



HAL
open science

Impact de l'insuffisance rénale chronique et de l'urémie sur la motilité et la perméabilité intestinale

Elsa Hoibian

► **To cite this version:**

Elsa Hoibian. Impact de l'insuffisance rénale chronique et de l'urémie sur la motilité et la perméabilité intestinale. Sciences agricoles. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSEI066 . tel-02917968

HAL Id: tel-02917968

<https://theses.hal.science/tel-02917968v1>

Submitted on 20 Aug 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre NNT : 2018-LYSEI-066

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de

L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé ED 205

Spécialité de doctorat : Biologie

Discipline : Physiologie

Soutenue publiquement le 14/09/2018, par :

Elsa HOIBIAN

Impact de l'insuffisance rénale chronique et de l'urémie sur la motilité et la perméabilité intestinale

Devant le jury composé de :

Pr SOULA Hédi, Professeur des Universités, Université Paris Sorbonne

Président du jury

Dr THENET Sophie, Directrice d'étude HDR, EPHE (Ecole Pratique des Hautes Etudes)

Rapporteuse

Pr DUCLUZEAU Pierre-Henri, Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Université de Tours

Rapporteur

Dr VIDAL Hubert, Directeur de Recherche, Université Claude Bernard Lyon 1

Directeur de thèse

Dr SOULAGE Christophe, Maître de Conférences HDR, INSA Lyon

Co-directeur de thèse

« Eòlas, saorsa agus misneachd »

Remerciements

Je souhaiterais remercier chaleureusement pour cette thèse :

Sophie Thenet et Pierre-Henri Ducluzeau pour leur participation en tant que rapporteurs et **Hédi Soula** en tant que président à cette thèse.

Christophe Soulage, qui m'a permis de travailler sur ce projet et qui a fait de cette thèse une formation épanouissante, enrichissante et vraiment agréable. Je le remercie, tout particulièrement, pour ses conseils, sa gentillesse, son écoute et sa confiance.

Hubert Vidal, pour son accueil au sein du laboratoire CarMeN et pour m'avoir permis de faire une thèse dans les meilleures conditions.

Emmanuelle Canet-Soulas, pour ses conseils judicieux.

Françoise, pour sa bonne humeur, son optimisme et toutes ces conversations qui m'ont beaucoup apportée. Le champ est totalement libre pour la hotte maintenant !

Romain l'artiste, pour toutes nos sympathiques conversations et l'aide apportée à mes petits projets.

Alex le sympathique cerbère de l'animalerie, qui m'a fait découvrir les lieux et les curiosités qu'ils cachent.

Patrick, pour sa bonne humeur et pour avoir toujours répondu à mes nombreux appels à l'aide.

Annie, pour sa formation et ses conseils avisés.

Jérémie, pour avoir toujours trouvé le temps de répondre à mes questions sur les Caco-2 et pour tous ces échanges voyage, plante, photo et autres curiosités.

Dan and Elisa for your kindness, your generosity, your patience with my English and all these fascinating intercultural exchanges.

Nans, pour les discussions et les moments musique. Un petit bout de terrain pour un grand Lord !

Mathilde, pour ces conversations parfois atypiques mais toujours très enrichissantes.

Laetitia, pour son aide et ses conseils.

Manu, l'Indéfinissable compagnon des heures tardives capable des meilleurs conseils et de brûler de mille feux (les mains surtout ^^).

Kassem, qui est aussi bon scientifique que pâtissier et dont nos conversations science et lecture me laisseront de supers souvenirs.

Lulu, le meilleur guide de voyage, pour sa bonne humeur et sa sympathie.

Benjamin, pour son super coaching qui a contribué à rendre cette aventure possible.

Adeline, pour toute sa gentillesse, sa sympathie et l'aide apportée à un tournant décisif de mon parcours dont je lui suis profondément reconnaissante.

Ma petite famille, qui m'a soutenue tout le long de mon parcours et sans qui rien n'aurait été possible.

Mes BHL. Un cocktail improbable et une bouffée d'oxygène à chaque fois :

Didou, pour cette amitié de près de vingt ans et ces supers voyages.

Flambi, pour avoir toujours répondu présent depuis cette rentrée qui commença par un problème de planning.

Halil, l'homme des situations (vraiment) improbables pour son écoute. Pog forever !

Lambi, Dr Jekyll dans la vie, mister Hyde sur scène et roi du tiramisu.

Manon, la métalleuse au grand cœur dont les encouragements ont été de précieux soutiens.

Mélo, le petit rayon de soleil plein d'optimisme qui m'a toujours prêté une oreille attentive.

Mimitri, Sangoku du Como et charmeur d'animaux digne d'une confiance plus solide qu'une barrière de sel.

Rozy, mon p'tit Jiminy Cricket qui m'a toujours aidée à y voir clair, pour toutes ces longues...très longues heures au téléphone et ce soutien jusqu'au bout de l'aventure.

Stefoune, le roi du dancefloor, pour son écoute, ses conseils judicieux et ces discussions mémorables autour de jeux de cartes.

Sylvain, le monsieur bricolage sur qui on peut toujours compter.

Enfin à **Twist et River**, qui m'ont accompagnée tout le long de ma thèse et à **NX, LT et FM**, qui ont maintenu le moral au top.

Département FEDORA – INSA Lyon - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2016-2020

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNES DU RESPONSABLE
CHIMIE	<p><u>CHIMIE DE LYON</u></p> <p>http://www.edchimie-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage secretariat@edchimie-lyon.fr INSA : R. GOURDON</p>	<p>M. Stéphane DANIELE Institut de recherches sur la catalyse et l'environnement de Lyon IRCELYON-UMR 5256 Équipe CDFA 2 Avenue Albert EINSTEIN 69 626 Villeurbanne CEDEX directeur@edchimie-lyon.fr</p>
E.E.A	<p><u>ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE</u></p> <p>http://edeea.ec-lyon.fr Sec. : M.C. HAVGOUDOUKIAN ecole-doctorale.eea@ec-lyon.fr</p>	<p>M. Gérard SCORLETTI École Centrale de Lyon 36 Avenue Guy DE COLLONGUE 69 134 Écully Tél : 04.72.18.60.97 Fax 04.78.43.37.17 gerard.scorletti@ec-lyon.fr</p>
E2M2	<p><u>ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME, MICROBIOLOGIE, MODÉLISATION</u></p> <p>http://e2m2.universite-lyon.fr Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 INSA : H. CHARLES secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr</p>	<p>M. Philippe NORMAND UMR 5557 Lab. d'Ecologie Microbienne Université Claude Bernard Lyon 1 Bâtiment Mendel 43, boulevard du 11 Novembre 1918 69 622 Villeurbanne CEDEX philippe.normand@univ-lyon1.fr</p>
EDISS	<p><u>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ</u></p> <p>http://www.ediss-lyon.fr Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 INSA : M. LAGARDE secretariat.ediss@univ-lyon1.fr</p>	<p>Mme Emmanuelle CANET-SOULAS INSERM U1060, CarMeN lab, Univ. Lyon 1 Bâtiment IMBL 11 Avenue Jean CAPELLE INSA de Lyon 69 621 Villeurbanne Tél : 04.72.68.49.09 Fax : 04.72.68.49.16 emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr</p>
INFOMATHS	<p><u>INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES</u></p> <p>http://edinfomaths.universite-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage Tél : 04.72.43.80.46 Fax : 04.72.43.16.87 infomaths@univ-lyon1.fr</p>	<p>M. Luca ZAMBONI Bât. Braconnier 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69 622 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.26.23.45.52 zamboni@maths.univ-lyon1.fr</p>
Matériaux	<p><u>MATÉRIAUX DE LYON</u></p> <p>http://ed34.universite-lyon.fr Sec. : Marion COMBE Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.87.12 Bât. Direction ed.materiaux@insa-lyon.fr</p>	<p>M. Jean-Yves BUFFIÈRE INSA de Lyon MATEIS - Bât. Saint-Exupéry 7 Avenue Jean CAPELLE 69 621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.85.28 jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr</p>
MEGA	<p><u>MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE, GÉNIE CIVIL, ACOUSTIQUE</u></p> <p>http://edmega.universite-lyon.fr Sec. : Marion COMBE Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.87.12 Bât. Direction mega@insa-lyon.fr</p>	<p>M. Jocelyn BONJOUR INSA de Lyon Laboratoire CETHIL Bâtiment Sadi-Carnot 9, rue de la Physique 69 621 Villeurbanne CEDEX jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr</p>
ScSo	<p><u>ScSo*</u></p> <p>http://ed483.univ-lyon2.fr Sec. : Viviane POLSINELLI</p>	<p>M. Christian MONTES Université Lyon 2 86 Rue Pasteur 69 365 Lyon CEDEX 07</p>

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Table des matières

Résumé	P01
Abstract	P03
Liste des abréviations	P05
Liste des figures et tables	P09
PREMIERE PARTIE : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE	P13
CHP I : Structure et physiologie intestinale	
1/ Anatomie du système digestif	P15
1/1/ L'intestin grêle.....	P15
1/2/ Le côlon.....	P16
2/ Les fonctions de l'intestin	P17
2/1/ Fonction de sécrétion.....	P17
2/2/ Fonction de propulsion du chyme le long du tube digestif.....	P18
2/3/ Fonction d'absorption des nutriments.....	P20
3/ Le microbiote intestinal	P20
4/ La barrière intestinale	P21
4/1/ Structure.....	P21
4/2/ Les molécules d'adhérence (Cell Adhesion Molecules/CAM).....	P23
4/3/ Les jonctions intercellulaires.....	P23
4/4/ Les jonctions serrées.....	P25
4/4/1/ <i>Nature</i>	P25
4/4/2/ <i>Rôle des jonctions serrées</i>	P27
4/4/3/ <i>Régulation des jonctions serrées</i>	P27

CHP II : L'insuffisance rénale chronique

1/ Physiologie rénale.....	P29
1/1/ La structure rénale.....	P29
1/2/ La fonction rénale.....	P31
2/ L'insuffisance rénale chronique.....	P31
2/1/ Généralités.....	P31
2/2/ Les traitements de suppléance rénale (hémodialyse et dialyse péritonéale).....	P33
2/3/ Les modèles animaux d'insuffisance rénale chronique.....	P34
3/ Les toxines urémiques.....	P36
3/1/ Généralités.....	P36
3/2/ Production, diffusion et élimination des toxines urémiques.....	P38
4/ Conséquences physiopathologiques de l'accumulation de toxines urémiques dans l'IRC.....	P40

CHP III : Intestin et syndrome urémique

1/ Altérations fonctionnelles de l'intestin en IRC.....	P43
2/ Altérations de la fonction barrière de l'intestin en IRC.....	P45
3/ Impact des toxines urémiques sur la perméabilité intestinale.....	P47
3/1/ Impact des toxines urémiques.....	P47
3/2/ Impact des toxines urémiques liées aux protéines.....	P51

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL..... P55

CHP I : Matériel & Méthodes

1/ Plasmas et toxines choisis pour l'étude.....	P57
2/ Culture cellulaire.....	P58
3/ Animaux.....	P59

4/ Dosage de l'urée	P60
5/ Etude du transit digestif	P61
5/1/ Mesure du temps de transit gastrointestinal.....	P61
5/2/ Mesure du transit colique.....	P61
5/3/ Collecte des fèces et mesure de l'eau fécale.....	P61
6/ Etude de la motilité intestinale ex vivo	P62
6/1/ Impact de l'IRC sur la motilité intestinale.....	P62
6/2/ Impact du plasma urémique sur la motilité du côlon descendant.....	P63
7/ Mesure de la cytotoxicité des Caco-2	P63
8/ Mesure de la perméabilité intestinale avec la Fluoresceine Isothiocyanate-Dextran (FITC-Dextran)	P63
8/1/ In vivo.....	P63
8/2/ In vitro.....	P64
9/ Analyse en microscopie à fluorescence	P64
10/ Western Blot	P65
11/ Analyse génomique	P66
12/ Analyse des données	P67
CHP II : Résultats	
1/ L'IRC est associée à des altérations de la fonction intestinale	P69
1/1/ Validation des modèles in vivo.....	P69
1/2/ Modifications biologiques associées à l'IRC.....	P70
1/3/ Le transit gastrointestinal est ralenti en IRC.....	P72
1/4/ L'altération du transit gastrointestinal observée en IRC est associée à un transit intestinal plus lent au niveau du côlon descendant.....	P73
1/5/ Les propriétés contractiles de l'intestin grêle ne sont pas modifiées en IRC.....	P75
1/6/ Les propriétés contractiles du côlon sont modifiées en IRC.....	P77

