et l'expression de l'oxydase NADPH et régule négativement la eNOS. La co-incubation des EMPs avec les cellules restaure la production du NO. Ils suggèrent que cette restauration passe par les voies Akt (Protéine kinase B)/eNOS et Nrf2 (*Nuclear Factor Erythroid-2-related factor 2*)/ARE (*Anti-Oxydant Response*). Cette dernière induit l'expression d'antioxydants tels que SOD (*Superoxide Dismutase*). A l'inverse, l'application des EMPs, dans des conditions physiologiques, réduit Nrf2 et augmente la production de ROS. Suite à cela, les auteurs suggèrent que les EMPs jouent un double rôle qui dépend de l'environnement physiologique ou pathologique [91]. D'autres études ont mis en évidence que, suivant l'origine des MPs, la production de ROS peut être accentuée ou réduite et réciproquement pour le NO et l'expression de eNOS. En effet, les MPs provenant des cellules T diminuent la production des ROS [92] alors que les MPs d'origine monocytaires ont un effet pro-oxydant [93].

3. INFLAMMATION

Une variété de molécules pro-inflammatoires est à l'origine de la production des MPs et en retour, ces derniers peuvent contribuer à la réponse inflammatoire. De ce fait, la co-incubation de cellules endothéliales avec des LMPs provoque la libération de cytokines inflammatoires, IL-6 et MCP-1 [94]. Les MPs des cellules T favorisent la production de TNF- α , IL-1 β par les monocytes [95]. Le relargage de MPs de ces derniers stimule la sécrétion de IL-8 et MCP-1 par les cellules épithéliales humaines des voies respiratoires [96]. Les MPs des monocytes et les EMPs entraînent la production de IL-6 et MCP-1 par les podocytes [97]. De plus, les MPs de monocytes et de neutrophiles ont été rapportées dans l'activation de NF κ B et l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion [98]. A l'inverse, les EMPs n'ont aucun effet sur le relargage de cytokines/chimiokines provenant des cellules endothéliales mais les cellules apoptotiques permettent ces effets [99]. D'une autre manière, les MPs agissent sur l'inflammation en favorisant les interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales. Par exemple, les PMPs augmentent l'expression de ICAM (*Intercellular adhesion molecule*), molécule d'adhésion [100]. De même, les EMPs augmentent aussi l'expression des molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales et participent à la migration transendothéliale des monocytes [79][101]. Ainsi, les MPs jouent un rôle potentiel sur l'infiltration des leucocytes [102], les MPs seraient également impliquées dans ce processus [79]. D'autres études ont mis en évidence le rôle des MPs dans la réponse inflammatoire par l'administration exogène de MPs à des rats. Ceux-ci ont développé des lésions pulmonaires aiguës démontrées par l'élévation des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF- α) dans le système systémique et alvéolaire et par l'infiltration de neutrophiles dans l'espace périvasculaire [28][29]. L'injection de MPs d'origine de sang humain atteint de sepsis a montré, chez les souris, une augmentation de l'expression d'iNOS, de COX-2 (Cyclooxygénase 2) et de NF κ B dans le cœur et les poumons [105].

4. AUTRES

Les MPs sont aussi impliquées dans d'autres mécanismes tels que la régulation de l'angiogenèse. Par exemple, les PMPs ont été montrées comme étant impliquées dans la prolifération, la survie, la migration et dans la formation des tubes des HUVECs [106]. De plus, l'injection de ces MPs chez le rat augmente la densité des capillaires après l'ischémie dans un modèle d'ischémie myocardique [107].

Un autre mécanisme dans lequel les MPs peuvent intervenir est l'apoptose notamment les MPs d'origine monocyttaire ou, érythrocytaire, les EMPs et les PMPs qui contiennent de la caspase 3.

Ainsi, il a été proposé que ces MPs délivrent cette caspase dans les cellules et induisent ainsi l'apoptose de ces dernières [108].

Il est intéressant de noter que dans des MPs isolées de plaques athérosclérotiques, la présence de ADAM17 (*ADAM metallopeptidase domain 17*) a été détectée [109].

V. MPs ET LES PATHOLOGIES

1. BIOMARQUEURS

Les biomarqueurs sont des caractéristiques mesurables et utilisés comme indicateurs de processus biologiques normaux ou pathologiques. Dans des cas pathologiques, le biomarqueur recherché permet une détection précoce de la pathologie pour faciliter une intervention efficace. Ainsi, beaucoup de recherches se sont concentrées sur le potentiel des MPs à être utilisées comme biomarqueurs pour diverses pathologies. Barteneva *et al* ont recensé une grande variété de pathologies impliquant la variation de différentes populations de MPs [82]. Dans l'ensemble, les MPs augmentent sous des conditions pathologiques et l'élévation peut être corrélée à la sévérité de la maladie. Généralement, l'action des MPs est associée à l'inflammation, la coagulation et les lésions endothéliales. Dans cette partie, quelques pathologies choisies sont décrites.

2. MPs ET L'I/R

L'I/R d'un organe, décrit dans le chapitre I, s'observe principalement par une phase précoce, le stress oxydant, et une phase plus tardive, la réponse inflammatoire. Pendant cette dernière, il a été montré que les plaquettes, les cellules endothéliales et les leucocytes génèrent des MPs. L'étude suivante a cherché, sur un modèle d'I/R hépatique, les populations de MPs impliquées lors de la phase aiguë des lésions et la réponse régénérative. Ils ont montré qu'après 30 min de reperfusion une augmentation des PMPs est observée. Cette croissance contribue à l'activation des neutrophiles et des macrophages et facilite leur recrutement, par la régulation des molécules d'adhésion, sur les cellules endothéliales. Les LMPs s'élèvent après la reperfusion et gardent ce niveau durant la période aiguë de l'inflammation. Concernant les EMPs, leur augmentation s'observe en deux phases : une augmentation à 4 h de reperfusion suivie d'un retour à un niveau basal puis une seconde augmentation. Les auteurs associent cette deuxième augmentation à une phase de revascularisation et de régénération du foie [110].

3. MPS ET LES REINS

L'insuffisance rénale chronique (CRF) peut provoquer des maladies cardiovasculaires, qui plus est la première cause de mortalité. Une étude menée par Faure *et al* a cherché à évaluer les variations des EMPs chez des patients CRF et hémodialysés (HD) en comparaison à des patients sains. L'augmentation de ces MPs est souvent due à une dysfonction endothéliale. Ils ont montré que les EMPs augmentent chez les patients CRF et HD. En accordance avec ces résultats, les cellules endothéliales expriment plus fortement des molécules d'adhésion. En s'intéressant à d'autres populations de MPs, ils ont tout d'abord remarqué que les MPs en général sont augmentés chez les patients CRF et HD et que les PMPs sont plus élevées chez les patients CRF mais pas chez les patients HD. Néanmoins, suite à une session de dialyse, ces PMPs sont renforcées chez les HD suggérant un stress mécanique sur les plaquettes qui stimulent l'émission de MPs. Curieusement, les LMPs sont augmentées chez les patients HD mais restent constants chez les patients CRF [111].

Une étude récente a mis en évidence l'implication des PMPs dans les lésions des cellules endothéliales glomérulaires dans la néphropathie diabétique (DN) précoce. Ces cellules, en contact avec le plasma, constituent la première barrière aux substances macromoléculaires. De plus, il est reconnu que la dysfonction de ces cellules est une caractéristique précoce et délétère de la DN et par conséquent, ce phénomène altère la barrière de filtration glomérulaire et donne lieu à l'apparition de l'albuminurie. Dans le cas du diabète, les MPs sont beaucoup plus élevées. Ainsi, cette étude a montré que les PMPs délivrent des cytokines telles que CXCL7 (*Chemokine C-X-C motif ligand 7*) et active la voie mTORC1 à travers le récepteur CXCR (*CXC chemokine receptors*) exprimé sur les cellules endothéliales glomérulaires. Cette voie réduit la production du NO, l'activité de la eNOS, de SOD et augmente la production de ROS causant des lésions de ces cellules traduisant une augmentation de la perméabilité vasculaire, des fuites urinaires d'albumines et de ces faits la progression de la DN [112].

VI. CLAIRANCE DES MPS

La concentration des MPs circulantes résulte d'un équilibre dynamique entre production, capture, activation cellulaire et élimination. Le mécanisme privilégié pour leur clairance *in vivo* est la phagocytose. En effet, plusieurs études basées sur la co-culture des MPs avec des macrophages ou des HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) ont montré l'endocytose des MPs dérivées de cellules T ou de PMPs respectivement [113][114]. La phagocytose et l'internalisation des MPS est similaire à celle des cellules apoptotiques et s'effectue par l'externalisation de la PS permettant de créer la liaison avec les récepteurs des phagocytes. La lactadhérine est une glycoprotéine se liant à la PS, elle est exprimée par les macrophages et les

cellules dendritiques. Son rôle a été montré dans l'élimination des MPs par les macrophages spléniques [115]. La demi-vie est un critère compliqué à déterminer pour une MP, les études ont montré une clairance plutôt rapide de 10 à 30 min mais qui peut aussi être beaucoup plus lente de 5 à 6 h. De plus, la clairance des MPs varie suivant l'organisme, les conditions cliniques et la population des MPs étudiés [80].

Récemment, une étude menée par Mohning *et al* a mis en évidence l'implication de MerTK (*Myeloid-Epithelial-Reproductive Tyrosine Kinase*) dans la phagocytose des MPs dans les macrophages alvéolaires lors de lésions pulmonaires aiguës. Ces macrophages sont décrits comme des sentinelles permettant la phagocytose des particules et des pathogènes. Néanmoins, lors d'une inflammation, des monocytes maturés en macrophages sont recrutés et participent plus activement à l'élimination des cellules inflammatoires apoptotiques. MerTK et Axl (*Tyrosine-protein kinase receptor UFO*) étant fortement exprimés dans les macrophages alvéolaires. A l'inverse des cellules apoptotiques, cette étude a également montré que la phagocytose des MPs s'effectue principalement par les macrophages résidents. De plus, sur un modèle de souris déficiente en MerTK, l'étude a démontré que MerTK est nécessaire pour une absorption optimale des MPs. En revanche, l'expérience a aussi été menée sur Axl, l'observation a permis de déduire que Axl a un impact minime sur l'absorption [14]. Cependant, une autre équipe a mis en évidence que le complexe Gas6/Axl est impliqué dans l'ingestion des PMPs par des cellules endothéliales primaires humaines [100].

Le récepteur MerTK, avec son ligand la protéine S, a largement été décrit pour son implication dans la phagocytose des cellules apoptotiques.

CHAPITRE III : PROTEINE S/MERTK

I. PROTEINE S

En 1977, l'équipe de Di Scipio isole une nouvelle protéine du plasma, la protéine S en référence à la ville de Seattle [116].

1. STRUCTURE

Le gène de la protéine S est localisé sur le chromosome 3q11.2 et se compose de 15 exons d'une longueur totale d'environ 80 kb. La protéine S est une glycoprotéine de 69 kDa (635 acides aminés), arrangée en multiple domaines à sa forme mature. Sa partie N-terminal est occupée par le domaine Gla, composé de 11 résidus d'acide γ -carboxyglutamique. Le domaine suivant est une boucle formée par des ponts disulfures qui a la particularité d'être sensible à la thrombine. Les 4 domaines suivants sont des EGF-like (*Epidermal growth factor*). La protéine S se termine par deux domaines de type laminine G qui comprend la région SHBG (*Sex hormone-binding globulin*) [117]. La plupart des domaines contiennent des sites de liaisons du calcium permettant la stabilité de la structure et donnant la capacité à la protéine S de se lier à d'autres molécules (figure 10) [118][119]. De plus, la protéine contiendrait des ions zinc mais leur rôle n'est pas encore très bien compris. La protéine est synthétisée principalement dans le foie, l'endothélium mais aussi dans différentes cellules de l'organisme [117].

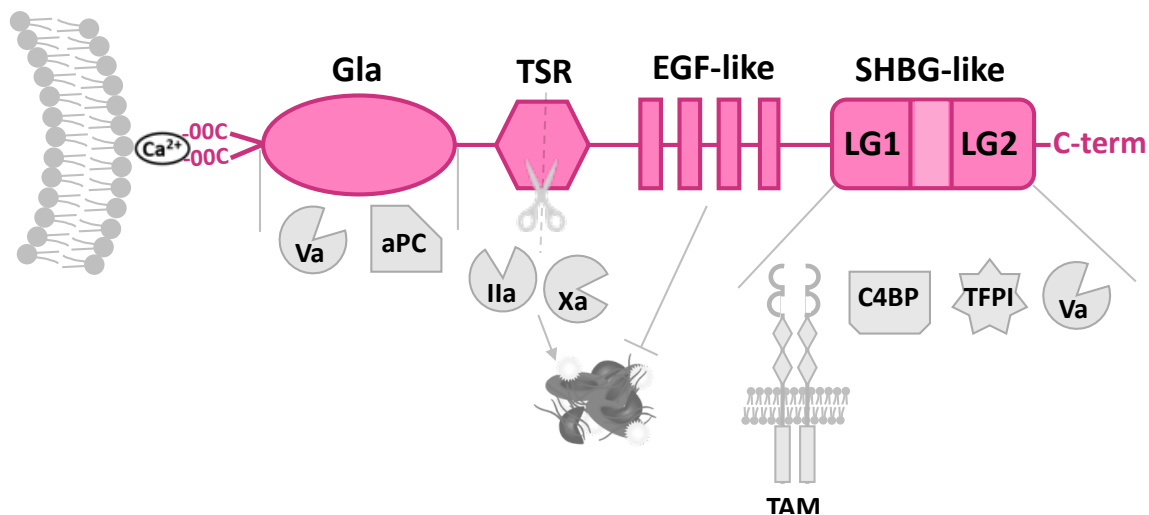


Figure 10 : Représentation schématique de la structure de la protéine S et de ses domaines d'interactions

Le domaine gla interagit avec les phospholipides chargés négativement, le factor V activé (Va) et la protéine C activée (aPC). Le domaine sensible à la thrombine (TSR) est clivé par le facteur II activé (IIa) et le facteur X activé (Xa). Ces facteurs sont, en partie, responsables de la formation des caillots sanguins. Les quatre domaines EGF-like inhibent la formation des caillots sanguins. Le domaine SHBG-like, composé de deux domaines laminines de type G (LG1 et LG2), interagit avec les récepteurs TAM et les protéines C4BP, TFPI et Va.

2. PROTEINE S, PROTEINE VITAMINE K DÉPENDANTE

Les protéines vitamine K-dépendantes forment une famille de 14 membres. La particularité de ces protéines est l'intervention d'un processus de γ -carboxylation nécessaire à l'activation de la protéine. Ce processus est une modification post-traductionnelle réalisée par l'enzyme γ -glutamyl carboxylase et son co-facteur, la vitamine K. La réaction s'observe par la substitution, au niveau du carbone γ d'un acide glutamique, d'un atome d'hydrogène par un groupement carboxyle, obtenant un acide γ -carboxyglutamique soit un résidu Gla. Durant cette réaction, la vitamine K est sous sa forme réduite, l'hydroquinone. La catalyse permet d'obtenir, en plus du γ -carboxyglutamate, du 2,3-époxyde, la vitamine K oxydée. Par la suite, la vitamine K 2,3-époxyde réductase (VKOR) recycle la vitamine K oxydée permettant la continuité du cycle γ -carboxylation [120]. Le domaine Gla ainsi formé a la capacité de lier le calcium grâce à ses charges négatives et d'interagir avec les phospholipides membranaires chargés négativement [121]. La Warfarine, connue pour ses propriétés anticoagulantes, est un antagoniste de la vitamine K. Son action empêche le recyclage de la vitamine en inhibant VKOR et donc le cycle γ -carboxylation (figure 11) [122].

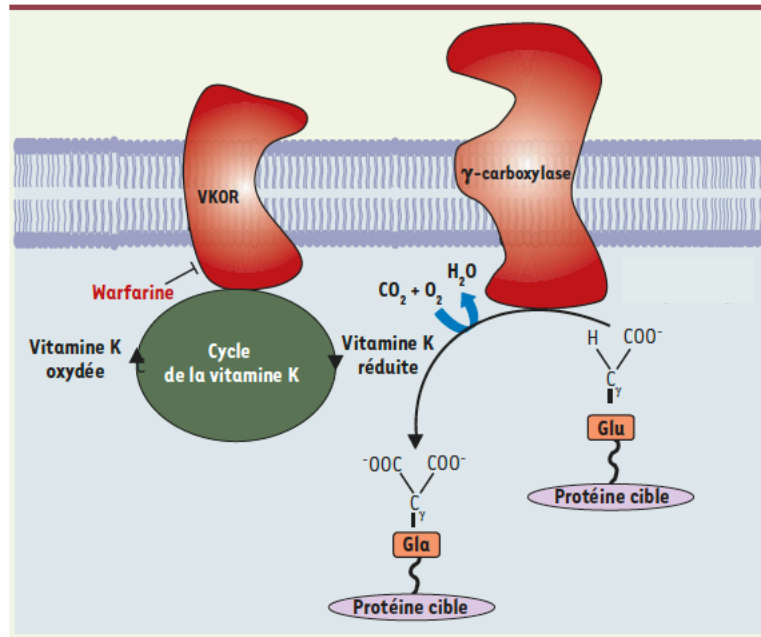


Figure 11 : Schéma représentant la γ -carboxylation et le cycle de vitamine K

La γ -carboxylation permet d'activer les protéines dépendantes de la vitamine K. L'enzyme γ -glutamyl carboxylase et son co-facteur, la vitamine K permettent à la protéine cible de substituer un acide glutamique (Glu) en acide γ -carboxyglutamique (Gla). VKOR (vitamine K 2, 3-époxyde réductase) permet de recycler la vitamine K sous sa forme oxydée en forme réduite. La Warfarine inhibe VKOR. Modifiée de Benzakour et al, 2007

3. C4BP

Dans le plasma humain, la protéine S existe sous deux formes : 60 % des protéines S (environ 350 nM), est présente sous la forme liée à la C4b-binding protein (C4BP) et 40 % sous la forme libre (140 nM). La C4BP, d'un poids moléculaire de 570 kDa, est composée de 7 sous-unités identifiées comme des chaînes alpha de 70 kDa et une autre sous-unité de type chaîne bêta de 40 kDa [123]. Chacune des sous-unités alpha contient 8 domaines protéiques du contrôle du complément (CCP) arrangés en tandem qui sont liés de façon covalente en C-terminal donnant à la molécule une forme de poulpe [124]. Elles possèdent un site de liaison pour C4b/C3b. Concernant la chaîne bêta, elle contient 3 CCP et un site disulfure en C-terminal. Elle porte également le site de liaison de haute-affinité au domaine SHBG de la protéine S. Il a été montré, dans le plasma humain, que la totalité des C4BP porte une protéine S, ainsi la forme libre de la protéine S correspond à l'excédent non lié (figure 12) [125]. C4BP est aussi un important régulateur de la voie de signalisation classique du système de complément. Elle se lie aux compléments C4b et C3b et agit comme co-facteur au facteur I dans la dégradation de ces deux compléments. Elle a également la capacité d'accélérer la dégradation non protéolytique de la convertase C3, liaison non-covalente C2a et C4b [123].

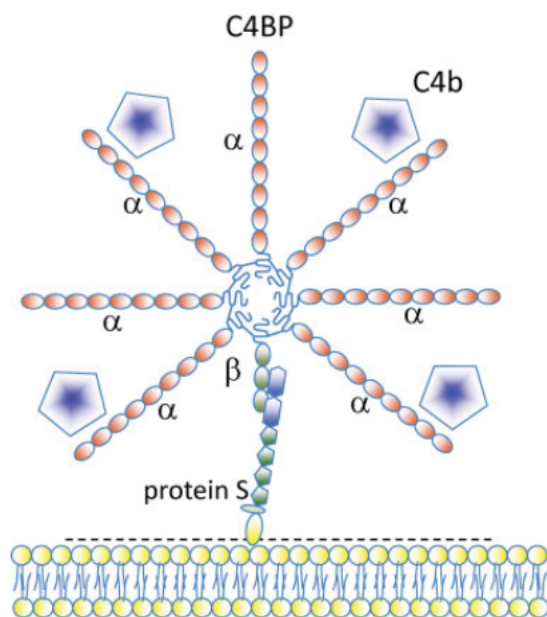


Figure 12 : Modèle schématique de l'interaction entre de la protéine S avec son récepteur membranaire d'un côté et avec la protéine C4BP de l'autre côté

Dahlbäck, 2017

4. GAS6, PROTEINE JUMELLE

Gas6, pour *Growth arrest-specific 6*, est l'homologue de la protéine S avec 44 % d'homologie de leur séquence. Elles possèdent des domaines identiques hormis un site de clivage reconnu par des sérines protéases identifié sur la protéine S [126]. Gas6 est aussi une vitamine K-dépendante mais à l'inverse de la protéine S, Gas6 n'est pas directement impliquée dans les voies de coagulation. Elle est également synthétisée par de multitudes de cellules mais elle n'est pas produite par le foie et sa concentration plasmatique est d'environ 0,3 nM [127].

5. COAGULATION

La protéine S a été largement décrite dans la littérature pour son rôle d'anticoagulant. En effet, la protéine S agit comme un co-facteur de l'APC (*Activated Protein C*), régulateur des facteurs Va (FVa) et VIIIa (FVIIIa). Ces facteurs possèdent des sites de clivages par l'APC et il a été montré que pour le clivage au niveau de certains sites de FVa par exemple, la protéine S est nécessaire [128]. FVa et FVIIIa sont des cofacteurs importants dans la formation de la prothrombinase (FXa et FVa) et de la tenase (FIXa et FVIIIa), ces complexes seraient formés sur la surface des membranes et plus précisément sur les phospholipides négativement chargés [129]. La tenase permet l'activation du FX, FXa. Ce facteur forme à son tour, avec la FVa, la prothrombinase engendrant une génération de thrombine. Cette dernière est composée de fibrine, suite à la transformation du

fibrinogène, et elle peut former un caillot avec les plaquettes. La plupart des domaines de la protéine S ont montré leur importance dans la fonction de co-facteur de la protéine S. En effet, le domaine Gla aurait la capacité d'interagir, en plus des phospholipides négativement chargés, avec APC et FVa [130]. Le clivage de la boucle sensible à la thrombine altère la liaison des phospholipides et l'interaction avec APC [131]. Les 4 domaines EGF sont impliqués dans les interactions avec APC [132]. De plus, le domaine SHBG serait important pour l'activité synergique entre l'APC et le co-facteur FV dans la dégradation de FVIIIa [133]. Plusieurs études ont mis en évidence que la protéine S était capable d'avoir une activité anticoagulante indépendamment de l'APC en régulant la prothrombinase et la tenase [134][135]. Le mécanisme n'est pas encore complètement élucidé mais il semblerait que la protéine S serait directement liée à FVa, FXa et FVIIIa pour inhiber leurs fonctions. La présence du zinc dans la protéine S est reportée comme étant indispensable [134]. La protéine S a été décrite comme un co-facteur de TFPI α (*Tissue factor pathway inhibitor α*). TFPI α contient 3 domaines de Kunitz qui ont pour fonction l'inhibition des protéases. Ainsi, TFPI α est un régulateur de la voie TF qui inhibe FXa et FVIIa, une fois liée à TF. Le mécanisme se déclenche par la liaison et l'inhibition de FXa, produit par le complexe FVIIa et TF, via le second domaine Kunitz et ensuite le complexe TFPI α /FXa inhibe FVIIa par le premier domaine Kunitz (figure 13) [117].

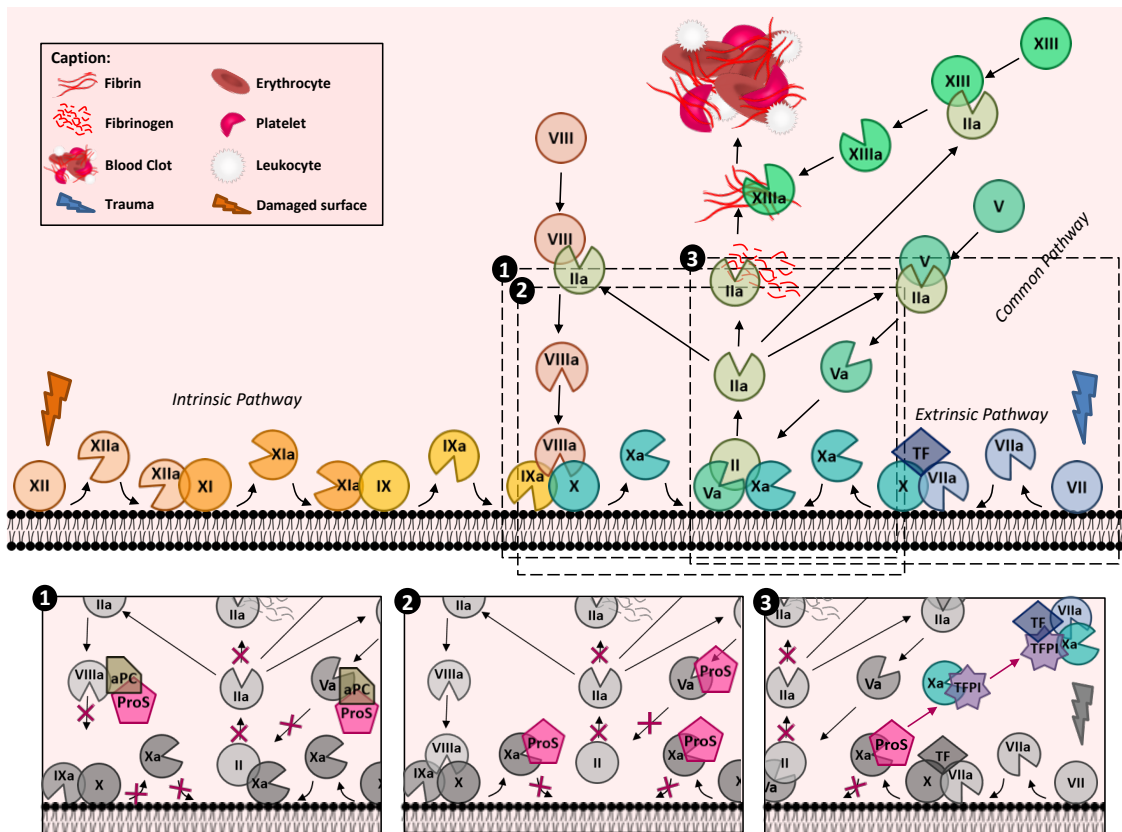


Figure 13 : Représentation schématique de la cascade de coagulation

La coagulation se distingue en trois voies : intrinsèque, extrinsèque et commune. La protéine S intervient dans chacune de ses trois voies. En se liant avec la protéine C activée (aPC), la protéine S réduit l'activité des facteurs VIIIa et Va (1). La protéine S peut aussi jouer son rôle d'anticoagulant en bloquant l'activité des facteurs Xa et Va de façon indépendante de l'aPC (2). Enfin, la protéine S peut inhiber directement le facteur Xa et le facteur VIIa, quand il est lié au facteur tissulaire (TF) (3).

6. PATHOLOGIES

Les pathologies associées à la protéine S se décrivent particulièrement par sa déficience. La protéine S, dans plusieurs pathologies, se caractérise par une réduction de son activité qui se traduit par une coagulation moins contrôlée et des excès de caillots sanguins. Cette déficience est généralement provoquée par des mutations sur le gène PROS1. Aujourd'hui, plus de 200 mutations ont été décrites et se différencient en 3 formes de déficiences :

- Type I : Niveau plus faible de la protéine S total et de sa forme libre avec en conséquence une réduction de son activité
- Type II : Niveau normal de la protéine S total et de sa forme libre mais son activité est réduite
- Type III : Niveau normal de la protéine S total mais le niveau de sa forme libre est réduit ainsi que son activité

La déficience de la protéine S est une pathologie autosomale dominante, la mutation d'une seule copie entraîne une déficience modérée alors que la mutation sur les deux copies se résulte par une sévère déficience. Malgré la déficience modérée chez un patient portant une mutation hétérozygote de la protéine S, la déficience, au cours du temps, peut s'aggraver et déclencher des évènements thrombotiques veineux, des embolies pulmonaires... Les effets d'une mutation homozygote se manifestent peu après la naissance et présentent les caractéristiques du Purpura Fulminans. L'absence de diagnostic et de traitement précoce rend le taux de survie minime pendant l'enfance [136].

Plusieurs études ont été menées sur des souris durant leur développement embryogénique pour évaluer l'importance de l'expression de la protéine S. Les souris *PROS1^{-/-}* présentent d'importants caillots sanguins et d'hémorragie, au milieu de l'embryogénèse, qui conduisent à la mort de l'embryon accompagné des anomalies secondaires de développement. Cette étude a mis en évidence, en plus du rôle d'anticoagulant, la protéine S régulerait le développement des vaisseaux et leur intégrité. Chez les souris *PROS1^{+/-}*, l'activité de l'APC est réduite de 50 %, de même que l'activité anticoagulante indépendante de l'APC qui est également réduite. Il est à noter que chez les souris invalidées pour le gène de la protéine C (souris *PC^{-/-}*), l'embryogénèse se déroule sans réel incident hormis des thromboses microvasculaires dispersées dans le cerveau, néanmoins la délétion entraîne la mort des souris quelques heures après la naissance [137].

Une autre étude s'est intéressée à une mutation de la protéine S, une substitution de l'acide aminé lysine (K) par un glutamate (E) en position 196. Cette mutation est localisée sur le deuxième domaine EGF. Cette mutation homozygote touche 1 habitant sur 12000 de la population japonaise et augmente les risques d'avoir des thromboses veineuses. Sa forme hétérozygote réduit l'activité anticoagulante de la protéine S de 16 %. Les souris protéine S K196E homozygotes présentent une diminution de l'activité de l'APC de 33 %. L'équipe suggère que la mutation sur le deuxième domaine de l'EGF est impliquée dans l'interaction avec l'APC [138].

II. MERTK

1. GENERALITES

Le récepteur MerTK appartient à la super famille des récepteurs tyrosine kinase et plus particulièrement à la sous famille des TAM (Tyro3, Axl, MerTK). Leur structure, quasiment identique d'un point vue génomique, se compose de 20 exons pour Tyro3 et Axl et 19 exons pour MerTK pour obtenir des transcrits de 3 à 5 kb. La traduction de ces transcrits permet de définir leur nombre d'acides aminés : 890 pour Tyro3, 894 pour Axl et 999 pour MerTK. La variance de leur poids moléculaire est liée à des modifications post-traductionnelles comme la glycosylations, la phosphorylation et l'ubiquitination. Ainsi, Tyro3 et Axl ont un poids moléculaire compris entre 100 et 140 kDa et MerTK entre 165 et 205 kDa [139]. L'équipe Feng *et al* a montré chez le rat que le poids moléculaire de MerTK est spécifique suivant l'organe où il est exprimé. En effet, le cerveau exprime un MerTK de 150 kDa alors que le rein exprime un MerTK supérieur à 150 kDa. Un traitement à PNGase F réduit considérablement son poids moléculaire à 120 kDa, qui est proche de son poids moléculaire natif de 110 kDa. Concernant la structure des TAM, ils se constituent par deux motifs immunoglobulines-like suivis de deux motifs de fibronectine de type 3, ensuite un domaine transmembranaire effectue la transition pour finir sur un domaine tyrosine kinase localisé dans le cytoplasme (figure 14) [122]. Ce domaine tyrosine kinase se distingue des autres récepteurs tyrosine kinase par la présence d'une séquence conservée KW (I/L)A(I/L)ES [140]. Les principaux ligands comprennent Gas6 et la protéine S, la liaison de ces ligands entraîne la dimérisation du récepteur nécessaire à l'activation des TAM [141]. Cette activation se traduit par la trans-autophosphorylation des résidus de tyrosine présents sur le domaine tyrosine kinase. Ce phénomène conduit à la phosphorylation d'autres substrats mais ces tyrosines phosphorylées constituent aussi des sites d'amarrage qui recrutent des molécules de signalisation possédant des domaines de liaison SH2 (*Src Homology 2*) [140][141]. Sur la séquence humaine de MerTK, trois résidus de tyrosine ont été identifiés comme étant les principaux sites de phosphorylation : Y-749, Y-753, Y-754 [142]. Une étude utilisant des mutations uniques sur ces trois résidus a montré une réduction de l'activité kinase de MerTK allant de 39 % à moins de 6 % suivant la mutation suggérant l'importance de ces résidus pour une activité fonctionnelle efficace [142]. Les ligands se lient aux TAM via le domaine SHBG situé sur les domaines immunoglobuline-like. Leur affinité diffère suivant le récepteur. Gas6 a la capacité de se fixer sur les trois récepteurs TAM mais avec une affinité de liaison réduite pour MerTK par rapport à Axl et Tyro3. A l'inverse, la protéine S se lie à MerTK et Tyro3 mais n'aurait pas d'affinité pour Axl [143]. La distribution des TAM dans le tissu adulte dépend du récepteur en question. Ainsi, Tyro3 est abondamment exprimé dans le système nerveux mais se retrouve aussi dans la rétine, les ostéoclastes, les reins, les poumons, les seins, les testicules et les ovaires. Son expression a aussi été décrite dans d'autres cellules telles

que les plaquettes et les monocytes/macrophages. Axl est exprimé dans l'hippocampe, le cervelet, les testicules, les reins, le foie, les muscles squelettiques, le cœur, les cellules endothéliales, les plaquettes et les monocytes/macrophages. Concernant MerTK, il est principalement exprimé dans les ovaires, la prostate, les poumons, la rétine, les reins mais aussi dans les lignées hématopoïétiques : monocytes/macrophages, plaquettes, cellules dendritiques, les cellules natural killer, les mégacaryocytes et les plaquettes. Il est aussi faiblement exprimé dans le cœur, le cerveau et les muscles squelettiques [140].

Les récepteurs TAM ont des rôles multiples et qui peuvent varier en fonction de la cellule où ils sont exprimés. Ils ont été décrits comme étant impliqués dans : la stimulation de la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, la régulation de la phagocytose, la stimulation de l'homéostasie et la régulation de l'inflammation [144]. Cependant, leur implication dans l'embryogénèse ne semble pas importante. En effet, des études menées sur des knockouts simples, doubles et triples ne montrent aucun défaut de développement à la naissance [145]–[147].

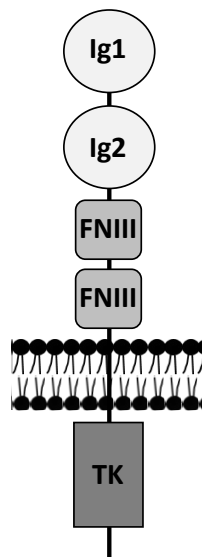


Figure 14 : Schéma de la structure du récepteur MerTK

Ce récepteur comprend, pour la partie extracellulaire, 2 domaines Immunoglobuline-like (Ig 1 et 2), deux domaines de fibronectine de type III (FNIII) et un domaine tyrosine kinase localisé dans la partie intracellulaire.

2. HEMOSTASE

L'hémostase se définit par des phénomènes du sang et des vaisseaux sanguins intervenant dans la prévention ou l'arrêt de l'écoulement du sang pour permettre un retour à une circulation normale. En cas de brèche vasculaire, une séquence moléculaire et physiologique est activée pour la formation d'un caillot sanguin sur la brèche pour éviter l'hémorragie. La présence des TAM sur les plaquettes a permis de mettre en évidence leur rôle dans la régulation de la thrombogénèse et

la stabilisation des plaquettes suite à leur activation par Gas 6 [148]–[150]. L'autophosphorylation des TAM provoque l'activation de molécules de signalisation telles que PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), Rap1 (*Ras-proximate-1*) et Akt. L'activation de la voie PI3K/Akt conduit à la phosphorylation de la queue cytoplasmique de l'intégrine bêta 3 stimulant la propagation et l'amplification de la signalisation « *outside-in* » entraînant un changement de forme de la plaquette, la rétraction du caillot et la stabilisation des plaquettes (figure 15). Des travaux antérieurs ont montré que la déficience d'un des récepteurs TAM chez la souris réduit la formation de thrombus et diminue la stabilité de l'agrégation des plaquettes [151].

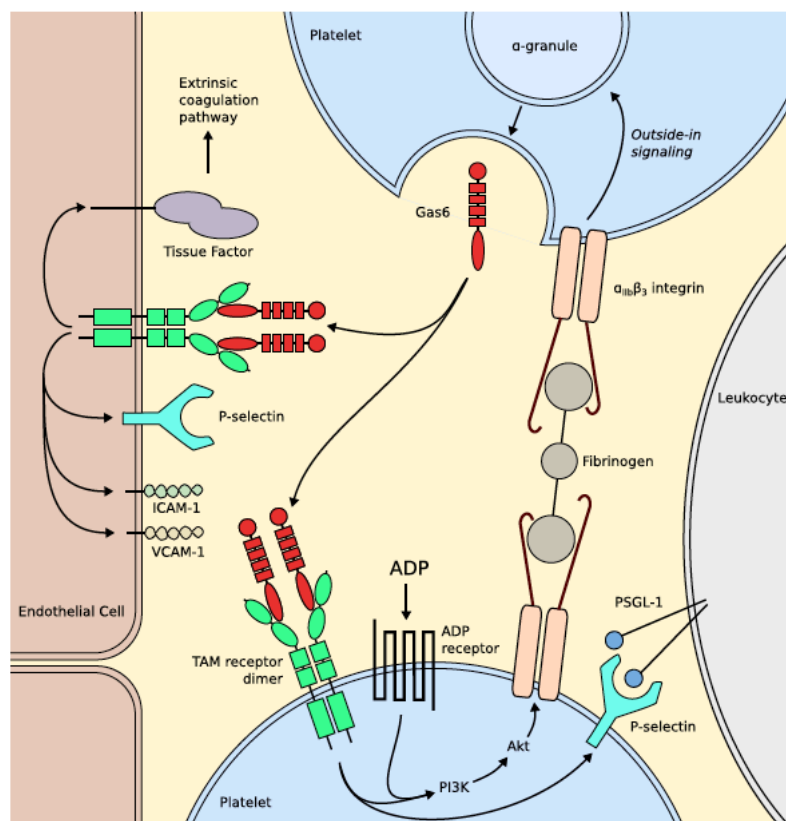


Figure 15 : Schéma représentatif de la stabilisation des plaquettes et le recrutement des leucocytes régulés par les TAM

L'autophosphorylation des TAM provoque l'activation de molécules de signalisation telles que PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), Rap1 (Ras-proximate-1) et Akt. L'activation de la voie PI3K/Akt conduit à la phosphorylation de la queue cytoplasmique de l'intégrine β3 stimulant la propagation et l'amplification de la signalisation « outside-in » entraînant un changement de forme des plaquettes, la rétraction du caillot et la stabilisation des plaquettes. Meer et al, 2014

3. *MERTK ET LA PHAGOCYTOSE*

Dans des conditions physiologiques, notre corps renouvèle environ 200 à 300 milliards de cellules chaque jour. Ce processus met en jeu la mort cellulaire programmée dans des cellules spécifiques à l'intérieur des tissus. Cette mort génère des débris cellulaires qui doivent être éliminés pour garder un équilibre homéostatique. Ce phénomène passe par la reconnaissance des cellules mourantes et leur dégradation par des phagocytes. Ces phagocytes se divisent en deux groupes : phagocytes professionnels et non-professionnels. Les phagocytes professionnels sont représentés par les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Les macrophages sont bien connus pour leur grande capacité d'absorption des corps apoptotiques [152]. Ils ont la faculté de se renouveler et de se différencier en types spécifiques de macrophages résidants. Ainsi on retrouve les cellules de Kupffer dans le foie, les macrophages alvéolaires dans les poumons, les microglies dans le cerveau et les monocytes/macrophages dans la partie péritonéale... Leur localisation différentielle permet d'éliminer des cellules mourantes bien spécifiques. Les cellules de Kupffer phagocytent les globules rouges âgés et les corps apoptotiques produits par le foie alors que les microglies éliminent plutôt les neurones mourants. Lors d'une lésion, tel que l'I/R rénale, les monocytes circulants peuvent être recrutés sur le site et jouer leur rôle de phagocytes en plus des macrophages résidants. Les phagocytes non-professionnels concernent les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les fibroblastes. Malgré leur efficacité moindre en comparaison aux phagocytes professionnels, ils jouent un rôle dans la conservation de l'homéostasie par leur capacité à éliminer les corps apoptotiques là où les macrophages se font rares ou lors d'un accès difficile du macrophage à la cellule apoptotique [153]. Durant les stades précoces de l'embryogénèse chez la souris, la phagocytose a toujours lieu malgré l'absence de macrophages mais avec une activité plus faible [154]. Dans la revue « *Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis* » rédigée par Arandjelovic et Ravichandran, les auteurs proposent une troisième catégorie de phagocytose dite spécialisée. Ils décrivent des types de phagocytes hybrides multifonctionnels. Les exemples mentionnés concernant les cellules de Sertoli, localisées dans les testicules et les cellules épithéliales pigmentaires rétinienne de l'œil. Ces dernières exercent leur rôle de phagocytose pour l'élimination des segments externes vieillissants des photorécepteurs [155]. Les cellules de Sertoli au niveau de l'épithélium des tubules séminifères participent à la constitution de la barrière hémato-testiculaire. Une cellule de Sertoli serait en contact avec 30 à 40 cellules germinales à diverses étapes de leur différenciation. En plus de son rôle dans le développement des spermatocytes, elle est capable de phagocyter les cellules germinales présentant des anomalies de développement [156].

Plusieurs étapes du processus de la phagocytose se distinguent.

La première étape commence par la libération de molécules « trouvez-moi » des cellules mourantes entraînant le recrutement des phagocytes qui peuvent être distants d'où la nécessité de ces molécules. Les molécules « trouvez-moi » sont constituées de nucléotides (ATP, UTP), de la chimiokine fractaline (CX3CL1) et des lipides lysophosphatidylcholine et sphingosine-1-phosphate. De plus, les phagocytes ont la faculté d'augmenter leur interaction de leur récepteur en formant des protusions de leur membrane. Elles permettent une plus grande exploration augmentant les chances de l'interactivité récepteurs-ligands. Une autre capacité des phagocytes est d'enlever certaines grosses glycoprotéines qui peuvent provoquer un encombrement stérique par la diffusion des récepteurs liés à la phagocytose mais aussi par leur taille empêchant l'accès aux ligands de se fixer [153].

Une fois sur place, les phagocytes reconnaissent les cellules apoptotiques par l'exposition de signaux « mangez-moi ». Ces signaux comprennent la PS, l'ICAM-3, l'annexine I, la thrombospondine... [157]. A ce jour, la PS reste le signal « mangez-moi » le plus étudié.

La PS est un phospholipide constitué de deux acides gras estérifiés présents sur une molécule de glycérol qui est liée à un acide phosphatidique. Son groupement phosphate est associé à un acide aminé, la sérine [158]. Dans une cellule saine, la PS est localisée et maintenue, par l'action d'une flippase, principalement sur le feuillet interne de la membrane. Lors de l'apoptose de la cellule, la phosphatidylsérine est externalisée suite à l'activation de la scramblase et à l'inactivation de la flippase. Des travaux précédents ont montré que ces deux enzymes possèdent des sites de clivage sensibles aux caspases, protéines généralement activées durant l'apoptose. Ainsi, il a été suggéré que les caspases activent la scramblase mais inactivent la flippase provoquant la translocation de la PS [159].

Le récepteur MerTK est capable, suite à la liaison de son ligand la protéine S, de lier le phagocyte sur lequel il est exprimé à la cellule apoptotique. En effet, la fixation de la protéine S est nécessaire pour former un pont et activer la signalisation pour initier la phagocytose. Comme dit précédemment, la protéine S se fixe, via son domaine SHBG, sur MerTK et sa liaison avec la PS s'effectue via le domaine Gla (figure16). A la différence, les récepteurs TIM-4 et BAI1 reconnaissent de façon directe la PS mais TIM-4 n'a pas de capacité de liaison alors que BAI1, protéine à 7 domaines transmembranaires, peut activer une signalisation intracellulaire initiant la phagocytose [153].