1/7/ L'altération de la motilité du côlon observée en IRC est induite par des constituants présents dans le plasma urémique.....	P80
2/ La capacité d'absorption de l'intestin est modifiée en IRC.....	P81
2/1/ L'IRC est associée à une augmentation de la perméabilité intestinale in vivo.....	P81
2/2/ L'IRC est associée à une augmentation de la perméabilité de la monocouche Cellulaire de cellules Caco-2.....	P82
2/2/1/ <i>Validation des modèles in vitro</i>	P82
2/2/2/ <i>Mesure de la perméabilité de la monocouche cellulaire</i>	P84
2/3/ L'augmentation de la perméabilité intestinale observée en IRC est associée à une dérégulation des protéines des jonctions serrées.....	P85
2/3/1/ <i>Régulation de ZO-1, Occludine et Claudine-1 dans le côlon</i>	P85
2/3/2/ <i>Régulation de ZO-1, Occludine et Claudine-1 in vitro</i>	P88
2/3/2/1/ <i>Expression des protéines des jonctions serrées dans les Caco-2</i>	P88
2/3/2/2/ <i>Quantification des protéines des jonctions serrées dans les Caco-2</i>	P89
3/ Composants du plasma urémique responsables de l'altération de la perméabilité intestinale en IRC.....	P91
3/1/ Impact de différentes fractions de plasma HD sur la perméabilité intestinale.....	P91
3/2/ Impact des toxines urémiques sur la perméabilité intestinale.....	P95
3/2/1/ <i>Impact des toxines urémiques liées aux protéines sur la perméabilité intestinale</i>	P95
3/2/2/ <i>Impact de l'urée sur la perméabilité intestinale</i>	P96
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION.....	P99
1/ Modèles et techniques.....	P101
2/ Altérations biologiques en IRC.....	P102
3/ Altérations du transit en IRC.....	P102
4/ La motilité intestinale en IRC.....	P103
5/ La perméabilité intestinale en IRC.....	P105

6/ Impact du plasma urémique sur l'altération de la perméabilité intestinale en IRC.....P108

7/ Toxines urémiques et perméabilité intestinale en IRC.....P109

QUATRIEME PARTIE : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....P113

Références bibliographiques.....P119

ANNEXES.....P127

Résumé

L'Insuffisance Rénale Chronique (IRC) résulte de la destruction progressive et irréversible des reins. Elle est associée à une rétention de toxines urémiques à l'origine des nombreuses complications de la maladie rénale chronique (cardiovasculaires, osseuses ou métaboliques). Nos travaux se sont focalisés sur l'impact de la dysfonction rénale et de l'urémie sur la fonction barrière de l'intestin et la motilité intestinale. Deux modèles d'IRC ont été implémentés : un modèle animal, chez la souris, par néphrectomie chimique (régime alimentaire enrichi en adénine) et un modèle cellulaire d'urémie en incubant des cellules coliques Caco-2 avec 10% de plasma de patients hémodialysés (HD). Le transit, la motilité, la perméabilité intestinale et la régulation des protéines des jonctions serrées ont été explorés. Les animaux urémiques présentent un transit gastro-intestinal ralenti et une perméabilité intestinale augmentée associés à une dérégulation de l'expression et de l'abondance des protéines des jonctions serrées dans le côlon (surexpression de la Claudine 1). La perméabilité de la monocouche cellulaire de Caco-2 incubées avec du plasma HD est significativement augmentée et est associée à une augmentation de l'expression et de l'abondance de la Claudine-1. En IRC, la motilité digestive et la fonction barrière de l'intestin sont significativement altérées. Ces dysfonctions pourraient contribuer à la production intestinale et l'absorption des toxines urémiques accélérant ainsi la progression du syndrome urémique et installant un véritable « cercle vicieux ».

Abstract

Chronic Kidney Disease (CKD) result from a progressive kidney dysfunction. CKD is associated with an increase in the concentration of uremic toxins inducing CKD-associated metabolic alterations. Our work focused on the impact of renal dysfunction on gut permeability and gut motility. *In vivo*, CKD was induced in mice by chemical nephrectomy (adenine-enriched diet); *In vitro*, Caco-2 cells were incubated for 24h with 10% (v/v) of uremic plasma to mimic the uremic environment. Gastrointestinal transit time, gut motility, intestinal permeability and expression of tight junction proteins were explored. *In vivo*, kidney failure was associated with an impaired gastrointestinal transit and an increased intestinal permeability associated with a dysregulation of tight junction proteins (mainly claudine-1 overexpression). The Caco-2 monolayer permeability was significantly increased in cell monolayers incubated with uremic plasma. Claudine-1 expression and abundance was increased. In CKD, gut motility and gut permeability (e.g. « leaky » gut) are significantly impaired. Generally speaking, these gut dysfunctions could promote the production and the absorption of uremic toxins contributing to the uremic syndrom.

Liste des abréviations

β2-m	β2-microglobuline
ADH	Antidiuretic Hormone
ADMA	Asymmetric Dimethyl Arginine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGE	Advanced Glycation End product
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARN	Acide Ribonucléique
BSA	Bovine Serum Albumin
Caco-2	Carcinoma Colon Cell-2
CAM	Cell Adhesion Molecule
CAPD	Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis
CKD	Chronic Kidney Disease
CML	Carboxymethyl Lysine
CTL	Contrôle (groupe ou plasma humain)
CTLU	Plasma CTL Ultrafiltré (PM < 5 kDa)
CTLUF	Plasma CTL Ultrafiltré (PM > 5 kDa)
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EGF	Epidermal Growth Factor
ESRD	End Stage Renal Disease
eTAB	Tissu Adipeux blanc Epididymal

FITC-Dextran	Fluoresceine Isothiocyanate-Dextran
GLP-1	Glucagon-Like-Peptide-1
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HD	Hémodialysé
HDD	Plasma HD Dialysé
HDU	Plasma HD Ultrafiltré (PM < 5 kDa)
HDF	Plasma HD Ultrafiltré (PM > 5 kDa)
I	Indole
IEC-18	Intestinal Epithelial Cell-18
IL	Interleukine
IMC	Indice de Masse Corporelle
IRC	Insuffisant/ance Rénal(e) Chronique
IS	Indoxyl Sulfate
JAM-A	Junctional Adhesion Molecule-A
NH ₃	Ammoniac
PBS	Phosphate Buffered Saline
p-C	p-Crésol
p-CS	p-Crésyl Sulfate
PAD	Pression Artérielle Diastolique
PEG	Polyéthylène Glycol
PM	Poids Moléculaire
PAS	Pression Artérielle Systolique
PTH	Parathormone
R.E.I.N	Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie
ROS	Radical Oxygen Species

rTAB	Tissu Adipeux blanc Rétropéritonéal
SDS	Dodécylsulfate de Sodium
SK-CO15	Colorectal Carcinoma Stage Cell 15
STD	Standard
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TBP	TATA-Binding Protein
TBS	Tris-Buffered Saline
TEER	Transepithelial Electric Resistance
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
ZO-1	Zonula Occludens-1

Liste des figures et tables

Figure 1. Structure et ultrastructure de l'intestin grêle

Figure 2. Ultrastructure du côlon

Figure 3. Le réflexe péristaltique et le péristaltisme intestinal

Figure 4. Régulation de l'absorption intestinale

Figure 5. Organisation structurale des protéines régulant la perméabilité de la barrière intestinale

Figure 6. Organisation structurale des jonctions communicantes (GAP-jonctions)

Figure 7. Organisation des protéines des jonctions serrées

Figure 8. Structure du rein

Figure 9. Structure du néphron, unité filtrante du rein

Figure 10. Elimination des différents groupes de toxines urémiques par les systèmes classiques de dialyse

Figure 11. Classification opérationnelle des toxines urémiques

Figure 12. Schéma récapitulatif de la synthèse du p-crésyl sulfate et de l'indoxyl sulfate

Figure 13. Etude du transit colique chez les patients insuffisants rénaux chroniques

Figure 14. Impact du plasma urémique sur la perméabilité intestinale

Figure 15. Impact de l'urée sur la perméabilité intestinale

Figure 16. Impact de l'urée et de l'uréase sur la perméabilité intestinale

Figure 17. Etude de l'effet du plasma urémique pré-HD ou post-HD sur la perméabilité intestinale

Figure 18. Structure d'un système transwell

Figure 19. Protocole de néphrectomie chimique chez la souris

Figure 20. Vue macroscopique des reins de souris IRC et CTL

Figure 21. Concentration plasmatique en urée chez les souris IRC et CTL

Figure 22. Mesure de la prise alimentaire cumulée et évolution du poids corporel

Figure 23. Mesure du temps de transit gastro-intestinal

Figure 24. Mesure de la motilité du côlon descendant

Figure 25. Mesure de la quantité, de la masse et du pourcentage d'humidité des fèces

Figure 26. Evaluation de l'activité contractile du duodénum

Figure 27. Evaluation de la motilité du duodénum

Figure 28. Enregistrements du mécanogramme pour les côlons de souris IRC et CTL

Figure 29. Evaluation de la force et de la fréquence de contraction du côlon

Figure 30. Evaluation de la motilité du côlon

Figure 31. Motilité du côlon incubé avec 20% (vol/vol) de plasma HD ou CTL

Figure 32. Mesure de la contraction plasmatique en FITC-Dextran

Figure 33. Mesure de la cytotoxicité cellulaire de Caco-2 incubées avec du plasma HD ou CTL

Figure 34. Mesure TEER de la monocouche cellulaire de Caco-2

Figure 35. Mesure de l'expression et de l'abondance des protéines des jonctions serrées dans le côlon

Figure 36. Mesure de l'expression des protéines des jonctions serrées dans les Caco-2

Figure 37. Mesure de l'abondance des protéines des jonctions serrées dans les Caco-2

Figure 38. Analyse en microscopie à fluorescence de l'abondance de l'Occludine et de la Claudine-1 dans les Caco-2

Figure 39. Evaluation de la concentration en plasma CTLUF induisant une TEER similaire à celui avec 10% (vol/vol) de plasma CTL

Figure 40. Mesure de la perméabilité de la monocouche cellulaire de Caco-2 incubées avec différentes fractions de plasma

Figure 41. Mesure de la perméabilité de la monocouche cellulaire de Caco-2 incubées avec les toxines p-C, p-CS, I et IS

Figure 42. Mesure de la perméabilité de la monocouche cellulaire de Caco-2 incubées avec de l'urée ou différentes concentrations d'ammoniac

Figure 43. Test de corrélation entre la TEER et la concentration en NH_3

Figure 44. Schéma bilan

Table 1. Les différents stades de l'IRC

Table 2. Liste des oligonucléotides utilisés dans les RT-PCR

Table 3. Mesure du poids et de la masse de différents organes

Table 4. Principales caractéristiques des patients contrôles et hémodialysés

Table 5. Mesure de la corrélation entre l'expression et l'abondance des protéines des jonctions serrées dans le côlon

Première partie :

Recherche bibliographique

CHAPITRE I : Structure et physiologie intestinale

1/ Anatomie du système digestif

1/1/ L'intestin grêle

L'intestin est un organe dont le rôle principal est d'assurer la digestion des nutriments. Il se divise en deux parties structurellement et fonctionnellement bien différentes. L'intestin grêle est la partie qui s'étend entre le sphincter pylorique de l'estomac et la valve iléo-caecale du côlon. Sa vascularisation est assurée par des vaisseaux issus de l'artère mésentérique supérieure et des vaisseaux rejoignant la veine porte hépatique.

L'intestin grêle se divise en trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Ils forment ensemble un tube de 3,5 mètres de long maintenu au niveau de l'abdomen par le mésentère. La couche tissulaire la plus externe est formée d'une séreuse qui recouvre une musculature lisse externe longitudinale et une musculature lisse interne circulaire. Plus en profondeur, il y a ensuite une couche tissulaire appelée sous-muqueuse puis une muqueuse. La surface de contact de l'intestin avec le bol alimentaire est augmentée à ce niveau grâce à une structure particulière de la muqueuse qui forme des multiples replis appelés valvules conniventes elles même repliées pour former les villosités intestinales. Cette augmentation de la surface de contact permet de maximiser la surface d'échange et d'optimiser la digestion et l'absorption des nutriments dans l'intestin. Enfin, la dernière couche au contact d'une lamina propria et de la lumière intestinale, est un épithélium monostratifié de cellules polarisées appelées entérocytes dont la structure particulière permet la régulation de l'absorption des nutriments à travers la barrière intestinale de la lumière vers la circulation sanguine. Outre ces cellules absorbantes de l'épithélium, l'intestin grêle est composé de plusieurs cellules et glandes exocrines et/ou endocrines. En effet, les cryptes des villosités (cryptes de Lieberkühn) sont riches en cellules souches comme les cellules +4 ou les cellules CBC mais également en cellules sécrétrices (*Stanislas. Q, 2016, Med Sci*). Ces dernières sont principalement des cellules caliciformes qui sécrètent du mucus permettant une lubrification du tube digestif et participent au système immunitaire, des cellules de Paneth ayant une action antimicrobienne et des cellules endocrines permettant une régulation des sécrétions et de la motilité intestinale (telle la sécrétine ou la somatostatine,...) (*Mowst. AM, 2014, Nat*

Rev Immunol & Clevers. HC, 2013, Annual Review of Physiology) (Figure 1). Au niveau des villosités, sont également présentent des cellules chimio sensorielles de Tufts, des lymphocytes intra-épithéliaux et les cellules M des plaques de Peyer (*Gerbe. F, 2011, The Journal of Cell Biology & Malamut. G, 2012, Hepato-Gastro*) qui participent au système immunitaire. Enfin, au niveau de la sous-muqueuse, il y a des glandes de Brunner qui sécrètent un mucus alcalin permettant une neutralisation des sucs gastriques dans l'intestin.

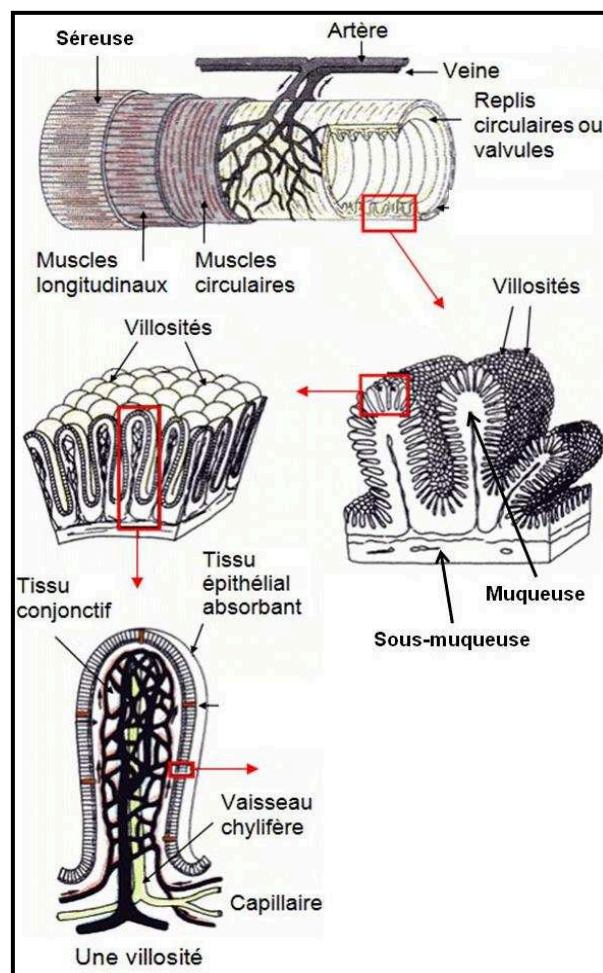


Figure 1 : structure et ultrastructure de l'intestin grêle. Schéma illustrant les différentes couches composant l'intestin grêle ainsi que l'organisation structurale des valvules conniventes et des villosités ; (www.dictionnaire-medical.net).

1/2/ Le côlon

La deuxième partie de l'intestin est formée par le côlon qui est situé en position intrapéritonéale et rétro-péritonéale. Sa vascularisation est assurée par les artères caecales et coliques en provenance de l'artère mésentérique supérieure ainsi que des vaisseaux qui

rejoignent les veines mésentériques supérieures et inférieures. Il est long de 1,5m et se divise en cinq parties : le caecum qui fait suite à l'intestin grêle, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et enfin le sigmoïde qui rejoint le rectum. Enfin à la différence de l'intestin grêle, le côlon est dénué de villosités et possède une flore bactérienne importante appelée microbiote intestinal.

Les couches qui constituent le côlon sont les mêmes que celles de l'intestin grêle avec une séreuse, une musculuse externe longitudinale puis une musculuse interne circulaire, une sous-muqueuse et une muqueuse. Enfin, la couche tissulaire en contact direct avec le chyme et le microbiote présents dans la lumière intestinale, est constituée d'un épithélium monostratifié de cellules absorbantes polarisées semblables aux entérocytes appelées colonocytes (Figure 2). Les cellules sécrétrices présentes dans le côlon sont les mêmes que celles localisées dans l'intestin grêle sauf en ce qui concerne les cellules de Paneth et les glandes de Brunner absentes du côlon. De plus, concernant les cellules de Tufts, leur localisation colique n'est pas encore parfaitement établie.

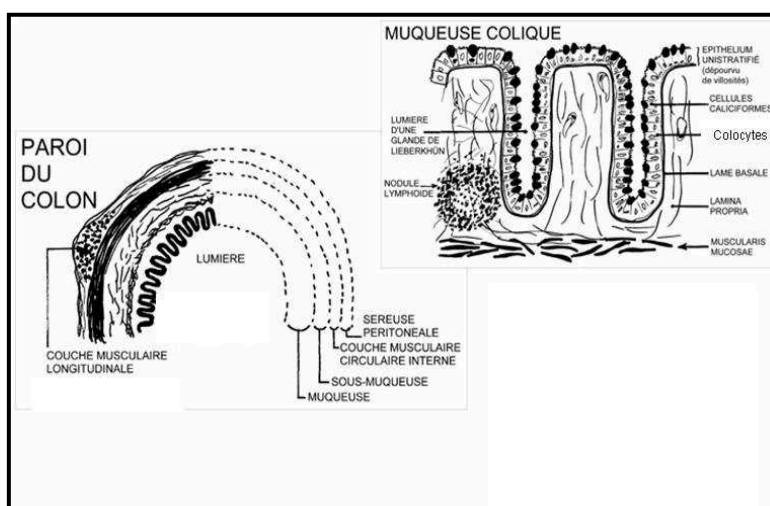


Figure 2 : Ultrastructure du côlon. Schéma illustrant les différentes couches composant le côlon ; (www.db-gersite.com).

2/ Les fonctions de l'intestin

2/1/ Fonction de sécrétion

L'intestin contribue au processus de digestion en sécrétant des enzymes et du mucus permettant la fragmentation et la transformation des macromolécules en nutriments. Il est

considéré comme l'un des plus gros organes endocrine de l'organisme avec la sécrétion de plus d'une centaine de cytokines et d'hormones. Il y a, entre autres, la gastrine qui régule la motricité intestinale et l'irrigation sanguine, la sécrétine qui augmente la sécrétion d'eau et de bicarbonates, la cholecystokinine qui induit la libération d'enzymes pancréatiques et diminue l'absorption intestinale de sucres, le polypeptide insulino-trope gluco-dépendant qui stimule la sécrétion d'insuline et augmente le flux sanguin, le peptide intestinal vaso-actif vasodilatateur, la motiline myostimulante, la neurotensine à fonction hyperglycémiant et qui augmente la motricité intestinale, la substance P qui augmente le péristaltisme intestinal et enfin la somatostatine qui régule la balance hydrique et électrolytique intestinale.

2/2/ Fonction de propulsion du chyme le long du tube digestif

L'intestin participe également aux processus digestifs en assurant la propulsion du chyme dans le tube digestif. En effet, les cellules musculaires de l'intestin possèdent un potentiel de repos instable induit par les cellules interstitielles de Cajal. Ce potentiel électrique se transmet le long de la couche musculaire à travers les jonctions communicantes liant deux cellules adjacentes. La présence d'aliments dans l'intestin active des mécanorécepteurs présents dans l'organe ce qui va induire, en amont du chyme, une contraction du muscle circulaire lisse conjointement à une relaxation du muscle lisse longitudinal. De façon synchrone à ce procédé il y a, en aval de ce chyme, une relaxation du muscle lisse circulaire conjointe à une contraction du muscle lisse longitudinal (Figure 3). Cette contraction synchronisée des muscles est appelée **reflexe péristaltique** et elle se propage comme une onde de l'estomac vers le rectum induisant un déplacement unidirectionnel du chyme vers le rectum ainsi qu'une fragmentation des nutriments et un mélange de ces derniers avec les sucs digestifs.

Le péristaltisme intestinal est régulé par une innervation intrinsèque (système nerveux entérique) et une innervation extrinsèque. Les plexus nerveux sous-muqueux (plexus de Meissner) et myentériques (plexus de Auerbach) sont situés directement dans la paroi de l'intestin. Ils sont très élaborés et sont souvent considérés comme constituant un véritable « deuxième cerveau ». Ce complexe nerveux local permet un contrôle de la motilité intestinale qui n'implique pas le système nerveux central et il est régulé par des

chémo-récepteurs, des mécano-récepteurs et des osmo-récepteurs situés directement dans l'intestin. Le contrôle extrinsèque est assuré par des innervations parasympathiques et orthosympathiques de l'intestin et induisent, respectivement, une augmentation et une diminution des sécrétions et de la motilité intestinale. Enfin, le péristaltisme intestinal est aussi régulé par des hormones comme la ghréline (ou motiline) et la GLP-1 (Glucagon-Like-Peptide-1) qui, respectivement, active et diminue la motilité intestinale (*Wu. GJ, 2017, Am J Physiol regul Integr Comp Physiol; Deportere. I, 2006, Hepato Gastro & Byrne. MM, 2001, Digestion*).

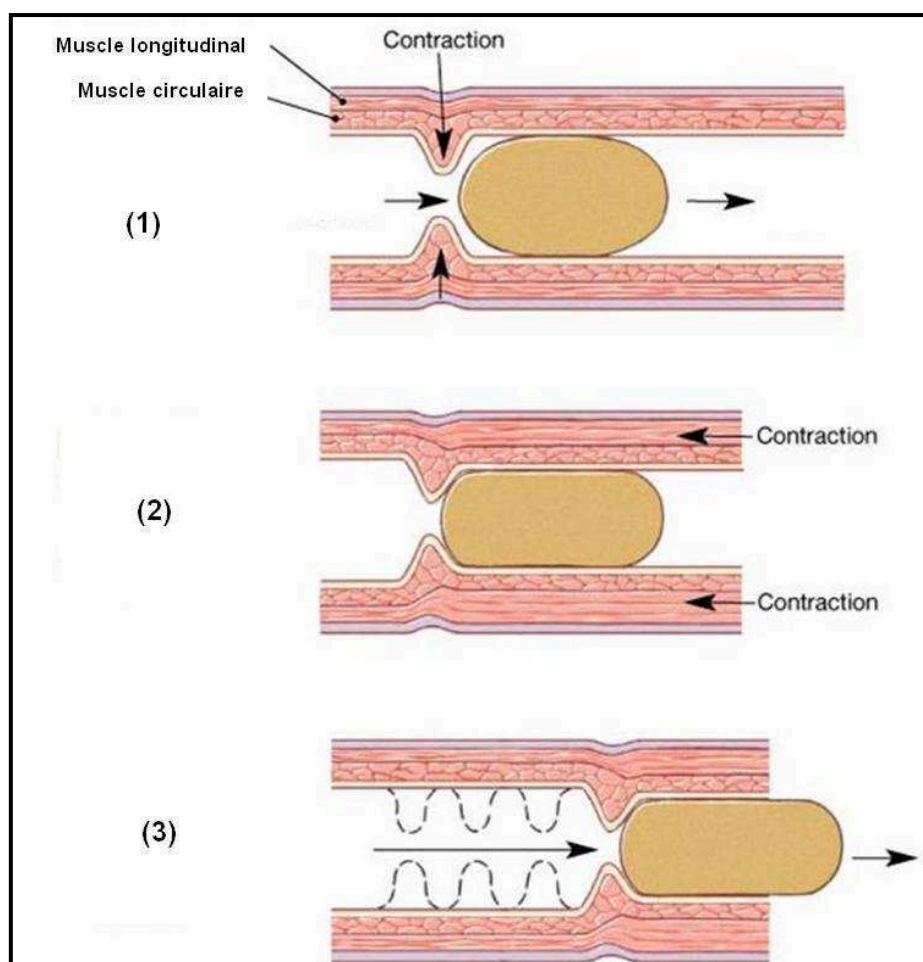


Figure 3 : Le réflexe péristaltique et le péristaltisme intestinal. Schéma illustrant la synchronisation de la contraction des muscles lisses intestinaux permettant la progression unidirectionnelle du chyme. En amont du chyme, du côté oral, il y a une contraction du muscle circulaire conjointe à une relaxation du muscle longitudinal (1). Alors que cet état est maintenu, en aval du chyme, il y a une contraction du muscle longitudinal associée à une relaxation du muscle circulaire (2). Enfin, ce mécanisme se répète de proche en proche à mesure de l'avancée du chyme induisant sa propulsion en direction du rectum (3) ; (<https://qph.ec.quoracdn.net>).