Pour montrer l'importance de MerTK et les autres membres de TAM, une étude chez la souris a mis en évidence que la déficience d'un seul TAM entraîne l'accumulation de cellules germinales apoptotiques dans les testicules alors que celle des trois TAM induit l'absence totale de spermatozoïdes matures. De plus, l'absence de MerTK dans la rétine chez la souris a montré des effets similaires au phénotype des rats RCS [147][160], [161]. Il a été montré que l'absence de

MerTK n'empêche pas la liaison entre les phagocytes et les cellules apoptotiques mais elle réduit l'efficacité de la phagocytose [162]. Une autre étude a mis en évidence que les TAM sont bien impliqués dans la phagocytose mais que la déficience de MerTK réduit considérablement la clairance des cellules apoptotiques de thymocytes chez la souris [163]. D'autres travaux ont également montré que MerTK est exprimé dans les glomérules et les macrophages de souris et qu'il joue un rôle dans la clairance des cellules apoptotiques [164]. *In vitro*, MerTK exprimé sur des monocytes de souris a montré sa capacité à phagocyter les cellules apoptotiques de thymocytes [165].

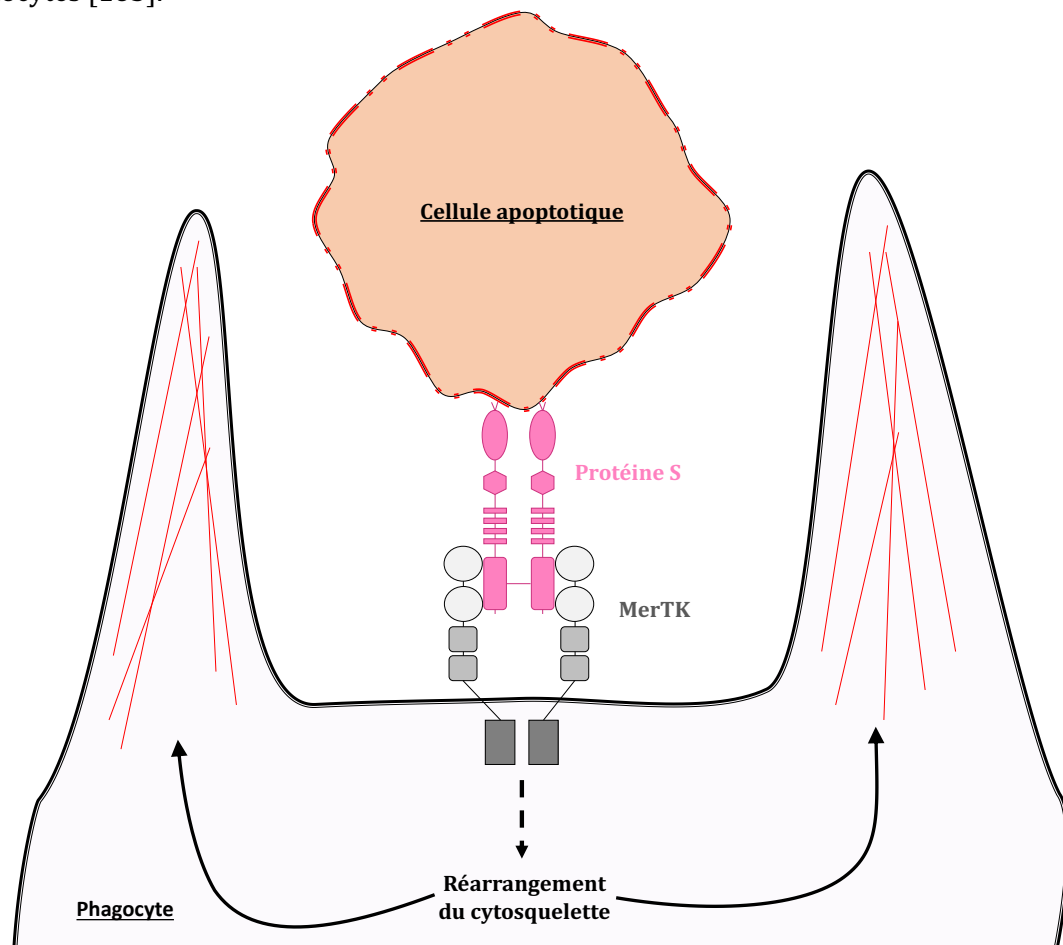


Figure 16 : Représentation schématique de la liaison de la protéine S avec son récepteur MerTK d'une part et avec les cellules apoptotiques d'une autre part pour l'initiation de la phagocytose de ces derniers par les phagocytes

Suite à la reconnaissance des cellules apoptotiques, les récepteurs des phagocytes initient une cascade de signalisation impliquant le remodelage des lipides membranaires et le réarrangement du cytosquelette pour entourer la cellule apoptotique et ainsi former un phagosome (figure 17) [166]. Une fois formé, le phagosome va subir des évolutions en fusionnant avec des lysosomes pour devenir un phagolysosome et dégrader ainsi son contenu [167].

Il est important à signaler que les cellules saines peuvent exprimer la PS sur la membrane externe cependant l'expression de la PS sur les cellules apoptotiques serait 300 fois plus élevée. De plus, il a été montré que des cellules saines expriment des molécules « ne me mangez-pas » tel que CD31 et CD47 [168]. Cela permet d'éviter les phagocytoses accidentelles.

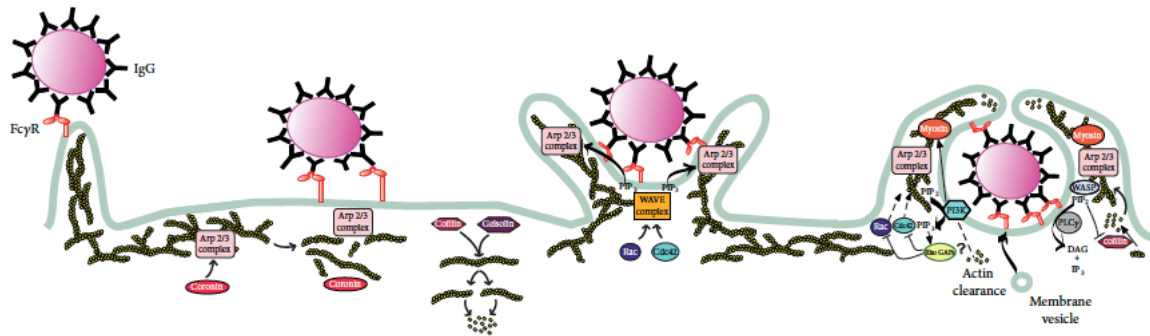


Figure 17 : Réarrangement du cytosquelette lors de la phagocytose

Une fois le corps apoptotique reconnu par les récepteurs des phagocytes, une cascade de signalisation est initiée impliquant le remodelage des lipides membranaires et le réarrangement du cytosquelette pour entourer la cellule apoptotique et ainsi former un phagosome. Rosales et al, 2017

4. MERTK ET L'INFLAMMATION

L'inflammation est, comme dit précédemment, un processus nécessaire lors de lésions cellulaires par son recrutement leucocytaire qui permet de nettoyer et de réparer le tissu lésé. Néanmoins, un contrôle pointu est très important pour éviter d'engendrer les inflammations chroniques dégradant les fonctions de l'organisme. De plus, des maladies auto-immunes peuvent se développer comme le lupus, maladie provoquant la production d'anticorps contre les molécules du soi. Les récepteurs TAM ont montré leur importance dans la régulation de l'inflammation. Des études ont montré chez la souris ayant une déficience pour MerTK que celle-ci développe des troubles auto-immuns légers qui deviennent sévères sur un modèle avec une triple déficience des TAM [146], [169].

La déficience des MerTK engendrerait dans le rein une augmentation de médiateurs pro-inflammatoires tels que IL-1, IL-6, MCP-1 et TNF- α [170] [170], [171]. Les cellules lésées libèrent des DAMPs. Ces molécules vont se fixer sur des récepteurs présents sur les leucocytes tels que les TLR. Ces récepteurs activent la voie de signalisation qui va engendrer la production de molécules pro-inflammatoires [172]. De plus, les TLR seraient capables d'induire l'activation des MerTK [173]. Dans les macrophages et par la coopération d'IFNAR (*Interferon- α/β receptor*)-STAT1 et de son ligand IFN de type I, MerTK peut induire les SOCS 1 et 3 (*Suppressor of cytokine signaling protein 1 et 3*). Ces dernières vont réguler négativement la signalisation des TLR réduisant la production de molécules pro-inflammatoires. De plus, MerTK, en activant PI3K/Akt, régule

négalement NF κ B réduisant ainsi la production de TNF- α [174]. Dans les cellules dendritiques, Axl est fortement exprimé et par la même voie que MerTK dans les macrophages, Axl inhibe la voie de signalisation des TLR par l'activation de SOCS 1 et 3 (figure 18) [175]. Il est intéressant de noter que l'IFN de type I est à la fois pro-inflammatoire par sa liaison avec IFNAR seul et immunosuppresseur par sa liaison avec TAM-IFNAR [143].

Il a été montré que MerTK est fortement exprimé dans le glomérule et que son activité est augmentée lors d'une inflammation rénale. En effet, dans les cellules endothéliales du glomérule exprimant MerTK, et suite au traitement par les LPS, la sécrétion de cytokines telles que MCP-1 et IL-6 est significativement réduite par rapport au modèle déficient en MerTK [176]. L'injection des LPS à des souris déficientes en MerTK provoque leur mort suite à une production excessive de cytokines en particulier celle du TNF- α , indiquant l'implication de MerTK dans la régulation de la production des cytokines [176]. En revanche, Axl étant exprimé dans les cellules mésangiales, provoque l'inflammation à travers l'augmentation de la prolifération de ces cellules [177]. Dans un modèle de souris déficiente en Axl, l'inflammation rénale est réduite par rapport aux souris de type sauvage. Un lien entre Axl et MerTK a été observé dans les reins de souris néphrétiques. En effet, l'activation de Axl s'est avérée plus faible dans un modèle de souris déficientes en MerTK et réciproquement ce qui implique l'existence d'une interaction fonctionnelle entre ces deux récepteurs [164]. D'autres travaux ont montré que l'activation des TAM par Gas6 entraîne l'expression de VCAM-1, ICAM-1 et P-sélectine dans les cellules endothéliales. Ces molécules permettent, entre autres, d'ancrer les leucocytes et participent à l'infiltration de ces dernières augmentant ainsi l'inflammation sur le site lésé [178]. L'expression de MerTK est plus élevée dans les macrophages immunosuppresseurs de type M2 que dans les macrophages de type M1 [179]. Comme dit précédemment, les récepteurs TAM, suite à leur activation par Gas6 ou par la protéine S, réduisent la production de cytokines telles qu'IL-1, IL-6 et TNF- α . Ces cytokines caractérisent les macrophages de type M1. De plus, il est connu que les macrophages de type M2 ont une activité de phagocytose plus importante que celles des M1 et qui est liée en partie à leur taux d'expression élevé des récepteurs TAM [180], [181]. Suite à ces données, Myers *et al* ont suggéré que les TAM jouent un rôle dans le déplacement de la polarisation des macrophages d'un phénotype de type M1 vers un phénotype de type M2 [181].

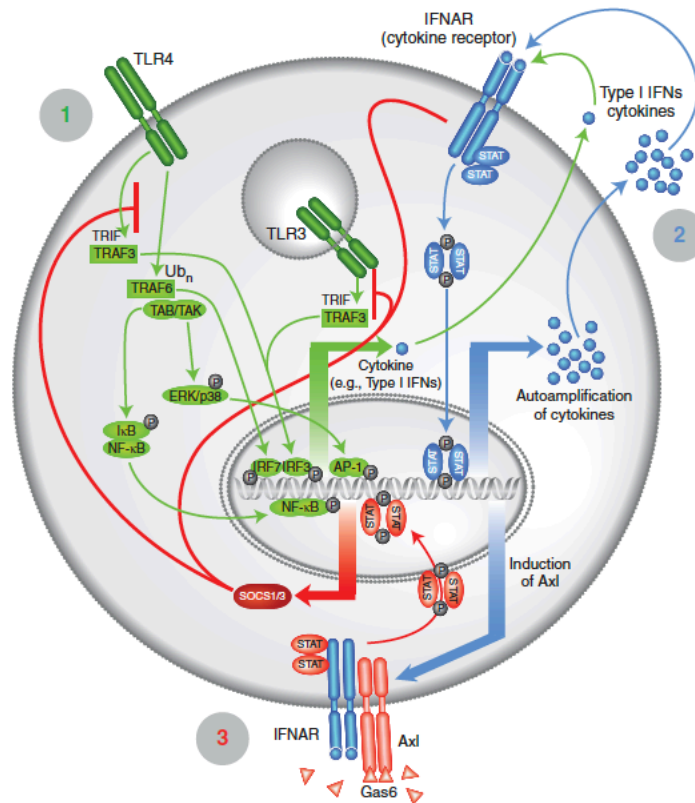


Figure 18 : Régulation du cycle de l'inflammation par les récepteurs TAM

Dans les macrophages, la coopération d'IFNAR-STAT1 et de son ligand IFN de type I avec Axl et Gas6 peut induire les SOCS 1 et 3. Ces dernières vont réguler négativement la signalisation des TLR réduisant la production de molécules pro-inflammatoires. Lemke et al, 2013

5. MERTK SOLUBLE

Les domaines extracellulaires des récepteurs TAM peuvent être protéolytiquement clivés et se retrouver, sous une forme circulante, dans le plasma. Un taux circulant excessif de la forme soluble de MerTK (sMerTK) a été corrélé à la gravité de la néphrite chez les patients atteints de lupus mais aussi au déclin de la fonction rénale chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique [182]. sMerTK est composé de la partie extracellulaire de MerTK. Sa forme soluble a la capacité de se lier aux ligands Gas6 et protéine S. Ce phénomène séquestrant les ligands inhibe l'activation de MerTK et de ses voies de signalisations se traduisant par une diminution de l'activité phagocytaire et une altération de la régulation négative de l'inflammation. Cela s'ensuit par une augmentation de cellules apoptotiques et nécrosées pouvant développer des maladies auto-immunes tel que le lupus [183].

L'enzyme responsable du clivage des MerTK est ADAM17, une désintégrine et une metalloprotéinase, connue aussi sous le nom de TACE (*Tumor necrosis factor- α -Converting*

Enzyme). TACE a d'abord été identifiée comme l'enzyme clivant le TNF- α rendant cette cytokine active. Il a été suggéré qu'ADAM17 est activée, en partie, par les ROS et les TLR [184].

OBJECTIF ET MODELE DE L'ETUDE

OBJECTIF DE L'ETUDE

L'I/R rénale est une conséquence délétère de la transplantation rénale affectant la qualité du greffon. D'un point de vue histologique, cette séquence s'observe par des lésions cellulaires touchant principalement les tubules proximaux et les cellules endothéliales. Le stress oxydant est l'une des causes responsables de la mort de ces cellules. Ces dernières libèrent des molécules pro-inflammatoires qui entraînent le recrutement, en partie, des neutrophiles et des macrophages afin de nettoyer et d'induire la réparation du tissu lésé. Néanmoins, ce processus demande un contrôle pointu pour éviter les effets négatifs d'une inflammation excessive sur le tissu.

L'un des rôles bénéfiques des macrophages est la clairance des débris cellulaires limitant le développement des lésions. La phagocytose s'effectue par la reconnaissance de molécules présentes sur la membrane des cellules lésées par des récepteurs de phagocytes. L'un de ces récepteurs bien connu pour son rôle dans la phagocytose est le récepteur tyrosine kinase MerTK, de la famille des TAM. Son rôle a été largement décrit dans la clairance des segments externes des photorécepteurs par les cellules épithéliales de la rétine. La protéine S, ligand de MerTK, est nécessaire à l'activation du récepteur mais aussi à la liaison entre la phosphatidylsérine, présente sur les cellules apoptotiques, et MerTK présent sur les phagocytes pour enclencher le processus de phagocytose. Ce récepteur, exprimé également dans le rein, joue un rôle dans la régulation négative de la production de molécules pro-inflammatoires en plus de son rôle dans la phagocytose.

Ainsi, l'objectif de cette étude est d'analyser l'impact potentiel de MerTK dans la physiopathologie de l'I/R rénale. L'étude porte sur un modèle d'I/R rénale chez le rat RCS (*Royal College Surgeon*) caractérisé par une mutation naturelle rendant déficient le récepteur MerTK. Ce modèle a un fort intérêt scientifique car il n'a jamais été évalué en I/R. Le but de notre projet est d'étudier les marqueurs de lésions et des fonctions rénales, la réponse inflammatoire et l'intégrité des structures rénales suite à une I/R mais aussi d'évaluer l'efficacité de la phagocytose des cellules apoptotiques.

En vue du rôle important du récepteur MerTK dans l'activation de la phagocytose et dans la régulation de l'inflammation, il est tout à fait concevable de proposer que l'absence de MerTK provoquerait des lésions rénales et fonctionnelles supplémentaires sur le modèle de rats RCS lors d'une I/R rénale en comparaison aux rats contrôles exprimant un MerTK fonctionnel.

L'étude s'intéresse également à identifier et à quantifier les populations de microparticules (MPs) potentiellement générées lors d'une I/R rénale. Ces petites vésicules ont montré leur intérêt en tant que biomarqueurs dans de nombreuses pathologies souvent établies par une élévation des MPs circulantes. L'élimination des MPs pourrait s'effectuer par phagocytose et notamment par

l'activité de MerTK. Vu que les rats RCS sont déficients en MerTK, nous supposons que la quantité de MPs circulantes générées suite à une I/R rénale est plus importante chez ces rats que chez les rats contrôles.

Le but général de ce travail est de mettre en évidence un potentiel effet protecteur de MerTK suite à une I/R rénale chez le rat.

MODELE D'ETUDE

Historiquement, le modèle rat RCS pour *Royal College Surgeon* a été découvert en 1938 par Bourne, Campbell et Tansley. Ce modèle se distingue par une dystrophie rétinienne héréditaire. La dystrophie se caractérise par la perte progressive de photorécepteurs dans la rétine. Cette dégénérescence s'observe, par histologie et électrorétinographie, durant la troisième semaine post-natale, aux dernières étapes de développement de la rétine, et se termine au troisième mois [185][186]. Les photorécepteurs renouvèlent constamment les disques photosensibles localisés dans leurs segments extérieurs suite aux agressions lumineuses. Ces segments externes sont au quotidien perdus et phagocytés par l'épithélium pigmentaire rétinien. Chez un rat normal, cet épithélium dégrade 25 000 à 30 000 segments externes vieillissant [155]. Dans le cas des rats RCS, la phagocytose de l'épithélium n'est plus opérationnelle, les débris entre les segments externes et l'épithélium s'accumulent et provoquent la mort progressive des photorécepteurs [187][188][186]. Plusieurs études ont montré que l'épithélium pigmentaire rétinien, *in vitro*, provenant du rat RCS est incapable de phagocyter les segments externes isolés, néanmoins il a la capacité d'ingérer des billes de latex ou des particules de carbones *in vitro* [189][190]. Suite à ces observations, les chercheurs ont suggéré qu'une liaison spécifique entre l'épithélium et les segments externes est nécessaire pour permettre la phagocytose de ces derniers. Des études génétiques ont été mises en place pour identifier la mutation responsable de cette phagocytose déficiente. Une délétion de 409 nucléotides a été retrouvée sur l'exon 2 du gène *rdy* (*retinal dystrophy*) du chromosome 3q36. Elle entraîne l'apparition d'un codon STOP précoce qui suite à la transcription/traduction donne une protéine de 20 acide aminés [187][180]. Cette mutation autosomale récessive du gène *rdy* a permis de définir la protéine MerTK comme étant responsable de cette phagocytose défectueuse.

MATERIEL ET METHODES

I. CHIRURGIE : ISCHEMIE-REPERFUSION BILATERALE RENALE

1. MODELE ANIMAL

Les rats RCS *rdy*^{-/-} et *rdy*^{+/+} sont gracieusement donnés par E. NANDROT (chef d'équipe de l'institut de vision à PARIS). L'élevage de ces rats est effectué dans notre animalerie universitaire agréée (PREBIOS). Des rats mâles âgés de 13 semaines \pm 1 semaine avec un poids variant entre 240g et 300g sont utilisés pour toutes les expériences. Les soins aux animaux ainsi que les manipulations lors des expérimentations sont effectuées conformément aux directives du ministère français de l'agriculture et de la Forêt (décret 87849) et à la directive du conseil des communautés européennes (86/609/CEE) et sont approuvés par le comité d'éthique local (COMETHEA, CE2012-06). Pour la suite du manuscrit, la définition des rats RCS *rdy*^{-/-} possédant un MerTK non fonctionnelles sont nommés rats RCS^{-/-} et les rats RCS *rdy*^{+/+} sont nommés rats RCS^{+/+}.

2. GROUPES EXPERIMENTAUX

Deux groupes expérimentaux sont mis en place : Rats RCS^{-/-} (n'exprimant pas le récepteur MerTK) et les Rats RCS^{+/+} (exprimant MerTK) Chaque groupe est composé de 7 sous-groupes avec un minimum de 5 rats par sous-groupe :

- Blancs : mise à mort à J0 avec prélèvement de reins et de sang à l'aorte abdominale.
- IR J1 : 1h d'ischémie (par clampage du pédicule rénale) avec 1 jour de reperfusion, puis mis à mort avec prélèvement de sang à l'aorte abdominale et des 2 reins
- SHAM J1 : protocole identique à celui effectué chez le groupe IR 1h mais sans clampage du pédicule rénal, avec 1 jour de reperfusion, puis mise à mort avec prélèvement de sang à l'aorte abdominale et des 2 reins.
- IR J3 (1h): 1h d'ischémie (par clampage du pédicule rénal) avec 3 jours de reperfusion, puis mise à mort avec prélèvement de sang à l'aorte abdominale et des 2 reins.
- SHAM J3 (1h): protocole identique à IR 1h sans clampage du pédicule rénal, avec 3 jours de reperfusion, puis mise à mort avec prélèvement de sang à l'aorte abdominale et des 2 reins.
- IR J3 (30min) : 30 min d'ischémie (par clampage du pédicule rénal) avec 3 jours de reperfusion, puis mise à mort avec prélèvement de sang à l'aorte abdominale et des 2 reins.

- SHAM J3 (30min) : protocole identique à IR 30 min sans clampage du pédicule rénale, avec 3 jours de reperfusion, puis mise à mort avec prélèvement de sang à l'aorte abdominale et des 2 reins.

3. PROTOCOLE CHIRURGICAL

a. J-7 : PRELEVEMENT SANGUIN

Sept jours avant la chirurgie, les rats sont pesés et un prélèvement sanguin est effectué à la veine caudale. Les rats sont ensuite anesthésiés avec de l'isoflurane à 4 % + O₂ à 4 L/min dans une chambre d'induction thermostatée à 37°C puis placés sur une plaque chauffante à 37°C avec le museau placé dans un bec diffusant, en continu, de l'isoflurane à 2% + O₂ à 2 L/min. La queue du rat est placée dans de l'eau chauffée à environ 42°C pendant environ 1 min pour permettre la vasodilatation de la veine caudale. Un volume d'environ 800 µl de sang est ensuite prélevé et réparti de façon égale dans deux tubes : un tube contenant 300 µl de citrate de sodium 3,2 % et l'autre de l'héparinate de lithium avec un séparateur acrylique. Après le prélèvement, la queue est désinfectée et une injection sous-cutanée de 800 µl de sérum physiologique est administrée au rat afin de combler la perte de sang. Le rat est ensuite remis dans sa cage.

b. J0 : CHIRURGIE

Le jour de la chirurgie, les rats sont pesés et un prélèvement sanguin est effectué à la veine caudale. Les rats sont ensuite anesthésiés avec de l'isoflurane à 4 % + O₂ à 4 L/min dans une chambre d'induction thermostatée à 37°C puis placés, après rasage de l'abdomen, sur une plaque chauffante à 37°C avec le museau placé dans un bec diffusant en continu de l'isoflurane à 2% + O₂ à 2 L/min. Une goutte de vaseline stérile (Cooper) en gel est appliquée sur chaque œil de l'animal pour conserver l'hydratation. Une injection, en sous-cutané, de 50 µl de buprénorphine (analgésique de la famille des morphiniques ; *Buprécare* 0,3 mg/ml) suivie, après désinfection de la partie abdominale, d'une injection en sous-cutanée, de 300 µl de lidocaïne stérile à 5 mg/ml (*Aguettant*) est réalisée. Une incision xipho-pubienne est ensuite effectuée. Après la mise en évidence de l'artère et de la veine rénale, les deux pédicules rénaux sont clampés à l'aide d'un clamp d'une pression de 100 g (*Fine Science Tools, Micro Serrefines FST#18055-03*). Un blanchiment du rein doit s'observer (=ischémie rénale). Au bout de 30 min ou de 1 h d'ischémie, les clamps, au niveau des veines et des artères rénales, sont retirés pour réactiver la circulation sanguine dans les reins (=reperfusion). La paroi abdominale du rat est refermée en deux étapes avec du fil 4/0 non résorbable : la paroi musculaire est d'abord suturée puis la peau. Une nouvelle

injection de lidocaïne, en sous cutanée, sur la paroi abdominale est réalisée suivie d'une désinfection puis d'une injection de 600 µl, en sous-cutanée, d'une solution glucosée 5% stérile (*B Braun*). Après son réveil, le rat est remis dans sa cage.

c. J1 : PRELEVEMENT SANGUIN SANS MISE A MORT

24 h après la chirurgie, les rats sont à nouveau pesés et un prélèvement sanguin est effectué à la veine caudale. Les rats sont anesthésiés comme décrit précédemment et la queue est placée, pendant 1 mn, dans de l'eau chauffée à 42 °C pour permettre la vasodilatation de la veine caudale. Un volume d'environ 400 µl de sang est alors prélevé et déposé dans un tube d'héparinate de lithium avec un séparateur acrylique. Après le prélèvement, la queue est désinfectée et une injection de 400 µl de sérum physiologique est administrée au rat en sous-cutanée afin de combler la perte de sang. Le rat est ensuite remis dans sa cage.

d. J0, J1, J3 : PRELEVEMENTS SANGUIN ET REAUX ET MISE A MORT

Avant le prélèvement, les rats sont pesés puis anesthésiés comme décrits précédemment. Ensuite, une incision xipho-pubienne ou une réouverture par coupure des points de suture sont effectuées. Après une mise en évidence de l'artère abdominale, un prélèvement sanguin est effectué et le sang est réparti, à volume égal, dans un tube citrate et un tube d'héparinate de lithium. Les reins sont ensuite prélevés et coupés de façon longitudinale. Une moitié des deux reins est congelée dans l'azote liquide. L'autre moitié du rein gauche est placée dans une cupule contenant de la Cryomatrix (*ThermoFisher ; 6769006*) qui doit recouvrir intégralement le rein. La cupule est ensuite placée dans de l'isopentane (*VWR ; 24872.298*), préalablement refroidi par de la carboglace. Une fois le rein fixé, celui-ci est conservé dans la carboglace. La moitié du rein droit est décapsulée et placée dans 10 volume de paraformaldéhyde 4 % (*VWR ; 9713.1000*). La mise à mort du rat est procédée par exsanguination et section du cœur.

4. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS RECUPERES SUR LES RATS

Les tubes de sang sont placés sur un support et manipulés délicatement pour éviter les agitations pendant le transport et limiter ainsi l'activation des plaquettes. Dans les 2 h qui suivent le prélèvement, les tubes de citrate de sodium et ceux contenant l'héparinate de lithium sont centrifugés à 2 500 g pendant 15 min à 20 °C, en enlevant le frein de la centrifugeuse. Le ratio hématocrite est mesuré à partir des tubes héparinates de lithium, et avec les tubes de citrates de sodium, le volume total est mesuré pour déterminer le facteur de dilution. Le plasma dans les deux

types tubes est récupéré et placé dans un nouveau tube pour une deuxième centrifugation faite dans les mêmes conditions que la première. Le surnageant issu de cette deuxième centrifugation correspond à un plasma pauvre en plaquettes. Ce plasma est ensuite aliquoté dans des microtubes à raison de 200 µl pour le plasma hépariné et 100 µl pour le plasma citrate et les microtubes sont ensuite conservés à -80 °C.

Les reins placés dans de la Cryomatrix et ceux préalablement mis dans de l'azote liquide sont conservés à -80 °C. Les reins plongés dans le paraformaldéhyde sont placés dans une armoire ventilée à température ambiante avant une rapide inclusion en paraffine.

II. DOSAGE DES MICROPARTICULES PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Cette expérience consiste à quantifier et à différencier les microparticules présentes dans le plasma de chaque rat aux différents temps en utilisant des marquages propres à leur origine cellulaire.

30 µl de plasma pauvre en plaquettes (PPP) sont placés dans un tube de polypropylène à fond rond (*Dutscher* ; 352052), dans un bain-marie thermostatée à 37 °C pendant 3 min. 10 µl d'Annexine V (*BD Biosciences* ; 556419) pré-diluée au 1/50e dans du tampon binding annexine V 1X en présence de 2 ATU/ml d'hirudine (*Stago* ; 00830) sont ajoutés. 10 µl d'anticorps pré-dilués sont ensuite ajoutés : l'anti-CD61 (*Ozyme* ; BLE104307; 0,2 mg/ml) pour le marquage des MPs plaquettaires est utilisé au 1/20e ; l'anti-CD54 (*Ozyme* ; BLE202405; 0,2 mg/ml) pour le marquage des MPs endothéliales est utilisé au 1/10e et l'anti-CD45 (*BD Biosciences* ; 561587; 0,2 mg/ml) pour le marquage des MPs leucocytaires est utilisé au 1/20e. Le tube est ensuite placé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min. Ensuite, 500 µl de tampon binding annexine V 1X avec 2 ATU/ml d'hirudine sont ajoutés. Enfin, 30 µl de MP Count Beads (*Stago* ; 01169) sont ajoutés pour permettre de déterminer la concentration en MPs/µl en appliquant la formule suivante :

$$\text{MPs}/\mu\text{L} = \frac{\text{Nombre de MPs comptées} \times [\text{MP-Count Beads}]}{\text{Nombre de MP-Count Beads comptées}} \times \text{Facteur de dilution}$$

Le tube est vortexé puis l'acquisition s'effectue sur le FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) BDVerse (*BD Biosciences*). Pour une meilleure précision, la vitesse de l'acquisition est placée sur le mode « Low » (12 µl/min). Avant le passage des échantillons de PPP (plasma pauvre en plaquettes), nous réalisons l'acquisition d'un tube contenant 300 µl d'une solution contenant des billes couplées à la FITC (Isothiocyanate de fluorescéine) : le Megamix-Plus SSC (*Stago* ; 01078).

Ce mélange est composé de billes de diamètres variés et permet de couvrir la majorité de la zone de tailles théoriques des MPs (0,1 à 1 μm) en utilisant le paramètre SSC (*Side Scatter*) comme paramètre de taille. Suite à l'acquisition du Megamix et à la calibration du cytomètre, une fenêtre (*gate*) est créée pour analyser, par la suite, la population de MPs contenues dans le PPP. Pour établir le seuil de positivité par rapport à la population double négative et contrôler la compensation pour chaque marquage, des tubes contrôles sont effectués, soit en monomarquage soit sans marquage. L'analyse post-acquisition s'effectue sur le logiciel *FlowJo 10.5.0*.

III. EXTRACTION PROTEIQUE RENALE

L'expérience consiste à extraire les protéines totales d'un fragment de rein congelé à l'azote liquide et conservé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Un fragment de rein, d'environ 100 mg, est découpé en petits morceaux à l'aide d'un scalpel, sur une plaque en verre posée sur un bac de carboglace. Les morceaux sont ensuite placés dans un tube en verre avec un volume de 900 μl de tampon de lyse 1X (*Euromedex Rippa Buffer III 2X* réf : RB4477-500 ml) supplémenté par des anti-phosphatases (Cocktail antiphosphatase PhosphoStop easy pack *Sigma* réf : 04906837001) et des anti-protéases (Cocktail Antiprotéase complète mini *Sigma* réf : 11697498001) et broyés immédiatement au polytron. Le tube contenant l'homogénat est ensuite incubé dans la glace pendant 1h puis l'homogénat est transvasé dans un microtube et centrifugé pendant 15 min à 9000 g. Le surnageant, contenant les protéines, est récupéré, aliquoté puis conservé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

IV. DOSAGE PROTEIQUE

Le dosage des protéines totales permet de déterminer la concentration en protéines dans l'échantillon de rein.

Dans une plaque 96 puits, 25 μl d'échantillon (surnageant de protéines extraites), dilués au 1/50e dans de l'eau stérile, sont déposés. En parallèle, une gamme étalon de BSA (*Bovine Serum Albumin*) est effectuée par le dépôt dans les puits de 25 μl de solution BSA à des concentrations croissantes allant de 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ à 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0, 50, 100, 250, 500, 750 et 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Le dépôt se fait en duplicata. Ensuite, 200 μl de réactif de BCA (acide bicinchoninique) (BCA protéine détermination *Sigma* Réf : BCA1-1Kt; 19 ml de réactif A + 0,38 ml de réactif B) sont rajoutés par puits. La plaque est ensuite incubée à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans une étuve à l'obscurité pendant 20 min. Le principe de ce dosage est basé sur la réduction des ions cuivriques Cu(II) en Cu(I) en milieu alcalin par les protéines. L'acide bicinchoninique est un réactif chromogène hautement spécifique pour

le Cu(I). Cette réaction donne un complexe pourpre qui est lue à 560 nm sur le Victor 3 (*Perkin-Elmer*). La concentration protéique des échantillons est calculée suivant l'équation de la droite d'étalonnage correspondant à l'absorbance en fonction de la concentration de la gamme BSA.

V. WESTERN BLOT

La technique de Western Blot est une technique semi-quantitative d'analyse des protéines. Son principe est basé sur la séparation des protéines suivant leur poids moléculaire et l'utilisation d'anticorps pour détecter la protéine cible.

Les échantillons protéiques sont préparés avec du Laemmli 4X (Laemmli 4X : 2 ml de Tris HCL à 1M pH6.8 ; 4 ml de SDS ; 2.5 ml de Glycérol ; 1 pincée de bleu de bromophénol QSP 10 ml d'eau distillée) complété avec du DTT (Dithiothreitol ; *Euromedex* EU0006-D) à 30 mM puis chauffés à 100 °C pendant 10 min. Les échantillons (100 µg de protéines) sont déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide à gradient de concentration 4-15 % (*Biorad* : Critérium TGX Stain Free 4-15 %, 18 well Réf : 5678054). Un marqueur de taille (*Biorad* : 5X Precision Plus Protein All Blue Standards Réf : 1610373) est aussi chargé dans un puits pour permettre d'identifier la taille de la protéine d'intérêt. La migration est ensuite effectuée à 150 V pendant 1 h. Le gel est récupéré à la fin de la migration et placé sur la plaque du Chemidoc de *Biorad* (1708265SP) pour effectuer un stain free. Cette procédure permet de révéler les protéines totales pour la normalisation des résultats. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (Polyfluorure de Vinylidène) (*Biorad* : *TransBlot turbo RTA Transfer Kit Midi PVDF for 40 Blot* réf :1704273 ; *TransBlot turbo RTA Transfer Kit Midi nitrocellulose for 40 Blot* réf :1704271) à l'aide du Trans blot Turbo de *Biorad*. Le transfert se fait à 25 V pendant 7 min. Ensuite, la membrane est incubée dans un tampon de blocage (Tableau 3) sous agitation à température ambiante pendant 1 h puis pendant toute la nuit à 4°C dans une solution d'anticorps primaires dilués dans la solution de blocage (Tableau 3). Le lendemain, la membrane est lavée 5 fois dans du tampon TBS (*Tris Buffered Saline*) contenant du Tween 0,1 % pendant 10 min sous agitation à température ambiante. Elle est ensuite incubée, pendant 1 h à température ambiante, dans une solution d'anticorps secondaires couplés à la HRP (*Horseradish Peroxidase*) et dilués dans la solution indiquée dans le tableau 4, Après 5 lavages de 10 mn au TBS Tween 0,1 %, la membrane est révélée au Chemidoc en ajoutant une solution substrat de la HRP, le Luminata (*Fisher* réf : WBLUF0500). L'analyse de l'image se fait sur le logiciel *Image Lab*.

Tableau 3 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés pour le Western Blot

Protéines cibles	Fournisseurs	Références	Espèces	Dilution	Tampons de blocage	Taille (kDa)
MerTK	FabGennix	MKT-101AP	Lapin	1/1000e	BSA	150
Phospho-MerTK	FabGennix	PMKT-140AP	Lapin	1/1000e	BSA	150
MCP-1	Biovision	5225-100	Lapin	1/1000e	Lait	20
iNOS	BD Biosciences	610431	Souris	1/1000e	BSA	130
TNF- α	Abcam	ab6671	Lapin	1/1000e	Lait	25
Neutrophile Elastase	ThermoFisher	PA5-79178	Lapin	1/1000e	Lait	75
H3a	Abcam	ab5103	Lapin	1/2000e	BSA	17
CD68	Bio-Rad antibodies.com	MCA341GA	Souris	1/1000e	Lait	25
MPO	Abcam	ab208670	Lapin	1/1000e	Lait	59

Tableau 4 : Récapitulatif des anticorps secondaires utilisés pour le Western Blot

Protéines cibles	Fournisseurs	Références	Espèces	Dilution	Tampons de blocage
anti-lapin-HRP	Abcam	ab6721	Chèvre	1/1000e	Lait
anti-souris-HRP	Abcam	ab6789	Chèvre	1/1000e	Lait

VI. ANALYSES BIOCHIMIQUES

Les analyses de Biochimie sont réalisées sur le plasma provenant des tubes héparinés dans le service de biochimie au CHU de Poitiers par l'analyseur modulaire, le Cobas 8000 (*Roche Diagnostics*, France). Les marqueurs analysés comprennent :

- La créatinémie ($\mu\text{mol/l}$)
- L'urémie (mmol/l)
- La lactate déshydrogénase (LDH ; UI/l)
- L'aspartate aminotransférase (ASAT ; UI/l)

VII. ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Les dosages par ELISA sont réalisés sur le plasma provenant des tubes héparinés suivant les instructions des fournisseurs. Les molécules cibles sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : Molécules cibles recherchées par la technique ELISA

Molécules cibles	Fournisseurs	Références	Type	Dilution de l'échantillon
TNF- α	R&D Systems	RTA00	Quantikine	1/2e
MCP-1	R&D Systems	DY3144-05	Duaset	SHAM 1/2e ; I/R 1/20e
NGAL	R&D Systems	DY3508-15	Duaset	1/1000e
KIM-1	R&D Systems	DY3689-15	Duaset	1/100e
MIP2 α	R&D Systems	DY525-15	Duaset	Pur

VIII. ANALYSES HISTOLOGIQUES

La moitié du rein droit fixée dans du paraformaldéhyde 4 % est utilisée pour ces analyses. Le rein est rapidement inclus en paraffine et conservé à température ambiante dans une cassette annotée. Des coupes rénales sont ensuite effectuées à une épaisseur de 3 µm par un microtome (*Microtome Leica RM2125RT*). Ces coupes sont fixées sur des lames de microscopie Superfrost ou SuperFrost+ (*Thermo fisher réf 16231551*).

Le déparaffinage est effectué par des bains successifs d'histosol et de concentrations décroissantes d'éthanol :

- Histosol 100 % : 3 min
- Histosol 100 % : 3 min
- Ethanol 100 % : 3 min
- Ethanol 90 % : 3 min
- Ethanol 70 % : 3 min

Suite aux colorations ou aux immunomarquages décrits ci-dessous, les lames sont observées en aveugle par le professeur Jean-Michel GOUJON, anatomopathologiste du CHU de Poitiers.

1. COLORATION A L'ACIDE PERIODIQUE ET L'HEMATOXYLINE EOSINE -SAFRAN

Des coupes de reins déparaffinées sont colorées à l'acide périodique de Schiff (PAS) et à l'hématoxyline éosine Safran (HES) avec la machine Leica ST5020 (*Leica Biosystems, Nussloch GmbH, Germany*) dans le service d'anatomopathologie du CHU de Poitiers. Le PAS permet une mise en évidence des membranes basales et des bordures en brosse des tubules. Le HES colore le noyau et les fibres de collagène des tissus conjonctifs par l'action de l'hématoxyline, permet de visualiser le cytoplasme par l'action de l'éosine et marque les fibres conjonctives par l'action du safran. Ces colorations permettent d'évaluer l'intégrité des structures rénales et l'infiltration inflammatoire selon un « *grading* » établi par Goujon *et al*, 1998 [191]. Cette publication décrit différents critères à observer :

- Inflammation
- Nécrose des tubules
- Dilatation tubulaire
- Détachement cellulaire
- Intégrité des bordures en brosse
- Œdème intracellulaire
- Membrane basale dénudée

Tous ces critères suivent une échelle de 1 à 5 :

- 1 : Aucune anormalité
- 2 : Lésions légères affectant 10 % ou moins du rein
- 3 : Lésions affectant 25 % du rein
- 4 : Lésions affectant 50 % du rein
- 5 : Lésions affectant 75 % ou plus du rein

Pour chaque rat, ces valeurs sont moyennées ce qui permet d'obtenir un score indiquant le degré de lésions sur le rein.

2. IMMUNOHISTOCHEMIE : INFILTRATION LEUCOCYTAIRE CD68 POSITIVE

Suite au déparaffinage des lames contenant les coupes de reins, une procédure de démasquage antigénique est effectuée par l'incubation des lames dans le tampon Tris-EDTA (Éthylènediaminetétraacétique) (Tris 1,21 g/l, EDTA 0,37 g/l, tween 0,3 %, pH 9) chauffé à 95-100 °C pendant 15 min. Après refroidissement, les lames sont rincées à l'eau distillée pendant 5 min sous agitation. Les coupes rénales sont entourées avec le Dako Pen et lavées pendant 5 min, sous agitation, dans du tampon TBS 1X tween 0,1 %. Les lames sont ensuite incubées dans une solution de blocage (Protein Bloc sérum free, *Dako* ; X0909) pendant 30 min à température ambiante puis dans une solution d'eau oxygénée à 0,3 % (Gilbert Eau oxygénée 10V réf :Eau-OXY-125-Eti/2) pendant 5 min. Un nouveau lavage au TBS 1X tween 0,1 % est effectué. A l'issue de ces étapes, les lames sont incubées pendant la nuit à 4 °C avec une solution d'anticorps anti-CD68 (*Bio-Rad antibodies.com* ; MCA341GA), dilué dans du Dako antibody diluent (S2022) à une concentration finale de 5 µg/ml. Les lames sont ensuite lavées 2 fois dans du TBS 1X tween 0,1 % puis incubées, pendant 40 min à température ambiante, avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (*Dako HRP Envision Antimouse Réf : K4000*). Deux nouveaux lavages au TBS 1X sont effectués puis le substrat chromogène DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (*Dako real detection systems réf K5001*) dilué dans le substrat buffer (1 ml de substrat buffer + 20 µl de DAB chromogène) est appliqué sur les lames pendant 5 à 10 min à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées 2 fois dans de l'eau distillée et la contre-coloration est effectuée à température ambiante pendant 10 min avec de l'hématoxyline (*Thermo fisher ; réf : 72804*) diluée au 1/2. Les lames sont ensuite rincées avec de l'eau du robinet et le montage est effectué à l'aide d'une goutte de glycergel (C0563). Avant l'observation au microscope, les lames sont séchées à 37 °C pendant 30 min. La présence des leucocytes CD68 positifs est quantifiée sur 5 champs différents au niveau de la jonction cortico-médullaire avec un grossissement X 200.

IX. GENOTYPAGE DES RATS

Les biopsies de queues sont effectuées sur les rats RCS.

L'extraction de l'ADN (acide désoxyribonucléique) génomique a été effectuée avec le kit REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (*Sigma* ; XNAT-100RXN). Puis l'amplification du gène d'intérêt a été effectuée par la technique PCR (Polymerase chain Reaction). Les amorces « forward » (TGCTGAAAAGGAGGAAGAAATCAAG) et « reverse » (AATGATGTGCCCAAGCAGT) sont ajoutées dans la solution d'amplification (*Sigma Aldrich* ; R4775) à une concentration de 500 nM. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 2 % - SyBR Safe 1X (*Invitrogen* ; S33102) immergé dans un bac d'électrophorèse avec le tampon TAE (Tris Acétate EDTA). Le marqueur de taille d'ADN GeneRuler 100 bp DNA Ladder (*Thermoscientific* ; SM0241) est aussi déposé. La migration s'effectue pendant environ 45 min à 150 V. Le gel est révélé au Chemidoc. L'analyse se fait sur le logiciel *Image Lab*.

X. PHAGOCYTOSE IN VITRO

Le prélèvement de sang sur des rats RCS est effectué à l'aorte abdominale. Le sang récupéré est placé dans des tubes EDTA.