2/3/ Fonction d'absorption des nutriments

La fonction principale de l'intestin est de permettre l'absorption des nutriments issus de la digestion à travers la barrière intestinale afin qu'ils puissent rejoindre la circulation sanguine et être utilisés par les différents organes. Ce procédé se fait grâce à une organisation structurale particulière de l'épithélium intestinal. La nature des nutriments absorbés varie en fonction de leur localisation dans l'intestin. Ainsi, dans le duodénum, il y a principalement une absorption de fer, de calcium, de certains sucres et de certaines vitamines. Le reste de l'intestin grêle joue, quant à lui, un rôle primordial dans l'absorption des glucides, des peptides, des acides gras, des sels minéraux, des vitamines et des lipides. Enfin, le côlon est surtout le lieu de la réabsorption d'eau et de la digestion de nutriments par le microbiote à l'origine d'une production importante de déchets biologiques parmi lesquels des **toxines urémiques** dont la nature sera discutée ci-après. Ces dernières traversent la barrière intestinale, rejoignent la circulation sanguine et seront éliminées de l'organisme grâce à la filtration rénale.

3/ Le microbiote intestinal

Dans l'intestin, et majoritairement dans le côlon qui abrite près de 10^{11} bactéries par gramme de contenu, on trouve un écosystème comprenant près de 10^{14} micro-organismes et que l'on désigne sous le terme de microbiote intestinal. La composition et la proportion des bactéries qui le constituent varient d'un individu à l'autre (*Doré. J, 2010, Gastroentérologie Clinique et Biologie*). Il existe cependant un ensemble de souches bactériennes composant le microbiote présent chez tous les organismes humains et qui définit la norme physiologique appelée aussi **normobiose**. Cinq groupes principaux constituent cette normobiose : les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes*, les *Actinobacteria*, les *Proteobacteria* et les *Verrucomicrobia* (*Pan. W, 2017, Int Urol Nephrol*) ; les *Bacteroidetes* et les *Fimicutes* étant les deux phylla dominants (*Gill. SR, 2006, Science*).

Ce microbiote présent dans l'intestin joue un rôle important dans la maturation du tractus digestif (épaisseur de la muqueuse intestinale, taille des villosités,...) mais aussi dans l'immunité. En effet, le microbiote constitue une barrière écologique empêchant

l'implantation de bactéries pathogènes (*Edelblum. KL, 2017, Cell Mol Gastroenterol Hepatol*). Le microbiote joue également un rôle important dans la digestion des nutriments qui servent de produits de fermentation au microbiote. Ce procédé métabolique est à l'origine de la production de métabolites absorbables qui peuvent passer la barrière intestinale mais aussi de gaz et de toxines urémiques. En effet, il a été montré que 11 solutés, dont les toxines urémiques liées aux protéines p-crésyl sulfate et indoxyl sulfate, étaient exclusivement issus de l'activité du microbiote (*Mishima. E, 2017, Kidney Int & Skye. SM, 2016, Cell Host Microbe*).

La composition, et donc l'action du microbiote, peut être modifiée par des facteurs environnementaux (*Lin. CS, 2014, Biomed J*). Il a été montré, par exemple, qu'une importante consommation de viande induisait un déséquilibre de la composition du microbiote chez le rat (*Zhu. Y, 2017, Front Microbiol*). De même, la fermentation d'une grande quantité d'acides gras à chaîne courte dans le côlon peut induire des modifications de la flore bactérienne (*Lin. CS, 2014, Biomed J*).

Une altération de la normobiose, appelée **dysbiose**, est associée à de nombreuses pathologies comme des maladies cardio-vasculaires, l'insulino-résistance, des allergies, des maladies immunitaires ou des maladies hépatiques (*Lin. CS, 2014, Biomed J*). Le microbiote de souris obèses transplanté dans l'intestin de souris saines suffit à induire chez ces dernières des altérations métaboliques similaires à celles observées chez les souris obèses (*Schachter. J, 2017, Brain, behavior and immunity*). Il a également été montré qu'une dysbiose favorisait le développement de pathologies intestinales comme la maladie de Crohn (*Doré. J, 2010, Gastroentérologie Clinique et Biologique*). Une dysbiose a également été observée dans l'insuffisance rénale chronique (*Vaziri. ND, 2013, Kidney Int*).

4/ La barrière intestinale

4/1/ Structure

L'absorption sélective intestinale est régulée tout d'abord grâce à des enzymes et des peptides sécrétés par les cellules de l'intestin empêchant le passage de bactéries, de virus et de parasites à travers la barrière intestinale. Le mucus contribue également à cette

régulation en formant une barrière physique (Swidsinski. A, 2007, Gut). Enfin, l'organisation structurale des cellules polarisées formant l'épithélium (entérocytes ou colonocytes) joue un rôle majeur dans la formation et la régulation de la barrière intestinale. En effet, les cellules de l'épithélium sont liées les unes aux autres par des jonctions d'ancrage cellulaire permettant une cohésion structurale et une régulation contrôlée de l'absorption intestinale. Les cellules adjacentes sont également liées entre elles par des jonctions communicantes (jonctions GAP) qui permettent le passage de l'onde péristaltique ainsi que de certains éléments de faible poids moléculaire. Le chyme est en contact avec le pôle apical des entérocytes tandis que les vaisseaux sanguins ou lymphatiques sont en contact avec le pôle basal de ces cellules.

Les nutriments traversent la barrière intestinale, de la lumière vers la circulation sanguine, par deux voies. La première est la **voie transcellulaire**. Elle implique des canaux, des protéines de transport et des mécanismes d'endocytose qui permettent le passage d'acides aminés, d'acides gras et d'autres molécules. La seconde est la **voie paracellulaire**. Elle est permise grâce à un complexe de protéines formant des jonctions serrées. Ces dernières régulent finement l'espace entre deux cellules adjacentes de l'épithélium intestinal et permettent le passage d'éléments dont le poids moléculaire est inférieur à 350 Da (Figure 4).

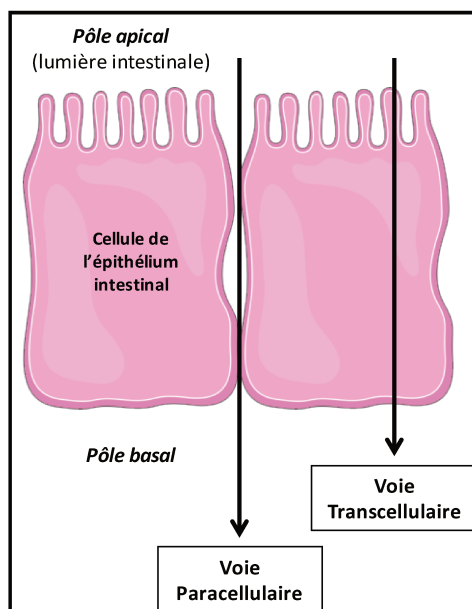


Figure 4 : Régulation de l'absorption intestinale. L'épithélium intestinal est formé d'une monocouche de cellules polarisées régulant le passage sélectif d'éléments de la lumière intestinale (du côté apical des cellules) vers la circulation sanguine ou lymphatique (du côté basal des cellules). Les éléments traversent la barrière intestinale par deux voies : la voie transcellulaire et/ou la voie paracellulaire en fonction de leur nature et de leur taille.

4/2/ Les molécules d'adhérence (Cell Adhesion Molecules/CAM)

Les **molécules d'adhérence** sont des glycoprotéines transmembranaires calcium-dépendantes. Elles appartiennent, entre autres, à la famille des cadhérines et des intégrines qui maintiennent l'adhésion entre deux cellules adjacentes ainsi que la cohésion des cellules à la matrice extracellulaire.

4/3/ Les jonctions intercellulaires

Les protéines des jonctions intercellulaires sont des protéines transmembranaires qui forment des structures reliant entre elles deux cellules épithéliales adjacentes et sont impliquées dans la structure de la barrière intestinale (Figure 5).

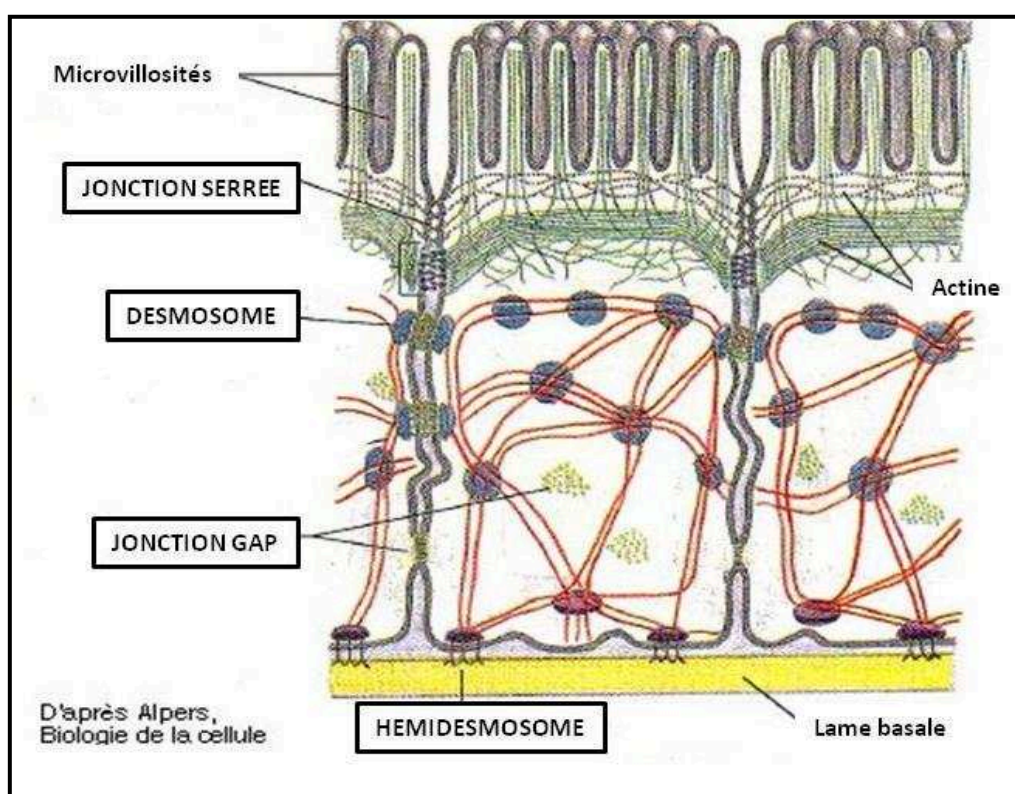


Figure 5 : Organisation structurale des protéines régulant la perméabilité de la barrière intestinale. La perméabilité de la barrière intestinale est régulée par des protéines permettant le maintien de la cohésion entre les cellules (zonula-adherens & Macula-adherens), la cohésion des cellules avec la lame basale (hémidesmosomes), la communication intercellulaire (jonctions GAP) et la régulation de l'espace intercellulaire permettant le passage d'éléments par la voie paracellulaire (jonctions serrées) ; (www.db-gersite.com).