La lyse des globules rouges est effectuée par l'ajout de 4 volumes de tampon de lyse (NH₄Cl 0,15 M ; KHCO₃ 10 mM ; Na₂EDTA ; 0,1 mM ; pH 7,2-7,4). Les tubes sont agités délicatement et après environ 2 min (quand le sang devient noir), ils sont centrifugés à 400 g pendant 5 min. Le culot de leucocytes sanguins est resuspendu dans du milieu RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) à 10 % SVF. Les cellules sont ensuiteensemencées dans une flasque gélatinée à 1 % ou dans une plaque 6 puits avec une contre-lame au fond de chaque puits en présence de poly-lysine (*Sigma* ; P4832) puis incubées toute la nuit à 37 °C et à 5 % CO₂. Le lendemain, le surnageant de la flasque est éliminé et la flasque est lavée plusieurs fois avec du PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 1X pour enlever les globules rouges et les lymphocytes restants et ainsi conserver uniquement les cellules adhérentes (monocytes et neutrophiles) qui sont ensuite remises en culture dans du milieu RPMI 1640 à 10% SVF.

En parallèle, des cellules épithéliales rénales de rat (NRK-52), en suspension, sont incubées à 37 °C pendant 30 min à l'obscurité avec du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contenant un marqueur fluorescent, le CMF-DA (diacétate de 5-chlorométhylfluorescéine) Green 5 µM (*Abcam* ; ab145459) qui est internalisé par les cellules NRK-52. Le CMF-DA est un colorant qui traverse librement la membrane cellulaire pour être ensuite transformé et retenu à l'intérieur de la cellule. Après 5 min d'incubation à 4°C et une centrifugation de 5 min à 400g, l'apoptose des

cellules NRK-52 est induite par la mise en culture de ces cellules, pendant 3 h, dans du milieu DMEM à 2 % SVF et en présence de bicarbonate de sodium 1 % et de H₂O₂ à 150 µM. Après une centrifugation de 5 min à 400g, les corps apoptotiques des NRK-52 sont récupérés et co-incubés avec les monocytes/neutrophiles à un ratio de 5 cellules apoptotiques pour 1 monocytes/neutrophiles dans du milieu RPMI 1640 + SVF 10 % pendant 9 h à 37 °C à l'obscurité. Dans une autre condition, des billes d'une taille de 1 µm (*Molecular Probes* ; F8823) sont rajoutés sur les cultures des monocytes/neutrophiles avec un ratio identique à celui des corps apoptotiques. A l'aide de la trypsine (*Gibco* ; 25300-054), les monocytes/neutrophiles de la flasque sont récupérés et centrifugés à 400g pendant 5 min. Le culot est resuspendu et les puits de la plaque sont incubés avec un anticorps anti-CD45-PE (*BioLegend* ; 202207 ; 0,2 mg/ml) à une concentration finale de 2 µg/ml. Après une incubation de 45 min à température ambiante à l'obscurité, 4 volumes de tampon de FACS (PBS 1X BSA 0,5 % EDTA 2 mM) sont ajoutés. Avant l'acquisition, une concentration finale de 2 % de bleu de Trypan est ajoutée. La suspension cellulaire est analysée au cytomètre de *BD Biosciences Acuri 6*.

L'apoptose des NRK-52 a été évaluée, au cytomètre, par un marquage de ces cellules à l'annexine V-FITC.

Concernant la plaque 6 puits, les puits sont lavés au PBS 1X puis les contre-lames sont récupérées et observées au microscope confocal *Olympus*.

XI. ANALYSES STATISTIQUES

Les données sont représentées sous forme de moyennes ± SEM par l'utilisation du logiciel *GraphPad PRISM 7*. Les analyses statistiques, comportant de plus de deux groupes, sont réalisées à l'aide du test Kruskal-Wallis suivi du test Dunn pour obtenir une comparaison entre chaque groupe. Pour les expériences avec deux groupes, le test Mann-Whitney est utilisé. Si les analyses révèlent une p-value inférieure ou égale à 0,05 alors une différence significative est établie pour les groupes comparés. p>0,05 : ns (non significatif) ; p<0,05 : * ; p<0,01 : ** ; p<0,005 : *** ; p<0,001 : **** ; nd (non détectable)

RESULTATS

I. VALIDATION DE LA MUTATION CHEZ LES RATS RCS

Les rats RCS^{-/-} sont caractérisés par la présence d'une mutation sur le gène *rdy*. Cette mutation provoque un décalage de la séquence d'ADN et donne lieu à un codon STOP précoce. À terme, la protéine MerTK, qui résulte de l'expression de ce gène, donne forme à une protéine raccourcie et non-fonctionnelle.

Afin d'étudier l'implication de MerTK dans le développement des lésions liées à une I/R rénale chez les rats RCS, nous avons tout d'abord vérifié la présence de cette mutation par la technique PCR mais également par la technique de Western Blotting pour l'expression de la protéine MerTK.

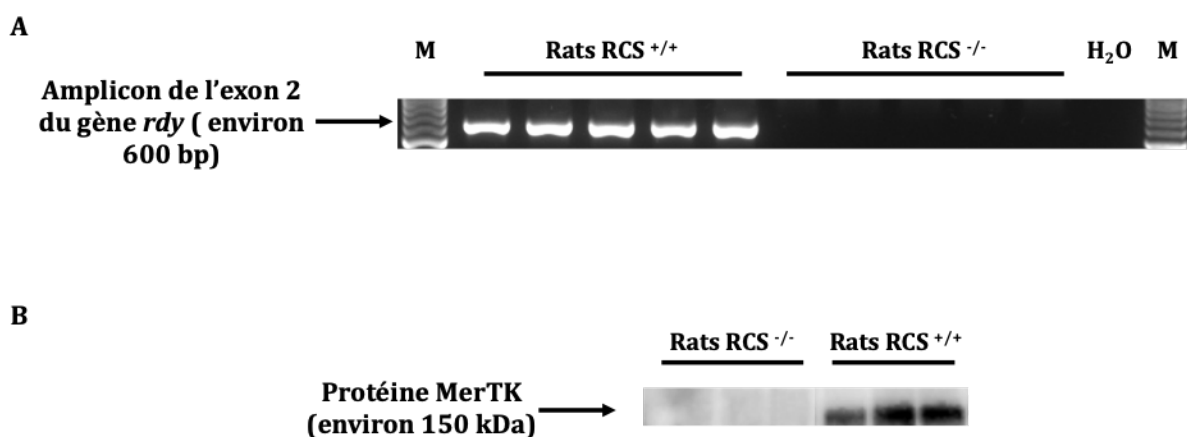


Figure 19 : Validation de la mutation génétique des rats RCS par géotypage et expression protéique de MerTK par Western Blot

L'ADN est extrait sur des morceaux de queue de rats RCS. La séquence d'intérêt est amplifiée par PCR et sa taille est évaluée par un gel d'électrophorèse. La délétion du gène *rdy* est mise en évidence sur les rats RCS^{-/-} ($n=5$) par rapport aux rats RCS^{+/+} ($n=5$) (A). Le western blot est effectué sur des extraits protéiques de reins. L'utilisation de l'anticorps anti MerTK révèle l'expression de MerTK (rats RCS^{+/+} ; $n=3$) ou son absence (rats RCS^{-/-} ; $n=3$).

Le géotypage de ces rats s'est appuyé sur le choix des amorces mettant en évidence la délétion présente sur l'exon 2 par la présence d'un amplicon de plus petite taille pour les rats RCS^{-/-}. Le poids moléculaire de la protéine MerTK est évalué à environ 150 kDa dans le rein de rat RCS^{+/+} alors que chez les rats RCS^{-/-}, l'expression de la protéine MerTK devrait être inexistante ou alors sous forme d'une protéine de 12 kDa environ.

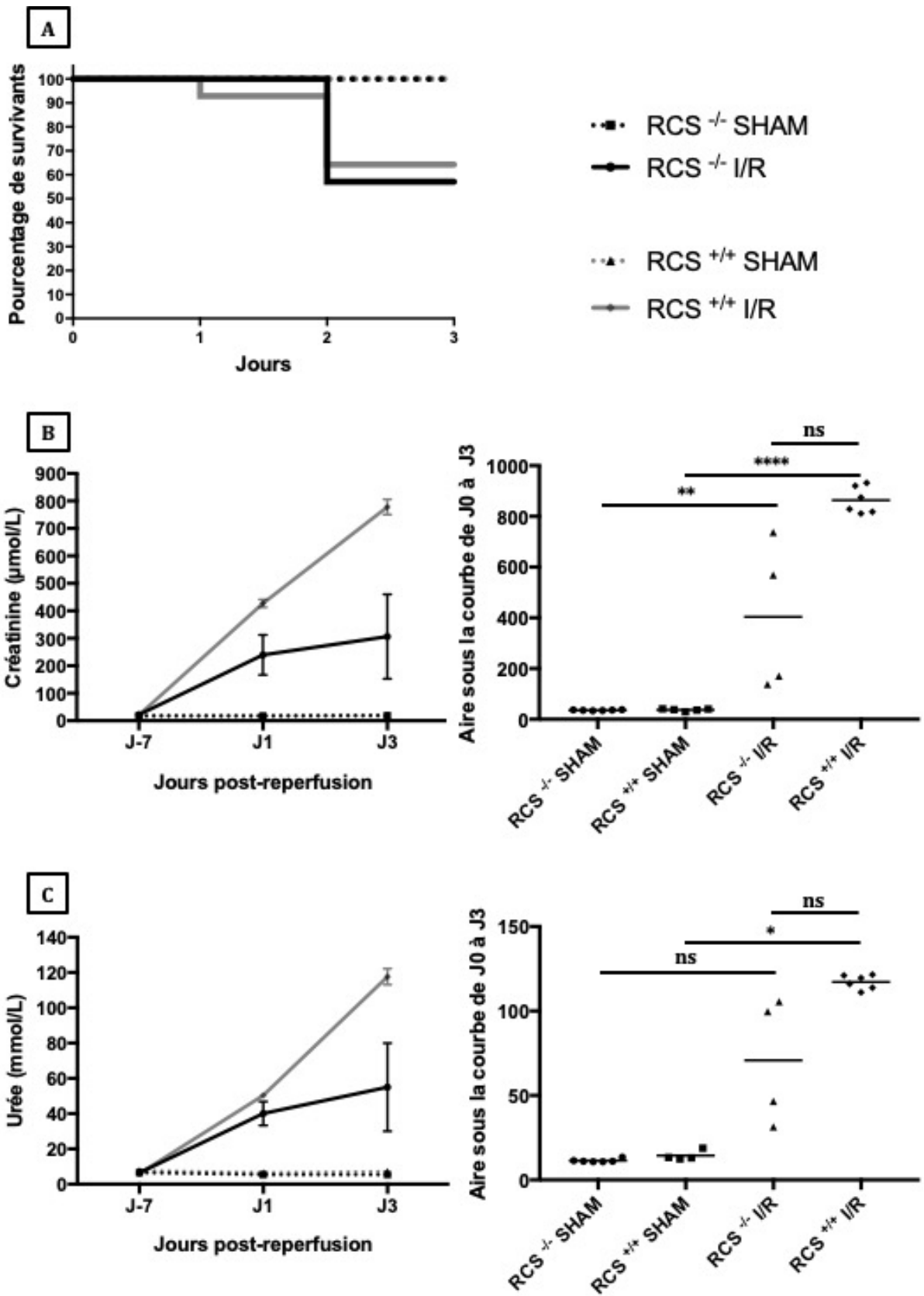
Le géotypage des rats RCS (figure 19A) permet de montrer la délétion présente sur le gène *rdy* des rats RCS^{-/-} par l'absence de l'amplicon sur le gel d'électrophorèse. Suite à cela, la technique de Western Blot (figure 19B) révèle l'absence d'expression de la protéine MerTK chez les rats RCS^{-/-}. À l'inverse, cette protéine est bien exprimée chez les rats RCS^{+/+}. Ces résultats valident le modèle

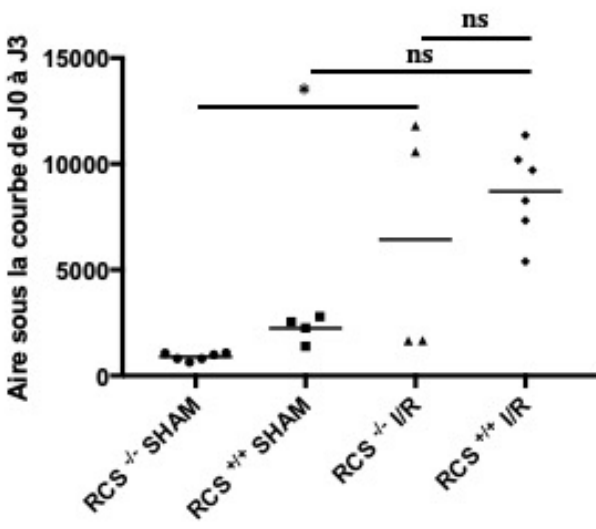
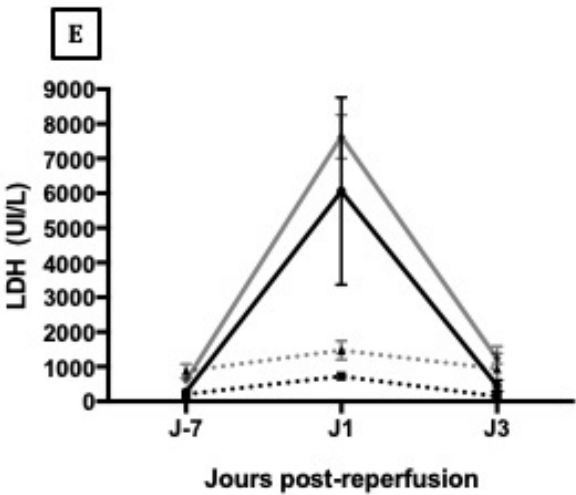
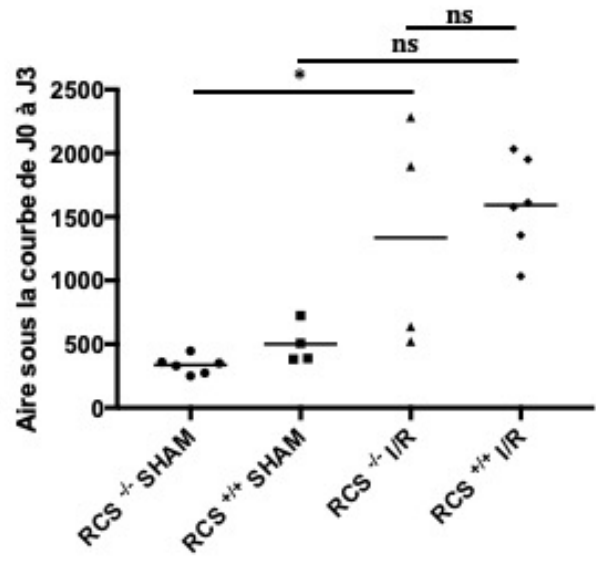
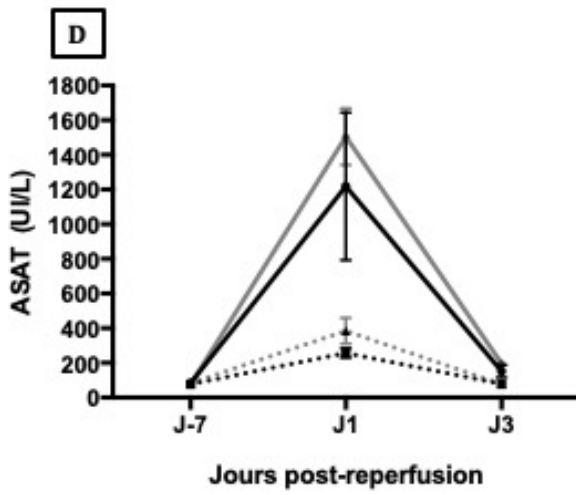
rat RCS et nous permettent de poursuivre l'étude sur le rôle de MerTK lors d'une I/R rénale chez ces rats.

II. ÉVALUATION DE L'IMPACT DE MERTK DANS UN MODELE D'I/R RENALE DE RAT RCS (ISCHEMIE DE 1 H)

1. ÉVALUATION DE LA CINETIQUE DES BIOMARQUEURS PLASMATIQUES DE FONCTION ET DE LÉSIONS RENALES SUITE A 1 H D'ISCHEMIE RENALE

La séquence d'I/R rénale est effectuée par le clampage des pédicules rénaux pendant 1 h correspondant à la phase d'ischémie. Après cela, les pédicules sont déclampés représentant ainsi la phase de reperfusion. En parallèle, des animaux SHAM qui retranscrivent le même mode opératoire que précédemment mais sans clampage des reins sont effectués. Ainsi, les SHAM sont des contrôles idéaux pour évaluer le rôle de l'I/R dans notre étude. De plus, d'autres rats contrôles à J0 subissent une chirurgie identique afin de prélever les reins et le sang à l'état basal (contrôles J0). Ces contrôles mettent en évidence uniquement les impacts potentiels de la chirurgie sans les effets post-opératoires. Suite à ces chirurgies, certains groupes sont mis à mort après 1 ou 3 jours de reperfusion avec un prélèvement de sang et des reins. Les analyses statistiques sont effectuées entre les groupes I/R et leur groupe SHAM attribués et aussi entre les deux groupes d'I/R. Afin d'évaluer les conséquences de l'I/R, nous avons établi une courbe de Kaplan-Meier de survie et dosé plusieurs marqueurs de lésions et de fonction rénales.





- RCS +/- SHAM
- RCS +/- I/R
- RCS +/- SHAM
- ▲— RCS +/- I/R

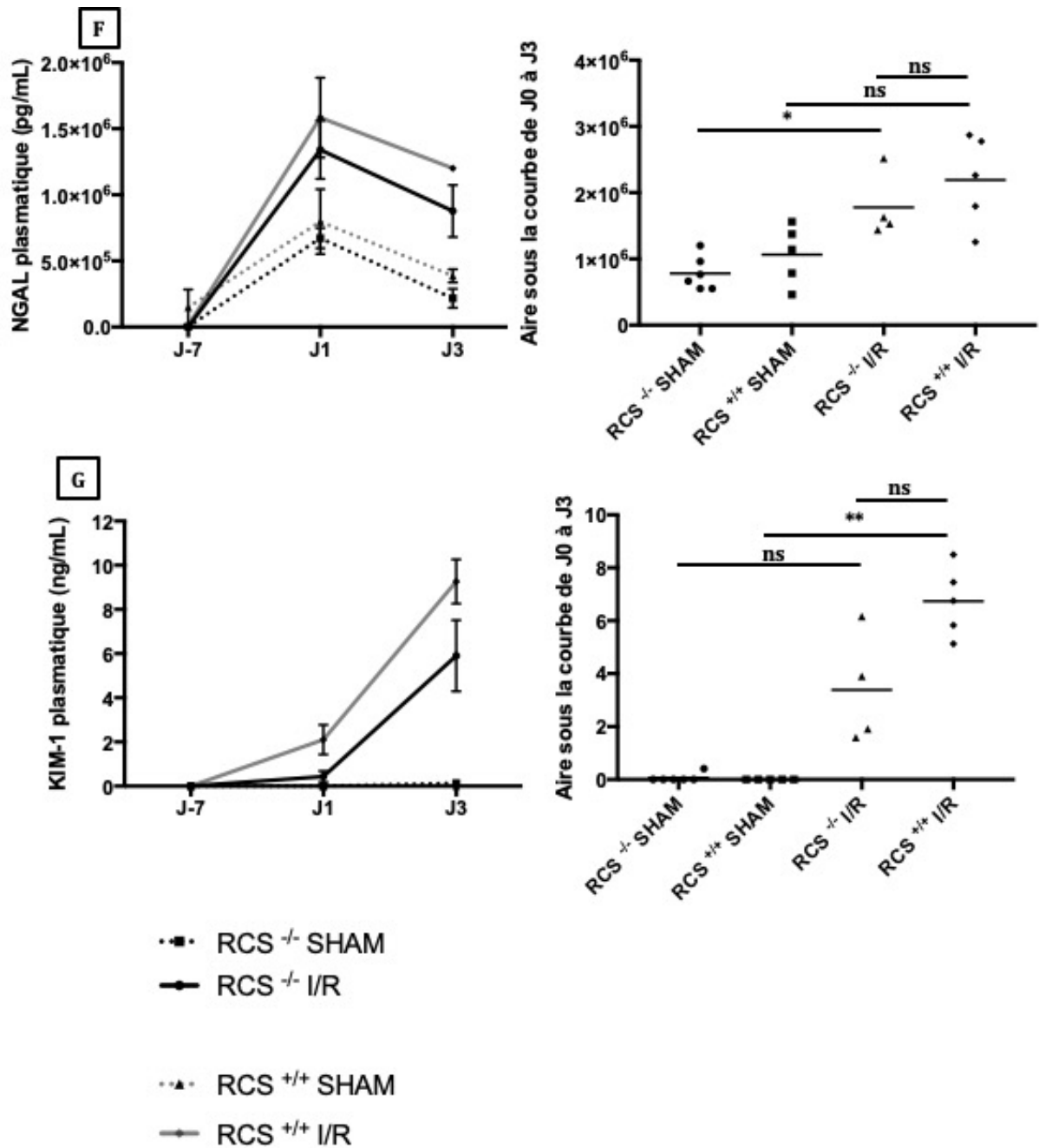


Figure 20 : Étude des biomarqueurs plasmatiques de fonction et de lésions rénales suite à une ischémie rénale bilatérale de 1 h

Courbe de survie des rats opérés (A), Cinétique des marqueurs de la fonction rénale sur du plasma de rats RCS prélevé à J-7, J1 et J3 : créatinine (B), urée (C), ASAT (D), LDH (E), NGAL (F) et KIM-1 (G). L'analyse statistique est effectuée sur l'aire sous les courbes calculée, pour chaque marqueur, à partir des cinétiques de J0 à J3 post ischémie, et représentée sur les panneaux de droite des figures B, C, D, E, F, et G. RCS^{-/-} SHAM (n=6), RCS^{-/-} I/R (n=4), RCS^{+/+} SHAM (n=4), RCS^{+/+} I/R (n=6)

La courbe de Kaplan-Meier (figure 20A) montre l'impact négatif de l'ischémie rénale de 1 h sur la survie des rats. En effet, après 2 jours de reperfusion, le groupe de rats RCS^{+/+} I/R perd plus

de 30 % de sa population. La perte pour le groupe de rats RCS^{-/-} I/R est supérieure à 40 %. Pour les groupes SHAM, aucune perte n'est enregistrée au cours de ces 3 jours de reperfusion. La mutation du gène MerTK ne semble pas avoir d'effet significatif sur la survie des rats après une séquence d'I/R.

Pour évaluer l'effet de l'I/R sur la fonction et les lésions rénales, nous avons dosé 6 biomarqueurs sanguins : la Créatinine, l'Urée, l'ASAT, les LDH, NGAL et KIM-1. Afin d'établir une cinétique, un prélèvement de sang est effectué sur les rats à différents temps en prenant la chirurgie comme jour de référence : J-7, J1 et J3. Le point J-7 détermine la valeur seuil pour chacun des marqueurs.

Les cinétiques de la créatinine (figure 20B, panneau de gauche) et de l'urée (figure 20C, panneau de gauche) montrent un profil similaire qui se décrit par une augmentation considérable et continue de la sécrétion de ces deux marqueurs au cours des trois jours de reperfusion pour les groupes RCS I/R. Le groupe RCS^{+/+} I/R se démarque par une augmentation plus élevée pour la créatinine (815 $\mu\text{mol/l}$ à J3) et l'urée (123,4 mmol/l à J3). Les groupes SHAM quant à eux, gardent des valeurs basales tout au long des 3 jours de reperfusion. L'analyse statistique de l'aire sous les courbes (figure 20B et C, panneau de droite) révèle une augmentation significative de la concentration plasmatique de ces marqueurs chez les groupes I/R par rapport aux groupes SHAM correspondants sauf pour l'urée dont le taux ne varie pas de façon significative entre les groupes RCS^{-/-} I/R et RCS^{-/-} SHAM. De plus, cette analyse ne révèle aucune différence significative de sécrétion de ces deux marqueurs entre les groupes I/R.

Concernant les marqueurs ASAT (figure 20D, panneau de gauche) et LDH (figure 20E, panneau de gauche), l'étude montre une élévation de leur concentration plasmatique atteignant un pic au premier jour de la reperfusion pour les quatre groupes. L'augmentation pour les groupes I/R est beaucoup plus importante et atteint pour ASAT à J1 une moyenne de 1463 UI/l et pour LDH une moyenne de 7814 UI/l chez le groupe RCS^{+/+} I/R contre 427 UI/l d'ASAT et 1659 UI/l de LDH pour son groupe contrôle. Après 3 jours de reperfusion, la concentration plasmatique de ASAT et LDH reviennent quasiment à leur valeur seuil pour les 4 groupes. L'analyse statistique de l'aire sous la courbe (figure 20D et E, panneaux de droite) montre une différence significative entre les groupes RCS^{-/-} SHAM et RCS^{-/-} I/R contrairement aux groupes RCS^{+/+} I/R et RCS^{+/+} SHAM. Aucune différence notable n'est montrée entre les groupes I/R au cours de la reperfusion.

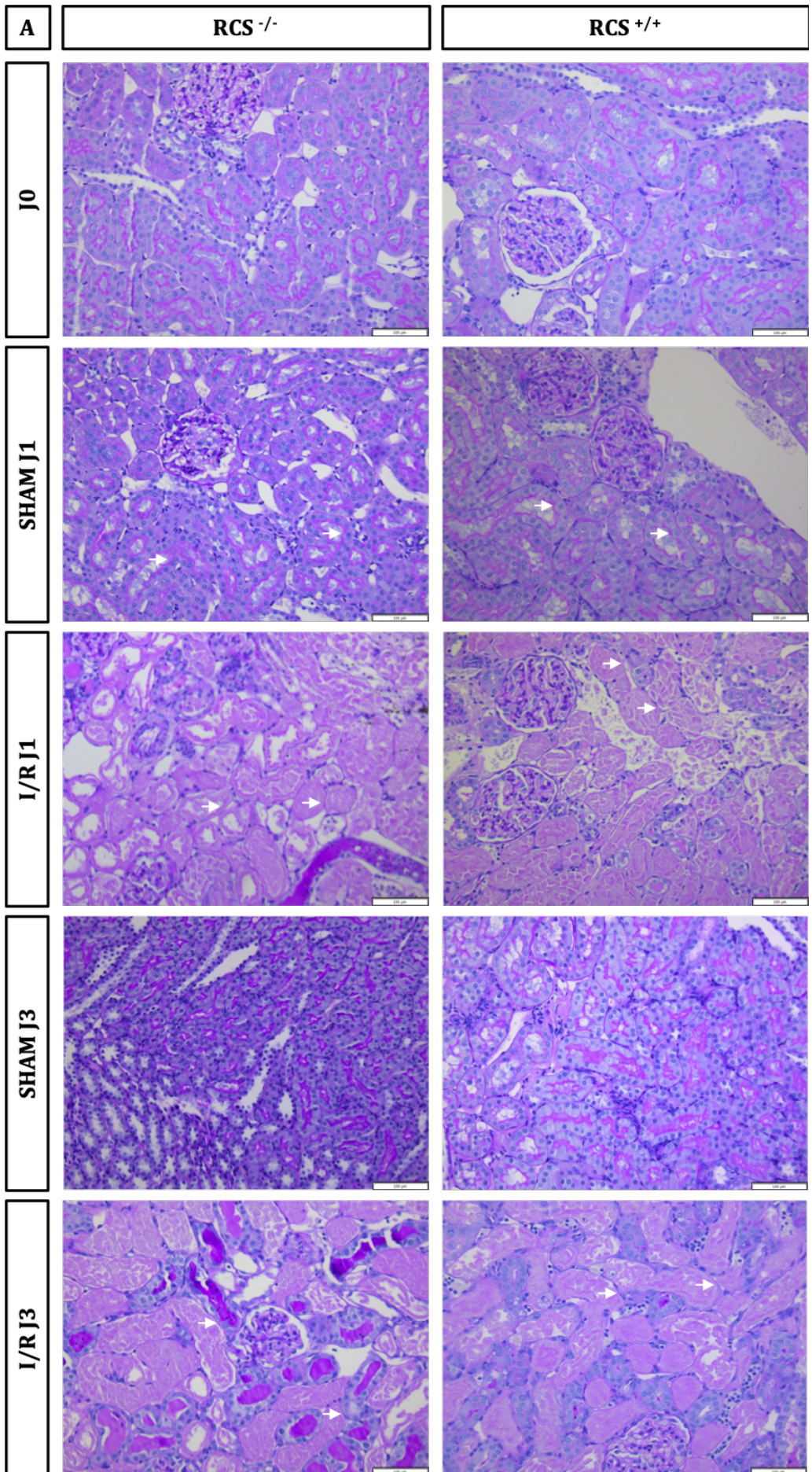
La cinétique de sécrétion de NGAL (figure 20F, panneau de gauche) est similaire à celles de LDH et de ASAT avec une faible diminution entre J1 et J3. Le pic de sécrétion pour les groupes RCS^{-/-} I/R et RCS^{+/+} I/R atteint une valeur respective de $1,34 \cdot 10^6$ et $1,58 \cdot 10^6$ pg/ml respectivement contre $0,67 \cdot 10^6$ et $0,79 \cdot 10^6$ pg/ml pour les groupes SHAM respectifs. L'analyse de l'aire sous la courbe (figure 20F, panneau de droite) permet de confirmer partiellement cette différence. En

effet, seule le groupe RCS^{-/-} I/R est significativement différent par rapport aux rats RCS^{-/-} SHAM. La comparaison des groupes I/R entre eux ne montre aucune différence significative de sécrétion de NGAL. À l'inverse, la sécrétion de KIM-1 (figure 20G, panneau de gauche) est significativement augmentée dans le groupe RCS^{+/+} I/R par rapport au groupe RCS^{+/+} SHAM. Pour cette cinétique, nous observons d'abord une légère augmentation de sécrétion de KIM-1 entre J-7 et J1 qui passe de 0 à 0,43 ng/ml et de 0 à 2,10 ng/ml pour les groupes RCS^{-/-} I/R et les groupes RCS^{+/+} I/R respectivement, puis une augmentation plus intense entre J1 et J3 qui passe de 0,43 à 5,90 ng/ml et de 2,10 à 9,27 ng/ml pour les groupes RCS^{-/-} I/R et les groupes RCS^{+/+} I/R respectivement.

En conclusion, les évaluations cinétiques de ces biomarqueurs sanguins mettent en évidence les lésions cellulaires et une fonction rénale altérée lors de la séquence d'I/R. Cependant, au cours de cette séquence, aucune différence n'est observée entre les rats RCS^{-/-} et les rats RCS^{+/+}.

2. ANALYSES DES LESIONS HISTOLOGIQUES SUITE A 1 H D'ISCHEMIE RENALE

Les biomarqueurs ont montré des lésions cellulaires et une fonction rénale diminuée pour les groupes d'I/R. L'analyse histologique permet d'illustrer l'évolution de ces lésions cellulaires localisées sur le rein.



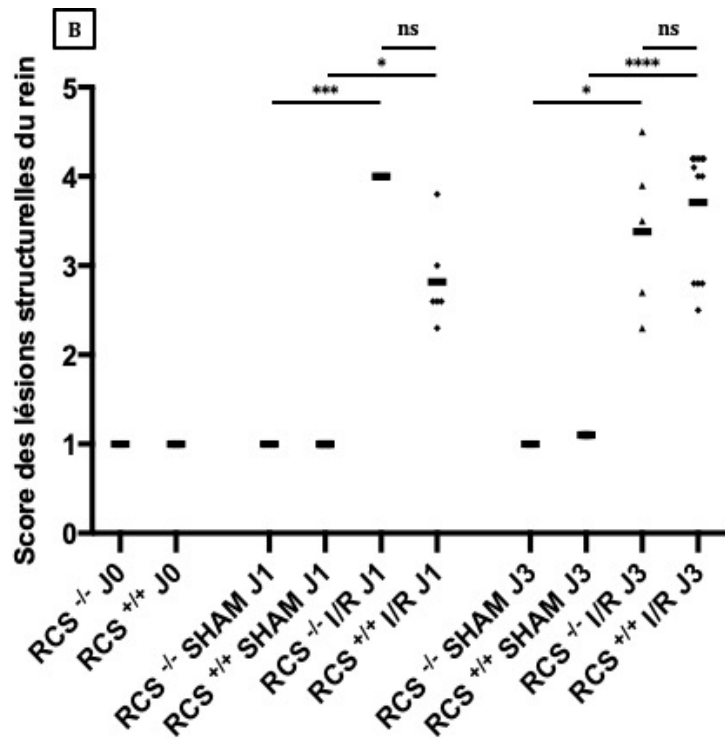


Figure 21 : Étude histologique de l'intégrité des structures rénales suite à une ischémie de 1 h

Les reins sont prélevés sur les rats mis à mort après une reperfusion de 1 et 3 jours. Ils sont ensuite fixés au paraformaldéhyde 4 % puis inclus en paraffine. Les coupes rénales, après une déshydratation, subissent une coloration HES-PAS. L'observation au microscope permet d'évaluer l'intégrité des structures suivant un score basé sur des critères définis (grossissement X200)(A). Les scores sont moyennés pour chaque rat et reportés sur un graphique (B). RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=6), RCS^{-/-} I/R J1 (n=6), RCS^{+/+} I/R J1 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=5), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=7), RCS^{-/-} I/R J3 (n=10), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7)

Pour visualiser histologiquement les lésions tissulaires potentielles dans le rein, une coloration HES-PAS est effectuée sur des coupes rénales provenant de reins inclus en paraffine. L'observation au microscope (figure 21A) montre principalement la perte de l'intégrité des structures tubulaires dans les groupes d'I/R : perte de la bordure en brosse (flèche blanche), débris cellulaire présents dans la lumière des tubules, dilatation des tubules.

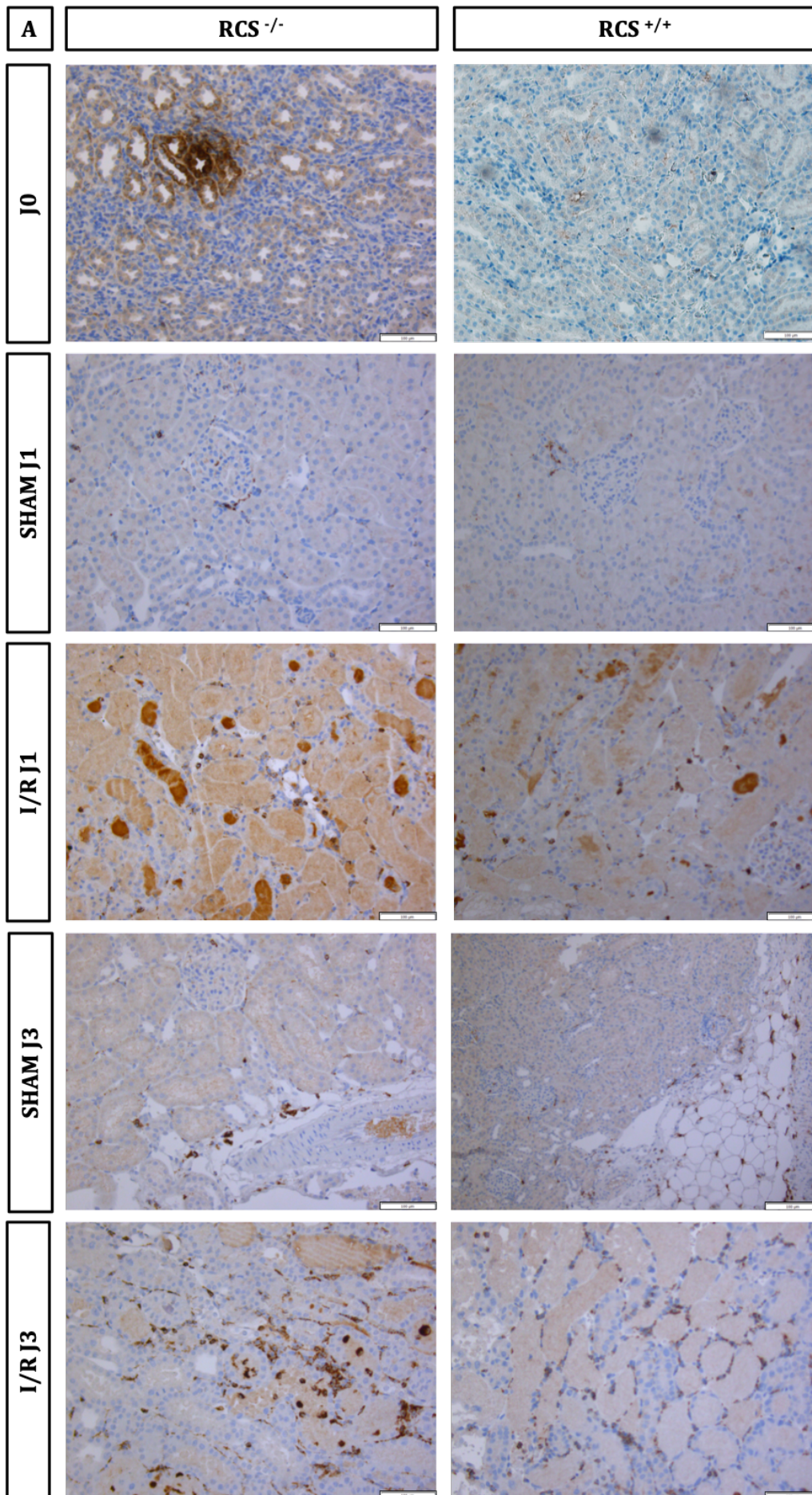
Afin de comparer chaque groupe, l'observation s'est concentrée sur plusieurs critères (décrits dans le matériel et méthodes). Pour chaque critère, une moyenne des scores de lésions est calculée (score établi sur la superficie des coupes rénales affectée par cette lésion). Les résultats (figure 21B) ne montrent aucune anomalie sur les groupes SHAM à J0 alors qu'après une reperfusion de 1 jour, l'I/R, sur les rats RCS^{+/+} et RCS^{-/-}, cause des lésions rénales significatives sur le rein. Néanmoins, la sévérité de ces lésions ne se différencie pas entre les deux groupes I/R.

Sur une reperfusion de 3 jours, l'analyse histologique, après une I/R, montre également de sévères lésions sur les structures tubulaires en comparaison avec les groupes SHAM : perte de la bordure en brosse, débris cellulaire présents dans la lumière des tubules, dilatation des tubules. Ces observations se valident par la figure 21B qui montre que les groupes I/R ont un score significativement élevé : 3,38 pour le groupe RCS^{-/-} et 3,70 pour le groupe RCS^{+/+} par rapport aux groupes SHAM qui ont des scores de 1 et de 1,1 respectivement. Ces scores des groupes d'I/R signifient que les lésions affectent entre 25 et 50 % du rein.

En corrélation avec les biomarqueurs plasmatiques, l'étude histologique ne démontre pas de différence entre les rats RCS^{-/-} et les rats RCS^{+/+}.

3. ÉVALUATION DE L'INFILTRATION LEUCOCYTAIRE AU SEIN DU TISSU SUITE A 1 H D'ISCHEMIE RENALE

L'une des conséquences des lésions engendrées par l'I/R est l'activation de l'inflammation qui passe par un recrutement leucocytaire. Nous avons recherché la présence de macrophages et de neutrophiles sur des coupes rénales par immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti-CD68. En effet, nous nous sommes concentrés sur l'infiltrat des macrophages et neutrophiles : leucocytes CD68 positifs dotés de la capacité de phagocytose, mécanisme impliquant le récepteur MerTK.



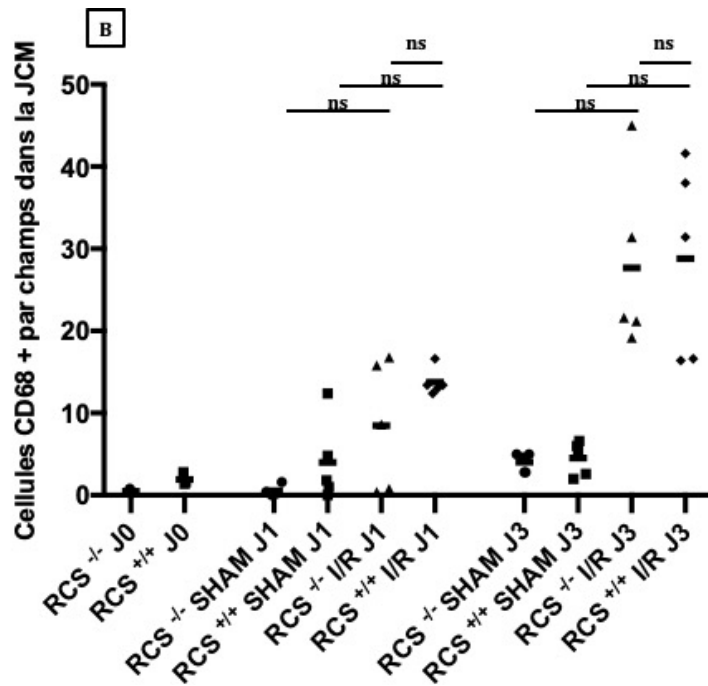


Figure 22 : Étude, par immunohistochimie, de l'infiltration leucocytaire dans le rein suite à une ischémie de 1 h

Les reins sont prélevés sur les rats mis à mort après une reperfusion de 1 et 3 jours. Ils sont ensuite fixés au paraformaldéhyde 4 % puis inclus en paraffine. Les leucocytes sont marqués, par la technique d'immunohistochimie, à l'aide de l'anticorps anti-CD68. L'évaluation de l'infiltration leucocytaire est effectuée par un comptage des cellules CD68 positifs à raison de 5 champs par coupe rénale au grossissement X200 (A). Les champs choisis sont localisés sur la jonction cortico-médullaire du rein. Le nombre de cellules comptées sur les 5 champs est moyenné et reporté sur un graphique (B). RCS^{-/-} J0 (n=3), RCS^{+/-} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=4), RCS^{+/-} SHAM J1 (n=5), RCS^{-/-} I/R J1 (n=5), RCS^{+/-} I/R J1 (n=5), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=5), RCS^{+/-} SHAM J3 (n=5), RCS^{-/-} I/R J3 (n=5), RCS^{+/-} I/R J3 (n=5)

L'observation des coupes immunohistologiques (Figure 22A) montre un marquage CD68 bien présent sur des coupes provenant des groupes I/R et qui est plus faible pour les groupes SHAM et quasiment inexistant pour les groupes J0. Dans l'ensemble, ce marquage semble plutôt être localisé dans le milieu interstitiel en contact avec les tubules. La quantification s'est effectuée par un comptage du nombre de cellules CD68 positives sur 5 champs avec un grossissement X200 pour chaque coupe rénale. Cette quantification s'est focalisée sur la jonction cortico-médullaire (JCM). Après 1 jour de reperfusion, l'I/R semble augmenter le recrutement des macrophages et des neutrophiles avec une moyenne de 8,5 et de 12,8 leucocytes par champs pour les groupes RCS^{-/-} I/R et RCS^{+/-} I/R respectivement, contre une moyenne respective de 0,6 et de 6 leucocytes par champs pour les groupe RCS^{-/-} SHAM et RCS^{+/-} SHAM. Néanmoins, ces résultats n'ont pas montré de différence significative entre les groupes. L'évolution à 3 jours de reperfusion montre une infiltration leucocytaire significativement plus élevée chez les groupes I/R avec une moyenne

respective de 27,68 et de 28,8 leucocytes par champs pour les groupes RCS^{-/-} I/R et RCS^{+/+} I/R, contre 4,04 et 4,52 leucocytes par champs pour les groupes RCS^{-/-} SHAM et RCS^{+/+} SHAM respectivement.

Afin de compléter cette observation, plusieurs marqueurs de cellules leucocytaires sont évalués par la technique de Western Blot sur des extraits protéiques rénaux. Les figures 23 et 24 représentent, respectivement, les résultats des marquages CD68 (macrophages et neutrophiles) et MPO (neutrophiles activés).