Les **jonctions d'ancrage** (ou Zonula-adherens) sont constituées, entre autres, de cadhérines, de caténines et de vinculines. Elles forment des zones de filaments denses qui s'étendent autour de chaque cellule maintenant son adhésion avec les cellules adjacentes. Les **desmosomes** (ou Macula-adherens) qui sont des protéines filamenteuses permettent une adhérence intercellulaire. Les **hémidesmosomes** sont des protéines de la même nature que les desmosomes. Elles ont, en revanche, une fonction différente de ces derniers car elles contribuent à maintenir l'adhésion des cellules de l'épithélium intestinal à la lame basale.

Les **jonctions communicantes (ou jonctions GAP)** sont, elles, constituées d'un ensemble de connexines formant un canal et se situent sur le côté latéral des cellules de l'épithélium intestinal. Elles permettent une communication et le passage d'éléments de diamètre inférieur à 2nm entre deux cellules adjacentes. Ces jonctions sont responsables de la propagation des ondes de dépolarisation observées lors de la digestion et régulent la synchronisation de la contraction-décontraction du muscle lisse intestinal à l'origine de l'avancée unilatérale du bol alimentaire de l'estomac vers le rectum. L'ouverture du canal formé par ces protéines est régulée par le calcium et l'acidité du milieu qui, lorsqu'ils sont bas, induisent une fermeture des connexons (Figure 6). Enfin, les **jonctions serrées** (ou zonula-occludens) correspondent à un ensemble de protéines liant deux cellules épithéliales adjacentes. Elles sont à l'origine du maintien et de la régulation de la perméabilité de la barrière intestinale et donc de la capacité d'absorption de l'intestin.

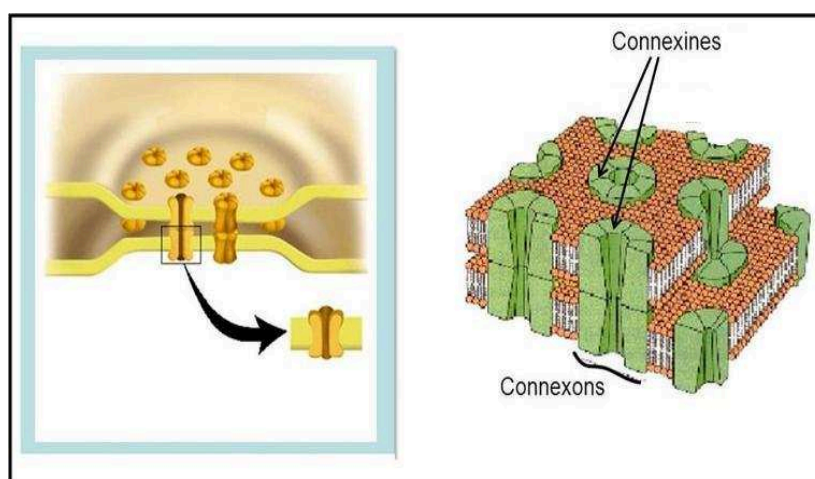


Figure 6 : Organisation structurale des jonctions communicantes (GAP-jonctions). Les jonctions communicantes sont des canaux traversant la membrane plasmique de deux cellules adjacentes de 2nm de diamètre. Ces canaux sont constitués de deux connexons chacun formé de six connexines. Ces jonctions ont un rôle important dans la transmission des ondes de dépolarisation ; (*slideplayer.fr*).

4/4/ Les jonctions serrées

4/4/1/ Nature

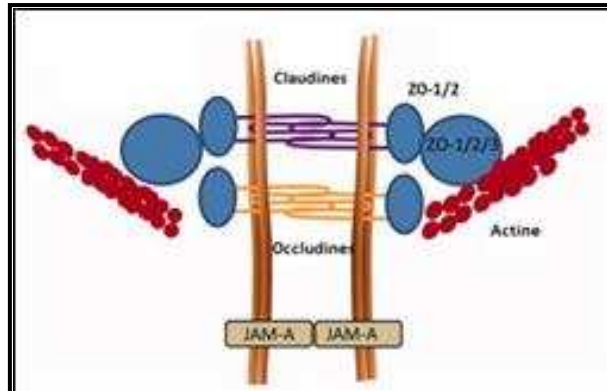


Figure 7 : Organisation des protéines des jonctions serrées. Les jonctions serrées forment un complexe qui maintient et régule un espace entre deux cellules adjacentes permettant le passage sélectif d'éléments de poids moléculaire inférieur à 350 Da. Les Occludines, les JAM-A et les Claudines de chaque cellule interagissent entre elles. Les Occludines et les Claudines sont également liées à l'actine du cytoplasme par l'intermédiaire des protéines ZO ; (<https://connexience.files.wordpress.com>).

Les principales protéines impliquées dans la formation des jonctions serrées sont l'Occludine, la protéine JAM-A (Junctional Adhesion Molecule-A), la Claudine-1 et la protéine ZO-1 (Zonula Occludens-1) (Figure 7). L'**Occludine** est une protéine transmembranaire de 64 kDa située au pôle apical des cellules épithéliales qui est constituée de quatre domaines transmembranaires en hélice alpha. Il a été montré qu'une diminution de la perméabilité de l'épithélium au niveau du côlon ascendant chez des souris au cycle circadien altéré est associée à une abondance plus importante de l'Occludine dans le tissu (Kyoko. OO, 2014, *PLoS One*). De même, cette abondance diminue lorsque la perméabilité intestinale est augmentée dans le côlon de rats insuffisants rénaux mais aussi dans des cellules T84 dont la perméabilité de la monocouche de cellules est augmentée après incubation avec du plasma de patients insuffisants rénaux hémodialysés HD (Vaziri. ND, 2012, *Nephrol Dial Transplant* & Vaziri. ND, 2012, *Am J Nephrol*). Une augmentation de la perméabilité intestinale au niveau du jéjunum chez des souris transplantées ou au niveau du côlon de rats insuffisants rénaux est associée, respectivement, à une diminution et une augmentation de l'expression de l'Occludine (Noth. R, 2011, *BMC Gastroenterol* & Vaziri. ND, 2012, *Nephrol Dial*

Transplant). Enfin, des études réalisées sur des cellules IEC-18 (Intestinal Epithelial Cell-18), cellules épithéliales d'iléon de rat, ont montré qu'une augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire est associée à une diminution de l'expression de l'Occludine (*Poritz. LS, 2011, Dig Dis Sci*).

La seconde protéine impliquée dans la régulation des jonctions serrées est la protéine **JAM-A**. C'est une protéine de 33 kDa située au pôle apical des cellules de l'épithélium intestinal et constituée d'un seul domaine transmembranaire. JAM-A est fortement impliquée dans la régulation de la perméabilité intestinale et de l'inflammation. En effet, l'inhibition de l'expression de JAM-A dans le côlon de souris ou dans des cellules SK-CO15 (Colorectal Carcinoma Stage Cell 15) suffit à induire une augmentation de la perméabilité intestinale associée à des processus inflammatoires (*Laukoetter. MG, 2007, J Exp Med*).

Enfin, la dernière protéine régulant les jonctions serrées est la **Claudine-1**. C'est une protéine transmembranaire de 22 kDa située au pôle apical des cellules épithéliales et constituée de quatre domaines transmembranaires. L'extrémité N-terminale située dans le cytoplasme est courte et l'extrémité C-terminale, elle aussi localisée dans le cytoplasme, est de longueur plus variable. Il a été montré que son abondance augmentait dans le côlon de souris souffrant de perturbation du cycle circadien et que cette modification était associée à une diminution de la perméabilité intestinale (*Kyoko. OO, 2014, PloS One*). Son abondance diminue dans le côlon ascendant de rats rendus insuffisants rénaux par une néphrectomie subtotale ainsi que dans des cellules T84 incubées 24h avec du plasma HD en association avec une augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire (*Vaziri. ND, 2012, Nephrol Dial Transplant & Vaziri. ND, 2012, Am J Nephrol*). Il a également été montré que l'augmentation de la perméabilité intestinale observée sur des cellules Caco-2 (Carcinoma Colon Cell-2) incubées avec 5% d'éthanol était associée à une augmentation de l'expression de la Claudine-1 (*Wang. Y, 2014, Mol Med Rep*). Son expression augmente en association avec une augmentation de la perméabilité de la monocouche de cellules IEC-18 incubées avec du TNF α (Tumor Necrosis Factor α) (*Poritz. LS, 2011, Dig Dis Sci*). Enfin, une surexpression de la Claudine-1 est associée à une inflammation du côlon, l'apparition de tumeurs et une augmentation de la perméabilité intestinale chez des souris APC (Adenomatous Polyposis Coli) (*Pope. JL, 2014, Molecular Cancer*).

Concernant la protéine **ZO-1**, elle se situe du côté cytoplasmique des cellules de l'épithélium intestinal et relie directement les protéines des jonctions serrées aux filaments d'actines via la Cinguline. Il ne s'agit pas, à proprement parler, d'une protéine participant à la formation

des jonctions serrées mais elle est indispensable au maintien de l'ensemble de la structure d'où le fait qu'on la considère comme appartenant au complexe des jonctions serrées. Sa régulation est étroitement associée à celle de la perméabilité intestinale. En effet, il a été montré que son abondance diminue chez des rats rendus insuffisants rénaux par une néphrectomie subtotale et chez des cellules T84 incubées 24h avec 10% (vol/vol) de plasma HD en association avec une augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire (Vaziri. ND, 2012, *Nephrol Dial Transplant* & Vaziri. ND, 2012, *Am J Nephrol*). Enfin, son expression est augmentée dans le côlon ascendant de rats rendus insuffisants rénaux par une néphrectomie subtotale et elle diminue dans des Caco-2 incubées avec 5% d'éthanol en association avec à une augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire (Wang. Y, 2014, *Mol Med Rep*).

4/4/2/ Rôle des jonctions serrées

Les jonctions serrées maintiennent la cohésion des cellules de l'épithélium intestinal entre elles et régulent l'espace entre les cellules adjacentes. Elles induisent la formation d'une barrière permettant le passage sélectif, par la voie paracellulaire, de molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 350 Da comme les monosaccharides, les dipeptides, les acides gras libres, les minéraux, les vitamines ou l'eau. Les protéines des jonctions serrées vont également être à l'origine d'une résistance électrique de part et d'autre de l'épithélium appelé résistance électrique transépithéliale (TEER, Transepithelial Resistance) qui diminue lorsque la perméabilité intestinale augmente.

4/4/3/ Régulation des jonctions serrées

Les jonctions serrées sont régulées par plusieurs éléments comme le zinc, le butyrate ou l'indole (Valenzano. MC, 2015, *PloS One*). La Zonuline (pré-haptoglobine-2) est une hormone fabriquée par la muqueuse intestinale et elle est activée par la présence de bactéries ou de gluten dans l'intestin. Elle régule de façon réversible la perméabilité intestinale. En effet, la Zonuline active EGF (Epidermal Growth Factor) qui induit un désengagement de la protéine ZO-1 du complexe de jonctions serrées et ainsi une

augmentation de la perméabilité intestinale (*Fasano. A, 2012, Clin Gastroenterol Hepatol*). La surexpression de la Zonuline est associée à de nombreuses pathologies impliquant une modification de la régulation des jonctions serrées de l'intestin comme dans la maladie coéliquaue, la maladie de Crohn ou l'insuffisance rénale chronique (*Fasano. A, 2012, Ann N Y Acad Sci*).