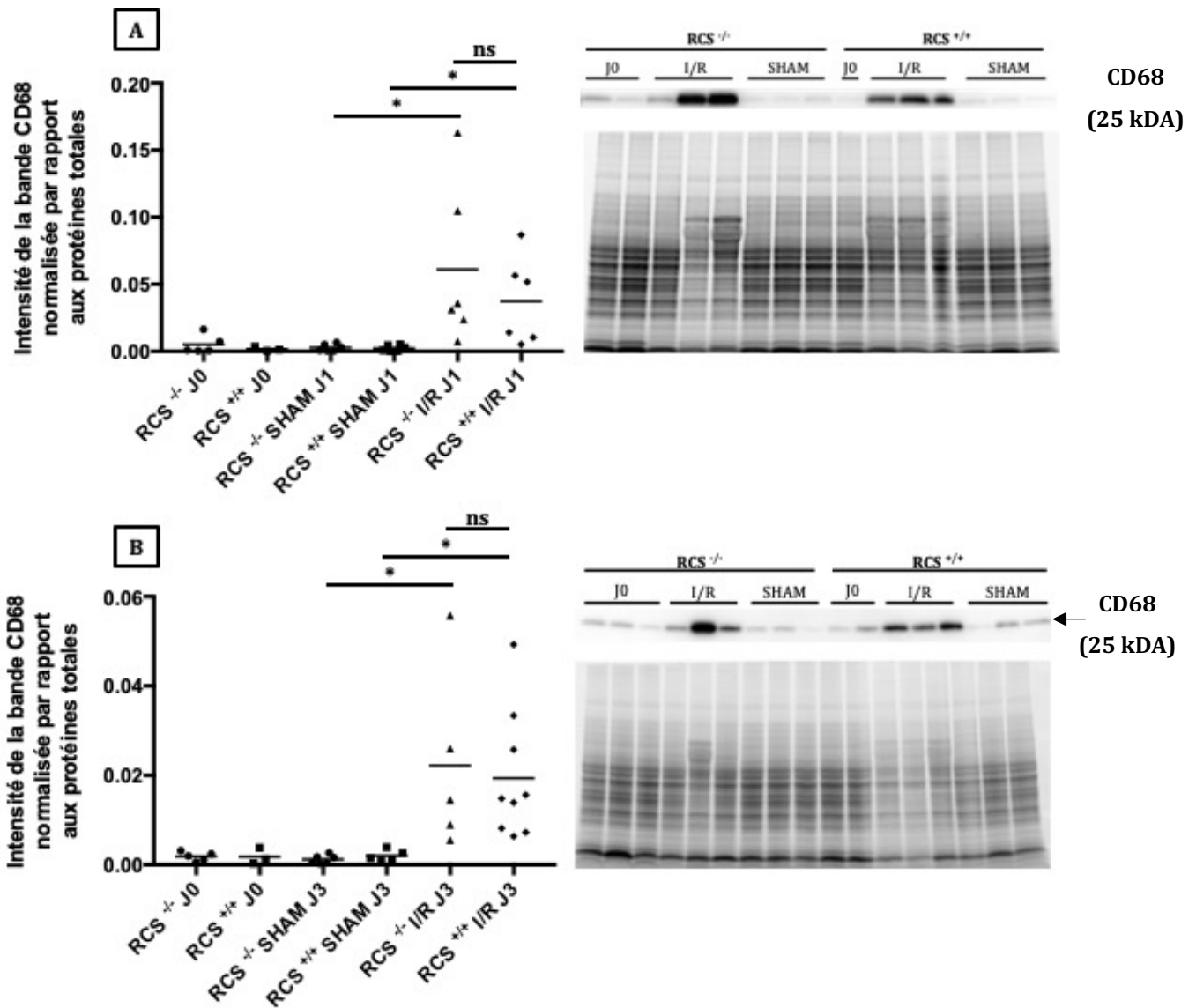


Figure 23 : Quantification, par Western Blot, de CD68 tissulaire suite à une ischémie de 1 h

Les protéines sont extraites du rein et déposées sur un gel de polyacrylamide. Une fois la migration terminée, les protéines totales sont révélées (stain free). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. La protéine CD68 (25 kDa) est révélée à l'aide d'un anticorps anti-CD68. La quantification et la normalisation de CD68 à J1 (A) et à J3 (B) s'effectue par la mesure de la densité de la bande d'intérêt et des protéines totales à l'aide du logiciel Image Lab. Le ratio CD68/protéines totales de chaque rein testé est reporté sur les graphiques A et B, panneaux de gauche. Les images des membranes associées aux graphiques sont représentées sur les figures A et B, panneaux de droite. RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=6), RCS^{-/-} I/R J1 (n=6), RCS^{+/+} I/R J1 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=5), RCS^{-/-} I/R J3 (n=5), RCS^{+/+} I/R J3 (n=9)

Les résultats sont en accord avec les immunomarquages de la figure 22 car la quantification révèle une augmentation significative de la présence de CD68, après 1 jour de reperfusion (figure 23A, panneau de gauche), dans les extraits protéiques des groupes I/R en comparaison avec les

groupes SHAM correspondants. Cette augmentation semble être accentuée dans les groupes I/R J3 (figure 23B, panneau de gauche).

Pour mieux caractériser les fonctions des macrophages et des neutrophiles présents sur le site de l'inflammation, nous avons quantifié les enzymes MPO, exprimées par les neutrophiles activés et l'enzyme iNOS exprimée notamment par les macrophages inflammatoires de type I, ainsi que H3A, marqueur de NETose médiée par les neutrophiles activés.

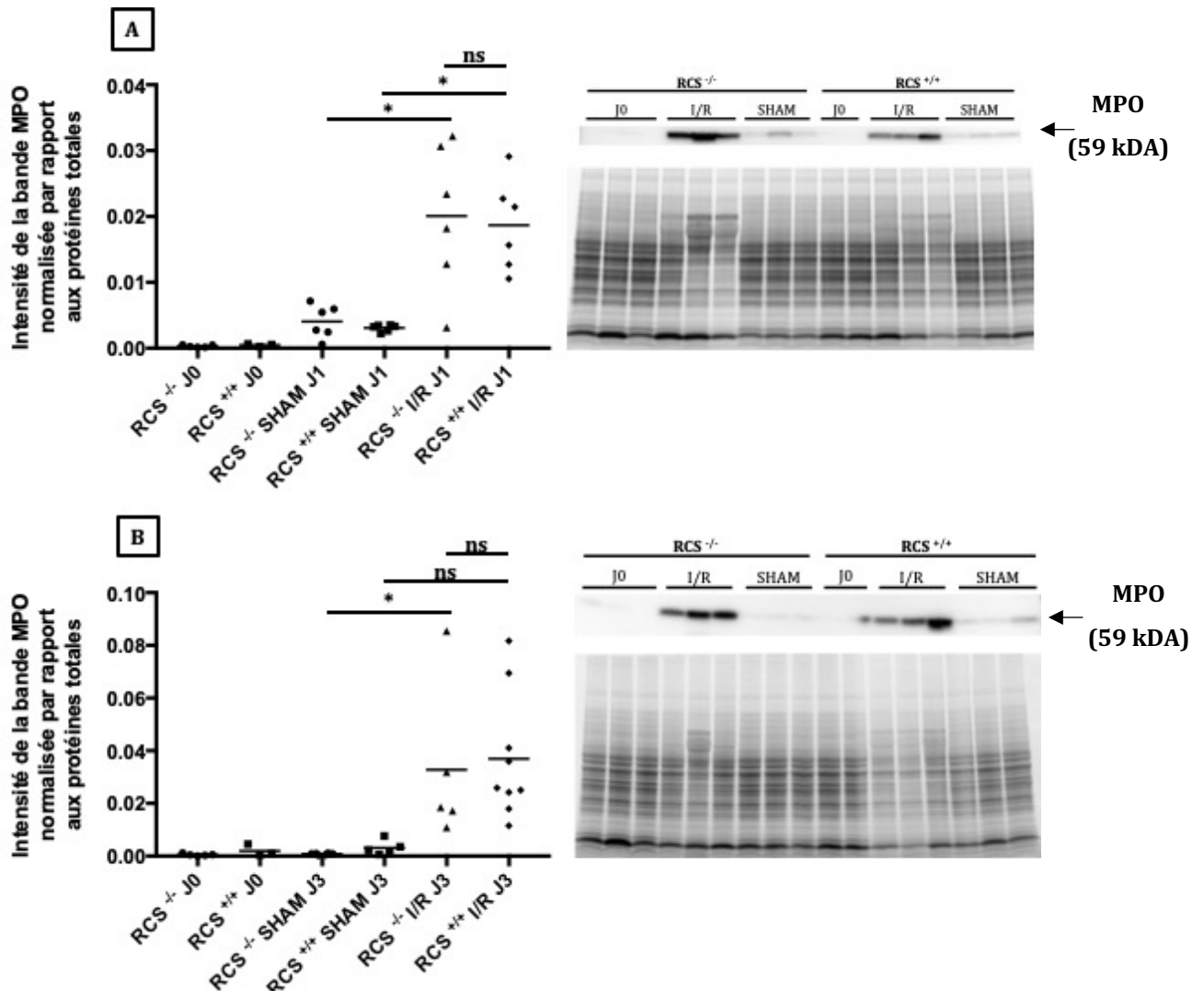


Figure 24 : Quantification, par Western Blot, de MPO tissulaire suite à une ischémie de 1 h

Les protéines sont extraites du rein et déposées sur un gel polyacrylamide. Une fois la migration terminée, les protéines totales sont révélées (stain free). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. La protéine MPO (59 kDa) est révélée à l'aide de l'anticorps anti-MPO. La quantification et la normalisation de MPO à J1 (A) et à J3 (B) s'effectue par la mesure de la densité de la bande d'intérêt et des protéines totales à l'aide du logiciel Image Lab. Le ratio protéine MPO/protéines totales de chaque rein testé est reporté sur un graphique (A et B, panneaux de gauche). Les images des membranes associées aux graphiques sont représentées sur les figures A et B, panneaux de droite. RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=6), RCS^{-/-} I/R J1 (n=6), RCS^{+/+} I/R J1 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=5), RCS^{-/-} I/R J3 (n=5), RCS^{+/+} I/R J3 (n=9)

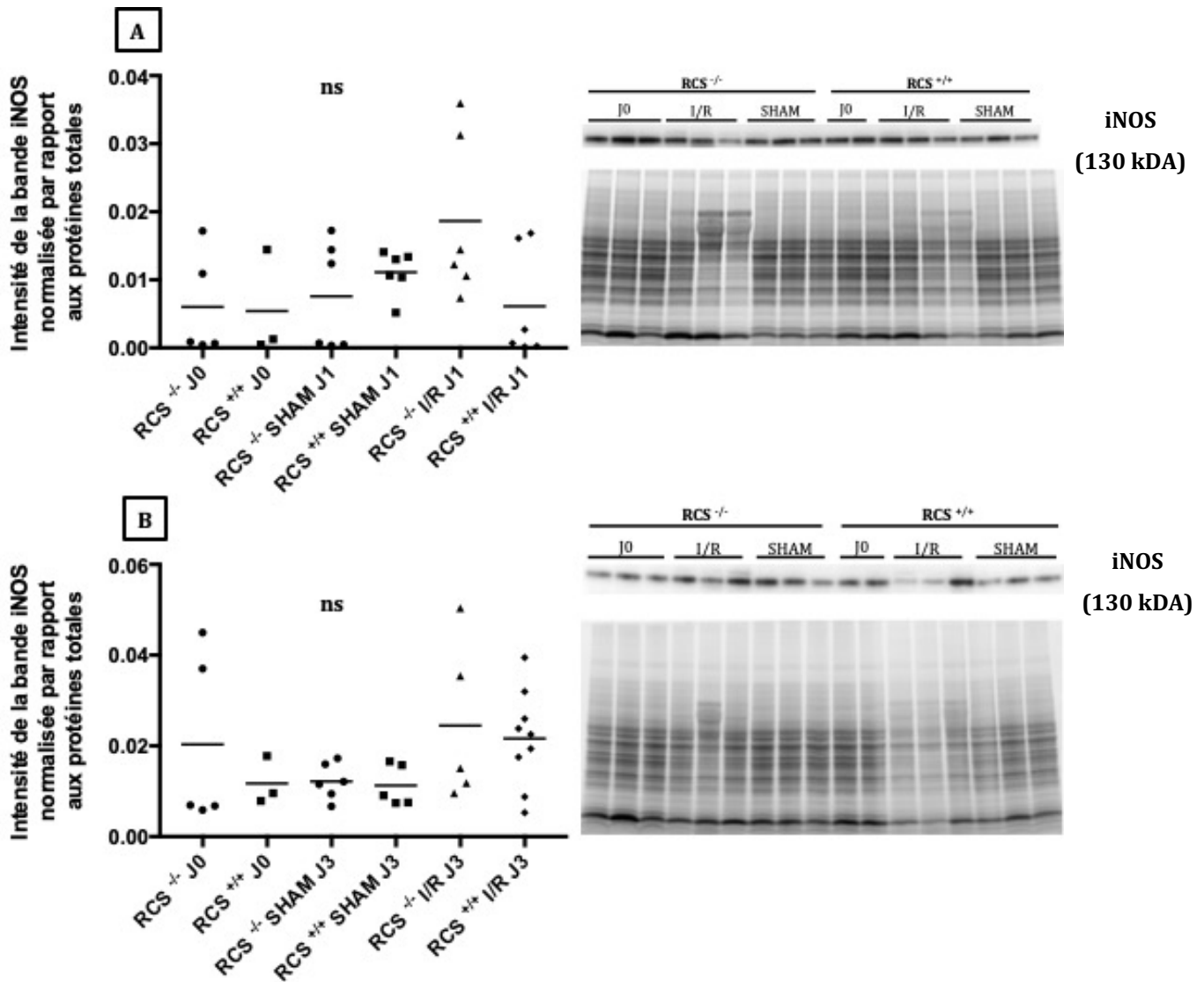


Figure 25 : Quantification, par Western Blot, de iNOS tissulaire suite à une ischémie de 1 h

Les protéines sont extraites du rein et déposées sur un gel polyacrylamide. Une fois la migration terminée, les protéines totales sont révélées (stain free). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. La protéine iNOS (130 kDa) est révélée à l'aide de l'anticorps anti iNOS. La quantification et la normalisation de iNOS à J1 (A) et à J3 (B) s'effectue par la mesure de la densité de la bande d'intérêt et des protéines totales à l'aide du logiciel Image Lab. Le ratio protéine iNOS /protéines totales de chaque rein testé est reporté sur un graphique (A et B, panneaux de gauche). Les images des membranes associées aux graphiques sont représentées sur les figures A et B, panneaux de droite. RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=6), RCS^{-/-} I/R J1 (n=6), RCS^{+/+} I/R J1 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=5), RCS^{-/-} I/R J3 (n=5), RCS^{+/+} I/R J3 (n=9)

La figure 24A montre le recrutement des neutrophiles à travers le marqueur MPO. Celui-ci augmente significativement, avec une similarité proche, chez les groupes I/R J1 en comparaison aux groupes SHAM J1. À J3, la quantité de MPO est également augmentée chez les groupes I/R

malgré une absence de significativité pour les rats RCS^{+/+} par rapports aux rats SHAM correspondants.

L'analyse de la figure 25, aux deux temps de reperfusion, montre que cette enzyme est exprimée chez tous les groupes sans réelle variabilité entre ces groupes.

La NETose est une action bien connue des neutrophiles activés qui consiste en un relargage de leur contenu pour piéger des cellules lésées. L'ADN est un élément important dans ce mécanisme. Les histones présentes dans ce mécanisme ont la caractéristique « unique » d'avoir subi des étapes de citrullination. Grâce à un anticorps H3a reconnaissant certains sites de citrullination, nous avons cherché à détecter cette histone citrullinée par Western Blot.

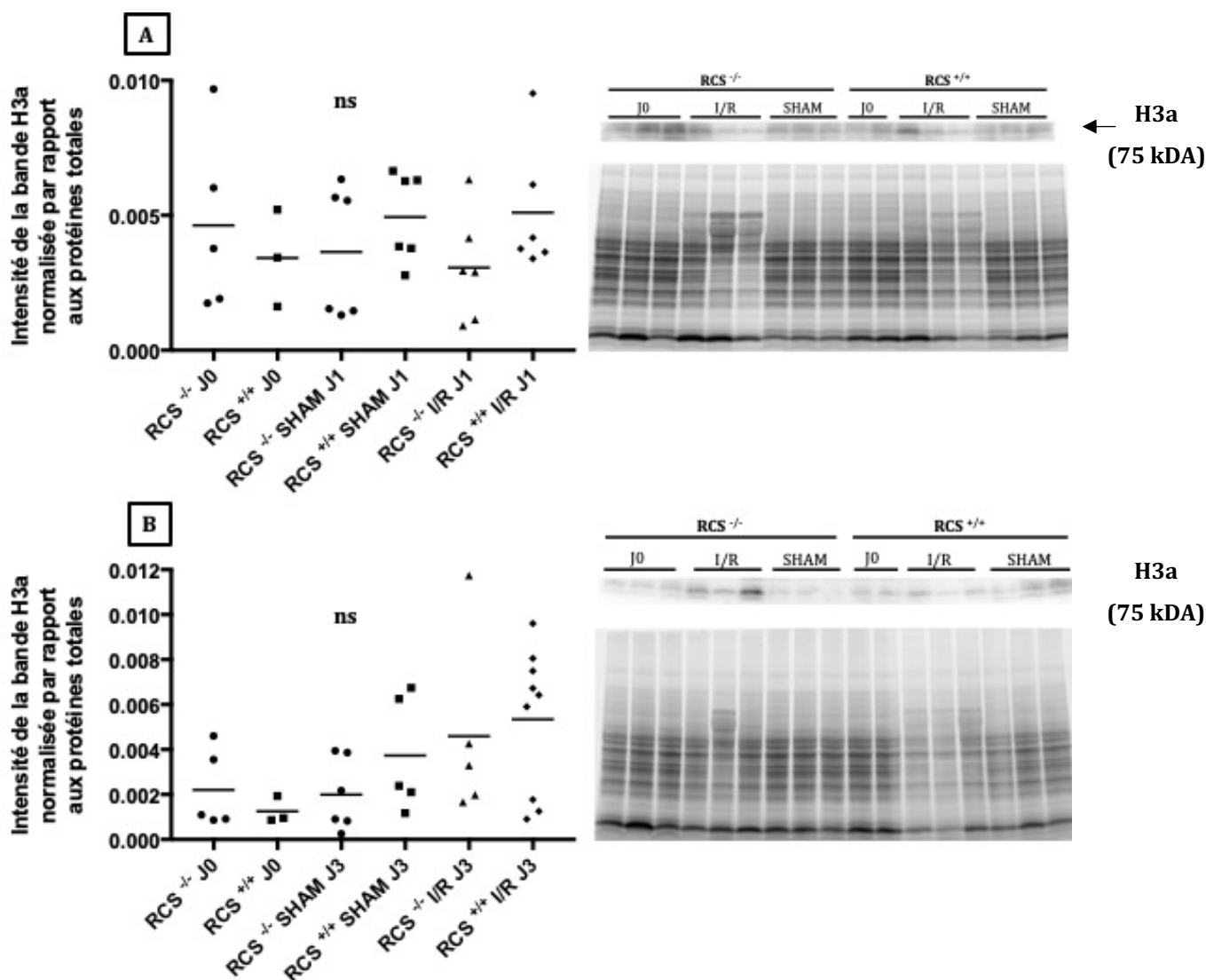


Figure 26 : Quantification de H3a tissulaire par Western Blot suite à une ischémie de 1 h

Les protéines sont extraites du rein et déposées sur un gel polyacrylamide 10%. Une fois la migration terminée, les protéines totales sont révélées (stain free). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. La protéine H3a (75 kDa) est révélée à l'aide de l'anticorps anti-H3a. La quantification et la normalisation de H3a à J1 (A) et à J3 (B) s'effectue par la mesure de la densité de la bande d'intérêt et des protéines totales à l'aide du logiciel Image Lab. Le ratio H3a /protéines totales de chaque rein testé est reporté sur un graphique (A et B, panneaux de gauche). Les images des membranes associées aux graphiques sont représentées sur les panneaux de droite des figures A et B. RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=6), RCS^{-/-} I/R J1 (n=6), RCS^{+/+} I/R J1 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=5), RCS^{-/-} I/R J3 (n=5), RCS^{+/+} I/R J3 (n=9)

Malgré une tendance à une expression plus importante à J3 dans les groupes I/R, H3a semble être exprimée dans chaque groupe sans réelle différence significative entre eux ni entre les groupes I/R RCS^{-/-} et RCS^{+/+} (figure 26).

En conclusion, l'évaluation de ces différents marqueurs révèle, lors d'une I/R, un recrutement leucocytaire CD68 positif augmenté avec des neutrophiles activés visualisés par le marqueur MPO. Ces neutrophiles, par une potentielle augmentation de H3a, ont la capacité de déclencher la NETose. L'absence de variabilité de iNOS ne permet pas d'identifier le type de macrophages recruté. Enfin, la déficience en MerTK chez les rats RCS^{-/-} ne semble pas impacter le recrutement leucocytaire CD68 positif.

4. ÉVALUATION DES MARQUEURS PRO-INFLAMMATOIRES SUITE A 1 H D'ISCHEMIE

RENALE

A la suite de l'infiltration leucocytaire, nous nous sommes intéressés à la production de molécules pro-inflammatoires au cours d'une I/R rénale. Ces molécules sont, en partie, responsables du recrutement leucocytaire sur un site lésé. Les molécules étudiées sont MCP-1, TNF- α et MIP2.

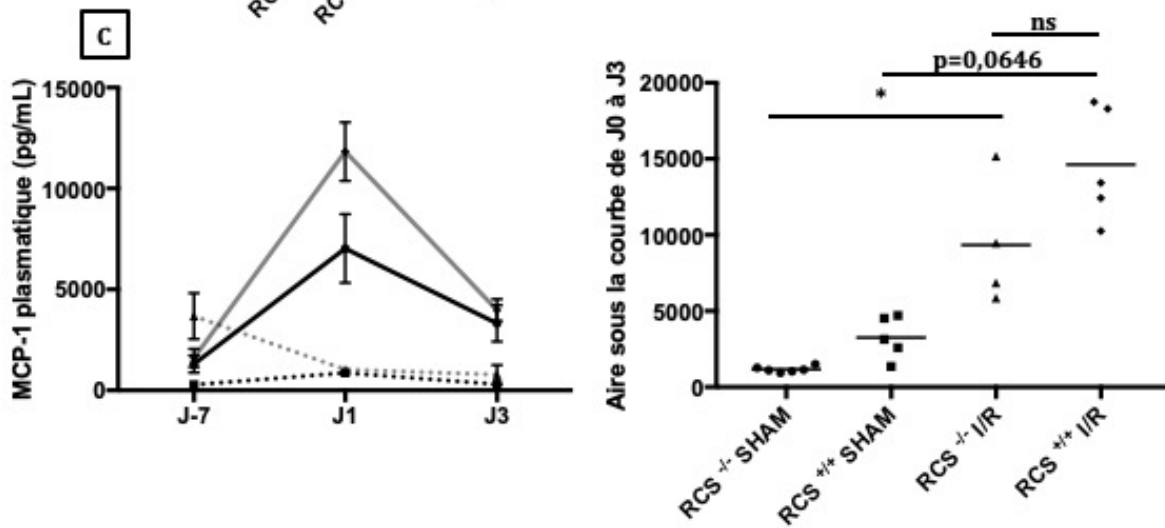
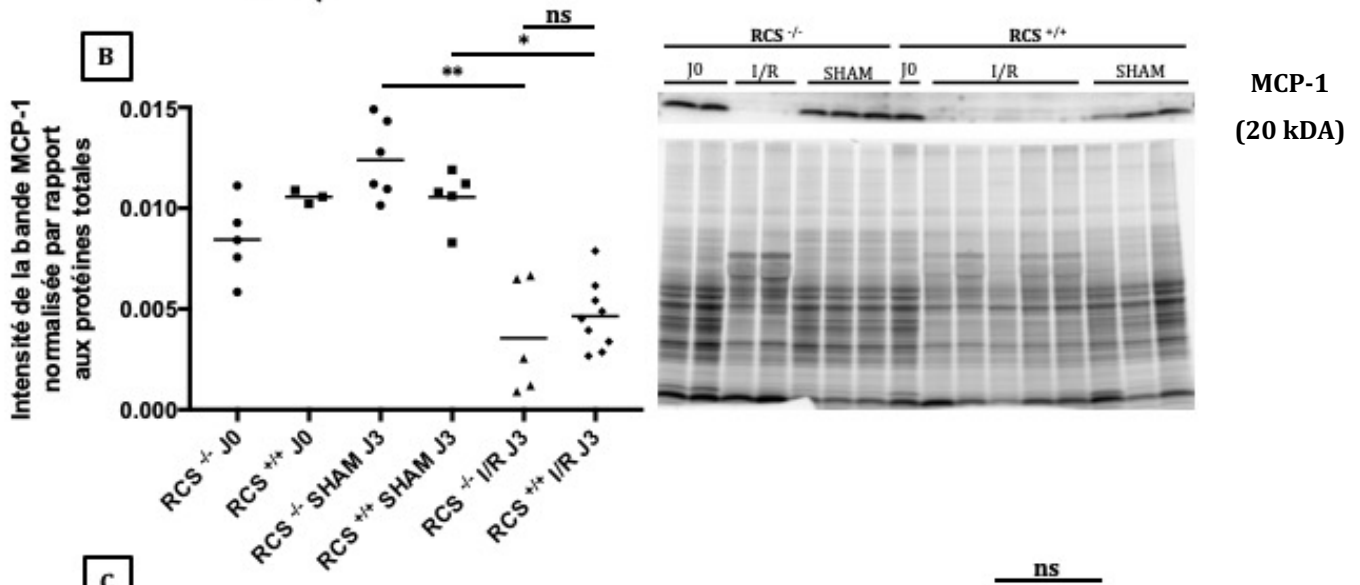
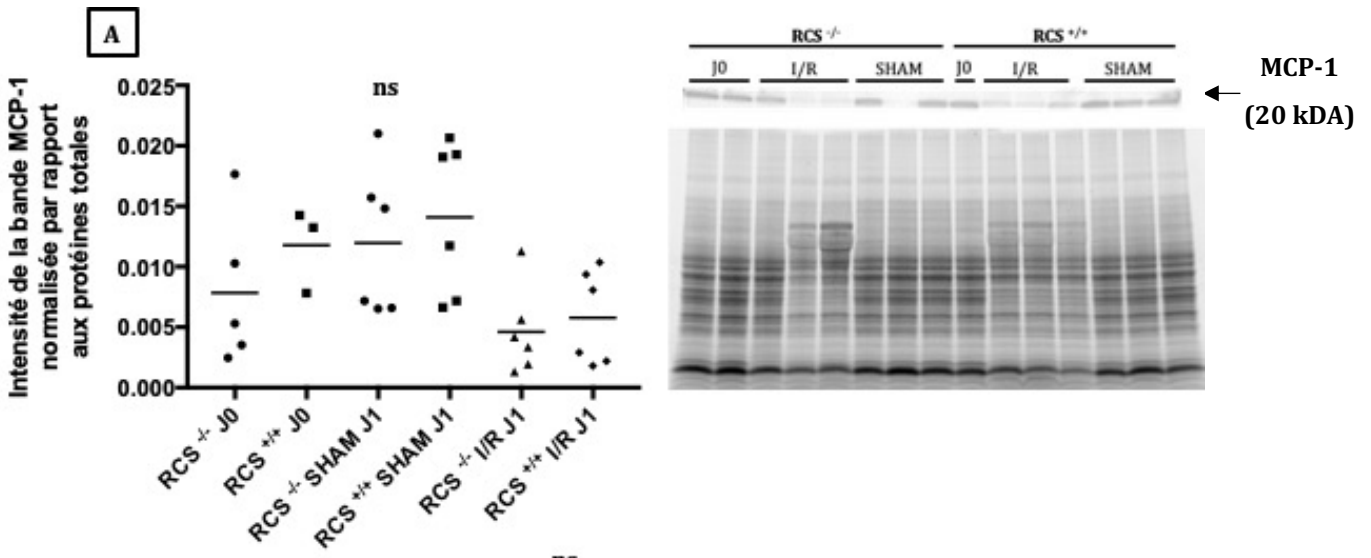


Figure 27 : Quantification de MCP-1 tissulaire et plasmatique, par Western Blot et par ELISA, suite à une ischémie de 1 h

Les protéines sont extraites du rein et déposées sur un gel polyacrylamide. Une fois la migration terminée, les protéines totales sont révélées (stain free). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. La protéine MCP-1 (20 kDa) est révélée à l'aide de l'anticorps anti MCP-1. La quantification et la normalisation de MCP-1 à J1 (A) et à J3 (B) s'effectue par la mesure de la densité de la bande d'intérêt et des protéines totales à l'aide du logiciel Image Lab. Le ratio MCP-1 /protéines totales de chaque rein testé est reporté sur un graphique (A et B, panneaux de gauche). RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=6), RCS^{-/-} I/R J1 (n=6), RCS^{+/+} I/R J1 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=5), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=7), RCS^{-/-} I/R J3 (n=7), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7). Le dosage de MCP-1 plasmatique est effectué par ELISA suivant les instructions du fournisseur. La concentration de MCP-1 (pg/mL) est déterminée par une courbe d'étalon. La cinétique (C, panneau de gauche) est réalisée sur des prélèvements de sang à J-7, J1 et J3 post reperfusion. L'analyse statistique de l'aire sous les courbes de J0 à J3 est représentée sur la figure C, panneau de droite. RCS^{-/-} J0 (n=6), RCS^{+/+} J0 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=6), RCS^{-/-} I/R J1 (n=6), RCS^{+/+} I/R J1 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=4), RCS^{-/-} I/R J3 (n=4), RCS^{+/+} I/R J3 (n=6).

Les résultats de la figure 27 montrent que suite à une I/R de 1 h et au bout de 1 jour de reperfusion, le niveau de MCP-1 des groupes I/R semble diminuer par rapport à celui des groupes SHAM mais de façon non significative (figure 27A) et que cette diminution devient significative au bout de 3 jours de reperfusion (figure 27B). Dans le plasma, une étude cinétique (figure 27C, panneau de gauche) montre que la concentration de MCP-1 chez les groupes I/R atteint un pic à J1 puis diminue à J3 jusqu'à atteindre des valeurs seuils équivalentes à celles enregistrées à J-7. L'analyse de l'aire sous la courbe (figure 27C, panneau de droite) démontre que cette diminution de MCP-1 chez les groupes I/R est bien significative en comparaison avec les groupes SHAM.

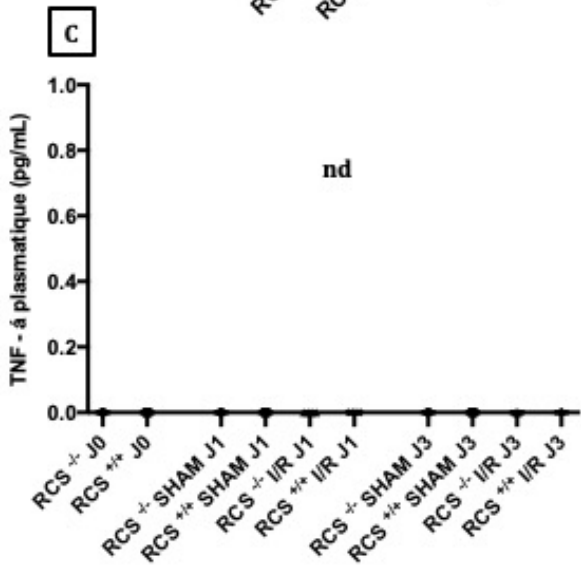
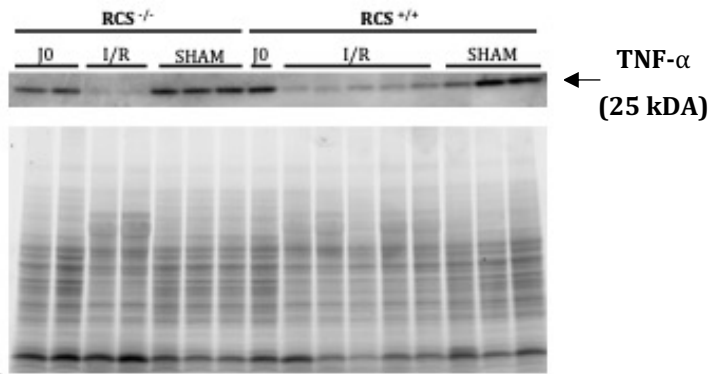
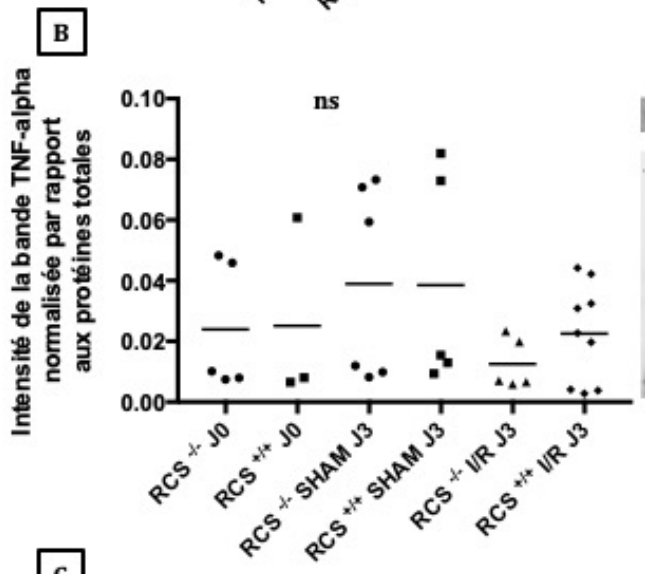
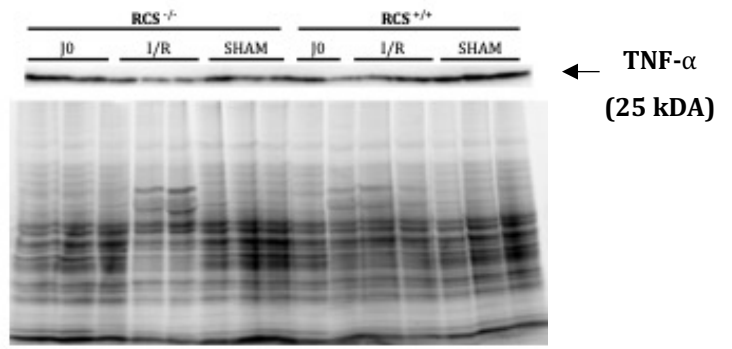
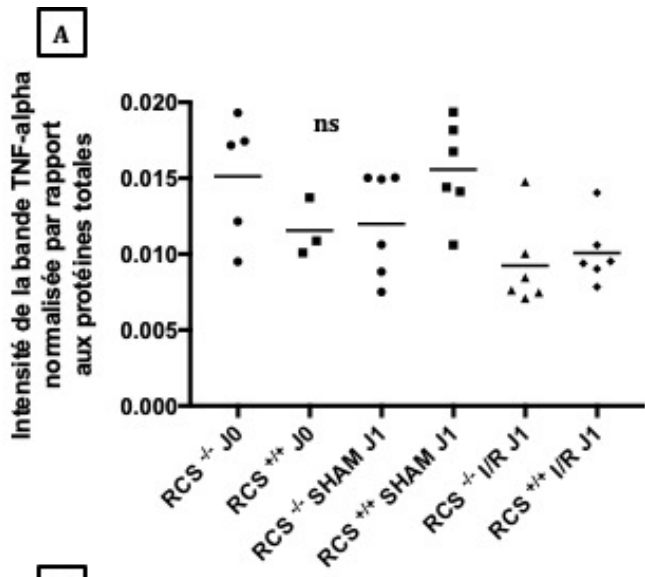


Figure 28 : Quantification, par Western Blot et par ELISA, du niveau du TNF- α tissulaire et plasmatique après une ischémie de 1 h

Les protéines sont extraites du rein et déposées sur un gel polyacrylamide. Une fois la migration terminée, les protéines totales sont révélées (stain free). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose et la protéine TNF- α (25 kDa) est révélée à l'aide de l'anticorps anti TNF- α . La quantification et la normalisation de TNF- α s'effectue par la mesure de la densité de la bande d'intérêt et des protéines totales à l'aide du logiciel Image Lab. Le ratio TNF- α /protéines totales de chaque rein testé est reporté sur un graphique (A et B, panneaux de gauche). RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=6), RCS^{-/-} I/R J1 (n=6), RCS^{+/+} I/R J1 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=5), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=7), RCS^{-/-} I/R J3 (n=7), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7). Le dosage de TNF- α plasmatique (C) est effectué par le kit ELISA suivant les instructions du fournisseur. La concentration de TNF- α est déterminée par une courbe d'étalon. RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=5), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=5), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=5), RCS^{-/-} I/R J1 (n=4), RCS^{+/+} I/R J1 (n=4), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=4), RCS^{-/-} I/R J3 (n=4), RCS^{+/+} I/R J3 (n=6)

Le dosage du TNF- α dans le rein révèle la présence de cette protéine mais ne montre pas de réelle variation dans son niveau d'expression entre les groupes I/R et les groupes SHAM correspondants (figure 28A et B). Concernant sa concentration plasmatique, le TNF- α est non détectable dans le sang comme montré par la technique ELISA (figure 28C).

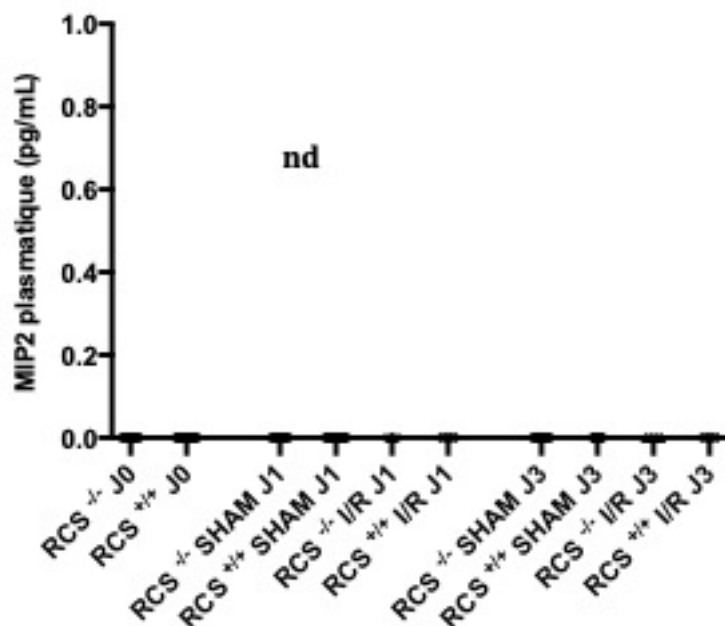


Figure 29 : Quantification de MIP2 plasmatique, par ELISA, suite à une ischémie de 1 h

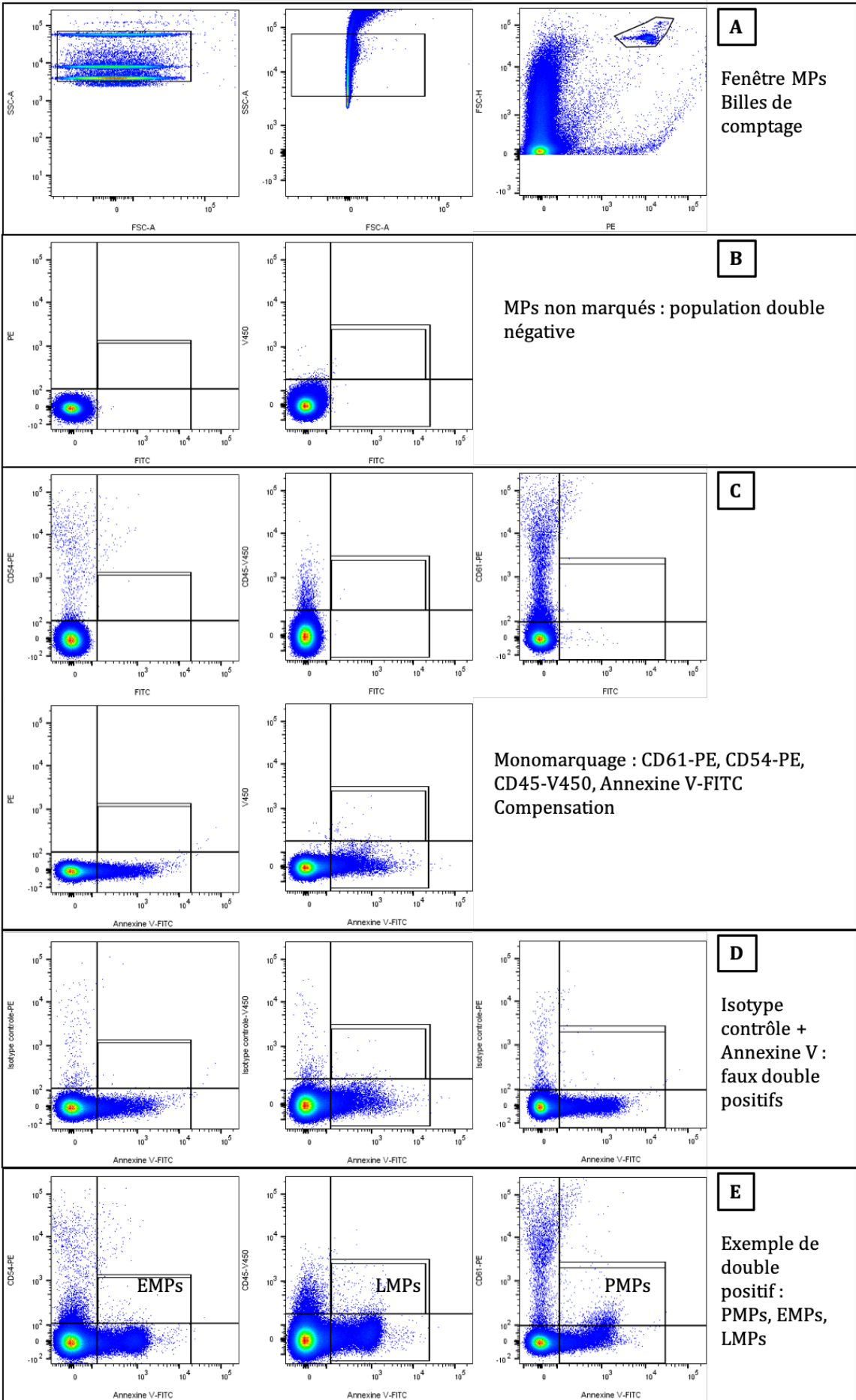
Le dosage de MIP2 plasmatique est effectué par le kit ELISA suivant les instructions du fournisseur. La concentration de MIP2 (pg/ml) est déterminée par une courbe étalon. RCS^{-/-} J0 (n=6), RCS^{+/+} J0 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=6), RCS^{-/-} I/R J1 (n=5), RCS^{+/+} I/R J1 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=4), RCS^{-/-} I/R J3 (n=4), RCS^{+/+} I/R J3 (n=6)

Enfin, comme pour le TNF- α , le dosage de MIP2 ne révèle pas sa présence dans le plasma (figure 29).

Ainsi, Pour les trois molécules pro-inflammatoires étudiées, aucune différence significative entre les rats RCS^{-/-} et les rats RCS^{+/+} n'a été détectée.

5. IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES MICROPARTICULES PLASMATIQUES SUITE A 1 H D'ISCHEMIE RENALE

Les lésions cellulaires provoquent la génération de MPs. Ces dernières peuvent avoir une origine cellulaire différente. Notre étude cherche à caractériser et à quantifier les MPs présentes dans le PPP (Plasma Pauvre en Plaquettes) suite à une I/R. Notre méthode s'appuie sur l'analyse au cytomètre en flux qui permet la détection des MPs préalablement marquées par des anticorps afin de déterminer leur origine cellulaire : CD61 (PMPs), CDparti 54 (EMPs), CD45 (LMPs).