CHAPITRE II : L'insuffisance rénale chronique

1/ Physiologie rénale

1/1/ La structure rénale

Longs d'une dizaine de centimètres, les deux reins sont situés au niveau de l'abdomen, dans le rétro-péritoine. Leur vascularisation est assurée par les artères et les veines rénales et leur innervation par le système orthosympathique et parasymphatique. Les reins ont une forme de haricot et sont composés de deux parties distinctes. La partie la plus interne est la **médulla** et elle constitue la plus grande surface du rein. Elle se compose de structures pyramidales appelées pyramides de Malpighi et les extrémités les plus internes de ces « pyramides » rejoignent des invaginations plus en profondeur appelées calices rénaux. Ces derniers fusionnent ensemble pour former une structure unique appelée Bassinet qui s'affine en un canal unique, l'uretère, menant à la vessie. Cette médulla est englobée dans une structure plus fine appelée le **cortex** qui constitue la structure la plus périphérique du rein (*Smith. HW, 1951*) (Figure 8).

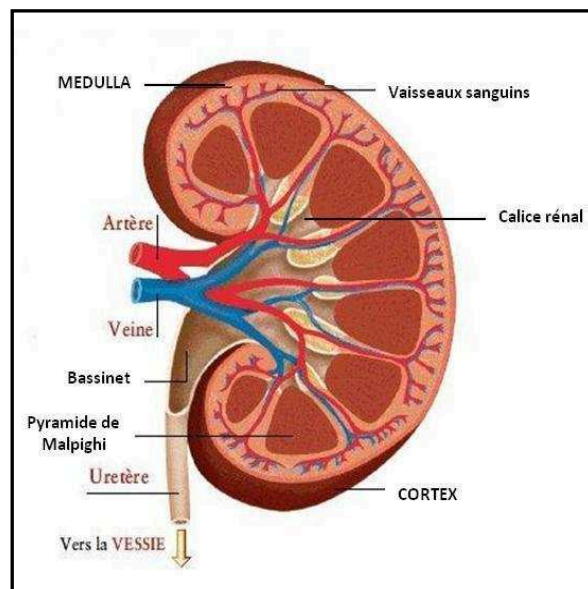


Figure 8 : Structure du rein. Le rein est constitué d'une médulla entourée par le cortex. Elle s'organise en différents compartiments qui fusionnent les uns avec les autres, de la périphérie vers la partie la plus en profondeur du rein, pour former au final un canal unique appelé uretère. Celui du rein droit et du rein gauche se rejoignent ensuite au niveau de la vessie ; (<http://s2.e-monsite.com>).

Le complexe rénal à l'origine de la filtration rénale est formé d'une succession de tubules appelés **néphrons** (Figure 9). Ils sont en étroite relation avec le réseau capillaire rénal et il en existe de deux sortes : les superficiels qui possèdent une anse de Henlé courte et les profonds dont l'anse de Henlé est beaucoup plus longue. Cette succession de tubules s'enfonce dans le cortex et la médulla du rein avant de rejoindre les calices rénaux. La première partie de ce complexe, la plus proche du cortex, est formée par le **glomérule rénal**. Il est entouré par la capsule de Bowman et définit la capacité de filtration du rein. A ce niveau du néphron, on observe une ultrafiltration unidirectionnelle du plasma vers le néphron. L'urine primitive issue de ce processus parcourt ensuite le reste des tubules rénaux où vont s'effectuer, cette fois, des transferts passifs et actifs de solutés du sang vers le néphron (sécrétion) mais aussi du néphron vers le sang (réabsorption). Ces tubules sont du glomérule vers les calices : le tube contourné proximal, le tube droit proximal, le tube intermédiaire, le tube droit distal, le tube contourné distal et le canal collecteur. L'anse de Henlé est une structure en « U » qui est formée par le tube droit proximal, le tube intermédiaire et le tube droit distal.

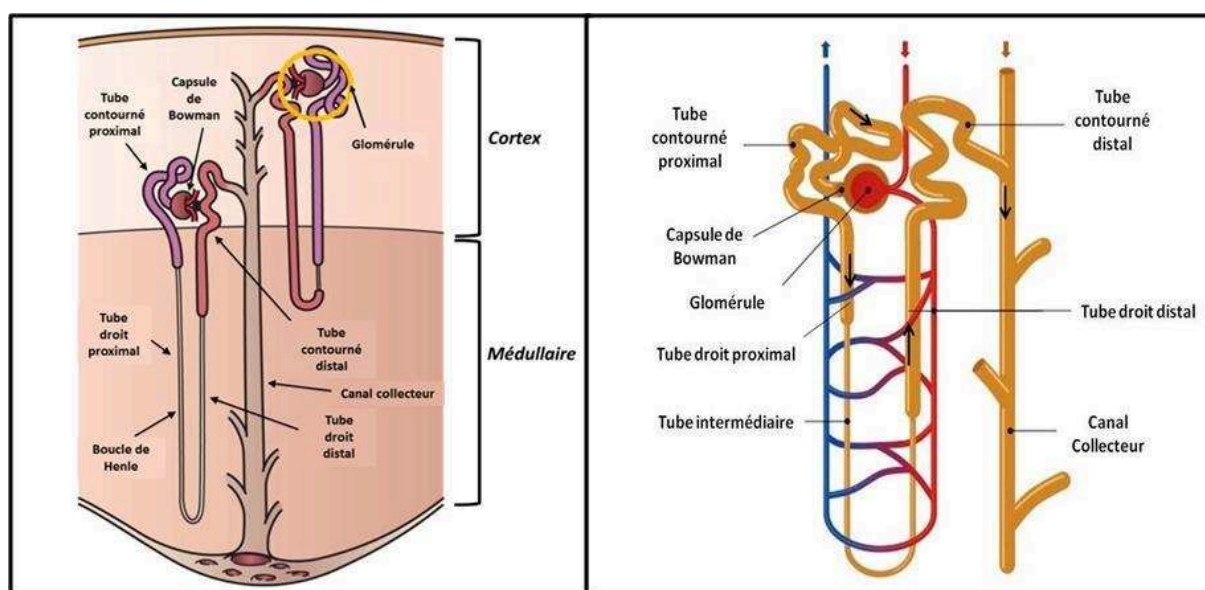


Figure 9 : Structure du néphron, unité filtrante du rein. Les néphrons sont les structures élémentaires responsables de la filtration rénale. Les glomérules, au niveau du cortex, sont en étroite relation avec les artères rénales et permettent la filtration, la sécrétion et la réabsorption d'éléments du plasma et mais aussi d'eau dans le néphron. Cette urine primitive parcourt ensuite l'ensemble des tubules où elle sera transformée en urine définitive suite à plusieurs processus de réabsorption et de sécrétion jusqu'à atteindre les canaux collecteurs puis les calices rénaux ; (<https://upload.wikimedia.org> & <https://ib.bioninja.com.au>).

1/2/ La fonction rénale

Les reins sont des organes impliqués dans le maintien de l'équilibre hydro-électrolytique et acido-basique, la régulation de la pression artérielle et l'élimination des déchets métaboliques non volatils. Ainsi, il y a une sécrétion de Rénine au niveau de l'appareil juxta-glomérulaire lorsque la pression artérielle diminue. Cette hormone induit la transformation de l'Angiotensinogène en Angiotensine I qui sera à son tour transformée en Angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine. L'Angiotensine II est un puissant vasoconstricteur qui contribue à l'augmentation de la pression artérielle. L'Angiotensine II stimule également la libération d'Aldostérone qui augmente la réabsorption de sodium au niveau rénal. De même l'ADH (Antidiuretic Hormone), produite par le cerveau, est une hormone qui agit au niveau du rein lors d'une déshydratation induisant une rétention et une réabsorption d'eau plus importante par les tubules rénaux. Les reins sont également impliqués, de part leur capacité de sécrétion et de réabsorption d'électrolytes, dans le maintien de l'équilibre électrolytique et acido-basique du corps par une régulation fine de l'excrétion du bicarbonate et des protons. Enfin, les reins ont surtout un rôle indispensable dans l'élimination de déchets biologiques non volatils qui entrent dans l'organisme de façon exogène ou qui sont produits lors des réactions métaboliques.

2/ L'insuffisance rénale chronique

2/1/ Généralités

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est une maladie qui touche une large tranche de la population dans le monde et davantage chaque année. En 2015, le R.E.I.N (Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie) recensait une augmentation annuelle de 2% du nombre de patients souffrant d'insuffisance rénale. En France, en 2015, 82 295 personnes étaient traitées pour une IRC terminale et 7730 décès ont été recensés dont 18,6% de patients sous dialyse et 2% de patients transplantés.

L'IRC se caractérise par une diminution de la fonction filtrante des reins et résulte de multiples causes comme une pyélonéphrite, une polykystose ou des maladies auto-immunes

mais, dans près de 50% des cas, ce sont des néphropathies diabétiques (22,3% en 2015) et l'hypertension artérielle (25,2% en 2015) qui sont à l'origine d'une IRC. Des calculs rénaux, un durcissement des artères rénales ainsi qu'une utilisation médicamenteuse excessive peuvent également induire un dysfonctionnement de la filtration rénale. Cependant, quelle qu'en soit l'origine, l'IRC est une pathologie qui se met en place progressivement. Le niveau d'avancement de la maladie est reflété par la diminution du **débit de filtration glomérulaire** (DFG) (Table 1). A l'état physiologique, ce débit est supérieur ou égal à 90mL/min/1,73m². Lorsque ce débit est compris entre 60 et 89 mL/min/1,73m² on parle alors de stade 1 et 2 d'insuffisance rénale. A ce niveau de dégradation de la filtration glomérulaire, certains marqueurs de l'insuffisance rénale peuvent être détectables dans le plasma (augmentation de l'urée ou de la créatine plasmatique,...) et les risques de mise en place de maladies cardio-vasculaires augmentent. En revanche, aucun des symptômes que l'on observe lors d'une IRC ne sont ressentis par le patient comme les nausées, une grande faiblesse ou une perte d'appétit. A partir du stade 3 (débit de filtration glomérulaire compris entre 30 et 59 mL/min/1,73 m²), les reins du patient sont encore suffisamment fonctionnels mais il devient nécessaire de mettre en place des traitements médicaux pour préserver la fonction rénale (néphroprotection), réguler la tension artérielle et diminuer la fuite de protéines plasmatiques dans les urines (protéinurie). A côté de ces traitements, il est également recommandé au patient de modifier son mode de vie en diminuant, par exemple, sa consommation d'aliments riche en protéines, en phosphore ou en potassium et en augmentant la pratique d'exercices physiques pour lutter contre les risques de maladies cardio-vasculaires. Au stade 4 (débit compris entre 15 et 29 mL/min/1,73 m²) la filtration glomérulaire devient beaucoup trop faible et il y a une accumulation plasmatique trop importante de toxines urémiques qui ne sont plus éliminées dans les urines. Enfin, au stade 5 (débit inférieur à 15 mL/min/1,73 m²), l'insuffisance rénale est dite terminale ce qui correspond à une perte de plus de 85% de la fonction filtrante des reins. L'accumulation des toxines urémiques dans l'organisme met en péril la survie du patient et la mise en place de traitements de suppléance rénale (hémodialyse ou dialyse péritonéale) permettant l'élimination de ces déchets devient alors indispensable (*Gutiérrez Sanchez. D, 2017, Clin Nurs Res*).

Débit de filtration glomérulaire (mL/min/1,73m²)	Etat biologique	Stade d'insuffisance rénale
≥ 90	Etat physiologique	/
[60; 90]	Stade 1 & 2 de l'IRC	IRC légère
[30; 59]	Stade 3 de l'IRC	IRC modérée
[15; 29]	Stade 4 de l'IRC	IRC sévère
< 15	Stade 5 de l'IRC	IRC terminale

Table 1 : Les différents stades de l'IRC. Tableau récapitulatif de la progression de l'IRC qui est corrélée à la dégradation du débit de filtration glomérulaire et des stades qui y sont associés.