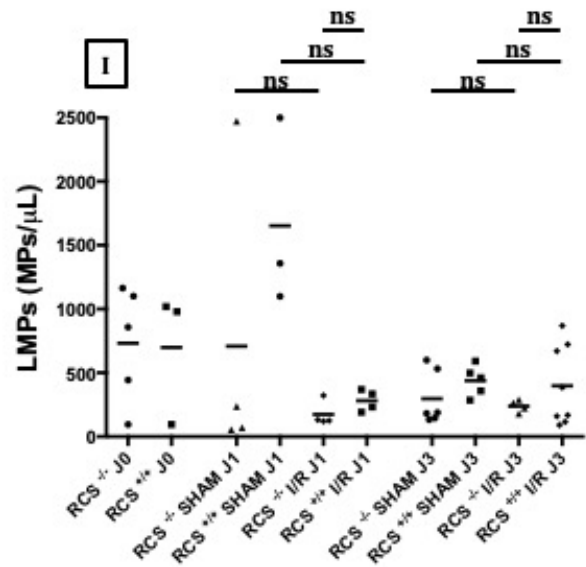
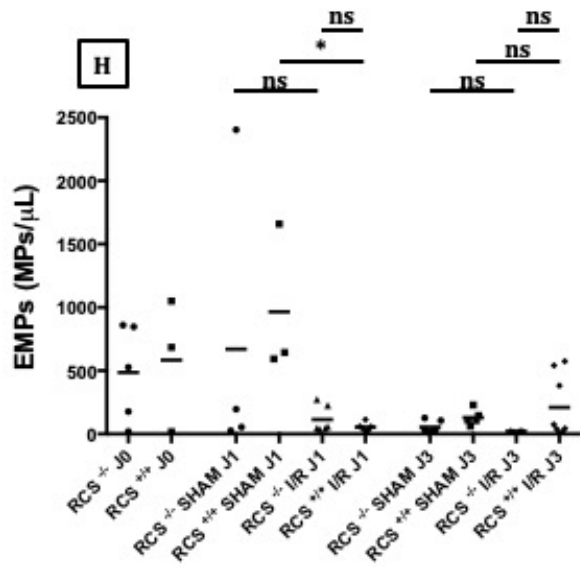
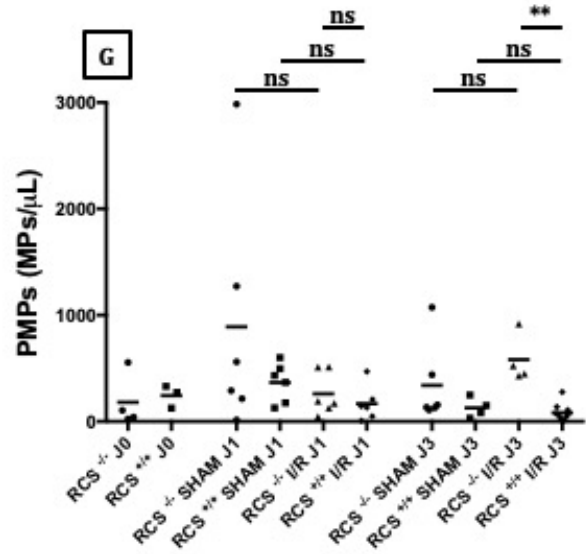
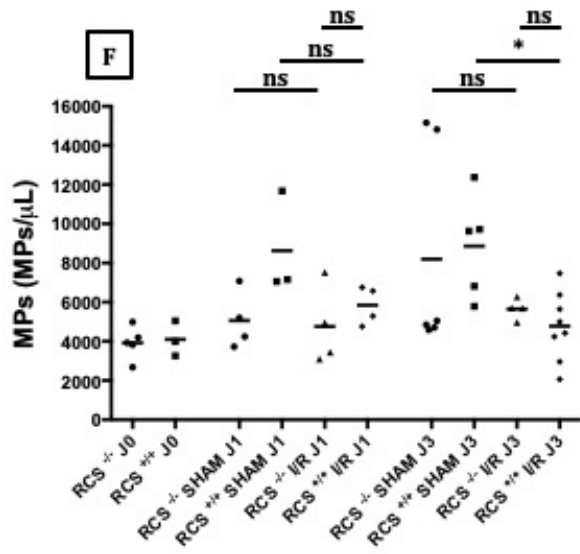


Figure 30 : Identification et quantification des MPs plasmatiques, par cytométrie en flux, suite à une ischémie de 1 h

Le sang prélevé est déposé dans un tube citraté et subit une double centrifugation qui permet d'avoir un plasma pauvre en plaquettes. Les MPs sont marquées par des anticorps ciblant un marqueur de leur origine cellulaire : PMPs (CD61-PE)(G), EMPs (CD54-PE)(H), LMPs (CD45-V450)(I). Les MPs totaux sont marquées par l'Annexine V-FITC (F). L'acquisition s'effectue sur le cytomètre en flux BDVerse. La fenêtre taille/structure est déterminée par l'acquisition du Megamix-Plus SSC (A). Les compensations potentielles sont ajustées par les monomarquages des MPs (C). Différentes conditions permettent d'identifier les différentes populations. L'origine des MPs est identifiée par une population double positive pour l'Annexine V et pour un marqueur de leur origine cellulaire (E). La concentration des MPs est déterminée par les billes de comptages (MP Count Beads) présents dans chaque échantillon (A). Les résultats sont analysés par le logiciel FlowJo. Les valeurs obtenues sont reportés, selon l'origine cellulaire des MPs, sur les graphiques F, G, H et I.

MPs : RCS^{-/-} J-7 (n=31), RCS^{+/+} J-7 (n=30), RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=4), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=3), RCS^{-/-} I/R J1 (n=4), RCS^{+/+} I/R J1 (n=4), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=5), RCS^{-/-} I/R J3 (n=4), RCS^{+/+} I/R J3 (n=8)

PMPs : RCS^{-/-} J-7 (n=30), RCS^{+/+} J-7 (n=28), RCS^{-/-} J0 (n=4), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=6), RCS^{-/-} I/R J1 (n=6), RCS^{+/+} I/R J1 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=4), RCS^{-/-} I/R J3 (n=4), RCS^{+/+} I/R J3 (n=10)

EMPs : RCS^{-/-} J-7 (n=29), RCS^{+/+} J-7 (n=25), RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=4), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=3), RCS^{-/-} I/R J1 (n=6), RCS^{+/+} I/R J1 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=5), RCS^{-/-} I/R J3 (n=4), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7)

LMPs : RCS^{-/-} J-7 (n=30), RCS^{+/+} J-7 (n=27), RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=4), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=3), RCS^{-/-} I/R J1 (n=6), RCS^{+/+} I/R J1 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=5), RCS^{-/-} I/R J3 (n=4), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7)

Avant l'acquisition, le cytomètre est calibré à l'aide d'une solution de billes de différentes tailles (Megamix Plus-SSC) (figure 30A, panneau de gauche). Cette solution permet de déterminer la fenêtre taille/granulométrie correspondant aux MPs. Cette fenêtre est appliquée lors de l'analyse des PPP (figure 30A, panneau du milieu). L'acquisition de chaque PPP se fait en présence de billes de comptage (MP Count Beads) afin de déterminer la concentration des MPs dans le PPP (figure 30A, panneau de droite). La condition de MPs non marquées (figure 30B) détermine la population double négative. L'utilisation de plusieurs fluorochromes lors d'une acquisition peut provoquer un chevauchement de leurs ondes d'émission. Pour cela, des monomarquages pour chaque anticorps et pour l'Annexine V sont effectués pour régler les compensations (figure 30C). L'utilisation de l'isotype contrôle nous permet de détecter les faux double positifs et de valider ou non l'expérience (figure 30D). La figure 30E représente des exemples de MPs doubles positives

révélées suite aux marquages par des anticorps de l'origine cellulaire et celui de l'Annexine V. Le nombre de MPs double positives est déterminé pour déduire la concentration de cette population dans le PPP.

Les concentrations calculées des MPs sont reportées dans un graphique selon l'origine des MPs, sur des graphiques (figure 30F, G, H et I). L'analyse de la concentration de la totalité des MPs (Annexine V positive) dans chaque groupe montre une absence de significativité entre les groupes étudiés excepté pour le groupe $RCS^{+/+}$ SHAM J3 qui a une concentration de MPs significativement plus élevée que celle enregistrée chez le groupe $RCS^{+/+}$ I/R J3 (figure 30F).

Concernant la concentration des PMPs (figure 30G), elle est significativement plus élevée chez les groupes $RCS^{-/-}$ I/R J3 par rapport aux groupes $RCS^{+/+}$ I/R J3.

L'analyse des EMPs (figure 30H) montre une hausse potentielle de concentration pour le groupe $RCS^{-/-}$ SHAM J1, avec une moyenne de 670 MPs/ μ l, par rapport au groupe $RCS^{-/-}$ I/R J1 (115 MPs/ μ l). Cette hausse significative entre le groupe $RCS^{+/+}$ SHAM J1 (965 MPs/ μ l) et le groupe $RCS^{+/+}$ I/R J1 (54 MPs/ μ l).

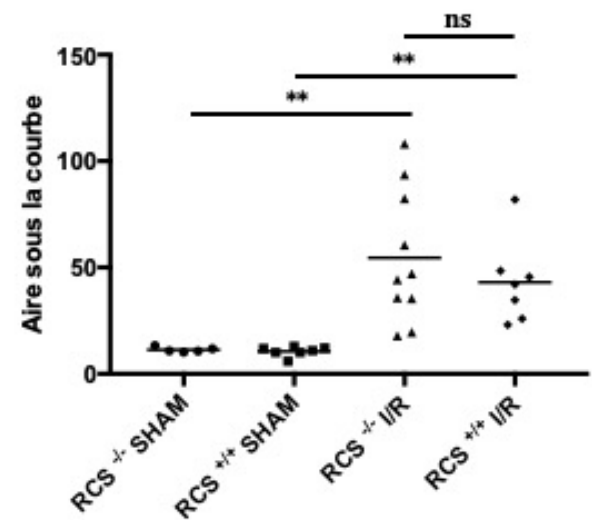
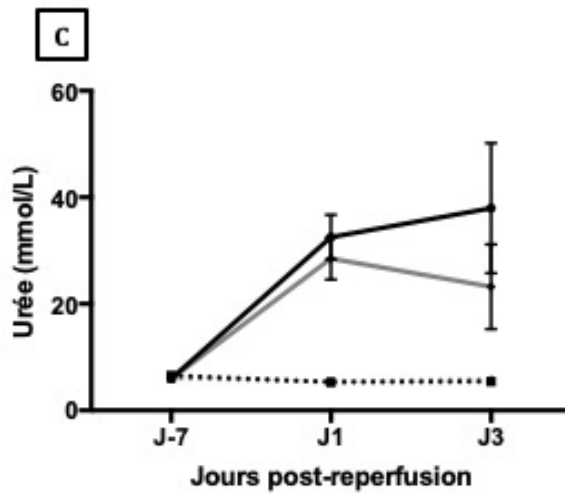
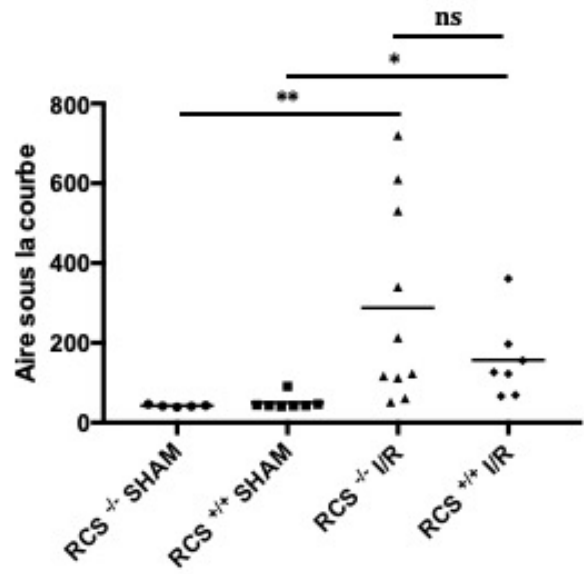
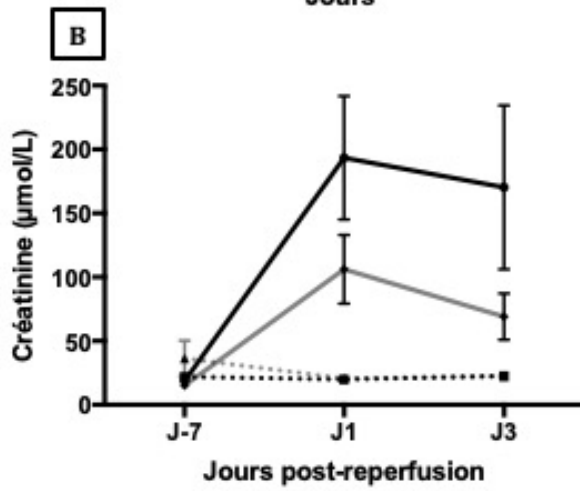
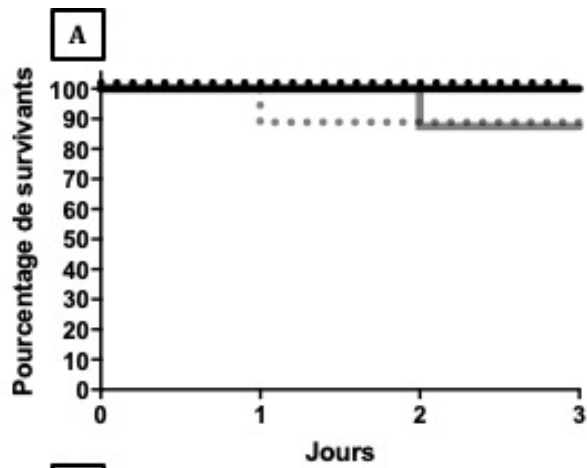
Enfin, la quantification des LMPs (figure 30I) montre un profil assez similaire à celui des EMPs mais aucune différence significative n'a été observée entre les groupes.

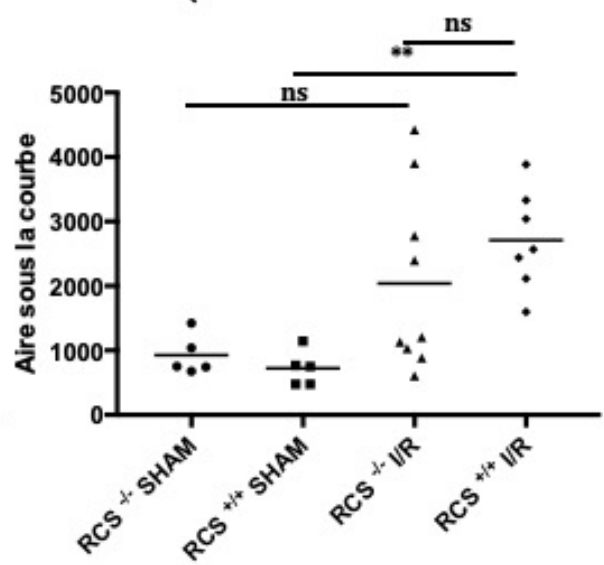
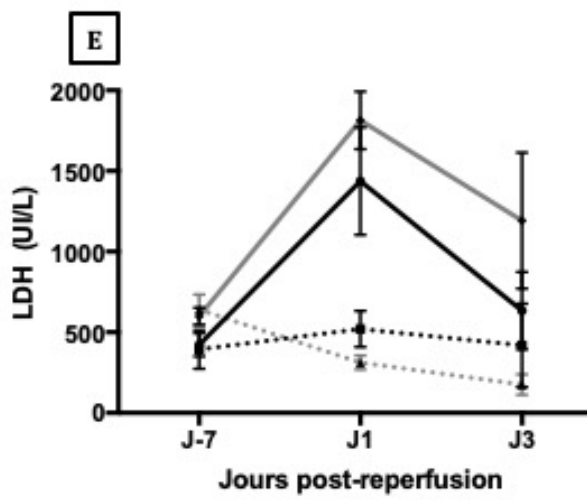
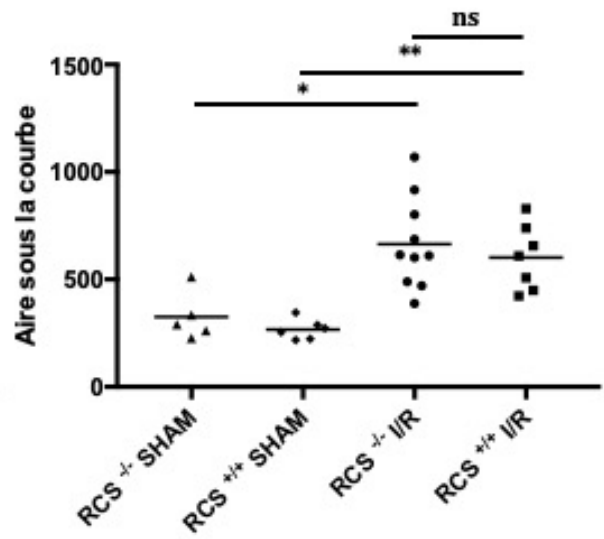
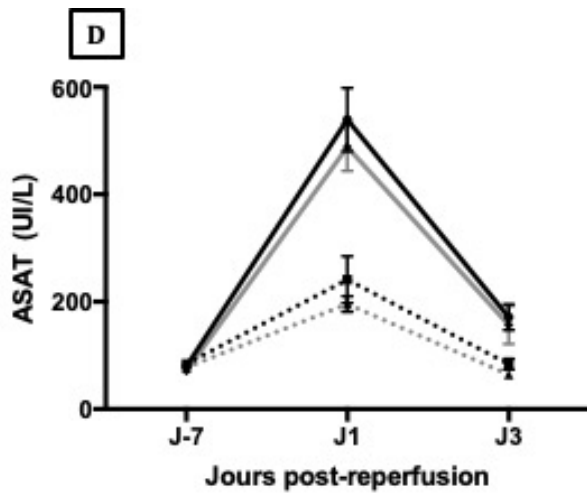
Ces résultats mettent en évidence l'absence de différences dans la génération de MPs entre les rats $RCS^{-/-}$ et les rats $RCS^{+/+}$ lors d'une I/R hormis pour les PMPs dont le taux est significativement plus élevé chez les groupes $RCS^{-/-}$ par rapport aux groupes $RCS^{+/+}$ au troisième jour de reperfusion (figure 30G).

III. ÉVALUATION DE L'IMPACT DE MERTK DANS UN MODELE D'I/R RENALE DE RAT RCS (ISCHEMIE DE 30 MIN)

1. ÉVALUATION DE LA CINÉTIQUE DES BIOMARQUEURS PLASMATIQUES DE FONCTION ET DE LÉSIONS RENALES SUITE A 30 MIN D'ISCHEMIE RENALE

Les premières conclusions des expériences sur l'I/R avec 1 h d'ischémie témoignent de la sévérité du modèle notamment par sa courbe de survie qui montre plus de 30 % de rats subissant une ischémie de 1 h meurent au deuxième jour de la reperfusion. Le dosage de la créatinine et de l'urée montre une augmentation continue même après 3 jours de reperfusion indiquant une altération de la fonction rénale sur le déclin. Enfin, l'observation des coupes rénales colorées à la HES-PAS (figure 21A) révèle de sévères lésions tubulaires affectant une grande partie du rein. Face à ces observations, notre étude s'est orientée vers un nouveau modèle d'I/R en réduisant le temps d'ischémie à 30 min et en reproduisant les expériences précédentes.





••• RCS +/- SHAM

—•— RCS +/- I/R

••• RCS +/- SHAM

—•— RCS +/- I/R

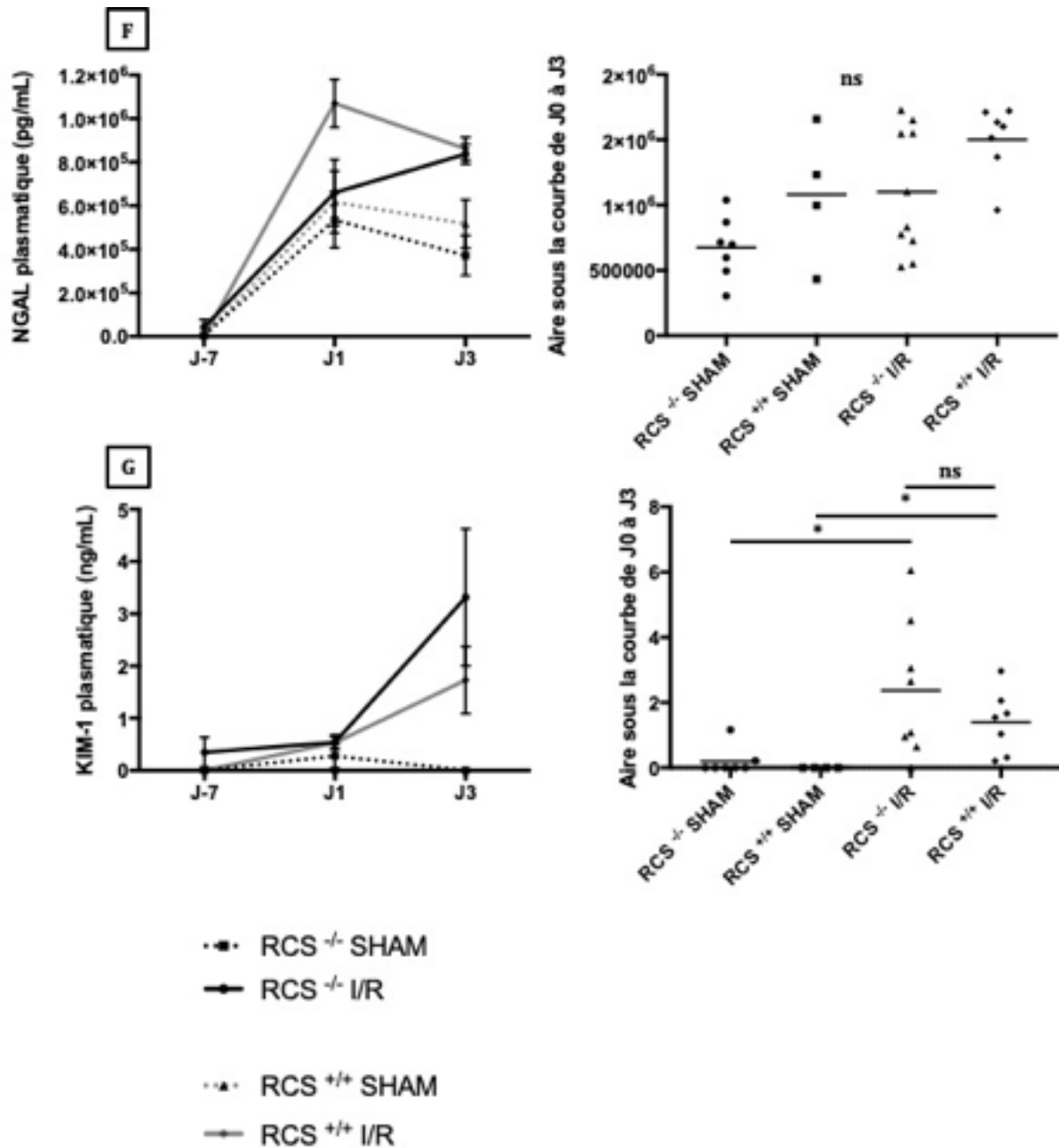


Figure 31 : Étude des biomarqueurs plasmatiques de fonction et de lésions rénales suite à une ischémie rénale bilatérale de 30 min

Courbe de survie des rats opérés (A). Cinétique des marqueurs de la fonction rénale sur du plasma de rats RCS prélevé à J-7, J1 et J3 : créatinine (B), urée (C), ASAT (D), LDH (E), NGAL (F) et KIM-1 (G). Une analyse statistique est effectuée sur l'aire sous les courbes calculée pour chaque marqueur, à partir des cinétiques de J0 à J3 post ischémie et les résultats sont reportés sur les panneaux de droite des figures B, C, D, E, F, et G. RCS^{-/-} SHAM (n=5), RCS^{-/-} I/R (n=10), RCS^{+/+} SHAM (n=6), RCS^{+/+} I/R (n=7).

La courbe de Kaplan-Meier (figure 31A) montre que l'ischémie rénale de 30 min n'affecte pas la survie après 3 jours de reperfusion, 100 % de la population des rats RCS^{-/-} I/R et 90 % des rats RCS^{+/+} I/R survivent jusqu'à 3 jours. Concernant les cinétiques de la créatinine et de l'urée (figure

31B et C, panneaux de gauche), l'I/R entraîne l'augmentation de ces marqueurs au cours de la reperfusion. En effet, la valeur seuil à J-7 est d'environ 20 $\mu\text{mol/l}$ pour la créatinine et de 6 mmol/l pour l'urée. À J1, la proportion de créatinine/urée atteint 193 $\mu\text{mol/l}/33 \text{ mmol/l}$ pour les rats RCS^{-/-} I/R et 115 $\mu\text{mol/l}/29 \text{ mmol/l}$ pour les rats RCS^{+/+} I/R. Au troisième jour de la reperfusion, la pente de la courbe se stabilise voire diminue. Concernant les groupes SHAM, nous n'observons aucune évolution au cours de la reperfusion. L'analyse de l'aire sous la courbe pour la créatinine et l'urée (figure 31B et C, panneaux de droite) montre une augmentation entre les groupes I/R et leurs contrôles respectifs. Aucune différence n'est observée entre les groupes I/R. D'autres biomarqueurs sont étudiés comme ASAT et LDH, les cinétiques des groupes I/R des deux marqueurs (figure 31D et E, panneaux de gauche) se caractérisent par une augmentation importante atteignant un maximal à J1 suivie d'une diminution rapide pour ASAT et progressive pour LDH à J3. L'aire sous la courbe du marqueur ASAT (figure 31D, panneau de droite) révèle une hausse significative de ce marqueur chez tous les groupes I/R par rapport aux groupes SHAM correspondants alors que celle des cinétiques de LDH (figure 31E, panneau de droite) montre une hausse significative de ce marqueur uniquement chez les rats RCS^{+/+} I/R par rapport aux rats RCS^{+/+} SHAM. La cinétique du marqueur NGAL (figure 31F, panneau de gauche) montre un pic de sécrétion à J1 pour tous les groupes. La moyenne des groupes SHAM est de $0,54 \cdot 10^6 \text{ pg/ml}$ pour les rats RCS^{-/-} et de $0,62 \cdot 10^6 \text{ pg/ml}$ pour les rats RCS^{+/+} alors que pour les groupes I/R, la moyenne est de $0,66 \cdot 10^6 \text{ pg/ml}$ pour les rats RCS^{-/-} et de $1,07 \cdot 10^6 \text{ pg/ml}$ pour les rats RCS^{+/+}. À J3, les cinétiques se stabilisent pour tous les groupes. Cette proximité se vérifie par l'aire de la courbe (figure 31F, panneau de droite) qui ne montre aucune significativité entre les groupes. Enfin, pour le dernier biomarqueur KIM-1 (figure 31G, panneau de gauche) sa cinétique de sécrétion montre que sa concentration plasmatique augmente très légèrement pour atteindre, à J1, une valeur de 0,54 ng/ml chez les rats RCS^{-/-} et 0,54 ng/ml chez les rats RCS^{+/+} puis de J1 à J3, cette augmentation devient brutale et beaucoup plus importante et atteint des valeurs respectives de 3,32 ng/ml et de 1,73 ng/ml chez les rats RCS^{-/-} et les rats RCS^{+/+}. L'analyse statistique (figure 31G, panneau de droite) montre que la concentration de KIM-1 est significativement plus élevée au cours de la reperfusion dans le plasma des groupes de rats I/R par rapport aux groupes SHAM.

En conclusion, l'ischémie de 30 min provoque des lésions cellulaires et une altération de la fonction rénale au cours de la reperfusion mais elle ne met pas en évidence une différence significative entre les rats RCS^{-/-} et les rats RCS^{+/+}.

2. ANALYSES DES LESIONS HISTOLOGIQUES SUITE A 30 MIN D'ISCHEMIE RENALE

Ensuite, nous avons évalué les lésions rénales par une coloration au HES-PAS pour évaluer la corrélation avec les biomarqueurs analysés dans le plasma. Les résultats sont présentés sur la figure 32.

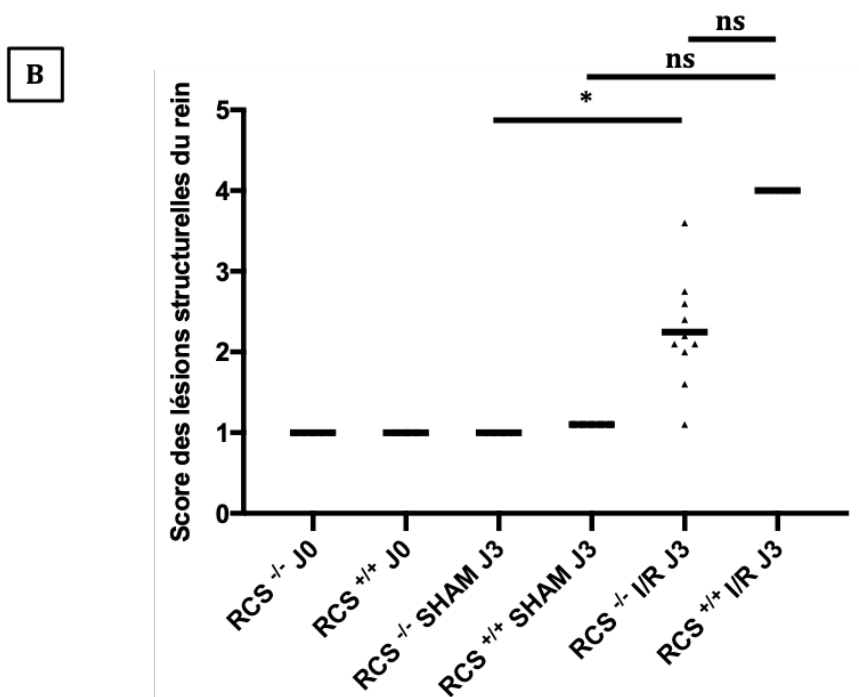
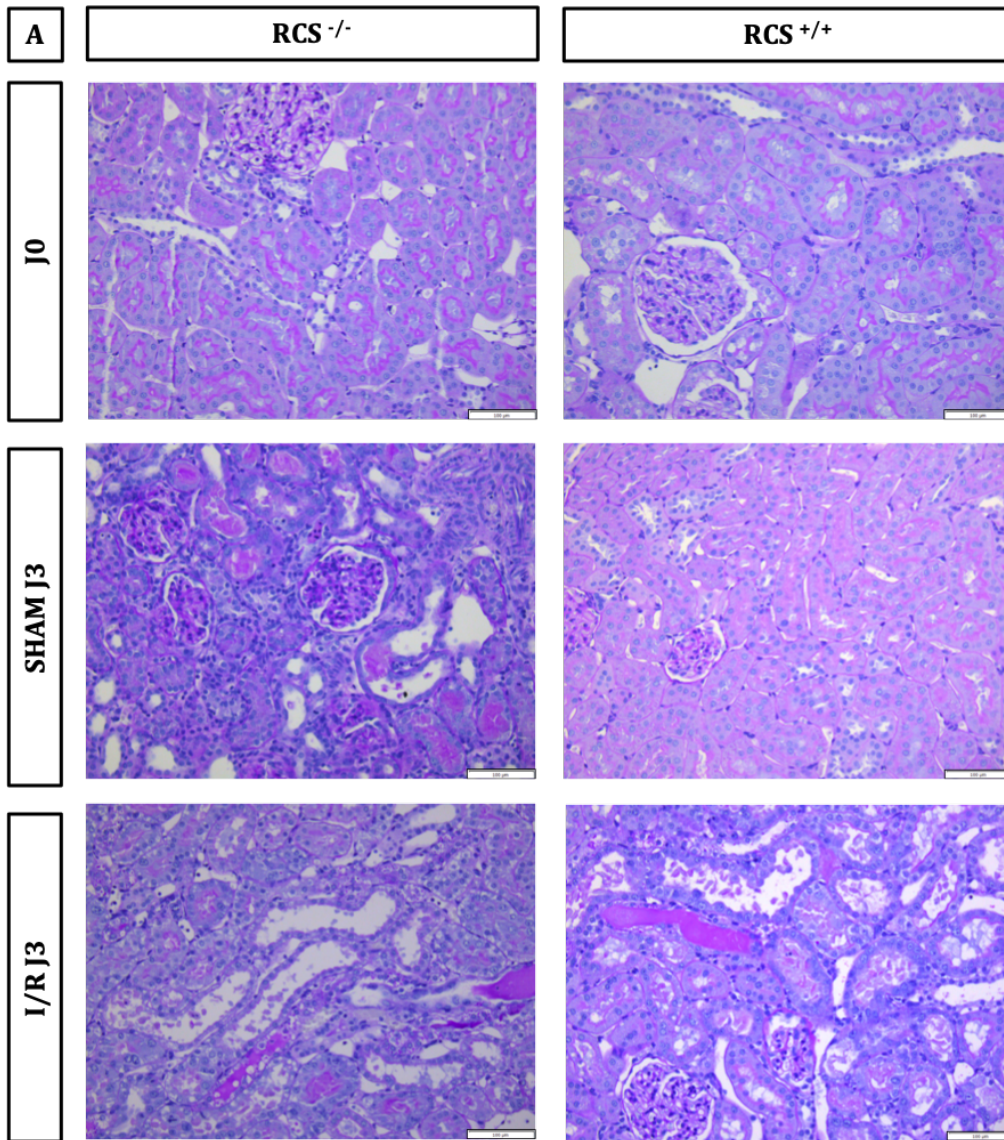


Figure 32 : Étude histologique de l'intégrité des structures rénales suite à une ischémie de 30 min

Les reins sont prélevés sur les rats mis à mort après une reperfusion de 3 jours. Ils sont ensuite fixés au paraformaldéhyde 4 % puis inclus en paraffine. Les coupes rénales, après une déshydratation, subissent une coloration HES-PAS. L'observation au microscope permet d'évaluer l'intégrité des structures suivant un score sur des critères définis (grossissement X200) (A). Les scores sont moyennés pour chaque rat et reportés sur un graphique (B). RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=7), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=5), RCS^{-/-} I/R J3 (n=5), RCS^{+/+} I/R J3 (n=13)

Dans l'ensemble, les observations montrent que, dans les groupes I/R, les lésions cellulaires sont localisées sur les tubules et se manifestent par une perte de la bordure en brosse et par la présence de débris cellulaires dans la lumière des tubules (figure 32A). La quantification de ces lésions (figure 32B) montre que les rats RCS^{-/-} I/R J3 semblent moins affectés par l'ischémie que les rats RCS^{+/+} I/R J3 avec une moyenne de score des lésions de 2,25 pour les rats RCS^{-/-} et 4 pour les rats RCS^{+/+} même si l'analyse statistique ne montre pas de significativité entre ces valeurs.

3. ÉVALUATION DE L'INFILTRATION LEUCOCYTAIRE AU SEIN DU TISSU SUITE A 30 MIN D'ISCHEMIE RENALE

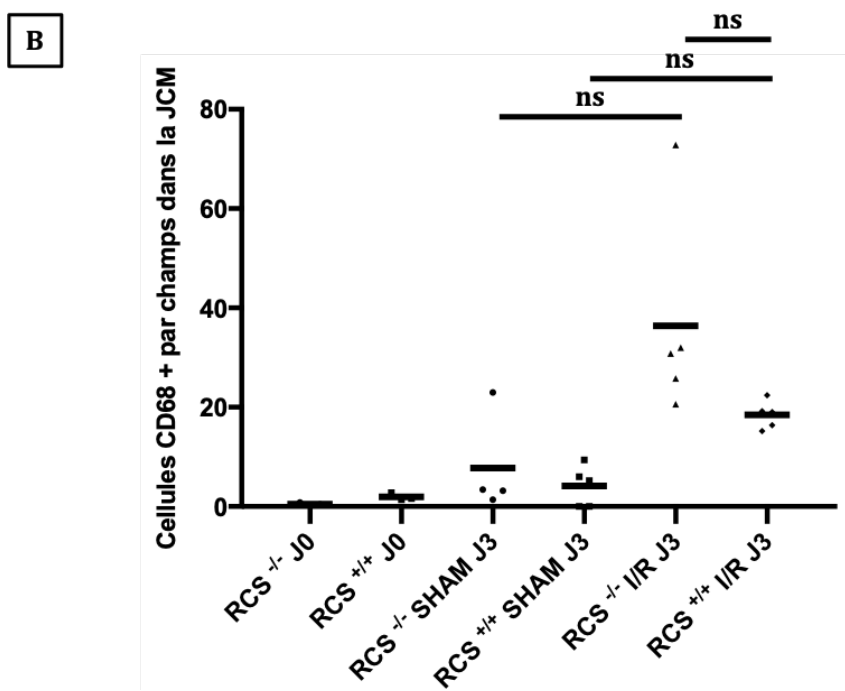
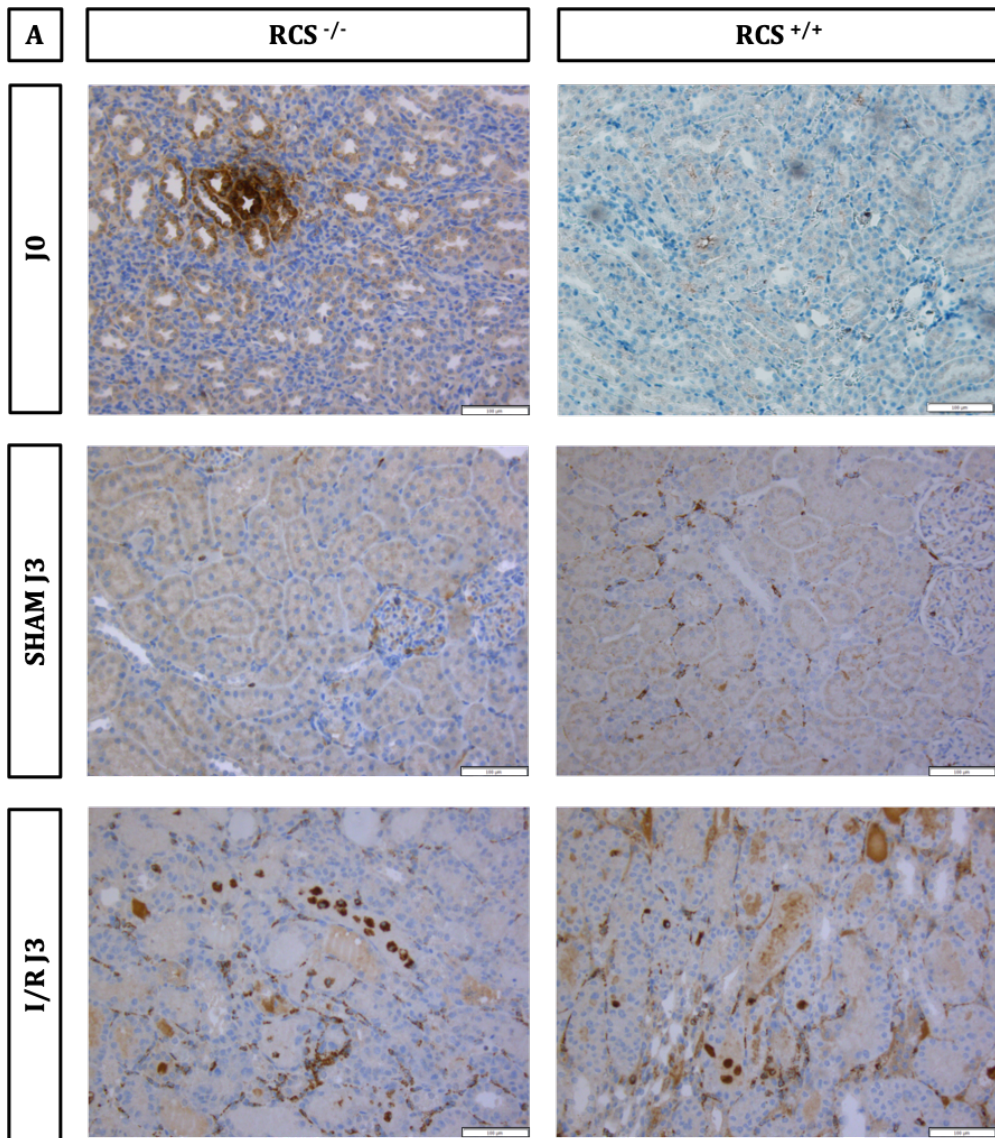


Figure 33 : Étude, par immunohistochimie, de l'infiltration leucocytaire dans le rein suite à une ischémie de 30 min

Les reins sont prélevés sur les rats mis à mort après une reperfusion de 1 jour. Ils sont ensuite fixés au paraformaldéhyde 4 % puis inclus en paraffine. Les leucocytes sont marqués, par la technique d'immunohistochimie, à l'aide de l'anticorps anti-CD68. Les images prises sont observées au grossissement X200 (A). L'évaluation de l'infiltration leucocytaire est effectuée par un comptage des cellules CD68 positives à raison de 5 champs par coupe rénale au grossissement X200. Les champs choisis sont localisés sur la jonction cortico-médullaire du rein. Le nombre de cellules comptées sur les 5 champs est moyenné et reporté sur un graphique (B). RCS^{-/-} J0 (n=3), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=4), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=5), RCS^{-/-} I/R J3 (n=5), RCS^{+/+} I/R J3 (n=5)

L'ischémie de 30 min suivie d'une reperfusion engendre une légère augmentation non significative du recrutement des macrophages et des neutrophiles avec une moyenne de 36,4 leucocytes CD68 positifs pour les rats RCS^{-/-} I/R et de 18,4 leucocytes CD68 positifs pour les rats RCS^{+/+} I/R (figure 33B), la moyenne pour les groupes SHAM étant de 7,8 leucocytes CD68 positifs pour les rats RCS^{-/-} SHAM et de 4,1 leucocytes CD68 positifs pour les rats RCS^{+/+} SHAM. Cette augmentation s'illustre par un marquage plus présent chez les groupes I/R (figure 33A).

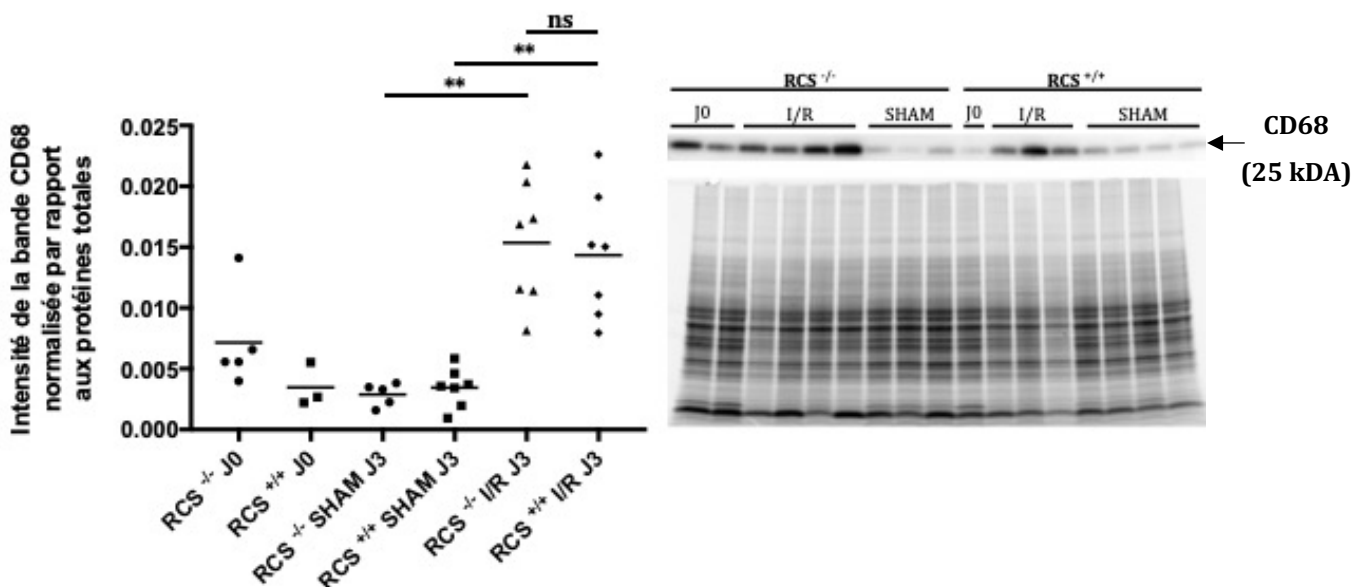


Figure 34 : Quantification, par Western Blot, de CD68 tissulaire suite à une ischémie de 30 min

Les protéines sont extraites du rein et déposées sur un gel de polyacrylamide. Une fois la migration terminée, les protéines totales sont révélées (stain free). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. La protéine CD68 (25 kDa) est révélée à l'aide de l'anticorps anti CD68. La quantification et la normalisation de CD68 s'effectue par la mesure de la densité de la bande d'intérêt et des protéines totales à l'aide du logiciel Image Lab. Le ratio CD68 /protéines totales de chaque rein testé est reporté sur un graphique (panneau de gauche). L'image représentative des membranes associées au graphique est présentée sur le panneau de droite. RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=5), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=7), RCS^{-/-} I/R J3 (n=7), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7)

Le Western blot de la figure 34 permet d'appuyer l'augmentation potentielle du recrutement des macrophages et des neutrophiles chez les groupes I/R observée dans la figure 35. En effet, la quantification démontre que la protéine CD68 est significativement plus présente dans les reins des groupes I/R que ceux des groupes SHAM.