2/2/ Les traitements de suppléance rénale (hémodialyse et dialyse péritonéale)

Les hémodialyses et les dialyses péritonéales impliquent une filtration par diffusion. Elles filtrent les toxines urémiques hydrosolubles et une partie de celles de moyen poids moléculaire. Les hémofiltrations et les hémodialfiltrations permettent, quand à elles, une filtration par convection qui augmente la proportion de toxines urémiques de moyen poids moléculaires éliminées (Figure 10). Il existe un groupe de toxines qui sont liées aux protéines plasmatiques et qui ne sont pas dialysables par ces systèmes. Ceci est dû au fait que ces toxines, étant liées à l'albumine du sang, ont un poids moléculaire supérieur à 60 kDa. Or les différentes techniques de dialyse actuelles ont toutes une capacité de filtration qui n'excède pas 40 kDa. Ces toxines ne peuvent donc pas traverser la membrane de filtration des systèmes de dialyse et s'accumulent de façon croissante dans l'organisme. L'efficacité de ces procédés reste donc limitée pour permettre de compenser de façon parfaite la dysfonction rénale. Ainsi, 27% des patients dialysés meurent toujours de maladies cardio-vasculaires, 12% d'infections et 10% de cancers qui sont des maladies associées à l'IRC (*Chantrel. F, 2013, Nephrol Ther*). De plus, les dialyses sont des traitements médicaux extrêmement contraignants. En effet, les hémodialyses nécessitent des séances de 4h, trois fois par semaine et doivent être associées à des traitements permettant de lutter contre l'anémie et les altérations du métabolisme phosphocalcique observées chez les patients. La dialyse péritonéale, quand à elle, consiste à placer du dialysat dans la cavité péritonéale du patient afin de permettre une filtration permanente. Cependant, ce système induit des hernies abdominales, des scléroses péritonéales et son efficacité diminue dans le temps (*Del Peso. G,*

2003, *Perit Dial Int* ; Davenport. A, 2009, *Perit Dial Int & Slingeneyer. A, 1983, Trans Am Soc Artif Intern Organs*).

Pour les patients souffrant d'IRC, la meilleure alternative pour retrouver une filtration rénale efficace et durable dans le temps reste donc la transplantation rénale. Cependant, outre les risques de rejet ou de complication qui restent importants, les donneurs sont rares avec 3488 greffés en 2015 pour 16 529 demandeurs, en France. De plus, les greffes doivent être associées à la prise d'immunosuppresseurs et les reins greffés ont une fonctionnalité qui dure entre 10 et 14 ans.

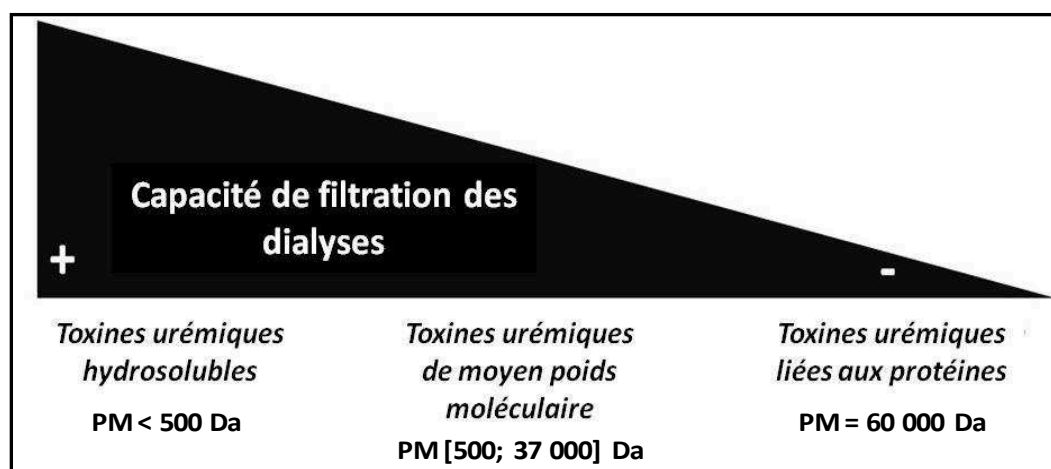


Figure 10 : Elimination des différents groupes de toxines urémiques par les systèmes classiques de dialyse. Les toxines urémiques sont des déchets biologiques qui ne sont plus éliminés efficacement hors de l'organisme quand la capacité de filtration rénale devient insuffisante. Les dialyses permettent une filtration artificielle de ces toxines afin de pallier au dysfonctionnement des reins mais ne parviennent pas pour autant à remplacer ces derniers de façon aussi efficace. En effet, si la totalité des toxines hydrosolubles et la majorité de celles de moyen poids moléculaires sont filtrées, celles liées aux protéines ne le peuvent pas, leur poids moléculaire apparent étant bien supérieur à la taille des pores des membranes utilisés en dialyse.

2/3/ Les modèles animaux d'insuffisance rénale chronique

Pour les études sur l'insuffisance rénale chronique les rats et les souris sont les principaux modèles choisis cependant des études ont aussi été réalisées sur d'autres animaux comme les lapins ou les chiens (*Anovsky. A, 2003, thèse*). Les rats et les souris sont des animaux qui présentent des avantages car leur coût est limité, l'hébergement en

animalerie est facilité et la manipulation expérimentale simple à réaliser. Leur espérance de vie reste cependant très courte ce qui complique les études sur les altérations métaboliques induites par l'IRC sur le long terme. De plus, les rats ont une croissance qui se prolonge bien après la puberté ce qui peut compliquer les études, une forte croissance pouvant interférer avec les processus métaboliques.

L'insuffisance rénale peut être induite de plusieurs façons sur les modèles animaux et la première technique consiste en une réduction néphronique. Elle peut être induite par une ligature du pédicule rénal ou une chirurgie de néphroréduction. Pour les études sur l'insuffisance rénale chronique, la technique de réduction néphronique utilisée est la néphrectomie subtotale qui consiste à détruire 5/6^{ème} du parenchyme rénal total des animaux. Elle induit cependant une hypertrophie compensatoire au niveau de la partie du rein encore fonctionnelle dont il faut tenir compte dans les études.

Ensuite, il existe des techniques moins invasives permettant l'induction d'une insuffisance rénale par des injections d'agents chimiques. Il s'agit, entre autres, de métaux lourds (uranium) ou d'antibiotiques (puromycine, adriamycine, gentamicine,...). Cependant, leurs actions sont limitées dans le temps et ils permettent donc surtout des études sur l'insuffisance rénale aiguë. Il est également possible d'induire une IRC en alimentant les animaux avec un régime supplémenté en adénine (*Yokozawa. T, 1986, Nephron*). En effet, celle-ci est immédiatement métabolisée en 2,8-dihydroxyadénine qui précipite et forme des cristaux dans le tube contourné proximal du néphron induisant une dégénérescence irréversible de ces derniers. Cette technique permet de s'affranchir des complications liées à la chirurgie et du phénomène d'hypertrophie compensatoire observé après une néphrectomie subtotale.

Enfin, il existe également des modèles transgéniques d'insuffisance rénale permettant l'étude de l'IRC comme les souris mutantes OS dont le nombre de néphrons est 50% plus bas qu'une souris sauvage. Cependant ces modèles restent beaucoup plus coûteux que les modèles non génétiquement modifiés ce qui limite les études.

Concernant notre étude, nous avons fait le choix d'étudier des modèles de souris dont le régime alimentaire a été supplémenté pendant environ trois semaines avec 0,25% (wt/wt) d'adénine car c'est une technique peu coûteuse, reproductible, couramment utilisée pour les études sur l'IRC et qui, de part le fait qu'elle ne nécessite aucune manipulation invasive, est simple d'application.

3/ Les toxines urémiques

3/1/ Généralités

Les toxines urémiques sont des déchets biologiques toxiques présents dans l'organisme qui sont éliminés, à l'état physiologique, par voie urinaire. Pour qu'un soluté soit considéré comme une toxine urémique il doit intégrer deux caractéristiques ; s'il n'intègre pas ces deux propriétés ou s'il n'en intègre qu'une seule on parle alors de soluté de rétention urémique et non pas de toxine urémique. La première caractéristique que doit intégrer une toxine urémique est que ce soluté, parfaitement caractérisable et normalement éliminé par voie urinaire, s'accumule dans l'organisme par défaut de clairance rénale. Enfin, dans un deuxième temps, il faut également qu'il y ait eu des études ayant démontré que ce soluté induit, de par son accumulation dans l'organisme, un effet sur plusieurs fonctions physiologiques (*Vanholder. R, 2003, Nephrology*). En 2003, le groupe de travail européen sur les toxines urémiques (www.uremic-toxins.org) a défini, à partir de l'étude de 850 publications, un classement de ces toxines urémiques en trois groupes selon leurs propriétés physico-chimiques et leur comportement à la dialyse. Ce classement n'est cependant pas reconnu comme universel. En effet, si les différentes références bibliographiques s'accordent pour définir trois groupes principaux il existe, en revanche, des variations concernant le classement des toxines dans les différentes sous-classes de ces groupes. De plus, certaines toxines urémiques ont des propriétés physico-chimiques leur permettant d'appartenir simultanément à deux groupes différents ce qui rend un classement précis de ces solutés difficile. Cette classification a, par ailleurs, été réévaluée et actualisée en 2012 (*Duranton. F, 2012, J Am Soc Nephrol*).

Le premier groupe regroupe les **toxines urémiques de faible poids moléculaire hydrosolubles**. Il se compose d'environ 40 toxines qui ne sont pas liées à l'albumine et dont le poids moléculaire est inférieur à 500 Da. Ce groupe intègre, entre autres, l'urée (60 Da), la créatinine (113 Da), la guanidine (59 Da), l'oxalate (90 Da) et l'ADMA (Asymmetric Dimethyl Arginine) (202 Da). La totalité des toxines urémiques hydrosolubles sont dialysables et peuvent donc être filtrées hors de l'organisme grâce aux techniques de suppléance rénale existantes telle l'hémodialyse.

Le second groupe est celui des **toxines urémiques de moyen poids moléculaire** (Middle Molecules) et regroupe près de 25 solutés. Ces toxines ont un poids moléculaire compris entre 500 Da et 37 kDa. La β 2-microglobuline (β 2-m) (11 kDa), IL-1 β (Interleukine-1 β) (32 kDa), IL-6 (24 kDa), TNF α (Tumor Necrosis Factor α) (26 kDa), PTH (Parathormone) (9 kDa) et la Leptine (16 kDa) appartiennent, entre autres, à ce groupe.

Enfin, le dernier groupe est celui des **toxines de faible poids moléculaire liées aux protéines plasmatiques** (« toxines liées aux protéines ») et comprend une vingtaine de molécules. Lorsqu'elles sont sous forme libre, les toxines de ce groupe ont un poids moléculaire inférieur à 500 Da et la fraction libre représente seulement une faible part (moins de 10%) de la concentration plasmatique totale de ces toxines. La fraction restante est constituée des toxines de ce groupe qui sont liées à l'albumine et dont le poids moléculaire apparent est supérieur à 60 kDa. Ce groupe intègre, entre autres, l'acide indole acétique (175 Da), le p-crésyl sulfate (188 Da), l'homocystéine (135 Da), la pentosidine (342 Da) et la CML (Carboxymethyl Lysine) (204 Da) (Figure 11).

Au-delà de ce classement, il existe également des substances organiques qui ne sont pas caractérisées comme des toxines urémiques mais qui jouent un rôle similaire à celles-ci dans les altérations induites par l'IRC. C'est le cas du sodium ou du magnésium qui ne sont plus réabsorbés par le rein en IRC ainsi que le potassium ou le calcium qui ne sont plus éliminés. En effet, il a été montré qu'une modification de la concentration plasmatique de ces éléments était associée aux problèmes cardiaques, de fatigue, ou aux problèmes osseux observés en IRC (*Glassock. RJ, 2008, Journal of Renal Nutrition*).

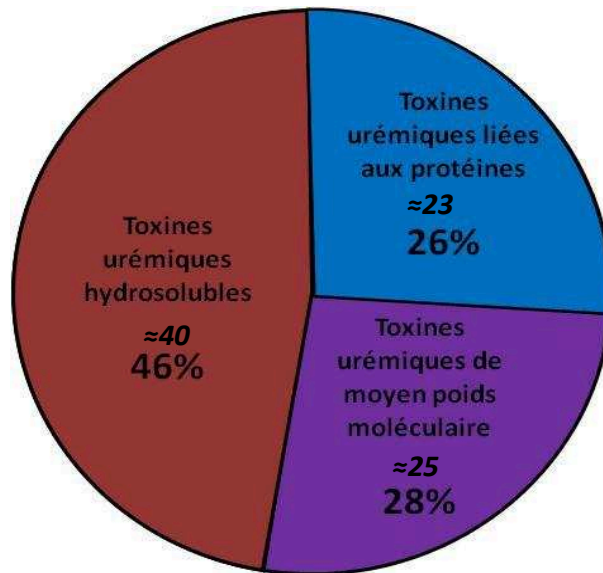


Figure 11 : Classification opérationnelle des toxines urémiques. La majorité des toxines urémiques qui s'accumulent dans les fluides biologiques sont des toxines urémiques hydrosolubles. Les toxines urémiques de moyen poids moléculaire et celles liées aux protéines sont en proportion quasiment identique et, concernant les dernières, seule une faible fraction de celles-ci circule dans le plasma sous forme libre ; (Nombre de toxines et proportion dans le plasma représentés d'après Duranton. F, 2012, *J Am Soc Nephrol*).