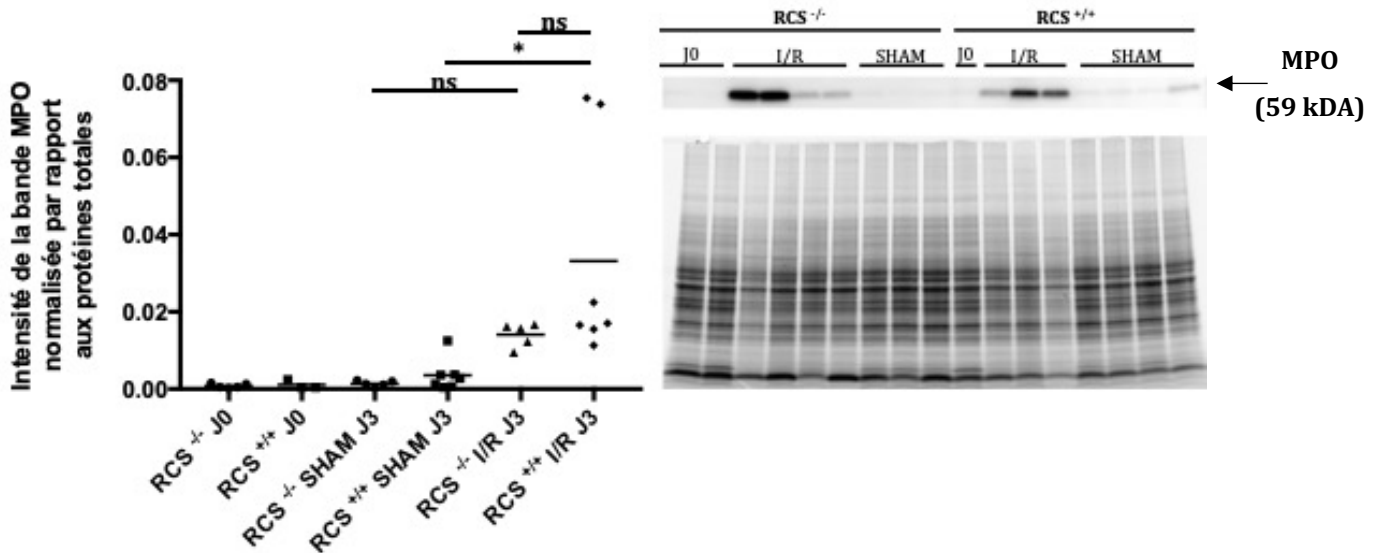


Figure 35 : Quantification, par Western Blot, de MPO tissulaire suite à une ischémie de 30 min

Les protéines sont extraites du rein et déposées sur un gel polyacrylamide. Une fois la migration terminée, les protéines totales sont révélées (stain free). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. La protéine MPO (59 kDa) est révélée à l'aide de l'anticorps anti MPO. La quantification et la normalisation de MP s'effectue par la mesure de la densité de la bande d'intérêt et des protéines totales à l'aide du logiciel Image Lab. Le ratio MPO /protéines totales de chaque rein testé est reporté sur un graphique (panneau de gauche). Une image représentative des membranes associées au graphique est présentée sur le panneau de droite. RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=5), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=7), RCS^{-/-} I/R J3 (n=7), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7)

L'analyse du marqueur des neutrophiles activés, le MPO, montre que la concentration de ce dernier est plus élevée dans les reins du groupe RCS^{+/+} I/R J3 par rapport à ceux du groupe RCS^{+/+} SHAM J3 alors qu'elle n'est pas significativement modifiée chez le groupe RCS^{-/-} I/R J3 par rapport au groupe RCS^{-/-} SHAM J3 (figure 35).

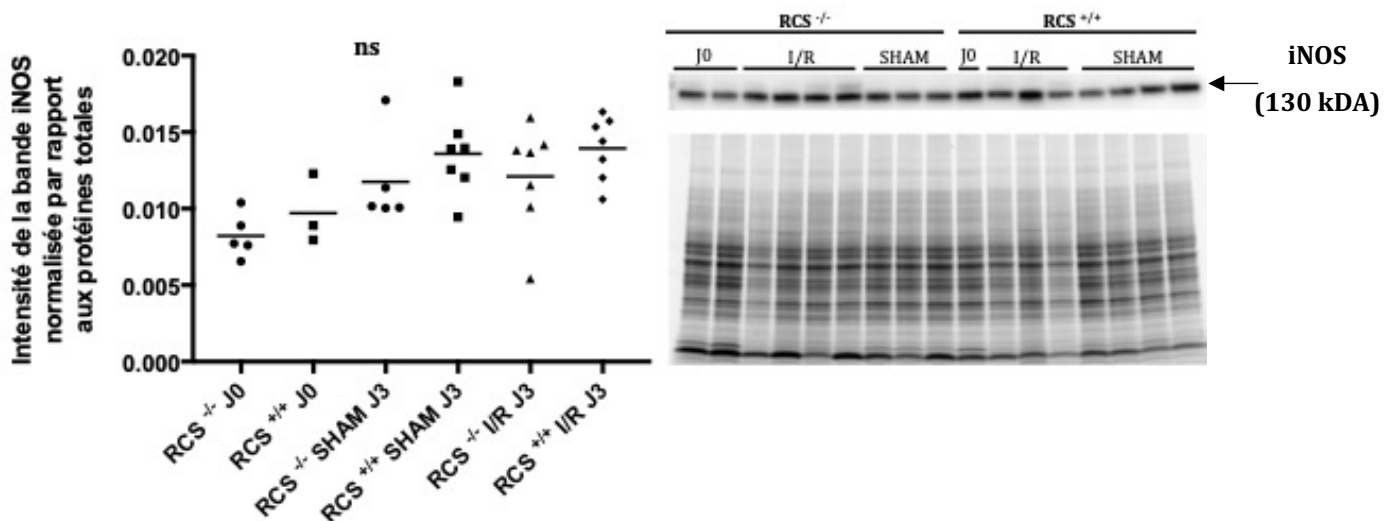


Figure 36 : Quantification, par Western Blot, de iNOS suite à une ischémie de 30 min

Les protéines sont extraites du rein et déposées sur un gel polyacrylamide. Une fois la migration terminée, les protéines totales sont révélées (stain free). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. La protéine iNOS (130 kDa) est révélée à l'aide de l'anticorps anti iNOS. La quantification et la normalisation de iNOS s'effectue par la mesure de la densité de la bande d'intérêt et des protéines totales à l'aide du logiciel Image Lab. Le ratio iNOS/protéines totales de chaque rein testé est reporté sur un graphique (panneau de gauche). Une image représentative des membranes associées au graphique est présentée sur le panneau de droite. RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=5), RCS^{-/-} I/R J3 (n=5), RCS^{+/+} I/R J3 (n=9)

Nous avons cherché, par la suite, à quantifier le niveau de la protéine iNOS par western blot et nos résultats présentés sur la figure 36 montrent que cette enzyme est bien exprimée dans le rein mais sans réelle variation entre les groupes de rats étudiés.

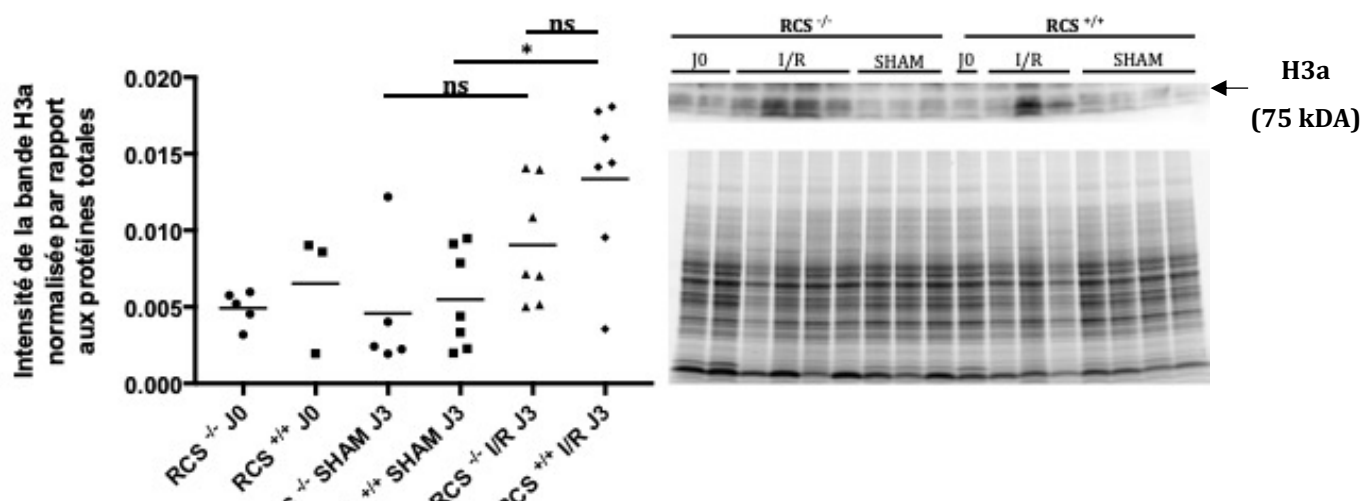


Figure 37 : Quantification, par Western Blot, de H3a suite à une ischémie de 30 min

Les protéines sont extraites du rein et déposées sur un gel de polyacrylamide. Une fois la migration terminée, les protéines totales sont révélées (stain free). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. La protéine H3a (75 kDa) est révélée à l'aide de l'anticorps anti-H3a. La quantification et la normalisation de H3a s'effectue par la mesure de la densité de la bande d'intérêt et des protéines totales à l'aide du logiciel Image Lab. Le ratio H3a/protéines totales de chaque rein testé est reporté sur un graphique (panneau de gauche). Une image représentative des membranes associées au graphique est présentée sur le panneau de droite. RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=6), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=5), RCS^{-/-} I/R J3 (n=5), RCS^{+/+} I/R J3 (n=9)

La quantification de l'histone H3a (figure 37) révèle une augmentation significative de son taux dans les reins du groupe RCS^{+/+} I/R J3 par rapport à ceux du groupe RCS^{+/+} SHAM J3. Une tendance à l'augmentation est également observée chez les groupes RCS^{-/-} I/R par rapport aux groupes SHAM correspondants.

En conclusion, l'ischémie rénale de 30 min engendre un recrutement des leucocytes CD68 positifs et des neutrophiles activés (marquage MPO) et provoque de la NETose au sein du tissu rénal. Cependant, aucune différence n'a été observée entre les rats RCS^{+/+} et les rats RCS^{-/-}.

4. ÉVALUATION DES MARQUEURS PRO-INFLAMMATOIRES SUITE A 30 MIN D'ISCHEMIE RENALE

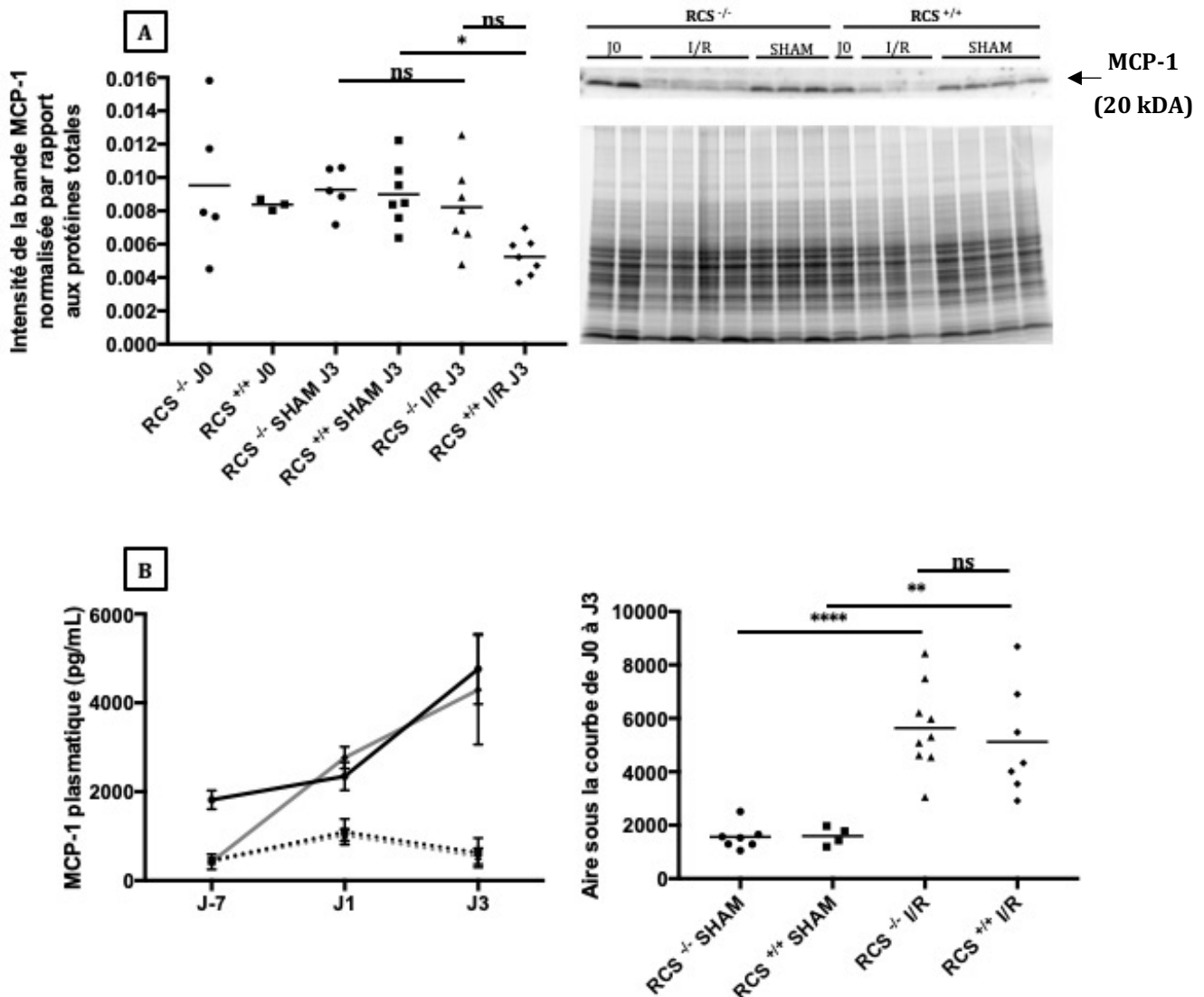


Figure 38 : Quantification de MCP-1 tissulaire et plasmatique, par Western Blot et par ELISA, suite à une ischémie de 30 min

Les protéines sont extraites du rein et déposées sur un gel de polyacrylamide. Une fois la migration terminée, les protéines totales sont révélées (stain free). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose et la protéine MCP-1 (20 kDa) est révélée à l'aide de l'anticorps anti MCP-1. La quantification et la normalisation de MCP-1 s'effectue par la mesure de la densité de la bande d'intérêt et des protéines totales à l'aide du logiciel Image Lab. Le ratio MCP1 /protéines totales de chaque rein testé est reporté sur un graphique (A, panneau de droite). RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=5), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=7), RCS^{-/-} I/R J3 (n=7), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7). B, Cinétique de l'expression du marqueur MCP-1 dans le plasma chez les rats RCS à J-7, J1 et J3. Une analyse statistique est effectuée sur l'aire sous les courbes des cinétiques et les résultats sont reportés sur la figure B, panneau de droite. RCS^{-/-} SHAM (n=5), RCS^{+/+} SHAM (n=6), RCS^{-/-} I/R (n=9), RCS^{+/+} I/R (n=7).

La quantification de la chimiokine MCP-1, par Western blot (figure 38A), révèle une diminution significative de l'expression de cette protéine dans les reins des rats RCS^{+/+} I/R J3 par rapport aux rats RCS^{+/+} SHAM J3. La cinétique montre que la concentration plasmatique de MCP-1 (figure 38B, panneau de gauche) augmente en continu au cours de la reperfusion chez les groupes I/R avec une valeur moyenne de 2349 pg/ml pour les rats RCS^{-/-} I/R et de 2767 pg/ml pour les rats RCS^{+/+} I/R à J1, et une valeur moyenne de 4763 pg/ml pour les rats RCS^{-/-} I/R et de 4293 pg/ml pour les rats RCS^{+/+} I/R à J3. Concernant les groupes SHAM, nous observons une légère augmentation au jour 1 et un retour à la valeur seuil au jour 3 après la reperfusion.

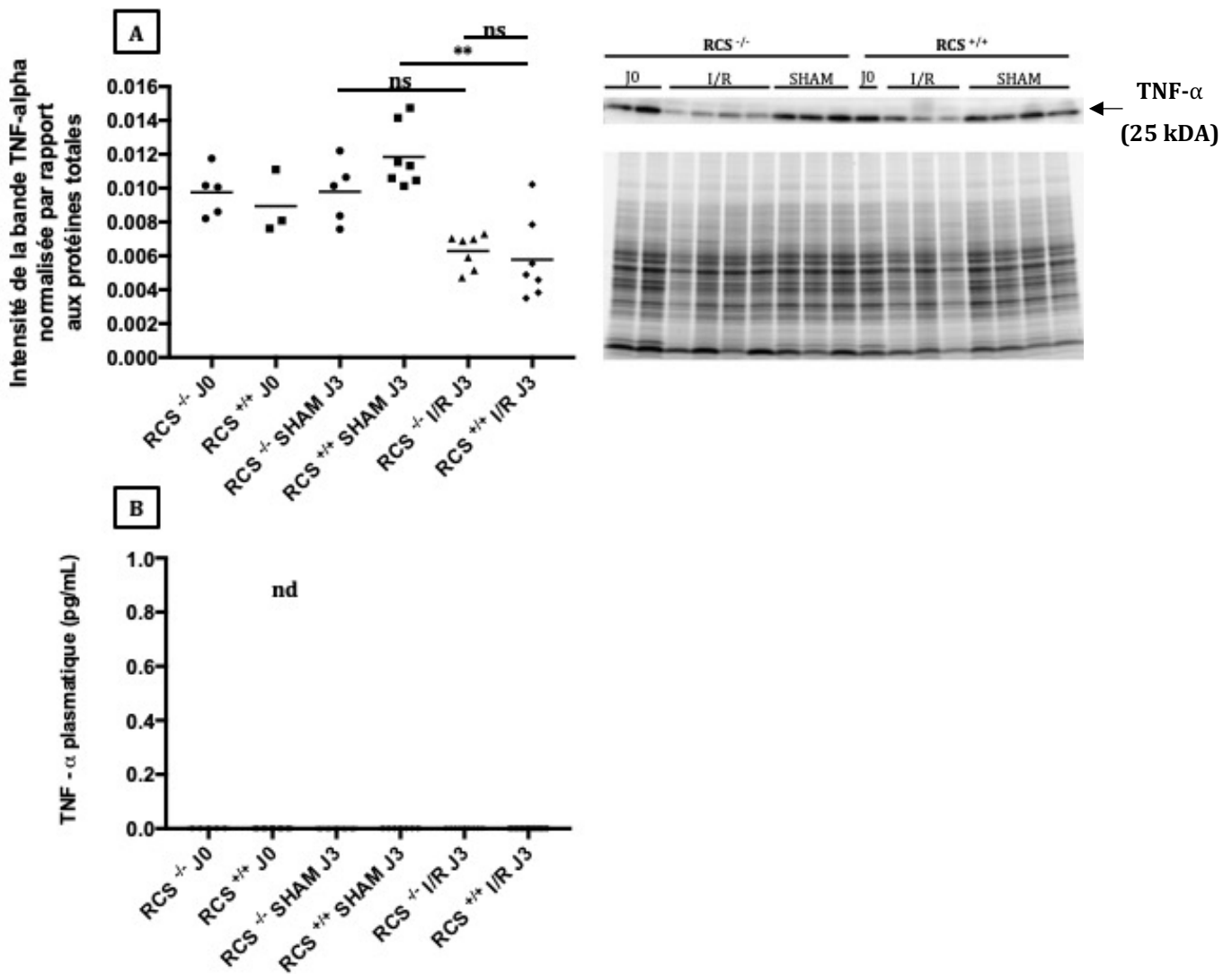


Figure 39 : Quantification TNF- α tissulaire et plasmatique, par Western Blot et par ELISA, suite à une ischémie de 30 min

Les protéines totales sont extraites du rein et déposées sur un gel de polyacrylamide. Une fois la migration terminée, les protéines totales sont révélées (stain free). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose et la protéine TNF- α (25 kDa) est révélée à l'aide de l'anticorps anti TNF- α . La quantification et la normalisation de TNF- α s'effectue par la mesure de la densité de la bande d'intérêt et des protéines totales à l'aide du logiciel Image Lab. Le ratio TNF- α /protéines totales de chaque rein testé est reporté sur un graphique (A, panneau de gauche). RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=5), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=7), RCS^{-/-} I/R J3 (n=7), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7). B, Le dosage de TNF- α plasmatique est effectué par ELISA suivant les instructions du fournisseur. La concentration de TNF- α est déterminée par une courbe d'étalon. RCS^{-/-} J0 (n=6), RCS^{+/+} J0 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=5), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=7), RCS^{-/-} I/R J1 (n=9), RCS^{+/+} I/R J1 (n=7), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=4), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=7), RCS^{-/-} I/R J3 (n=10), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7)

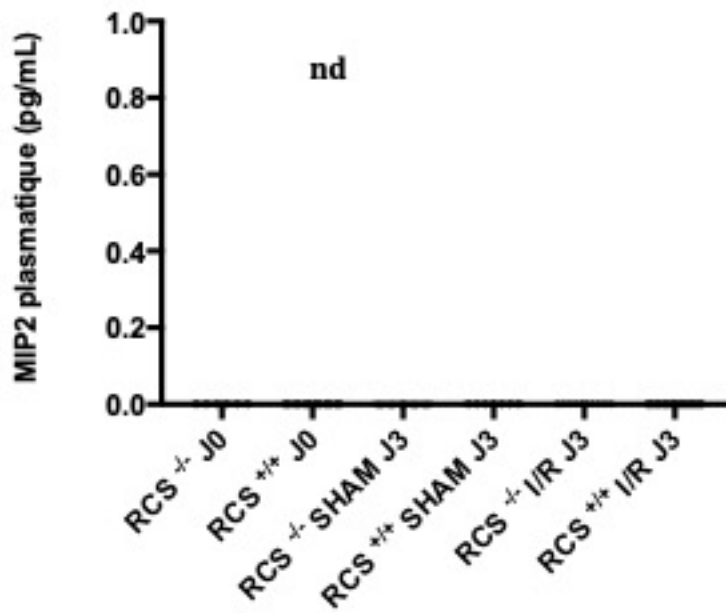


Figure 40 : Quantification de MIP2 plasmatique, par ELISA, suite à une ischémie de 30 min

Le dosage de MIP2 plasmatique est effectué par ELISA suivant les instructions du fournisseur. La concentration de MIP2 (pg/ml) est déterminée par une courbe étalon. RCS^{-/-} J0 (n=6), RCS^{+/+} J0 (n=6), RCS^{-/-} SHAM J1 (n=5), RCS^{+/+} SHAM J1 (n=7), RCS^{-/-} I/R J1 (n=9), RCS^{+/+} I/R J1 (n=7), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=4), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=7), RCS^{-/-} I/R J3 (n=10), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7)

La quantification de TNF- α (figure 39A) au niveau des reins prélevés sur les rats RCS montre une diminution significative de son taux d'expression chez les rats RCS^{+/+} I/R J3 par rapport à celui mesuré chez les rats RCS^{+/+} SHAM J3. Une tendance à la diminution du taux rénal de TNF- α est également observée chez le groupe de rats RCS^{-/-} I/R J3 par rapport au groupe de rats RCS^{-/-}

SHAM J3. Les concentrations plasmatiques du TNF- α (figure 39B) et de MIP2 (figure 40) s'est avérée indétectable par la technique ELISA.

En résumé, certaines variations dans le niveau d'expression des molécules pro-inflammatoires ont été montrées entre les groupes de rats RCS I/R et les groupes de rats RCS SHAM. Cependant, aucune différence significative entre les rats RCS^{+/+} et les rats RCS^{-/-} n'a été mise en évidence, ce qui implique que le récepteur MerTK ne module pas le niveau des molécules pro-inflammatoires générées suite à une ischémie-reperfusion rénale.

5. IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES MICROPARTICULES PLASMATIQUES SUITE A 30 MIN D'ISCHEMIE RENALE

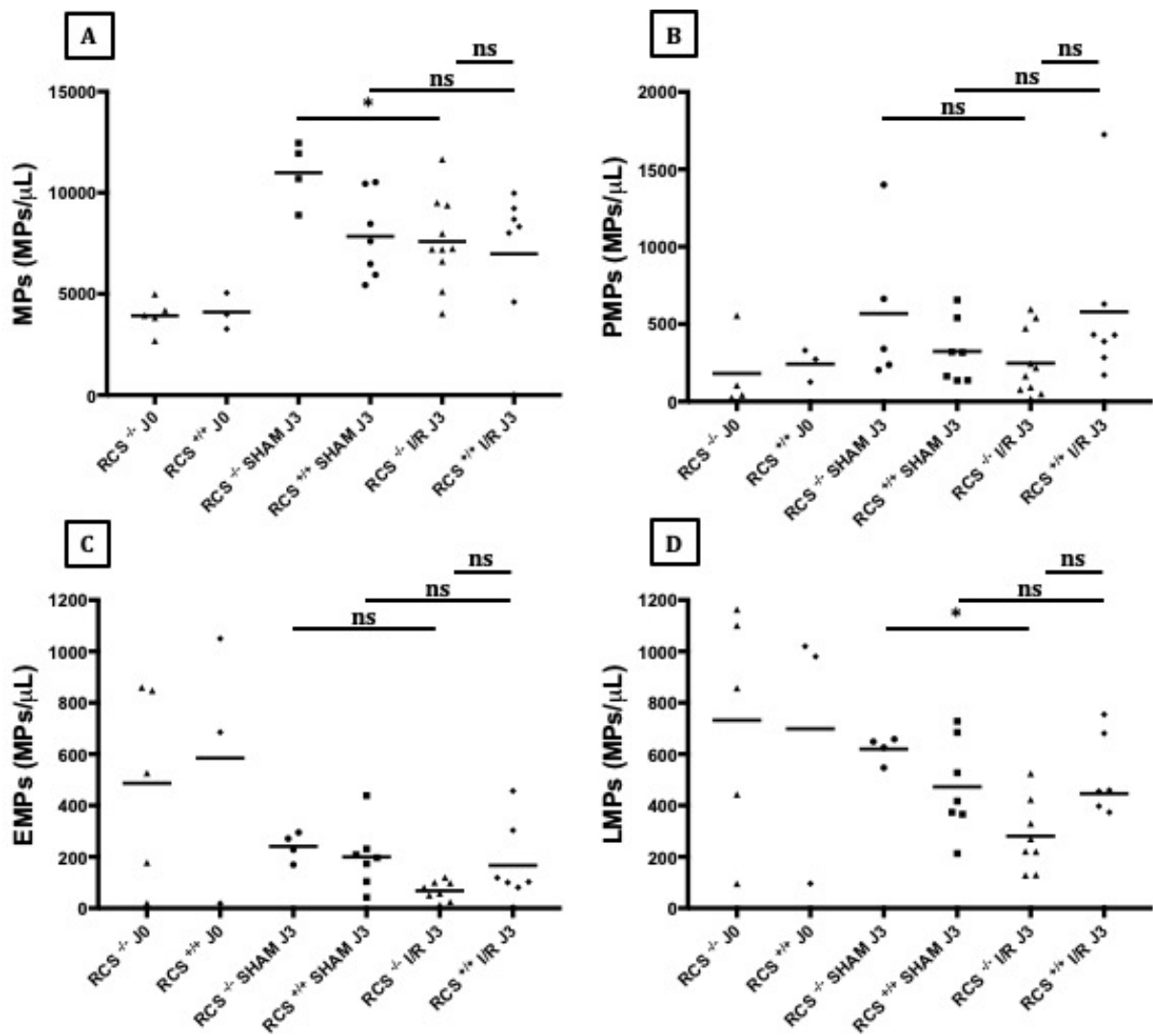


Figure 41 : Identification et quantification des MPs plasmatiques, par cytométrie en flux, suite à une ischémie de 30 min

Le sang prélevé est déposé dans un tube citraté et subit une double centrifugation qui permet d'avoir un plasma pauvre en plaquettes. Les MPs sont marquées par des anticorps ciblant un marqueur de leur origine cellulaire : PMPs (CD61-PE), EMPs (CD54-PE), LMPs (CD45-V450). Les MPs totaux sont marquées par l'Annexine V-FITC. L'acquisition s'effectue sur le cytomètre en flux BDVerse. L'origine des MPs est identifiée par une population double positive pour l'Annexine V et pour un marqueur de leur origine cellulaire. Les résultats sont analysés par le logiciel FlowJo. La valeur obtenue est reportée dans le graphique suivant l'origine cellulaire des MPs. (A) : MPs totales ; (B) : PMPs ; (C) : EMPs ; (D) : LMPs.

MPs : RCS^{-/-} J-7 (n=31), RCS^{+/+} J-7 (n=30), RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=4), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=7), RCS^{-/-} I/R J3 (n=10), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7)

PMPs : RCS^{-/-} J-7 (n=30), RCS^{+/+} J-7 (n=28), RCS^{-/-} J0 (n=4), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=4), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=7), RCS^{-/-} I/R J3 (n=10), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7)

EMPs : RCS^{-/-} J-7 (n=29), RCS^{+/+} J-7 (n=25), RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=4), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=7), RCS^{-/-} I/R J3 (n=8), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7)

LMPs : RCS^{-/-} J-7 (n=30), RCS^{+/+} J-7 (n=27), RCS^{-/-} J0 (n=5), RCS^{+/+} J0 (n=3), RCS^{-/-} SHAM J3 (n=4), RCS^{+/+} SHAM J3 (n=7), RCS^{-/-} I/R J3 (n=8), RCS^{+/+} I/R J3 (n=7)

La quantification des MPs totales (figure 41A) ne montre pas de variations significatives entre les groupes sauf pour le groupe RCS^{-/-} SHAM J3 qui présente une concentration en MPs significativement plus élevée que le groupe RCS^{-/-} I/R J3.

Concernant les PMPs (figure 41B) et les EMPs (figure 41C) aucune différence n'est observée entre les groupes de rats étudiés.

Des similitudes entre les courbes de quantification des LMPs (figure 41D) et celles des EMPs (figure 41C) sont notées. Cependant, chez le groupe de rats RCS^{-/-} SHAM J3, une augmentation significative du nombre des EMPs (241,1 MPs/ μ l) par rapport à celui des rats RCS^{-/-} I/R J3 (68,1 MPs/ μ l) a été observée.

En conclusion, la quantification des MPs montre des tendances voire des différences ponctuelles de concentration entre les groupes SHAM et les groupes I/R mais pas entre les groupes RCS^{+/+} et RCS^{-/-} ayant subi une ischémie reperfusion rénale.

IV. PHAGOCYTOSE *IN VITRO*

Nos études précédentes n'ont pas montré d'impact de MerTK sur le recrutement leucocytaire CD68 positif et la réponse inflammatoire (MCP-1) suite à l'ischémie reperfusion rénale. Nous avons cherché, par la suite, à évaluer l'efficacité de la phagocytose des monocytes isolés à partir du sang des rats RCS^{+/+} et des rats RCS^{-/-} afin d'évaluer l'impact de la déficience de MerTK sur ce mécanisme de clairance.

Dans cette étude, nous avons comparé les monocytes d'origine de rats RCS^{-/-} et de rats RCS^{+/+}. Pour cela, un traqueur fluorescent est incubé avec des cellules NRK-52. Ces cellules subissent une induction de l'apoptose et les corps apoptotiques générés sont co-incubés avec les monocytesensemencés. Les monocytes sont ensuite récupérés et analysés au cytomètre en flux. La figure 42A présente la méthode pour déterminer le pourcentage de phagocytose, le choix des conditions 1 à 9 pour ces expériences est justifié ci-dessous:

- (1) : Cellules NRK-52 non marquées pour définir la population négative
- (2) : NRK-52 marquées à l'Annexine V-FITC pour valider la présence de corps apoptotiques
- (3) : NRK-52 marquées au CMF-DA pour valider le traqueur
- (4) : Monocytes non marqués pour définir la population négative
- (5) : Monocytes marqués au CD45-PE pour définir la population positive
- (6) : Monocytes marqués au CD45-PE + NRK-52 marquées au CMF-DA pour vérifier l'absence des cellules NRK-52 dans la population positive CD45-PE
- (7) : Définir la population négative au CMF-DA à partir de la population CD45 positive
- (8) : Exemple de représentation montrant des cellules CD45 positives et CMF-DA positives
- (9) : Contrôle positif (billes fluorescentes) pour valider la capacité de phagocytose des monocytes CD45 positifs

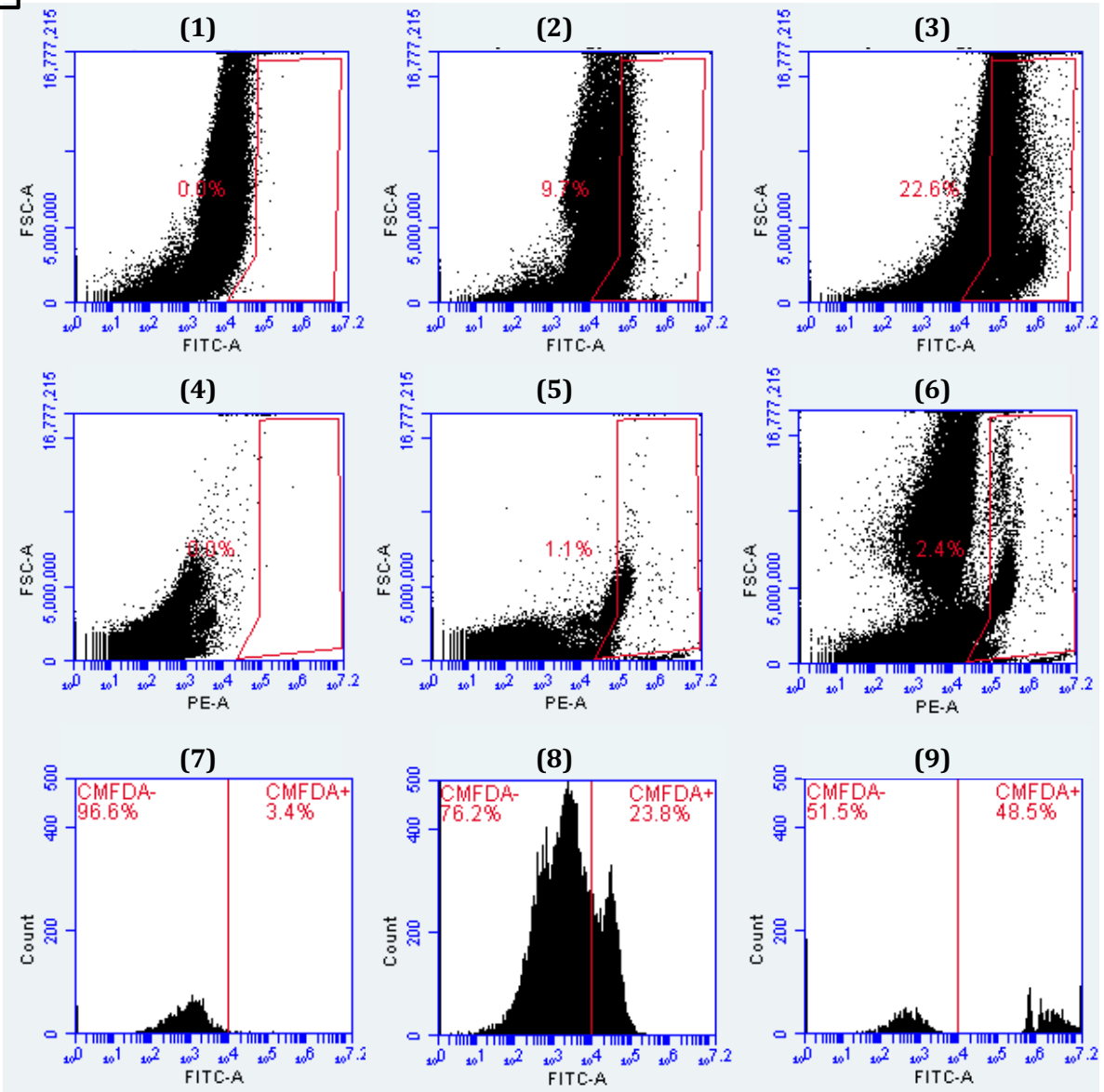
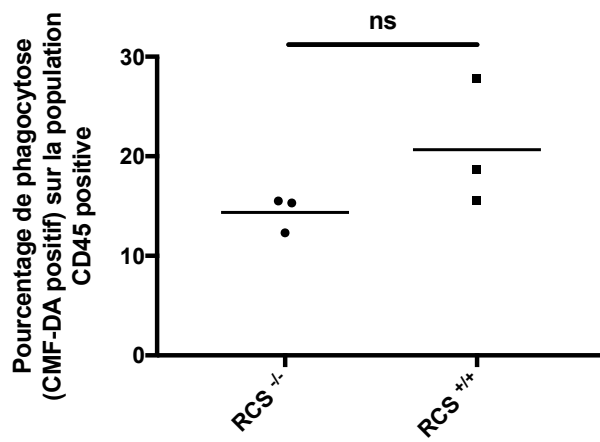
A**B**

Figure 42 : Étude, par cytométrie en flux, des capacités de phagocytose des corps apoptotiques NRK-52 par les leucocytes sanguins CD45 positifs provenant du sang de rat RCS

Le sang est prélevé sur les rats RCS. Les leucocytes sont isolés des hématies par l'action d'un tampon de lyse et sont ensuite mises en culture. La co-incubation des leucocytes avec les corps apoptotiques NRK-52 positifs au CMF-DA se fait pendant 9 h. Les cellules sont récupérées et marquées par un anticorps anti-CD45-PE. Après l'ajout de bleu de Trypan, la suspension cellulaire est analysée au cytomètre de flux BD Acuri 6. Différentes conditions (A) permettent d'identifier chaque population cellulaire. Le % de phagocytose est déterminé par le rapport des CMF-DA positives sur la population CD45 positives (B). (1) Cellules NRK-52 non marquées ; (2) NRK-52 marquées à l'Annexine V-FITC ; (3) NRK-52 marquées au CMF-DA ; (4) Monocytes non marqués ; (5) Monocytes marqués au CD45-PE ; (6) Monocytes marqués au CD45-PE + NRK-52 marquées au CMF-DA ; (7) Population négative au CMF-DA définie à partir de la population CD45 positive ; (8) Exemple de représentation montrant des cellules CD45 positives et CMF-DA positives ; (9) Contrôle positif (billes fluorescentes. (n=3).

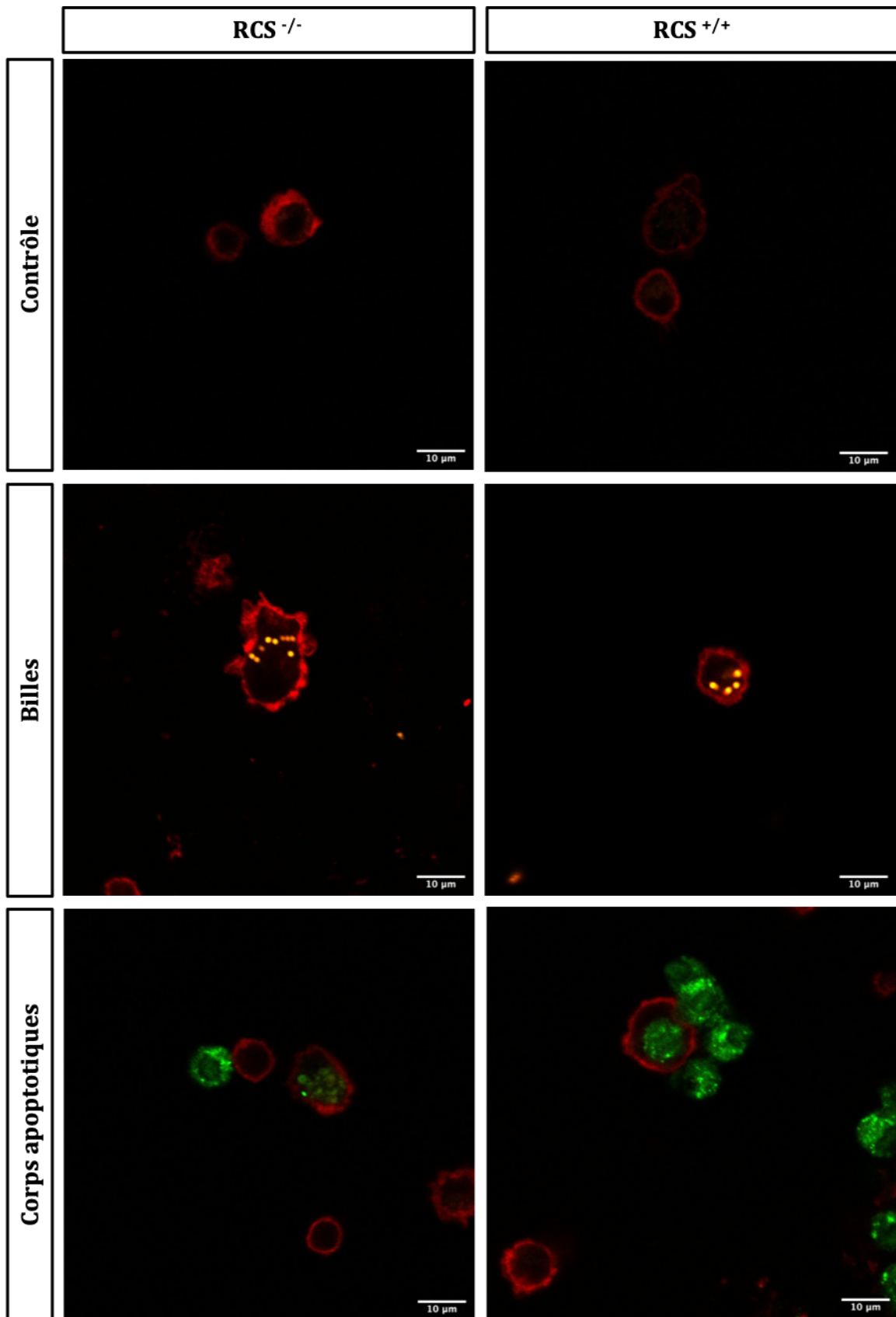


Figure 43 : Étude, par microscopie confocale, des capacités de phagocytose des corps apoptotiques NRK-52 par les leucocytes sanguins CD45 positifs provenant du sang de rat RCS

Le sang est prélevé sur les rats RCS. Les leucocytes sont isolés des hématies par l'action d'un tampon de lyse et sont ensuite mis en culture. La co-incubation des leucocytes avec les corps apoptotiques NRK-52 positifs au CMF-DA se fait pendant 9 h sur des contre-lames. Les cellules sont marquées par un anticorps anti-CD45-PE. Les contre-lames sont observées au microscope confocal Olympus. (n=1)

Les résultats présentés sur la figure 42 B montrent que les monocytes prélevés chez les rats RCS^{-/-} et ceux prélevés chez les rats RCS^{+/+} sont capables de phagocyter des corps apoptotiques avec une valeur moyenne de 14,4 % chez les monocytes des rats RCS^{-/-} et de 20,7 % chez ceux des rats RCS^{+/+}. Néanmoins l'efficacité de la phagocytose ne diffère pas significativement entre les deux groupes de monocytes.

Afin de compléter les résultats obtenus par cryométrie en flux, la phagocytose est visualisée par observation en microscopie confocale (figure 43). Cette expérience met en évidence la présence de billes (marquage orange) à l'intérieur de cellules CD45 positives (marquage rouge). Nous observons, qu'en mettant en contact les corps apoptotiques (marquage vert) avec les cellules CD45 positives, certains corps apoptotiques se trouvent liés aux cellules CD45 positives et d'autres sont localisés à l'intérieur de ces cellules mettant ainsi en évidence, le phénomène de phagocytose.

En conclusion, la déficience de MerTK ne semble pas impacter l'efficacité de la phagocytose des corps apoptotiques de cellules épithéliales rénales de rat.

L'ensemble de ces données, ci-dessus, font l'objet d'un article qui sera prochainement soumis.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'I/R rénale est une séquence incontournable du processus de transplantation rénale. Elle est responsable de lésions du greffon affectant la fonction rénale et, à plus long terme, de la survie du greffon. Il est donc indispensable de mieux comprendre les mécanismes participant aux lésions d'I/R afin de les limiter et ainsi optimiser la reprise de fonction du greffon. Cela permettrait également de développer des traitements thérapeutiques ciblés. L'I/R rénale induit notamment des lésions cellulaires conduisant à l'apoptose et à la mort cellulaire. La mort, par nécrose, s'observe par un relargage de molécules pro-inflammatoires induisant le recrutement leucocytaire tel que les macrophages et les neutrophiles. Ces leucocytes, au niveau du site lésé, produisent également des molécules pro-inflammatoires mettant en place des réactions qui s'avèrent délétères pour le tissu infiltré. La phagocytose est l'un des mécanismes permettant de diminuer l'activité inflammatoire sur le site. En effet, les phagocytes, en particulier les macrophages et les neutrophiles, permettent d'internaliser et donc d'éliminer les débris cellulaires. Le récepteur tyrosine kinase MerTK, est décrit comme étant impliqué dans le mécanisme de phagocytose. De plus, MerTK participe également à la régulation négative des voies de signalisations pro-inflammatoires. L'objectif de notre étude était de caractériser le rôle du récepteur MerTK au cours d'une séquence d'I/R rénale et son impact sur le développement des lésions rénales post-reperfusion. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de rat RCS qui a la particularité d'exprimer une protéine MerTK non fonctionnelle (rats RCS^{-/-}) et un modèle de rat exprimant un MerTK fonctionnel (rats RCS^{+/+}) et nous avons évalué et comparé entre ces deux modèles, la reprise précoce de la fonction rénale après une séquence d'I/R.

Tout d'abord, nous avons cherché à valider notre modèle d'étude en vérifiant la présence de la mutation génétique chez les rats RCS^{-/-} (délétion présente sur l'exon 2 du gène *rdy*) par génotypage et Western blot. Les amorces ont été choisies afin de mettre en évidence la délétion présente sur l'exon 2 du gène *rdy* du rat RCS^{-/-} détectée par une taille réduite de l'amplicon par rapport aux rats RCS^{+/+}. Les amorces se positionnent sur les introns voisins de l'exon 2. Les résultats ont montré l'absence totale d'amplicons sur le gel d'électrophorèse pour les rats RCS^{-/-} alors que nous nous attendions à détecter un amplicon de taille réduite par rapport à celui des rats RCS^{+/+}. Cette observation peut s'expliquer par le fait que la partie du gène délétée est mal définie, comme décrit dans la littérature. En effet la délétion s'étend sur les introns voisins de l'exon 2 mais elle est mal délimitée [187][186]. Dans notre cas, il est donc tout à fait possible que les amorces n'aient pas pu se fixer sur l'ADN muté, et donc n'aient pas pu amplifier la séquence cible chez les rats RCS^{-/-}. De manière à compléter les résultats du génotypage, la protéine MerTK a été recherchée par Western blot. De poids moléculaire natif de 110 kDa, MerTK possède 14 sites de glycosylations. Ces modifications post-traductionnelles peuvent changer son poids moléculaire qui peut varier suivant l'espèce mais aussi suivant l'organe qui l'exprime [192]. Dans notre cas, la détection de MerTK chez les rats RCS^{+/+} est observée à un poids moléculaire d'environ 150 kDa

alors que cette bande n'est pas retrouvée chez les rats RCS^{-/-}. Ces résultats valident notre modèle et montrent que les rats RCS^{-/-} ne sont pas capables de synthétiser la protéine MerTK native à cause de la délétion de l'exon 2 du gène *rdy* qui provoque un décalage de la séquence faisant apparaître un codon STOP précoce générant un peptide de 20 acides aminés [187]. Ce peptide n'a pas été détecté par Western blot ce qui peut s'expliquer par un poids moléculaire trop faible pour la technique (inférieur à 10 kDa) ou par l'incapacité de l'anticorps à se fixer sur ce peptide ou encore par la dégradation post-traductionnelle de ce dernier. En conclusion, ces deux méthodes de détection ont permis de valider notre modèle animal déficient en MerTK.

Durant notre étude, nous nous sommes heurtés à plusieurs difficultés liées à la souche RCS, la première étant la croissance très lente de ces rats. En effet, dans la littérature, la chirurgie d'I/R rénale est généralement effectuée sur des rats avec un poids d'environ 250 g qui est souvent atteint à 8 ou 9 semaines après la naissance comme c'est le cas pour les rats Sprague Dawley et Wistar, souches couramment utilisées pour ce genre de chirurgies. Or pour les rats RCS, nous avons observé que 12 à 13 semaines étaient nécessaires pour que ces rats atteignent un poids entre 250 g et 300 g. La deuxième difficulté est le faible niveau de gestation car il n'était pas rare que les femelles RCS^{-/-} ne soient pas gestantes après un accouplement avec un mâle. Cette observation peut s'expliquer par une fertilité affectée chez les mâles RCS^{-/-} et qui serait directement liée à la mutation de MerTK. En effet, Le récepteur MerTK est exprimé dans les cellules de Sertoli, cellules tapissant l'épithélium des tubules séminifères dans les testicules. Ces cellules sont en contact avec 30 à 40 cellules germinales durant les étapes de différenciation pour assurer leur développement et elles ont la capacité de phagocyter les cellules germinales présentant des anomalies de développement [156]. Une étude sur un modèle de souris déficiente en MerTK a mis en évidence l'accumulation de cellules germinales apoptotiques qui se traduit par une réduction de la fertilité [147]. Cette anomalie pourrait être présente chez les rats RCS et justifierait une fertilité plus faible. Enfin, la troisième difficulté rencontrée vient du fait que la majorité des portées étaient constituées de femelles alors que nous avons choisi d'effectuer nos chirurgies exclusivement sur des mâles afin d'éviter les biais hormonaux dans notre modèle d'I/R. Ceci a rajouté une difficulté supplémentaire pour compléter nos groupes expérimentaux et a de ce fait retardé nos expériences.

La durée d'ischémie rénale a été choisie en adéquation avec les précédentes études effectuées au sein du laboratoire et avec ce qui a été précédemment décrit par d'autres équipes [193]–[196]. Cependant il est à noter qu'à ce jour, aucune étude n'a été publiée sur les rats RCS subissant une I/R rénale. Suite aux chirurgies effectuées, la courbe de survie de Kaplan-Meier met en évidence au bout du deuxième jour de reperfusion, une importante mortalité des rats ayant subi une ischémie de 1h. Ce taux de mortalité nous a conduit, pour des raisons éthiques, à ne pas renouveler

ces expériences dans les mêmes conditions d'ischémie. Chez les animaux survivants à 3 jours post-ischémie, nous avons étudié plusieurs marqueurs plasmatiques de fonctions et de lésions rénales notamment la créatinine et l'urée. La cinétique de ces dosages montre une augmentation continue de la concentration de ces marqueurs durant les trois jours de reperfusion. Nos résultats montrent une différence entre ce modèle RCS et les études précédentes effectuées au sein du laboratoire. En effet, avec un même protocole chirurgical effectué sur des rats Sprague Dawley, la cinétique de la créatinine a montré un pic au premier jour de reperfusion puis une diminution de la concentration au troisième jour de reperfusion suggérant une reprise de la fonction rénale. Ces données suggèrent que notre modèle RCS est beaucoup plus sensible aux lésions induites par une ischémie d'1 h suivie d'une reperfusion. Nous avons également dosé des marqueurs plasmatiques LDH et ASAT, ce dernier est une enzyme présente dans les cellules épithéliales des tubules rénaux [197] et dont le relargage dans le milieu extracellulaire reflète des lésions cellulaires. Les cinétiques des marqueurs ASAT et LDH plasmatiques des groupes I/R indiquent un pic de lésions et des nécroses cellulaires après 1 jour de reperfusion. Ensuite, le niveau de ces marqueurs diminue rapidement pour atteindre un niveau presque basal après 3 jours de reperfusion suggérant une diminution des lésions cellulaires. Nous observons également un léger pic concernant les groupes SHAM, mais qui est significativement plus faible que celui des groupes I/R. Cette légère augmentation dans les groupes SHAM indique tout de même que la chirurgie sans le clampage provoque des lésions cellulaires, liées à l'attrition tissulaire. NGAL, à la différence de LDH, serait plus considéré comme une protéine de stress produite par des cellules vivantes et non par les cellules nécrotiques ou apoptotiques [197]. Cette protéine est relarguée par des cellules épithéliales tubulaires stressées voire lésées et par les neutrophiles activés [197]. Au cours d'une ischémie de 1 h et une reperfusion de 3 jours, la cinétique de NGAL montre un profil de sécrétion similaire à LDH et ASAT avec 1 pic d'expression à J1. L'information complémentaire qu'apporte ce marqueur, par rapport aux marqueurs LDH ou ASAT, est que le stress cellulaire semble toujours présent après 3 jours de reperfusion. Nous avons également dosé, dans le sang des rats opérés, le niveau de KIM-1 qui est un biomarqueur fortement exprimé et sécrété par les cellules épithéliales des tubules proximaux en réaction aux lésions cellulaires. Ce marqueur est un récepteur reconnaissant les PS et serait impliqué dans l'activité phagocytaire des cellules épithéliales [198]. En réponse à un stress oxydant, comme dans le cas de l'I/R, Kim-1 est clivé à la surface cellulaire via une metalloprotéinase, l'ectodomaine ainsi clivé est la partie dosée dans le plasma [198]. Ainsi, KIM-1 pourrait potentialiser la récupération des lésions rénales par son rôle dans la phagocytose et justifier l'augmentation de sa concentration plasmatique suite à l'I/R. Il aurait été intéressant de doser par Western Blot le niveau de Kim-1 exprimé au sein du tissu rénal afin de faire un ratio de Kim-1 total rénal/Kim-1 clivé circulant. À ce stade de l'étude, notre modèle d'I/R rénal est validé par la mise en évidence de biomarqueurs de lésions et d'affectation de la fonction rénale.

En faisant le lien avec les marqueurs de la fonction rénale et de lésions, il peut être suggéré que la séquence d'I/R provoque des lésions cellulaires importantes malgré un retour à un niveau basal à J3 pour certains marqueurs. Cependant, notre modèle reste un modèle très sensible et l'I/R représente un acte sévère qui ne permet pas une reprise de la fonction rénale 3 jours après une ischémie d'1 h.

De plus et de façon intéressante, il semblerait, par l'analyse statistique, que MerTK dans notre modèle ne soit pas impliqué dans le développement des lésions ou la reprise de la fonction rénale précoce. Une étude a montré, dans un modèle murin de néphrite, la déficience de MerTK entraîne l'augmentation de la concentration plasmatique de l'urée, néanmoins cette augmentation significative s'observe au 14ème jour après le déclenchement de la néphrite [164].

Afin de confirmer les lésions rénales observées par l'évaluation des biomarqueurs, nous avons étudié l'intégrité des structures rénales par histologie (coloration HES-PAS). Nous avons montré que les résultats de cette analyse histologique vont dans le même sens que ceux obtenus par le dosage des biomarqueurs plasmatiques de lésions rénales. En effet, nous avons observé que la jonction cortico-médullaire était la région la plus lésée par l'I/R. Dès le premier jour de reperfusion, les tubules proximaux subissent de sévères dommages qui se caractérisent par la perte de la bordure en brosse et la présence d'une grande quantité de débris cellulaires présents dans la lumière des tubules. Le score des lésions permet d'apporter un aperçu de la propagation des lésions sur le rein soit environ 25 à 50 % du rein est affecté par l'I/R. Comme dit précédemment, les tubules proximaux sont les plus sensibles et cette séquence d'I/R surtout quand l'ischémie dure 1 h car les cellules épithéliales de ces tubules ont une capacité limitée à subir un métabolisme anaérobie suite à une diminution de l'oxygène [199]. Pour une courte durée d'ischémie, ces cellules perdent leur polarité, mais face à une longue séquence d'I/R des dommages irréversibles sont observés tels que la nécrose et l'apoptose. Au troisième jour de reperfusion, les mêmes observations sont notées avec un score quasiment identique pour les deux groupes d'I/R (RCS^{-/-} et RCS^{+/+}). Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par le dosage des biomarqueurs LDH et ASAT, le pic à J1 est justifié par l'apparition de fortes lésions mais ces lésions n'évoluent pas au cours de la reperfusion résultant en un retour au niveau basal de LDH et ASAT à J3. L'encombrement de la lumière des tubules peut expliquer le pic des marqueurs de créatinine et d'urée suite à l'incapacité du rein à filtrer le sang. De plus, comme la situation n'évolue pas la concentration plasmatique de ces marqueurs continuent toujours d'augmenter. Enfin, il est à rajouter que les groupes SHAM n'ont pas subi de lésions histologiques suite à la chirurgie.

Les lésions d'I/R induisent le recrutement leucocytaire sur le site lésé et plus précisément celui des macrophages et des neutrophiles (phagocytes). Notre analyse histologique a mis en

évidence un recrutement des macrophages CD68 positifs et des neutrophiles CD68 positifs sur le site lésé qui augmente au cours de la reperfusion. L'analyse semi quantitative, par Western Blot, du marqueur CD68 dans le tissu rénal reperfusé, nous a permis de valider les observations histologiques. De plus, la majorité de ces leucocytes CD68 positifs se localise à proximité des tubules lésés dans la partie interstitielle. Nos observations sont en cohérence avec des travaux précédents qui ont déjà montré que l'I/R rénale augmente l'infiltration leucocytaire CD68 positive chez le rat [200]. Ces résultats sont également en cohérence avec le niveau lésionnel des reins après l'I/R, en effet nous observons d'importantes lésions histologiques rénales (telles que la nécrose cellulaire) après 1 ou 3 jours de reperfusion induisant le recrutement des leucocytes CD68 positifs ayant la capacité de phagocyter les débris cellulaires. Les données de la littérature montrent bien l'importance du recrutement des phagocytes afin de « nettoyer » le tissu suite à des lésions cellulaires [153].

Nous avons par la suite voulu caractériser le niveau d'activation des cellules leucocytaires infiltrant le rein. Pour cela, nous avons évalué l'expression de marqueurs pro-inflammatoires exprimés par les macrophages et les neutrophiles activés, tels que : iNOS, MPO, NE (Neutrophile Élastase) et H3A (histone 3A). iNOS est une enzyme qui catalyse le NO de façon indépendante du calcium [201]. Son expression peut être observée lors d'une infiltration leucocytaire associée à une production de ROS conduisant à des lésions cellulaires, comme dans le cas de l'I/R [202]. Cependant, dans notre modèle aucune variation significative n'a été observée au cours de la reperfusion malgré une tendance à une légère augmentation à 1 et 3 jours après l'I/R. Le marqueur MPO est une caractéristique des neutrophiles activés [203] et notamment dans le cas de l'I/R [50]. Dans notre modèle, le marqueur MPO est bien présent après la séquence d'I/R et son niveau d'expression augmente significativement après 1 et 3 jours de reperfusion par rapport à celui mesuré à J0 et à celui enregistré chez les groupes SHAM. Nous avons cherché à visualiser les neutrophiles par la technique d'immunohistochimie avec plusieurs marqueurs tels que MPO ou NE mais nos observations n'ont pas permis de visualiser des neutrophiles sur des coupes rénales. Les anticorps utilisés révélaient un fort marquage non spécifique qui ne permettait pas d'identifier les cellules MPO et NE positives. Il est décrit que les neutrophiles sont les premières cellules leucocytaires à arriver sur le site lésé soit environ 30 min après le début de la reperfusion et jusqu'à 3 jours après [204]. Les neutrophiles sont capables de produire des molécules pro-inflammatoires, une activité limitée par la durée de vie plutôt courte de ces cellules. Il semble que la présence du marqueur MPO (2 fois plus importante à J3 qu'à J1) dans les extraits protéiques de rein suite à une I/R, témoigne de la présence et de l'activation des neutrophiles. Leur action aggrave les lésions par la production de ROS notamment via l'enzyme MPO [205]. Nous avons voulu approfondir notre étude sur les neutrophiles car les cellules lésées ont la capacité d'induire le phénomène de NETose. Ce mécanisme se traduit en partie par le relargage de l'ADN décondensé

suite aux clivages des histones par la NE et leur citrullination par PAD4 [53]. Ainsi, nous avons cherché à quantifier l'histone H3A citrullinée (marqueur de NETose) dans les extraits protéiques rénaux, les résultats ne démontrent aucune augmentation significative qui soit en corrélation avec l'augmentation de cellules CD68 et MPO positives chez les groupes I/R par rapports aux groupes SHAM. Cependant, pour bien caractériser la NETose, on utilise généralement un co-immunomarquage entre H3a citrulliné et NE ou MPO avec une coloration du noyau au DAPI afin d'identifier les neutrophiles et l'ADN positif à H3a [55]. Nous avons également cherché à identifier la NETose de cette manière, mais nous n'avons pas pu observer de co-localisations d'immunomarquage franches et bien distinctes.

Afin de compléter l'étude du recrutement leucocytaire, nous avons, d'une autre part, évalué quelques marqueurs pro-inflammatoires chimioattractants comme MCP-1, MIP-2 et TNF- α . Ces chimiokines MCP-1 et MIP-2 ont le pouvoir d'attirer les leucocytes sur le site inflammatoire et d'amplifier la boucle pro-inflammatoire notamment via la production de TNF- α [206][67]. La chimiokine MCP-1, sécrétée et relarguée suite à des lésions cellulaires, stimule l'infiltration leucocytaire sur le site lésé. Son expression serait liée à l'activation de $\text{NK}\kappa\text{B}$, via le stress oxydant. Plusieurs études montrent que MCP-1 est précocement sécrétée après une séquence d'I/R [22]. De manière intéressante, nous avons constaté une augmentation plasmatique de la forme sécrétée et donc active de MCP-1 (en cohérence avec la diminution de la forme tissulaire). La concentration plasmatique de MCP-1 atteint un pic à J1 pour ensuite diminuer à J3 en restant relativement élevée par rapport aux groupes SHAM. Ces résultats sont en corrélation avec les lésions induites par l'I/R. De plus, sa diminution dans le rein au cours de la reperfusion semble suggérer que MCP-1 est stockée dans les cellules puis libérée une fois les cellules lésées. Le dosage par la technique ELISA de la forme circulante de la chimiokine MIP-2 et du TNF- α n'a pas montré de formes détectables de ces cytokines dans le plasma. Le rôle de TNF- α est multiple mais il est décrit comme une molécule capable de stimuler le relargage de médiateurs inflammatoires et l'activation des neutrophiles. Nos résultats vont dans le même sens que ceux de l'équipe de Meldrum *et al* qui ont montré dans, un modèle d'I/R chez le rat, que le niveau d'expression du TNF- α dans le rein augmente durant les deux premières heures de reperfusion pour ensuite diminuer à 4 h de reperfusion alors que celui dans le sérum est fortement augmenté à 1 h de reperfusion mais quasiment nul au-delà. [207].

En conclusion et par rapport à l'implication du récepteur MerTK lors de l'I/R, nos travaux ont montré que ce récepteur ne semble pas avoir d'influence sur le recrutement des leucocytes CD68 positifs ni sur la production de molécules pro-inflammatoires et chimioattractantes en lien avec ces leucocytes (macrophages et neutrophiles).

Dans une deuxième partie de nos travaux, nous avons étudié l'effet potentiel du récepteur MerTK sur la production et/ou l'élimination de microparticules plasmatiques générées suite à une I/R chez les rats RCS. Il a déjà été décrit que les MPs sont générées suite à la nécrose et l'apoptose cellulaire, lors des lésions cellulaires [110]. Le rôle de MerTK dans l'élimination des MPs par les leucocytes a déjà été reporté par d'autres équipes sur un modèle murin avec des lésions aiguës pulmonaires [14].

Lors de leur formation, les MPs gardent certains marqueurs de leur origine cellulaire et externalisent la PS (phosphatidylsérine). Nous avons tout d'abord travaillé sur la mise au point de la technique de caractérisation et de quantification des MPs, en particulier les PMPs, les EMPs et les LMPs. L'identification de ces MPs était basée sur un double marquage membranaire effectué par l'utilisation de l'Annexine V (marqueur des PS), révélant l'intégralité des MPs, et d'un anticorps reconnaissant un marqueur de leur origine cellulaire. De nombreuses études chez le rat utilisent un simple marquage pour valider les MPs et leur origine cellulaire [208][209][210] mais ce choix n'est pas judicieux étant donné la taille des MPs qui peut se confondre avec des débris cellulaires et donner lieu à des faux positifs lors de l'acquisition au cytomètre de flux comme peut le montrer l'utilisation d'isotypes contrôles. Au cours de notre mise au point, nous nous sommes heurtés au problème de présence de fibrine dans certains échantillons au moment de l'acquisition au cytomètre en flux et nous avons supposé que ce fût dû à l'ajout du tampon lors de l'incubation avec les anticorps et l'annexine. En effet, ce tampon contient du calcium, nécessaire à la liaison entre l'Annexine V et la PS, mais peut aussi stimuler la coagulation et générer de la fibrine. Cette fibrine peut provoquer une réduction du nombre de MPs détectées mais aussi des anomalies au moment de l'acquisition au cytomètre de flux. Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé l'hirudine, un anticoagulant inhibant directement la thrombine.

Après la mise au point des techniques de détection, le deuxième objectif de cette étude était de déterminer l'intérêt de l'utilisation des MPs comme biomarqueurs des lésions d'I/R rénale. Pour cela, nous avons cherché à caractériser et à quantifier les MPs présentes dans le plasma provenant de rats ayant subi une I/R rénale en comparaison avec les groupes de rats SHAM. Nos résultats n'ont pas montré de différences significatives entre les groupes de rats RCS I/R et des rats RCS SHAM ni entre les groupes RCS^{-/-} et RCS^{+/+} après 1 et 3 jours de reperfusion. Selon les données de la littérature, une augmentation des trois types de MPs (PMPs, EMPs, LMPs) était attendue. En effet, plusieurs études ont montré que l'I/R provoque une augmentation des MPs en réponse aux lésions cellulaires [110][111][211]. Néanmoins, il est possible que la génération de MPs soit limitée dans le temps et différente selon le modèle et l'origine cellulaire des MPs. De plus, nous avons démontré que la partie pré-analytique semble être un élément primordial pour l'obtention des résultats reproductibles. Lacroix *et al* ont mené une étude sur la partie pré-analytique des MPs

et discuté plusieurs critères importants durant plusieurs étapes qui vont du prélèvement sanguin au stockage de l'échantillon [212]. En effet, le prélèvement sanguin doit se faire par le même opérateur et dans les mêmes conditions pour éviter les variabilités et le choix de l'aiguille est aussi important pour éviter l'activation des plaquettes qui pourrait entraîner la génération de MPs supplémentaires. Concernant nos prélèvements sur les rats, nous avons observé que chez les rats ayant subi une I/R, le prélèvement sanguin était plus compliqué. Dans l'ensemble, ces rats semblaient avoir un débit sanguin beaucoup plus faible et le délai supplémentaire pour récupérer suffisamment de sang nous rapprochait dangereusement de l'activation de la coagulation. L'étude de Lacroix a abordé le choix de l'anticoagulant lors du dépôt du sang suite à un prélèvement. L'acquisition de MPs circulantes a montré que le citrate est l'anticoagulant le plus stable, à l'inverse de l'EDTA qui provoque une grande variabilité. Un autre critère abordé est le transport des tubes qui est un point crucial pour les MPs. En effet, si le tube est placé horizontalement lors du transport, cela augmente le nombre de MPs mais aussi la variabilité contrairement à la position verticale. Dans la même idée, une forte agitation lors du mélange sang/anticoagulant aura des conséquences indésirables sur les MPs par rapport à une agitation douce. Concernant nos prélèvements, ils étaient effectués sur un site différent de celui où était effectuée la première centrifugation, ainsi, un trajet en voiture était nécessaire ce qui a dû générer des perturbations des MPs dans les tubes de sang. Le délai entre le prélèvement et la première centrifugation a également été étudié et il s'avère qu'après 1h de délai, la quantité de MPs augmente générant ainsi la variabilité entre les expériences. Concernant les étapes de centrifugation, Lacroix *et al* ont comparé deux protocoles : 2 X 2500g pendant 15 min (A) ; 1500 g pendant 15 min puis 13000 g pendant 2 min (B). Le protocole B a démontré l'apparition d'agrégats plaquettaires, qui sont absents dans le protocole A. Il est à rajouter qu'entre chaque centrifugation, environ 1 cm de surnageant est laissé pour éviter le prélèvement de la couche leuco-plaquettaire. Enfin, la durée du stockage à -80 °C n'a pas montré de réel impact sur la variabilité et la quantité de MPs lors de l'acquisition.

Tous ces points sont à prendre en compte afin de permettre une bonne reproductibilité des résultats.

Enfin, l'étude comparative entre les rats RCS^{-/-} et les rats RCS^{+/+} après une séquence d'I/R n'a pas montré, dans notre cas, de différences en termes de nombre et d'origine des MPs circulantes. Ces résultats stipulent que le récepteur MerTK, présent sur les phagocytes des rats RCS^{+/+}, n'est pas impliqué dans la régulation du nombre de MPs circulantes générées suite à une I/R rénale. Une étude récente avait pourtant mis en évidence l'implication de ce récepteur dans la phagocytose des MPs par les macrophages alvéolaires lors de lésions pulmonaires aiguës [14].

Tous les résultats décrits ci-dessus ont été obtenus sur des rats RCS ayant subi une durée d'ischémie rénale de 1 h, ce qui a provoqué des dommages sévères sur les reins et qui se traduisent par une fonction rénale aggravée au cours de la reperfusion pouvant causer la mort de l'animal. La sévérité du modèle suggère que les lésions cellulaires sont tellement fortes que l'effet potentiel de MerTK ne peut pas être observé. Ces résultats permettent de conclure que la souche RCS est très sensible à l'I/R rénale, comparée à d'autres souches couramment utilisées. De ce fait, nous avons dans une seconde série d'expériences réduit cette durée d'ischémie rénale à 30 min afin de limiter les lésions et les décès des animaux mais aussi dans l'objectif de réduire la sévérité pour potentiellement voir apparaître des effets lisibles de la mutation du récepteur MerTK.

Avec cette durée d'ischémie réduite, les courbes de survie Kaplan-Meier révèlent une amélioration par rapport à celle établie après 1 h d'ischémie, avec une survie de 90 à 100 % de la population. Contrairement aux effets délétères d'une durée d'ischémie de 1 h sur la reprise de fonction rénale, la durée de 30 min d'ischémie permet un retour à une fonction rénale proche de la normale après 3 jours de reperfusion, définie par un taux plasmatique de créatinine de 69 $\mu\text{mol/l}$ pour le groupe RCS^{+/+} et de 170 $\mu\text{mol/l}$ pour le groupe RCS^{-/-} alors qu'à 1 h d'ischémie, ce taux était de 306 $\mu\text{mol/l}$ pour le groupe RCS^{-/-} et de 815 $\mu\text{mol/l}$ pour le groupe RCS^{+/+}, le taux à J0 étant d'environ 20 $\mu\text{mol/l}$.

Comme attendu, l'analyse des cinétiques plasmatiques des biomarqueurs ASAT, LDH, NGAL et KIM-1 permettent de conclure à des lésions moins sévères après 30 min d'ischémie comparé à 1 h d'ischémie. Les analyses histologiques montrent des lésions plus diffuses avec certains tubules qui conservent leur bordure en brosse à J3 pour le groupe RCS^{-/-} I/R. Étonnamment à J3, le groupe RCS^{+/+} I/R montre des dommages histologiques plus sévères affectant plus de 50 % du rein. De plus, l'infiltrat des leucocytes CD68 positifs est bien présent même si l'infiltration semble moins importante que dans le cas de 1 h d'ischémie comme le montre le taux plus faible de MCP-1 plasmatique et qui traduit une réponse inflammatoire moins agressive. Concernant l'activation des phagocytes, l'expression du marqueur H3a semble augmenter suggérant la présence de NETose sur le site lésé.

Enfin, la quantification des PMPs, EMPs, LMPs ne révèle aucune variation entre les groupes.

En Conclusion, l'ischémie de 30 min provoque des lésions moins fortes et une reprise de la fonction rénale qui se suivent par une infiltration leucocytaire et une production de molécules pro-inflammatoires réduite par rapport à l'ischémie de 1 h. Néanmoins, nos résultats n'ont pas permis d'observer un impact de la déficience de MerTK sur ces effets.

Suite à cela, nous nous sommes intéressés à l'étude du rôle potentiel du récepteur MerTK dans la phagocytose chez les rats RCS^{+/+} par rapport aux rats RCS^{-/-}. Les observations des précédentes

expériences, le recrutement leucocytaire CD68 positif et la réponse inflammatoire (MCP-1), n'ont pas montré de réelles différences entre les groupes RCS^{-/-} et RCS^{+/+}. Cependant, il est décrit que MCP-1 est augmentée dans les reins suite à une déficience de MerTK [170]. C'est pourquoi, nous nous sommes concentrés sur un autre rôle des MerTK qu'est la phagocytose [164]. Ainsi, nous avons cherché à évaluer l'efficacité de la phagocytose sur des monocytes isolés à partir du sang pour évaluer l'impact de la déficience de MerTK sur ce mécanisme de clairance. Nous avons ainsi mesuré et comparé, *in vitro*, la capacité des monocytes prélevés sur des rats RCS^{-/-} et des rats RCS^{+/+} à phagocyter des corps apoptotiques. Le choix de ces corps apoptotiques s'est porté sur les cellules NRK-52 qui sont des cellules épithéliales de rein de rat dans le but de conserver la même espèce et la même origine tissulaire. De plus, afin de mimer au mieux l'origine de la génération des corps apoptotiques, nous avons induit du stress oxydant sur les cellules NRK-52, comme observé dans le cas d'une I/R. Le temps de 9 h de phagocytose a été choisi suite à une étude cinétique qui a montré l'intérêt d'utiliser un temps suffisamment long pour optimiser la phagocytose sans affecter la survie des monocytes. Avant l'acquisition, du bleu de Trypan est ajouté pour permettre d'éteindre la fluorescence verte de surface et détecter uniquement les corps apoptotiques phagocytés par les monocytes et non l'apprêtement des corps apoptotiques à la surface des monocytes. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse en microscopie confocale. Les résultats n'ont pas montré de différences significatives entre les capacités de phagocytose des monocytes provenant des rats RCS^{-/-} versus ceux provenant des rats RCS^{+/+} et ceci en absence de toute stimulation par le ligand la protéine S. Il serait donc intéressant pour les futures expériences d'utiliser de la protéine S pour activer la phagocytose MerTK dépendante. En effet, la protéine S permet d'activer MerTK tout en se liant aux PS des corps apoptotiques. Ainsi, le pourcentage de phagocytose devrait être augmenté sur les monocytes de rats RCS^{+/+} et inchangé pour les monocytes de rats RCS^{-/-}. Une étude sur les monocytes humains a mis en évidence une phagocytose de corps apoptotiques de neutrophiles augmentée suite à la stimulation par la protéine S [213].

Au cours de ce travail, dans notre modèle, le récepteur tyrosine kinase MerTK n'a pas montré d'effets particuliers dans la physiopathologie de l'I/R rénale suivant les marqueurs étudiés. Cependant, cette étude a évalué les effets de l'I/R sur deux temps de reperfusion : J1 et J3. Il serait intéressant d'étudier certains marqueurs sur des temps plus précoces de reperfusion notamment le TNF- α pour lequel une étude précédente a déjà montré une augmentation de sa concentration plasmatique au bout de 1 h et une absence totale d'expression à 4 h de reperfusion. L'infiltration des neutrophiles et la quantification des MPs pourraient également profiter d'une meilleure visibilité à des temps plus précoces de reperfusion.

Concernant MCP-1, il est surprenant de ne pas observer de différences entre les deux groupes d'I/R. en effet, des travaux précédents ont montré que la déficience en MerTK engendre une augmentation de médiateurs pro-inflammatoires tels que MCP-1. Cette production de MCP-1 passerait par l'activation de NF κ B, or cette dernière est régulée négativement par l'activité de MerTK à travers la stimulation de PI3K/Akt. De même pour l'étude de la phagocytose, MerTK a été très largement décrit comme ayant un rôle important dans la phagocytose. En effet, dans un modèle de souris développant une néphrite, la déficience en MerTK a montré une diminution de la clairance des corps apoptotiques [164]. Il était donc attendu que la déficience en MerTK réduise l'efficacité de la phagocytose visualisée par une augmentation potentielle de lésions cellulaires (LDH, ASAT) et une fonction rénale plus réduite (créatinine, urée) en comparaison avec des rats RCS^{+/+}. Il est possible d'expliquer ces résultats par la faible activation du récepteur MerTK qui serait liée à un niveau insuffisant en protéine S. De plus il a été montré que ADAM17, une métalloprotéinase connue pour activer le TNF- α , est aussi responsable du clivage de MerTK, or la forme soluble de MerTK réduit l'activité de MerTK membranaire par la liaison avec ses ligands. ADAM17 étant souvent activée par des ROS et par les TLR, il est tout à fait possible d'envisager que ADAM17 réduise l'activité de MerTK lors de la séquence d'I/R rénale chez les rats RCS^{+/+}.

En conclusion, notre travail met en évidence l'absence d'effets protecteurs de MerTK à la suite d'une I/R rénale chez le rat RCS et ceci en absence de toute stimulation exogène par le ligand. Ces travaux ouvrent les perspectives vers de nouvelles études qui utiliseraient cette fois de la protéine S exogène lors des séquences d'ischémie reperfusion rénale afin de s'assurer de l'activation des récepteurs MerTK, et étudier ainsi l'impact de cette activation sur la physiopathologie de l'ischémie reperfusion rénale.

Notre étude nous a, par ailleurs, permis de mettre au point un modèle d'I/R rénale viable pour la souche des rats RCS mais aussi de mettre au point un protocole pour la détection et la quantification des microparticules d'origines plaquettaire, endothéliale et leucocytaire (PMPs, EMPs, et LMPs) et qui pourrait être utilisé pour l'évaluation de ces microparticules et leur utilisation en tant que biomarqueurs de l'I/R rénale.

BIBLIOGRAPHIE

[1] J. E. Murray, J. P. Merrill, et J. H. Harrison, « RENAL HOMOTRANSPLANTATION IN IDENTICAL TWINS », *J. Am. Soc. Nephrol.*, p. 4.

[2] « Transplantation rénale : élargissement des critères de sélection des donneurs ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/92/?sequence=16> [Consulté le: 08-oct-2019].

[3] S. Teraoka *et al.*, « Outcomes of kidney transplants from non-heart-beating deceased donors as reported to the Japan Organ Transplant Network from April 1995-December 2003: a multi-center report », *Clin. Transpl.*, p. 91-102, 2004.

[4] C. González-Segura *et al.*, « A good alternative to reduce the kidney shortage: kidneys from nonheartbeating donors », *Transplantation*, vol. 65, n° 11, p. 1465-1470, juin 1998.

[5] M. Takasato et M. H. Little, « The origin of the mammalian kidney: implications for recreating the kidney *in vitro* », *Development*, vol. 142, n° 11, p. 1937-1947, juin 2015.

[6] V. Gueutin, G. Deray, C. Isnard-Bagnis, et N. Janus, « Renal physiology », *J Pharm Clin*, 2011.

[7] « Le système urinaire ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.isto.ucl.ac.be/safe/urinair1.htm>. [Consulté le: 06-août-2019].

[8] J. F. Bertram, R. N. Douglas-Denton, B. Diouf, M. D. Hughson, et W. E. Hoy, « Human nephron number: implications for health and disease », *Pediatr. Nephrol.*, vol. 26, n° 9, p. 1529-1533, sept. 2011.

[9] M. F. Schreuder, « Glomerular Number and Function Are Influenced by Spontaneous and Induced Low Birth Weight in Rats », *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 16, n° 10, p. 2913-2919, août 2005.

[10] M. Zimanyi, J. Bertram, et J. Black, « Nephron number and blood pressure in rat offspring with maternal high-protein diet », *Pediatr. Nephrol.*, vol. 17, n° 12, p. 1000-1004, déc. 2002.

[11] L. Larsson, A. Aperia, et P. Wilton, « Effect of normal development on compensatory renal growth11Dedicated to our teacher in pediatrics, Prof. Rolf Zetterström, on his 60th anniversary », *Kidney Int.*, vol. 18, n° 1, p. 29-35, juill. 1980.

[12] K. E. White, « Research into the structure of the kidney glomerulus – making it count », *Micron*, vol. 43, n° 10, p. 1001-1009, oct. 2012.

[13] M. Zeisberg et R. Kalluri, « Physiology of the Renal Interstitium », *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 10, n° 10, p. 1831-1840, oct. 2015.

[14] M. P. Mohning *et al.*, « Phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages during acute lung injury requires MerTK », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 314, n° 1, p. L69-L82, janv. 2018.

- [15] G. Bianchi, U. Fox, G. F. D. Francesco, A. M. Giovanetti, et D. Pagetti, « Blood Pressure Changes Produced by Kidney Cross-Transplantation between Spontaneously Hypertensive Rats and Normotensive Rats », *Clin. Sci.*, vol. 47, n° 5, p. 435-448, nov. 1974.
- [16] O. Patschan, B. Kuttler, U. Heemann, A. Uber, et R. Rettig, « Kidneys from normotensive donors lower blood pressure in young transplanted spontaneously hypertensive rats », *Am. J. Physiol.*, vol. 273, n° 1 Pt 2, p. R175-180, juill. 1997.
- [17] M.-H. Canu, V. Bérézowski, P. Duriez, C. Langlet, P. Mariot, et O. Pétrault, *Physiologie humaine - Tout le cours en fiches*, Dunod. 2016.
- [18] H. M. Wadei et S. C. Textor, « The role of the kidney in regulating arterial blood pressure », *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 8, n° 10, p. 602-609, oct. 2012.
- [19] J. Perucca, « Rein, vasopressine et pression artérielle: importance de la concentration de l'urine et du rythme nyctéméral d'excrétion d'eau et de sodium », p. 219.
- [20] F. Favreau, S. Giraud, D. Bon, N. Chatauret, R. Thuillier, et T. Hauet, « L'ischémie reperfusion - Acteur essentiel du devenir du greffon rénal », *médecine/sciences*, vol. 29, n° 2, p. 183-188, févr. 2013.
- [21] Netgen, « Biomarqueurs dans l'insuffisance rénale aiguë », *Revue Médicale Suisse*. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2011/RMS-284/Biomarqueurs-dans-l-insuffisance-renale-aigue>. [Consulté le: 09-août-2019].
- [22] H. Peng, Y. Mao, X. Fu, Z. Feng, et J. Xu, « Comparison of biomarkers in rat renal ischemia-reperfusion injury », *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 8, n° 5, p. 7577-7584, mai 2015.
- [23] E. Melgarejo, M. A. Medina, F. Sánchez-Jiménez, et J. L. Urdiales, « Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 41, n° 5, p. 998-1001, mai 2009.
- [24] G. H. Tesch, « MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy », *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 294, n° 4, p. F697-701, avr. 2008.
- [25] J. Mishra *et al.*, « Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 14, n° 10, p. 2534-2543, oct. 2003.
- [26] T. L. Nickolas *et al.*, « Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury », *Ann. Intern. Med.*, vol. 148, n° 11, p. 810-819, juin 2008.

- [27] E. Masson, « Ischémie reperfusion en transplantation rénale », *EM-Consulte*. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/1209028/ischemie-reperfusion-en-transplantation-renale>. [Consulté le: 01-août-2019].
- [28] A. Djamali, « Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allografts », *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 293, n° 2, p. F445-455, août 2007.
- [29] W. C. Hooper, « The relationship between inflammation and the anticoagulant pathway: the emerging role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) », *Curr. Pharm. Des.*, vol. 10, n° 8, p. 923-927, 2004.
- [30] K. J. Kelly, « P53 Mediates the Apoptotic Response to GTP Depletion after Renal Ischemia-Reperfusion: Protective Role of a p53 Inhibitor », *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 14, n° 1, p. 128-138, janv. 2003.
- [31] S. Elmore, « Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death », *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, n° 4, p. 495-516, juin 2007.
- [32] R. W. Y. Hung et A. W. Chow, « Dissecting the “end game”: clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assessment of apoptosis », *Clin Invest Med*, vol. 27, n° 6, p. 22, 2004.
- [33] A. Havasi et S. C. Borkan, « Apoptosis and acute kidney injury », *Kidney Int.*, vol. 80, n° 1, p. 29-40, juill. 2011.
- [34] K. J. Kelly, Z. Plotkin, et P. C. Dagher, « Guanosine supplementation reduces apoptosis and protects renal function in the setting of ischemic injury », *J. Clin. Invest.*, vol. 108, n° 9, p. 1291-1298, nov. 2001.
- [35] C.-T. Chien *et al.*, « Adenovirus-mediated bcl-2 gene transfer inhibits renal ischemia/reperfusion induced tubular oxidative stress and apoptosis », *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.*, vol. 5, n° 6, p. 1194-1203, juin 2005.
- [36] M. N. Munkonda *et al.*, « Podocyte-derived microparticles promote proximal tubule fibrotic signaling via p38 MAPK and CD36 », *J. Extracell. Vesicles*, vol. 7, n° 1, févr. 2018.
- [37] G. Wiegele, M. Brandis, et L. B. Zimmerhackl, « Apoptosis and necrosis during ischaemia in renal tubular cells (LLC-PK1 and MDCK) », *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.*, vol. 13, n° 5, p. 1158-1167, mai 1998.
- [38] A. Pefanis, F. L. Ierino, J. M. Murphy, et P. J. Cowan, « Regulated necrosis in kidney ischemia-reperfusion injury », *Kidney Int.*, vol. 96, n° 2, p. 291-301, août 2019.
- [39] H. K. Eltzschig et T. Eckle, « Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation », *Nat. Med.*, vol. 17, n° 11, nov. 2011.

- [40] J. V. Bonventre et A. Zuk, « Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? », *Kidney Int.*, vol. 66, n° 2, p. 480-485, août 2004.
- [41] C. Kurts, U. Panzer, H.-J. Anders, et A. J. Rees, « The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, n° 10, p. 738-753, oct. 2013.
- [42] G. Ramesh et W. B. Reeves, « Inflammatory cytokines in acute renal failure », *Kidney Int.*, vol. 66, p. S56-S61, oct. 2004.
- [43] M. L. Kielar *et al.*, « Maladaptive Role of IL-6 in Ischemic Acute Renal Failure », *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 16, n° 11, p. 3315-3325, nov. 2005.
- [44] E. M. Simmons *et al.*, « Plasma cytokine levels predict mortality in patients with acute renal failure », *Kidney Int.*, vol. 65, n° 4, p. 1357-1365, avr. 2004.
- [45] J. Chen *et al.*, « Early interleukin 6 production by leukocytes during ischemic acute kidney injury is regulated by TLR4 », *Kidney Int.*, vol. 80, n° 5, p. 504-515, sept. 2011.
- [46] J. C. Leemans *et al.*, « Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney », *J. Clin. Invest.*, vol. 115, n° 10, p. 2894-2903, oct. 2005.
- [47] Y. Opsha et A. Brophy, « Chapter 33 - Blood, Blood Components, Plasma, and Plasma Products », in *Side Effects of Drugs Annual*, vol. 37, S. D. Ray, Éd. Elsevier, 2015, p. 403-418.
- [48] Š. Škrajnar, M. A. Lasnik, et A. B. Zavec, « A Flow Cytometric Method for Determination of the Blood Neutrophil Fraction in Rats », *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS*, vol. 48, n° 2, p. 152-156, mars 2009.
- [49] K. P. Kumar, A. J. Nicholls, et C. H. Y. Wong, « Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease », *Cell Tissue Res.*, vol. 371, n° 3, p. 551, 2018.
- [50] S. Bolisetty et A. Agarwal, « Neutrophils in acute kidney injury: not neutral any more », *Kidney Int.*, vol. 75, n° 7, p. 674-676, avr. 2009.
- [51] A. S. Awad *et al.*, « Compartmentalization of neutrophils in the kidney and lung following acute ischemic kidney injury », *Kidney Int.*, vol. 75, n° 7, p. 689-698, avr. 2009.
- [52] V. Brinkmann et A. Zychlinsky, « Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? », *J. Cell Biol.*, vol. 198, n° 5, p. 773-783, sept. 2012.
- [53] V. Granger, L. de Chaisemartin, et S. Chollet-Martin, « La pêche miraculeuse des filets du neutrophile », *médecine/sciences*, vol. 30, n° 5, p. 544-549, mai 2014.

- [54] D. Nakazawa *et al.*, « Histones and Neutrophil Extracellular Traps Enhance Tubular Necrosis and Remote Organ Injury in Ischemic AKI », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 28, n° 6, p. 1753-1768, juin 2017.
- [55] W. M. Raup-Konsavage, Y. Wang, W. W. Wang, D. Feliars, H. Ruan, et W. B. Reeves, « Neutrophil peptidyl arginine deiminase-4 has a pivotal role in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury », *Kidney Int.*, vol. 93, n° 2, p. 365-374, 2018.
- [56] A. Ham *et al.*, « Peptidyl arginine deiminase-4 activation exacerbates kidney ischemia-reperfusion injury », *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 307, n° 9, p. F1052-1062, nov. 2014.
- [57] M. Rabadi, M. Kim, V. D'Agati, et H. T. Lee, « Peptidyl arginine deiminase-4-deficient mice are protected against kidney and liver injury after renal ischemia and reperfusion », *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 311, n° 2, p. F437-449, 01 2016.
- [58] J. Liu et Z. Dong, « Neutrophil extracellular traps in ischemic AKI: new way to kill », *Kidney Int.*, vol. 93, n° 2, p. 303-305, 2018.
- [59] S. C. Huen et L. G. Cantley, « Macrophages in Renal Injury and Repair », *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 79, p. 449-469, 10 2017.
- [60] D. A. D. Munro et J. Hughes, « The Origins and Functions of Tissue-Resident Macrophages in Kidney Development », *Front. Physiol.*, vol. 8, oct. 2017.
- [61] S. C. Huen et L. G. Cantley, « Macrophage-mediated injury and repair after ischemic kidney injury », *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.*, vol. 30, n° 2, p. 199-209, févr. 2015.
- [62] L. Li *et al.*, « The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury », *Kidney Int.*, vol. 74, n° 12, p. 1526-1537, déc. 2008.
- [63] K. Furuichi *et al.*, « CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 14, n° 10, p. 2503-2515, oct. 2003.
- [64] I. Rauch, M. Müller, et T. Decker, « The regulation of inflammation by interferons and their STATs », *JAK-STAT*, vol. 2, n° 1, p. e23820, janv. 2013.
- [65] P. Pacher, J. S. Beckman, et L. Liaudet, « Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease », *Physiol. Rev.*, vol. 87, n° 1, p. 315-424, janv. 2007.
- [66] X. Zhang et D. M. Mosser, « Macrophage activation by endogenous danger signals », *J. Pathol.*, vol. 214, n° 2, p. 161-178, janv. 2008.
- [67] T. Lawrence et G. Natoli, « Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, n° 11, p. 750-761, oct. 2011.

[68] V. A. Fadok, D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott, et P. M. Henson, « Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF », *J. Clin. Invest.*, vol. 101, n° 4, p. 890-898, févr. 1998.

[69] A. A. Filardy *et al.*, « Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 185, n° 4, p. 2044-2050, août 2010.

[70] S. Lee *et al.*, « Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 22, n° 2, p. 317-326, févr. 2011.

[71] S. Lassen, M. Lech, C. Römmele, H.-W. Mittrüecker, T. W. Mak, et H.-J. Anders, « Ischemia reperfusion induces IFN regulatory factor 4 in renal dendritic cells, which suppresses postischemic inflammation and prevents acute renal failure », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 185, n° 3, p. 1976-1983, août 2010.

[72] T. A. Sutton *et al.*, « p53 is renoprotective after ischemic kidney injury by reducing inflammation », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 24, n° 1, p. 113-124, janv. 2013.

[73] D. A. Chistiakov, V. A. Myasoedova, V. V. Revin, A. N. Orekhov, et Y. V. Bobryshev, « The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2 », *Immunobiology*, vol. 223, n° 1, p. 101-111, 2018.

[74] F. O. Martinez, L. Helming, et S. Gordon, « Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, p. 451-483, 2009.

[75] D. Burger, S. C. Schock, C. S. Thompson, A. C. Montezano, A. M. Hakim, et R. M. Touyz, « Microparticles: biomarkers and beyond. », *Clin. Sci.*, vol. 124, n° 7, p. 423-441, 2013.

[76] F. Dignat-George et C. M. Boulanger, « The many faces of endothelial microparticles », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, n° 1, p. 27-33, janv. 2011.

[77] O. Rubin, G. Canellini, J. Delobel, N. Lion, et J.-D. Tissot, « Red blood cell microparticles: clinical relevance », *Transfus. Med. Hemotherapy Off. Organ Dtsch. Ges. Transfusionsmedizin Immunhamatologie*, vol. 39, n° 5, p. 342-347, oct. 2012.

[78] S. Cauwenberghs, M. A. H. Feijge, A. G. S. Harper, S. O. Sage, J. Curvers, et J. W. M. Heemskerk, « Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton », *FEBS Lett.*, vol. 580, n° 22, p. 5313-5320, oct. 2006.

[79] D. Burger, A. C. Montezano, N. Nishigaki, Y. He, A. Carter, et R. M. Touyz, « Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/

Rho kinase pathways targeted to lipid rafts », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, n° 8, p. 1898-1907, août 2011.

[80] F. Shamekhi Amiri, « Microparticles in kidney diseases: focus on kidney transplantation », *Ren. Replace. Ther.*, vol. 3, n° 1, déc. 2017.

[81] D. E. Connor, T. Exner, D. D. F. Ma, et J. E. Joseph, « The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib », *Thromb. Haemost.*, vol. 103, n° 5, p. 1044-1052, mai 2010.

[82] N. S. Barteneva *et al.*, « Circulating microparticles: square the circle », *BMC Cell Biol.*, vol. 14, p. 23, avr. 2013.

[83] K. Osumi *et al.*, « Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet-derived microparticles », *Thromb. Haemost.*, vol. 85, n° 2, p. 326-330, févr. 2001.

[84] B. R. Lentz, « Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation », *Prog. Lipid Res.*, vol. 42, n° 5, p. 423-438, sept. 2003.

[85] A. P. Owens et N. Mackman, « Microparticles in hemostasis and thrombosis », *Circ. Res.*, vol. 108, n° 10, p. 1284-1297, mai 2011.

[86] A. S. Shet *et al.*, « Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes », *Blood*, vol. 102, n° 7, p. 2678-2683, oct. 2003.

[87] R. S. Kasthuri *et al.*, « PF4/heparin-antibody complex induces monocyte tissue factor expression and release of tissue factor positive microparticles by activation of FcγRI », *Blood*, vol. 119, n° 22, p. 5285-5293, mai 2012.

[88] E. I. Sinauridze *et al.*, « Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets », *Thromb. Haemost.*, vol. 97, n° 3, p. 425-434, mars 2007.

[89] S. V. Brodsky, F. Zhang, A. Nasjletti, et M. S. Goligorsky, « Endothelium-derived microparticles impair endothelial function *in vitro* », *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 286, n° 5, p. H1910-1915, mai 2004.

[90] P. Horn *et al.*, « Circulating Microparticles Carry a Functional Endothelial Nitric Oxide Synthase That Is Decreased in Patients With Endothelial Dysfunction », *J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.*, vol. 2, n° 1, févr. 2013.

- [91] A. M. Mahmoud *et al.*, « Endothelial microparticles prevent lipid-induced endothelial damage via Akt/eNOS signaling and reduced oxidative stress », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 31, n° 10, p. 4636-4648, 2017.
- [92] A. Agouni *et al.*, « Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 21, n° 11, p. 2735-2741, sept. 2007.
- [93] M. L. Mastronardi, H. A. Mostefai, R. Soleti, A. Agouni, M. C. Martínez, et R. Andriantsitohaina, « Microparticles from apoptotic monocytes enhance nitrosative stress in human endothelial cells », *Fundam. Clin. Pharmacol.*, vol. 25, n° 6, p. 653-660, déc. 2011.
- [94] M. Mesri et D. C. Altieri, « Leukocyte Microparticles Stimulate Endothelial Cell Cytokine Release and Tissue Factor Induction in a JNK1 Signaling Pathway », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 33, p. 23111-23118, août 1999.
- [95] A. Scanu, N. Molnarfi, K. J. Brandt, L. Gruaz, J.-M. Dayer, et D. Burger, « Stimulated T cells generate microparticles, which mimic cellular contact activation of human monocytes: differential regulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production by high-density lipoproteins », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 83, n° 4, p. 921-927, 2008.
- [96] C. Cerri, D. Chimenti, I. Conti, T. Neri, P. Paggiaro, et A. Celi, « Monocyte/Macrophage-Derived Microparticles Up-Regulate Inflammatory Mediator Synthesis by Human Airway Epithelial Cells », *J. Immunol.*, vol. 177, n° 3, p. 1975-1980, août 2006.
- [97] J. Eyre, J. O. Burton, M. A. Saleem, P. W. Mathieson, P. S. Topham, et N. J. Brunskill, « Monocyte- and Endothelial-Derived Microparticles Induce an Inflammatory Phenotype in Human Podocytes », *Nephron Exp. Nephrol.*, vol. 119, n° 3, p. e58-e66, 2011.
- [98] J.-G. Wang *et al.*, « Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1 β -dependent manner », *Blood*, vol. 118, n° 8, p. 2366-2374, août 2011.
- [99] Y. Berda-Haddad *et al.*, « Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1 α », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, n° 51, p. 20684-20689, déc. 2011.
- [100] K. E. Happonen *et al.*, « The Gas6-Axl Protein Interaction Mediates Endothelial Uptake of Platelet Microparticles », *J. Biol. Chem.*, vol. 291, n° 20, p. 10586-10601, mai 2016.
- [101] W. Jy *et al.*, « Endothelial microparticles (EMP) bind and activate monocytes: elevated EMP-monocyte conjugates in multiple sclerosis », *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, vol. 9, p. 3137-3144, sept. 2004.

[102] O. P. Barry, D. Praticò, R. C. Savani, et G. A. FitzGerald, « Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. », *J. Clin. Invest.*, vol. 102, n° 1, p. 136-144, juill. 1998.

[103] K. L. Buesing *et al.*, « Endothelial microparticles induce inflammation in acute lung injury », *J. Surg. Res.*, vol. 166, n° 1, p. 32-39, mars 2011.

[104] J. C. Densmore *et al.*, « Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury », *Shock Augusta Ga*, vol. 26, n° 5, p. 464-471, nov. 2006.

[105] M. L. Mastronardi, H. A. Mostefai, F. Meziani, M. C. Martínez, P. Asfar, et R. Andriantsitohaina, « Circulating microparticles from septic shock patients exert differential tissue expression of enzymes related to inflammation and oxidative stress », *Crit. Care Med.*, vol. 39, n° 7, p. 1739-1748, juill. 2011.

[106] H. K. Kim, K. S. Song, J.-H. Chung, K. R. Lee, et S.-N. Lee, « Platelet microparticles induce angiogenesis *in vitro* », *Br. J. Haematol.*, vol. 124, n° 3, p. 376-384, 2004.

[107] A. Brill, O. Dashevsky, J. Rivo, Y. Gozal, et D. Varon, « Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization », *Cardiovasc. Res.*, vol. 67, n° 1, p. 30-38, juill. 2005.

[108] M. N. A. Hussein, R. Nieuwland, C. M. Hau, L. M. Evers, E. W. Meesters, et A. Sturk, « Cell-derived microparticles contain caspase 3 *in vitro* and *in vivo* », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 3, n° 5, p. 888-896, 2005.

[109] M. Canault *et al.*, « Microparticles of Human Atherosclerotic Plaques Enhance the Shedding of the Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme/ADAM17 Substrates, Tumor Necrosis Factor and Tumor Necrosis Factor Receptor-1 », *Am. J. Pathol.*, vol. 171, n° 5, p. 1713-1723, nov. 2007.

[110] C. M. Freeman *et al.*, « Characterization of microparticles after hepatic ischemia-reperfusion injury », *PloS One*, vol. 9, n° 5, p. e97945, 2014.

[111] V. Faure *et al.*, « Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 4, n° 3, p. 566-573, mars 2006.

[112] Y. Zhang *et al.*, « Platelet Microparticles Mediate Glomerular Endothelial Injury in Early Diabetic Nephropathy », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 29, n° 11, p. 2671-2695, 2018.

[113] J. H. W. Distler *et al.*, « The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages », *Apoptosis*, vol. 10, n° 4, p. 731-741, août 2005.

[114] A. D. Terrisse *et al.*, « Internalization of microparticles by endothelial cells promotes platelet/endothelial cell interaction under flow », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 8, n° 12, p. 2810-2819, 2010.

[115] S. K. Dasgupta *et al.*, « Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles », *Blood*, vol. 113, n° 6, p. 1332-1339, févr. 2009.

[116] R. G. Di Scipio, M. A. Hermodson, S. G. Yates, et E. W. Davie, « A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S », *Biochemistry*, vol. 16, n° 4, p. 698-706, févr. 1977.

[117] B. Dahlbäck, « Vitamin K-Dependent Protein S: Beyond the Protein C Pathway », *Semin. Thromb. Hemost.*, sept. 2017.

[118] B. Dahlbäck, B. Frohm, et G. Nelsestuen, « High affinity interaction between C4b-binding protein and vitamin K-dependent protein S in the presence of calcium. Suggestion of a third component in blood regulating the interaction », *J. Biol. Chem.*, vol. 265, n° 27, p. 16082-16087, sept. 1990.

[119] L. Suleiman, C. Négrier, et H. Boukerche, « Protein S: A multifunctional anticoagulant vitamin K-dependent protein at the crossroads of coagulation, inflammation, angiogenesis, and cancer », *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 88, n° 3, p. 637-654, déc. 2013.

[120] R. Wallin et S. M. Hutson, « Warfarin and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system », *Trends Mol. Med.*, vol. 10, n° 7, p. 299-302, juill. 2004.

[121] B. Furie, B. A. Bouchard, et B. C. Furie, « Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid », *Blood*, vol. 93, n° 6, p. 1798-1808, mars 1999.

[122] O. Benzakour, A. Gely, R. Lara, et V. Coronas, « Fonctions nouvelles de Gas-6 et de la protéine S - Facteurs vitamine K-dépendants et ligands des récepteurs tyrosine kinase de la famille TAM », *médecine/sciences*, vol. 23, n° 10, p. 826-833, oct. 2007.

[123] B. Dahlbäck, « C4b-binding protein: a forgotten factor in thrombosis and hemostasis », *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 37, n° 4, p. 355-361, juin 2011.

[124] B. Dahlbäck, C. A. Smith, et H. J. Müller-Eberhard, « Visualization of human C4b-binding protein and its complexes with vitamin K-dependent protein S and complement protein C4b », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 80, n° 11, p. 3461-3465, juin 1983.

[125] J. H. Griffin, A. Gruber, et J. A. Fernández, « Reevaluation of total, free, and bound protein S and C4b-binding protein levels in plasma anticoagulated with citrate or hirudin », *Blood*, vol. 79, n° 12, p. 3203-3211, juin 1992.

[126] G. Manfioletti, C. Brancolini, G. Avanzi, et C. E. Schneider, « The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 13, n° 8, p. 4976-4985, 1993.

[127] I. Balogh, S. Hafizi, J. Stenhoff, K. Hansson, et B. Dahlbäck, « Analysis of Gas6 in human platelets and plasma », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, n° 6, p. 1280-1286, juin 2005.

[128] J. H. Griffin, B. V. Zlokovic, et L. O. Mosnier, « Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways », *Int. J. Hematol.*, vol. 95, n° 4, p. 333-345, avr. 2012.

[129] B. Dahlbäck, « Blood coagulation », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 355, n° 9215, p. 1627-1632, mai 2000.

[130] M. J. Heeb, R. M. Mesters, J. A. Fernández, T. M. Hackeng, R. K. Nakasone, et J. H. Griffin, « Plasma protein S residues 37-50 mediate its binding to factor Va and inhibition of blood coagulation », *Thromb. Haemost.*, vol. 110, n° 2, p. 275-282, août 2013.

[131] T. Sugo, B. Dahlbäck, A. Holmgren, et J. Stenflo, « Calcium binding of bovine protein S. Effect of thrombin cleavage and removal of the gamma-carboxyglutamic acid-containing region », *J. Biol. Chem.*, vol. 261, n° 11, p. 5116-5120, avr. 1986.

[132] B. Mille-Baker, S. M. Rezende, R. E. Simmonds, P. J. Mason, D. A. Lane, et M. A. Laffan, « Deletion or replacement of the second EGF-like domain of protein S results in loss of APC cofactor activity », *Blood*, vol. 101, n° 4, p. 1416-1418, févr. 2003.

[133] P. Nyberg, B. Dahlbäck, et P. García de Frutos, « The SHBG-like region of protein S is crucial for factor V-dependent APC-cofactor function », *FEBS Lett.*, vol. 433, n° 1-2, p. 28-32, août 1998.

[134] M. J. Heeb, D. Prashun, J. H. Griffin, et B. N. Bouma, « Plasma protein S contains zinc essential for efficient activated protein C-independent anticoagulant activity and binding to factor Xa, but not for efficient binding to tissue factor pathway inhibitor », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 23, n° 7, p. 2244-2253, juill. 2009.

[135] R. Chattopadhyay, T. Sengupta, et R. Majumder, « Inhibition of intrinsic Xase by protein S: a novel regulatory role of protein S independent of activated protein C », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 32, n° 10, p. 2387-2393, oct. 2012.

[136] A. Gupta, A. M. Tun, et F. Tuma, *Protein S Deficiency*. StatPearls Publishing, 2019.

[137] T. Burstyn-Cohen, M. J. Heeb, et G. Lemke, « Lack of protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis », *J. Clin. Invest.*, vol. 119, n° 10, p. 2942-2953, oct. 2009.

[138] F. Banno *et al.*, « Exacerbated venous thromboembolism in mice carrying a protein S K196E mutation », *Blood*, vol. 126, n° 19, p. 2247-2253, nov. 2015.

[139] C. Parinot, « Etude des mécanismes extracellulaires régulant la fonction du récepteur MerTK au cours de la phagocytose rétinienne », p. 184.

[140] R. M. A. Linger, A. K. Keating, H. S. Earp, et D. K. Graham, « TAM Receptor Tyrosine Kinases: Biologic Functions, Signaling, and Potential Therapeutic Targeting in Human Cancer », in *Advances in Cancer Research*, vol. 100, Elsevier, 2008, p. 35-83.

[141] H. Uehara et E. Shacter, « Auto-oxidation and oligomerization of protein S on the apoptotic cell surface is required for Mer tyrosine kinase-mediated phagocytosis of apoptotic cells », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 180, n° 4, p. 2522-2530, févr. 2008.

[142] L. Ling, D. Templeton, et H. J. Kung, « Identification of the major autophosphorylation sites of Nyk/Mer, an NCAM-related receptor tyrosine kinase », *J. Biol. Chem.*, vol. 271, n° 31, p. 18355-18362, août 1996.

[143] G. Lemke, « Biology of the TAM Receptors », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, n° 11, p. a009076-a009076, nov. 2013.

[144] J. H. M. van der Meer, T. van der Poll, et C. van 't Veer, « TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis », *Blood*, vol. 123, n° 16, p. 2460-2469, avr. 2014.

[145] G. Lemke et Q. Lu, « Macrophage regulation by Tyro 3 family receptors », *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 15, n° 1, p. 31-36, févr. 2003.

[146] Q. Lu et G. Lemke, « Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family », *Science*, vol. 293, n° 5528, p. 306-311, juill. 2001.

[147] Q. Lu *et al.*, « Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis », *Nature*, vol. 398, n° 6729, p. 723-728, avr. 1999.

[148] A. Angelillo-Scherrer *et al.*, « Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy », *J. Clin. Invest.*, vol. 115, n° 2, p. 237-246, févr. 2005.

[149] F. J. Walker, « Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S », *J. Biol. Chem.*, vol. 255, n° 12, p. 5521-5524, juin 1980.

[150] M. J. Heeb, R. M. Mesters, G. Tans, J. Rosing, et J. H. Griffin, « Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C », *J. Biol. Chem.*, vol. 268, n° 4, p. 2872-2877, févr. 1993.

[151] L. A. Law, D. K. Graham, J. Di Paola, et B. R. Branchford, « GAS6/TAM Pathway Signaling in Hemostasis and Thrombosis », *Front. Med.*, vol. 5, p. 137, 2018.

[152] R. van Furth, Z. A. Cohn, J. G. Hirsch, J. H. Humphrey, W. G. Spector, et H. L. Langevoort, « The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells* », *Bull. World Health Organ.*, vol. 46, n° 6, p. 845-852, 1972.

[153] S. Arandjelovic et K. S. Ravichandran, « Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis », *Nat. Immunol.*, vol. 16, n° 9, p. 907-917, sept. 2015.

[154] W. Wood *et al.*, « Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos », *Dev. Camb. Engl.*, vol. 127, n° 24, p. 5245-5252, déc. 2000.

[155] M. M. LaVail, « Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting », *Science*, vol. 194, n° 4269, p. 1071-1074, déc. 1976.

[156] M. R. Elliott *et al.*, « Unexpected requirement for ELMO1 in clearance of apoptotic germ cells *in vivo* », *Nature*, vol. 467, n° 7313, p. 333-337, sept. 2010.

[157] K. Lauber, S. G. Blumenthal, M. Waibel, et S. Wesselborg, « Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses », *Mol. Cell*, vol. 14, n° 3, p. 277-287, mai 2004.

[158] « Phosphatidylsérine », *Wikipédia*. 18-juill-2019.

[159] pubmeddev et S. K. and N. S, « An Apoptotic “Eat Me” Signal: Phosphatidylserine Exposure. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/26437594>. [Consulté le: 27-sept-2019].

[160] J. L. Duncan *et al.*, « An RCS-like retinal dystrophy phenotype in mer knockout mice », *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 44, n° 2, p. 826-838, févr. 2003.

[161] C. V. Rothlin, S. Ghosh, E. I. Zuniga, M. B. A. Oldstone, et G. Lemke, « TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response », *Cell*, vol. 131, n° 6, p. 1124-1136, déc. 2007.

[162] C. Nishi, S. Toda, K. Segawa, et S. Nagata, « Tim4- and MerTK-Mediated Engulfment of Apoptotic Cells by Mouse Resident Peritoneal Macrophages », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 34, n° 8, p. 1512-1520, avr. 2014.

[163] H. M. Seitz, T. D. Camenisch, G. Lemke, H. S. Earp, et G. K. Matsushima, « Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 178, n° 9, p. 5635-5642, mai 2007.

[164] Y. Zhen, S. O. Priest, et W.-H. Shao, « Opposing Roles of Tyrosine Kinase Receptors Mer and Axl Determine Clinical Outcomes in Experimental Immune-Mediated Nephritis », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 197, n° 6, p. 2187-2194, 15 2016.

[165] I. Dransfield, A. Zagórska, E. D. Lew, K. Michail, et G. Lemke, « Mer receptor tyrosine kinase mediates both tethering and phagocytosis of apoptotic cells », *Cell Death Dis.*, vol. 6, n° 2, p. e1646-e1646, févr. 2015.

[166] S. A. Freeman et S. Grinstein, « Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton », *Immunol. Rev.*, vol. 262, n° 1, p. 193-215, nov. 2014.

[167] V. Marshansky et M. Futai, « The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 20, n° 4, p. 415-426, août 2008.

[168] C. Rosales et E. Uribe-Querol, « Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity », *BioMed Res. Int.*, vol. 2017, 2017.

[169] P. L. Cohen *et al.*, « Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase », *J. Exp. Med.*, vol. 196, n° 1, p. 135-140, juill. 2002.

[170] W.-H. Shao *et al.*, « A Protective Role of Mer Receptor Tyrosine Kinase in Nephrotoxic Serum-induced Nephritis », *Clin. Immunol. Orlando Fla*, vol. 136, n° 2, p. 236-244, août 2010.

[171] T. D. Camenisch, B. H. Koller, H. S. Earp, et G. K. Matsushima, « A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF-alpha production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 162, n° 6, p. 3498-3503, mars 1999.

[172] P. Sen *et al.*, « Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NF-kappaB activation in dendritic cells », *Blood*, vol. 109, n° 2, p. 653-660, janv. 2007.

[173] B. Zhang, L. Fang, H.-M. Wu, P.-S. Ding, K. Xu, et R.-Y. Liu, « Mer receptor tyrosine kinase negatively regulates lipoteichoic acid-induced inflammatory response via PI3K/Akt and SOCS3 », *Mol. Immunol.*, vol. 76, p. 98-107, 2016.

[174] Y.-J. Lee *et al.*, « Inhibiting Mer receptor tyrosine kinase suppresses STAT1, SOCS1/3, and NF-κB activation and enhances inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced acute lung injury », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 91, n° 6, p. 921-932, 2012.

[175] A. Yoshimura, T. Naka, et M. Kubo, « SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, n° 6, p. 454-465, juin 2007.

[176] Y. Zhen, F. D. Finkelman, et W.-H. Shao, « Mechanism of Mer receptor tyrosine kinase inhibition of glomerular endothelial cell inflammation », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 103, n° 4, p. 709-717, avr. 2018.

[177] M. Yanagita *et al.*, « Essential role of Gas6 for glomerular injury in nephrotoxic nephritis », *J. Clin. Invest.*, vol. 110, n° 2, p. 239-246, juill. 2002.

[178] M. Tjwa *et al.*, « Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes », *Blood*, vol. 111, n° 8, p. 4096-4105, avr. 2008.

[179] T. Shibata, D. M. Habel, A. L. Coelho, S. L. Kunkel, N. W. Lukacs, et C. M. Hogaboam, « Axl receptor blockade ameliorates pulmonary pathology resulting from primary viral infection and viral exacerbation of asthma », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 192, n° 8, p. 3569-3581, avr. 2014.

[180] M. Leidi *et al.*, « M2 macrophages phagocytose rituximab-opsonized leukemic targets more efficiently than m1 cells *in vitro* », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 182, n° 7, p. 4415-4422, avr. 2009.

[181] K. V. Myers, S. R. Amend, et K. J. Pienta, « Targeting Tyro3, Axl and MerTK (TAM receptors): implications for macrophages in the tumor microenvironment », *Mol. Cancer*, vol. 18, n° 1, déc. 2019.

[182] P. Ochodnický *et al.*, « Increased Circulating and Urinary Levels of Soluble TAM Receptors in Diabetic Nephropathy », *Am. J. Pathol.*, vol. 187, n° 9, p. 1971-1983, sept. 2017.

[183] P. L. Cohen et W.-H. Shao, « Gas6/TAM Receptors in Systemic Lupus Erythematosus », *Disease Markers*, 2019. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/dm/2019/7838195/>. [Consulté le: 30-sept-2019].

[184] E. Thorp, T. Vaisar, M. Subramanian, L. Mautner, C. Blobel, et I. Tabas, « Shedding of the Mer Tyrosine Kinase Receptor Is Mediated by ADAM17 Protein through a Pathway Involving Reactive Oxygen Species, Protein Kinase Cδ, and p38 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) », *J. Biol. Chem.*, vol. 286, n° 38, p. 33335-33344, sept. 2011.

[185] M. M. LaVail et B. A. Battelle, « Influence of eye pigmentation and light deprivation on inherited retinal dystrophy in the rat », *Exp. Eye Res.*, vol. 21, n° 2, p. 167-192, août 1975.

[186] E. Nandrot *et al.*, « Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis », *Neurobiol. Dis.*, vol. 7, n° 6 Pt B, p. 586-599, déc. 2000.

[187] P. M. D'Cruz *et al.*, « Mutation of the receptor tyrosine kinase gene MERTK in the retinal dystrophic RCS rat », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 9, n° 4, p. 645-651, mars 2000.

[188] C. Parinot et E. F. Nandrot, « A Comprehensive Review of Mutations in the MERTK Proto-Oncogene », *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 854, p. 259-265, 2016.

[189] R. B. Edwards et R. B. Szamier, « Defective phagocytosis of isolated rod outer segments by RCS rat retinal pigment epithelium in culture », *Science*, vol. 197, n° 4307, p. 1001-1003, sept. 1977.

[190] N. V. Custer et D. Bok, « Pigment epithelium-photoreceptor interactions in the normal and dystrophic rat retina », *Exp. Eye Res.*, vol. 21, n° 2, p. 153-166, août 1975.

[191] J. M. Goujon, T. Hauet, E. Menet, P. Levillain, P. Babin, et M. Carretier, « Histological Evaluation of Proximal Tubule Cell Injury in Isolated Perfused Pig Kidneys Exposed to Cold Ischemia », *J. Surg. Res.*, vol. 82, n° 2, p. 228-233, avr. 1999.

[192] W. Feng, D. Yasumura, M. T. Matthes, M. M. LaVail, et D. Vollrath, « Mertk Triggers Uptake of Photoreceptor Outer Segments during Phagocytosis by Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 19, p. 17016-17022, mai 2002.

[193] L. Fan, L. He, Z. Cao, B. Xiang, et L. Liu, « Effect of ischemia preconditioning on renal ischemia/reperfusion injury in rats », *Int. Braz J Urol Off. J. Braz. Soc. Urol.*, vol. 38, n° 6, p. 842-854, déc. 2012.

[194] S.-F. Ko *et al.*, « Severe bilateral ischemic-reperfusion renal injury: hyperacute and acute changes in apparent diffusion coefficient, T1, and T2 mapping with immunohistochemical correlations », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 1-10, mai 2017.

[195] H.-J. Wang, A. Varner, T. AbouShwareb, A. Atala, et J. J. Yoo, « Ischemia/reperfusion-induced renal failure in rats as a model for evaluating cell therapies », *Ren. Fail.*, vol. 34, n° 10, p. 1324-1332, 2012.

[196] H. Kocoglu, H. Ozturk, H. Ozturk, F. Yilmaz, et N. Gulcu, « Effect of dexmedetomidine on ischemia-reperfusion injury in rat kidney: a histopathologic study », *Ren. Fail.*, vol. 31, n° 1, p. 70-74, 2009.

[197] R. A. Zager, A. C. M. Johnson, et K. Becker, « Renal Cortical Lactate Dehydrogenase: A Useful, Accurate, Quantitative Marker of Tubular Injury and Acute Renal Failure », *PLoS One*, vol. 8, n° 6, p. e66776, 2013.

[198] W. K. Han, V. Bailly, R. Abichandani, R. Thadhani, et J. V. Bonventre, « Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury », *Kidney Int.*, vol. 62, n° 1, p. 237-244, juill. 2002.

[199] A. M. Sheridan et J. V. Bonventre, « Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure », *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, vol. 9, n° 4, p. 427-434, juill. 2000.

[200] X. Chen *et al.*, « The administration of erythropoietin attenuates kidney injury induced by ischemia/reperfusion with increased activation of Wnt/ β -catenin signaling », *J. Formos. Med. Assoc.*, vol. 114, n° 5, p. 430-437, mai 2015.

[201] X. Yu, L. Ge, L. Niu, X. Lian, H. Ma, et L. Pang, « The Dual Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Friend or Foe? », *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/8364848/>. [Consulté le: 08-nov-2019].

[202] H. Fatemikia, F. Ketabchi, Z. Karimi, et S. M. S. Moosavi, « Distant effects of unilateral renal ischemia/reperfusion on contralateral kidney but not lung in rats: the roles of ROS and iNOS », *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 94, n° 5, p. 477-487, mai 2016.

[203] I. V. Gorudko *et al.*, « Neutrophil activation in response to monomeric myeloperoxidase », *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.*, vol. 96, n° 5, p. 592-601, 2018.

[204] L. Li et M. D. Okusa, « Macrophages, dendritic cells, and kidney ischemia-reperfusion injury », *Semin. Nephrol.*, vol. 30, n° 3, p. 268-277, mai 2010.

[205] T. Zhou, E. R. Prather, D. E. Garrison, et L. Zuo, « Interplay between ROS and Antioxidants during Ischemia-Reperfusion Injuries in Cardiac and Skeletal Muscle », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, n° 2, janv. 2018.

[206] A. Akcay, Q. Nguyen, et C. L. Edelstein, « Mediators of Inflammation in Acute Kidney Injury », *Mediators Inflamm.*, vol. 2009, 2009.

[207] K. K. Meldrum, D. R. Meldrum, X. Meng, L. Ao, et A. H. Harken, « TNF-alpha-dependent bilateral renal injury is induced by unilateral renal ischemia-reperfusion », *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 282, n° 2, p. H540-546, févr. 2002.

[208] S. Mortaza *et al.*, « Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats », *Crit. Care Med.*, vol. 37, n° 6, p. 2045-2050, juin 2009.

[209] H. Bao *et al.*, « Platelet-derived microparticles promote endothelial cell proliferation in hypertension via miR-142-3p », *FASEB J.*, vol. 32, n° 7, p. 3912-3923, juill. 2018.

[210] N. L. Andrés *et al.*, « Increased Microparticle Production and Impaired Microvascular Endothelial Function in Aldosterone-Salt-Treated Rats: Protective Effects of Polyphenols », *PLOS ONE*, vol. 7, n° 7, p. e39235, juill. 2012.

[211] N. C. Teoh *et al.*, « Microparticles mediate hepatic ischemia-reperfusion injury and are the targets of Diannexin (ASP8597) », *PloS One*, vol. 9, n° 9, p. e104376, 2014.

[212] R. Lacroix *et al.*, « Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 10, n° 3, p. 437-446, mars 2012.

[213] N. D. Barth, J. A. Marwick, M. J. Heeb, A. J. Gale, A. G. Rossi, et I. Dransfield, « Augmentation of Human Monocyte Responses to Lipopolysaccharide by the Protein S and Mer/Tyro3 Receptor Tyrosine Kinase Axis », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 201, n° 9, p. 2602-2611, 01 2018.

Étude des effets potentiels du récepteur MerTK sur le développement des lésions liées à une ischémie/reperfusion rénale chez le rat

Mots clés : Ischémie-reperfusion, MerTK, Microparticules, Inflammation, Phagocytose, rats RCS

L'ischémie reperfusion se caractérise par deux phases distinctes : une cessation puis un retour de l'apport sanguin et peut se produire dans certaines situations pathologiques et lors de la transplantation d'organes. Cette séquence d'évènements peut induire la mort cellulaire, la formation de débris cellulaires et de microparticules. Les corps apoptotiques et les microparticules se caractérisent par l'exposition de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de leur membrane. Les cellules lésées suite à l'ischémie reperfusion entraînent, par le relargage de cytokines/chimiokines, l'activation de l'inflammation et le recrutement de leucocytes, tel que les macrophages. Les macrophages permettent l'élimination par phagocytose des débris cellulaires et des microparticules. Il a été établi précédemment que le récepteur tyrosine kinase MerTK, exprimé par plusieurs types cellulaires dont les macrophages, joue un rôle majeur dans la phagocytose. En effet, l'interaction du récepteur MerTK avec son ligand, la protéine S, permet la formation d'un pont entre le macrophage et les phosphatidylsérines exposées par les corps apoptotiques et les microparticules. MerTK contribue aussi à une régulation négative de l'expression de certaines molécules pro-inflammatoires impliquées dans le recrutement leucocytaire.

L'objectif de notre étude est de caractériser le rôle de MerTK dans le développement des lésions induites par une ischémie reperfusion rénale mais aussi dans la réparation post-ischémique. Nous avons utilisé un modèle de rats RCS (*Royal College of Surgeons*) caractérisés par un MerTK défectueux en raison d'une mutation naturelle dans le gène MerTK. La simulation de l'ischémie reperfusion rénale s'effectue par le clampage de l'artère et de la veine rénale. Le sang et les reins prélevés permettent d'évaluer, via des techniques d'ELISA, de Western Blot et de dosages biochimiques, des marqueurs de la fonction et de lésions rénales, d'inflammation et de recrutement leucocytaire. Les lésions histologiques sur des coupes rénales sont mises en évidence par les colorations HES-PAS, et la localisation ainsi que la quantification du recrutement leucocytaire ont été évaluées par la technique d'immunohistochimie. Nous avons par ailleurs utilisé la technique de cytométrie en flux pour quantifier les microparticules d'origine plaquettaire, endothéliales et leucocytaires dans le plasma. Enfin, nous avons étudié le rôle possible de MerTK dans la phagocytose *in vitro*, par co-incubation de corps apoptotiques avec des monocytes/macrophages, provenant de sang de rats RCS déficients en MerTK ou de rats contrôles exprimant normalement ce récepteur.

Nos travaux ont permis de mettre au point une technique de détection des microparticules par un double marquage, avec un anticorps spécifique de l'origine cellulaire et de l'annexine V, molécule marquant l'ensemble des microparticules en se liant à la phosphatidylsérine. La quantification de ces microparticules montre une augmentation, post-chirurgie, d'origine plaquettaire, endothéliale et leucocytaire. Les dosages de Créatinine, marqueur de la fonction rénale, ainsi que ceux des marqueurs inflammatoires et de lésions histologiques n'ont pas montré de différence significative entre les groupes d'ischémie reperfusion rénaux. Néanmoins, il semblerait que l'infiltrat des macrophages 3 jours après une ischémie reperfusion soit plus important chez les rats RCS par rapport aux rats contrôles. De plus, la phagocytose *in vitro* n'a pas montré de différence significative entre les rats RCS et leur contrôle. Cette étude montre une implication minimale du récepteur MerTK dans le développement et dans la réparation des lésions lors d'une séquence d'ischémie reperfusion rénale. Néanmoins, ce travail a permis de caractériser et de quantifier les microparticules générées suite à une ischémie reperfusion rénale par des techniques qui pourraient être utilisées par la suite dans l'évaluation de biomarqueurs de lésions rénales.

Study of potential effects of the tyrosine kinase receptor MerTK on the development of ischemia/renal perfusion-related lesions in rats

Keys words : Ischemia-reperfusion, MerTK, Microparticles, Inflammation, Phagocytosis, rats RCS

Ischemia reperfusion is characterized by two distinct phases: a cessation then a return of blood supply and may occur in some pathological situations as well as during organ transplantation. This sequence of events can induce cell death, formation of cell debris and microparticles. Apoptotic bodies and microparticles are characterized by the exposure of phosphatidylserine on the outer membrane bilayer. Ischemia reperfusion-induced cell damage lead to the activation of inflammation and to leukocyte recruitment through the release of cytokines/chemokines. Recruited macrophages may phagocyte cellular debris and microparticles. It has previously been established that the MerTK tyrosine kinase receptor, expressed by several cell types including macrophages, plays a major role in the phagocytosis process. The vitamin K-dependent anticoagulant factor Protein S is the MerTK receptor ligand. It binds by its C-terminus to MerTK receptor on the surface of macrophages and by its N-terminus to phosphatidylserins exposed by apoptotic bodies and microparticles bridging thereby the phagocytes (macrophages) to the substrate (phosphatidylserine exposing bodies).

The objective of our study is to characterize the role of MerTK in both the development of lesions induced by renal ischemia reperfusion and in post-ischemic repair. We used a model of RCS (Royal College of Surgeons) rats characterized by a defective MerTK due to a natural mutation in the MerTK gene. Simulation of renal ischemia reperfusion is performed by clamping the artery and renal vein. The blood and kidneys are collected and, using ELISA, Western Blot and biochemical assays, markers of kidney function and lesions, inflammation and leukocyte recruitment are determined. Histological lesions on renal sections are monitored by HES-PAS staining, and the location and quantification of leukocyte recruitment were assessed by immunohistochemistry technique. We also used flow cytometry to quantify microparticles of platelet, endothelial and leukocyte origin in plasma. Finally, we studied the possible role of MerTK in phagocytosis *in vitro*, by co-incubation of apoptotic bodies with monocytes/macrophages, derived from the blood of MerTK-deficient RCS rats or control rats normally expressing this receptor.

Our work has made it possible to develop a technique for detecting microparticles by double labelling, with an antibody specific to cell origin and annexin V, a molecule that marks all microparticles by binding to phosphatidylserine. The quantification of these microparticles shows an increase, post-surgery, of platelet, endothelial and leukocyte origin. The measurements of creatinine, a marker of renal function, as well as those of inflammatory markers and histological lesions did not show significant differences between any of the renal ischemia reperfusion groups. Nevertheless, macrophage infiltration 3 days after ischemia reperfusion seems more important in RCS rats than in control rats. In addition, *in vitro* phagocytosis did not show any significant difference between RCS rats and their control. Our study suggests minimal involvement of the MerTK receptor in the development and repair of lesions during a sequence of renal ischemia reperfusion. Nevertheless, this work has enabled us to characterize and quantify the microparticles generated following renal ischemia reperfusion by techniques that could subsequently be used in the evaluation of biomarkers of renal lesions.

Étude des effets potentiels du récepteur MerTK sur le développement des lésions liées à une ischémie/reperfusion rénale chez le rat

Mots clés : Ischémie-reperfusion, MerTK, Microparticules, Inflammation, Phagocytose, rats RCS

L'ischémie reperfusion se caractérise par deux phases distinctes : une cessation puis un retour de l'apport sanguin et peut se produire dans certaines situations pathologiques et lors de la transplantation d'organes. Cette séquence d'évènements peut induire la mort cellulaire, la formation de débris cellulaires et de microparticules. Les corps apoptotiques et les microparticules se caractérisent par l'exposition de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de leur membrane. Les cellules lésées suite à l'ischémie reperfusion entraînent, par le relargage de cytokines/chimiokines, l'activation de l'inflammation et le recrutement de leucocytes, tel que les macrophages. Les macrophages permettent l'élimination par phagocytose des débris cellulaires et des microparticules. Il a été établi précédemment que le récepteur tyrosine kinase MerTK, exprimé par plusieurs types cellulaires dont les macrophages, joue un rôle majeur dans la phagocytose. En effet, l'interaction du récepteur MerTK avec son ligand, la protéine S, permet la formation d'un pont entre le macrophage et les phosphatidylsérines exposées par les corps apoptotiques et les microparticules. MerTK contribue aussi à une régulation négative de l'expression de certaines molécules pro-inflammatoires impliquées dans le recrutement leucocytaire.

L'objectif de notre étude est de caractériser le rôle de MerTK dans le développement des lésions induites par une ischémie reperfusion rénale mais aussi dans la réparation post-ischémique. Nous avons utilisé un modèle de rats RCS (*Royal College of Surgeons*) caractérisés par un MerTK défectueux en raison d'une mutation naturelle dans le gène MerTK. La simulation de l'ischémie reperfusion rénale s'effectue par le clampage de l'artère et de la veine rénale. Le sang et les reins prélevés permettent d'évaluer, via des techniques d'ELISA, de Western Blot et de dosages biochimiques, des marqueurs de la fonction et de lésions rénales, d'inflammation et de recrutement leucocytaire. Les lésions histologiques sur des coupes rénales sont mises en évidence par les colorations HES-PAS, et la localisation ainsi que la quantification du recrutement leucocytaire ont été évaluées par la technique d'immunohistochimie. Nous avons par ailleurs utilisé la technique de cytométrie en flux pour quantifier les microparticules d'origine plaquettaire, endothéliales et leucocytaires dans le plasma. Enfin, nous avons étudié le rôle possible de MerTK dans la phagocytose *in vitro*, par co-incubation de corps apoptotiques avec des monocytes/macrophages, provenant de sang de rats RCS déficients en MerTK ou de rats contrôles exprimant normalement ce récepteur.

Nos travaux ont permis de mettre au point une technique de détection des microparticules par un double marquage, avec un anticorps spécifique de l'origine cellulaire et de l'annexine V, molécule marquant l'ensemble des microparticules en se liant à la phosphatidylsérine. La quantification de ces microparticules montre une augmentation, post-chirurgie, d'origine plaquettaire, endothéliale et leucocytaire. Les dosages de Créatinine, marqueur de la fonction rénale, ainsi que ceux des marqueurs inflammatoires et de lésions histologiques n'ont pas montré de différence significative entre les groupes d'ischémie reperfusion rénaux. Néanmoins, il semblerait que l'infiltrat des macrophages 3 jours après une ischémie reperfusion soit plus important chez les rats RCS par rapport aux rats contrôles. De plus, la phagocytose *in vitro* n'a pas montré de différence significative entre les rats RCS et leur contrôle. Cette étude montre une implication minimale du récepteur MerTK dans le développement et dans la réparation des lésions lors d'une séquence d'ischémie reperfusion rénale. Néanmoins, ce travail a permis de caractériser et de quantifier les microparticules générées suite à une ischémie reperfusion rénale par des techniques qui pourraient être utilisées par la suite dans l'évaluation de biomarqueurs de lésions rénales.