3/2/ Production, diffusion et élimination des toxines urémiques

Les toxines urémiques sont des déchets biologiques qui s'accumulent dans la circulation sanguine de trois façons (Evenepoel. P, 2009, *kidney International*). Une partie de ces toxines urémiques ont une origine exogène et se retrouvent dans l'organisme du fait de leur présence dans l'environnement. Elles pénètrent dans l'organisme suite à un contact avec la peau, les poumons ou par l'intermédiaire d'aliments. Beaucoup de toxines génératrices de phénol s'introduisent dans l'organisme par cette voie. On trouve également des toxines d'origine exogène dans les conservateurs ajoutés aux aliments mais aussi dans certains médicaments générateurs de p-crésol. Les AGEs (Advanced Glycation End Product) et l'Oxalate font partie, entre autres, des toxines qui peuvent entrer dans l'organisme par cette voie.

La seconde origine des toxines urémiques est endogène. Elles sont produites lors des différentes réactions métaboliques assurant le fonctionnement de l'organisme et sont, entre autres, l'ADMA, les AGEs, l'Homocystéine et l'Oxalate.

Enfin, la dernière origine, et surtout la principale source de production des toxines, est issue de la digestion des nutriments dans l'intestin et, plus particulièrement, dans le côlon sous

l'action du microbiote. De nombreuses études soulignent l'importance du microbiote intestinal dans la production des toxines urémiques. Aronov. PA *et al*, ont comparé, en 2011, la concentration plasmatique en toxines urémiques chez plusieurs patients insuffisants rénaux ayant subi ou non, préalablement, une colectomie. Il a alors été démontré sans ambiguïté que la concentration plasmatique en toxines urémiques était plus faible chez les patients ayant subi une colectomie que chez les patients atteints du même stade d'insuffisance rénale n'ayant pas été opérés (Aronov. PA, 2011, *J Am SocNephrol*). L'absence d'une partie du côlon et du microbiote intestinal suffit donc à induire une diminution de la concentration plasmatique en toxines urémiques confirmant ainsi le rôle important des bactéries intestinales dans la production de ces dernières lors de la digestion. D'autres études ont également précisé que le microbiote avait plus particulièrement un rôle important dans la production des toxines liées aux protéines. En effet, les AGEs sont issus de la glycation de protéines, de peptides et d'acides aminés dans l'intestin. Le p-crésol, quant à lui, est un composé phénolique issu de la fermentation de la tyrosine et devient du p-crésyl sulfate (108 Da) suite à une sulfo-conjugaison dans les entérocytes. De même, l'indoxyl-sulfate (251 Da) est également une toxine urémique liée aux protéines dont la synthèse nécessite une métabolisation par le microbiote. Le tryptophane est métabolisé en indole dans le côlon puis en l'indoxyl sulfate après passage dans le foie (Figure 12). Enfin, l'acide phenylacétique, l'acide indole 3-acétique et l'homocystéine sont également des toxines produites suite au processus de digestion des nutriments dans l'intestin.

Une fois produites, ces toxines issues de la digestion traversent la barrière intestinale jusqu'à la circulation sanguine. Elles atteignent le foie par la veine porte hépatique où certaines toxines finissent leur métabolisation puis rejoignent la circulation sanguine par la veine cave jusqu'aux artères rénales et sont éliminées dans les urines.

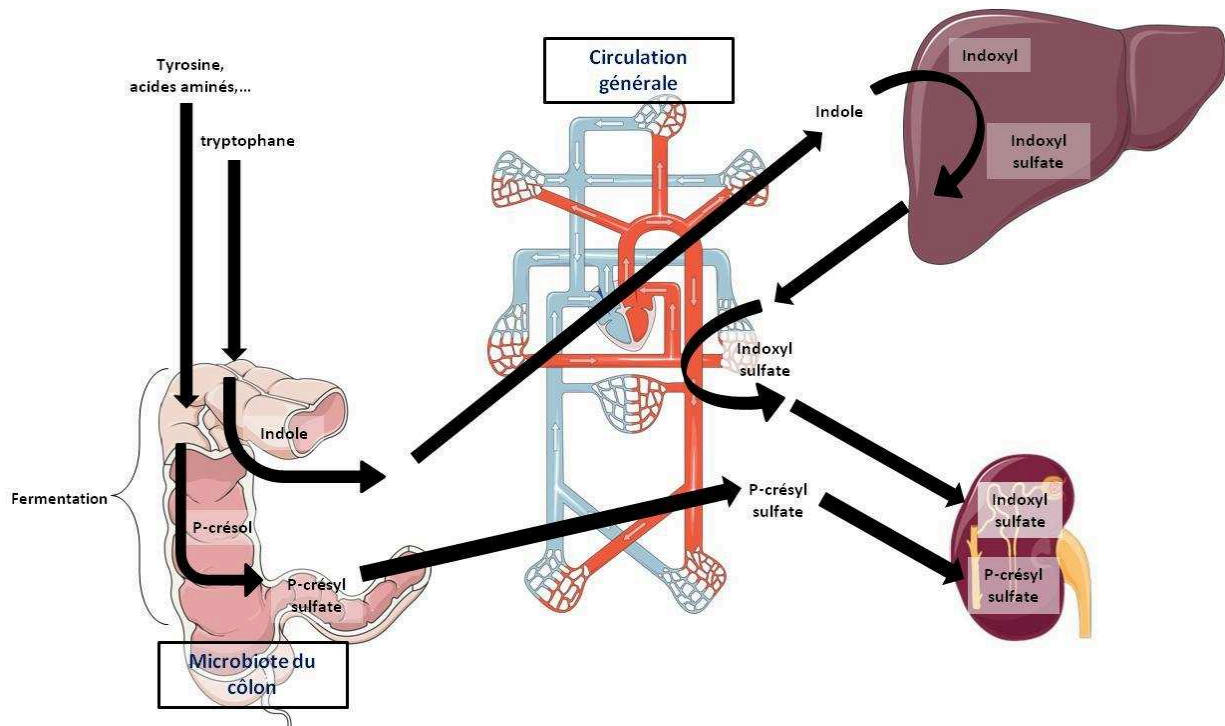


Figure 12 : Schéma récapitulatif de la synthèse du p-crésyl sulfate et de l'indoxyl sulfate. Le p-crésol est synthétisé à partir de la tyrosine, suite à une fermentation par le microbiote intestinal et est sulfaté dans l'entérocyte pour produire le p-crésyl sulfate. Il traverse ensuite la barrière intestinale et rejoint les reins par la circulation sanguine. Le tryptophane, quand à lui, est métabolisé en Indole par l'action du microbiote intestinal. Il rejoint ensuite le foie par la voie sanguine afin d'être, par addition d'un groupement hydroxyle, transformé en Indoxyl puis en Indoxyl-sulfate par sulfo-conjugaison. Il rejoint finalement les reins par la voie sanguine pour être éliminé de l'organisme avec les urines.

4/ Conséquences physiopathologiques de l'accumulation de toxines urémiques dans l'IRC

L'IRC se caractérise par une rétention dans l'organisme de toxines urémiques qui ne peuvent plus être éliminées hors de l'organisme par les reins. Ce processus induit l'apparition de nombreuses pathologies associées à l'IRC et regroupées sous le terme de **syndrome urémique**. Il s'agit notamment de pathologies cardio-vasculaires qui apparaissent très tôt, avant même que la filtration glomérulaire soit insuffisante pour assurer la survie de l'organisme (Vanholder. R, 2008, JASN & Vanholder. R, 2003, *Kidney International*). Les patients souffrent également de pathologies osseuses, de dénutrition, d'anémie et de diabète (Xu. H, 2017, *Nephrology*). Enfin, on observe également des altérations de la fonction et de la structure de l'intestin (Vanholder. R, 2003, *Nephrology & Kalman. RS, 2014, Seminars in Dialysis*).

De nombreuses études ont permis de montrer l'existence d'une corrélation entre la concentration de certaines toxines urémiques dans le sang et l'apparition de certaines pathologies. En 2006, Cheung. AK *et al* ont ainsi démontré une corrélation entre la concentration plasmatique de β 2-microglobuline (β 2-m) et la présence d'amylose, dépôt anormal de protéines amyloïdes dans les tissus, chez des patients atteints d'IRC (Cheung. AK, 2006, *J Am SocNephrol*). De même, les toxines issues des produits finaux de la glycation avancée (AGEs) sont fortement associées à la présence d'inflammations, d'altérations des jonctions serrées endothéliales et à la production de radicaux libres (ROS) (Uribarri. J, 2005, *Ann N Y Acad*). Le p-crésyl sulfate, quand à lui, est une toxine liée aux protéines qui a été beaucoup étudiée pour évaluer l'impact des toxines urémiques sur la progression du syndrome urémique. Il a été montré que sa concentration plasmatique était directement corrélée avec les risques de mortalité cardiovasculaire (Dou. L, 2004, *Kidney Int & Meijers. BK, 2008, Kidney Int*), avec la production de ROS associée à l'IRC (Schepers. E, 2006, *kidney Int & Schepers. E, 2007, Nephrol Dial Transplant*) et avec la mortalité des patients insuffisants rénaux (Bammens. B, 2006, *Kidney Int*). Enfin, concernant l'indoxyl sulfate, une autre toxine liée aux protéines très étudiée, elle a également une concentration plasmatique qui est corrélée à la production de ROS et qui est associée à la présence de certaines maladies cardiovasculaires ainsi qu'à des phénomènes d'apoptose observés en IRC (Dou. L, 2007, *J ThrombHaemost* ; Dou. L, 2004, *Kidney Int & Faure. V, 2005, J ThrombHaemost*).

Concernant l'urée, l'importance de son rôle dans la progression du syndrome urémique est soumise à controverse. Dans une étude faite par WJ Johnson *et al*, en 1972, de l'urée a été ajoutée durant trois mois au dialysat de patients insuffisants rénaux. Les résultats ne montraient aucune différence significative concernant la progression du syndrome urémique entre les patients ayant été traités avec du dialysat supplémenté en urée et ceux traités avec du dialysat non supplémenté (Johnson. WJ, 1972, *Mayo Clin Proc*). Cette conclusion laisse penser que l'urée n'aurait aucun impact significatif sur l'induction des pathologies associées à l'IRC. Cependant, d'autres études tendent vers une conclusion assez différente. En effet, Velasquez. MT *et al*, ont avancé l'hypothèse que l'urée pourrait être à l'origine des problèmes cardio-vasculaires associés à l'IRC. Celle-ci a été établie d'après le fait que l'IRC se définit par une augmentation de la concentration plasmatique d'urée et qu'elle est associée à des risques cardiovasculaires. Or l'urée est une toxine induisant une carbamylation des protéines et cette réaction métabolique est étroitement associée aux maladies

cardiovasculaires. Ainsi donc, Velasquez. MT *et al* ont émis l'hypothèse que l'urée pourrait alors être à l'origine des problèmes cardiovasculaires rencontrés en IRC par la carbamylation de protéines induite par cette toxine urémique (Velasquez. MT, 2015, *kidney Int*). L'urée aurait également un rôle dans l'apparition de l'insulino-résistance associée à l'IRC. En effet, D'Apolito. M *et al*, ont démontré, *in vitro*, que l'addition d'urée dans le milieu de culture de cellules adipocytaires 3T3-L1 induisait une production de ROS et une insulino-résistance. Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris saines dont la concentration plasmatique en urée a été augmentée par des injections. De plus, il a été démontré, dans ce même protocole expérimental, que le fait de traiter, en parallèle des injections, les souris avec un traitement antioxydant améliorait la sensibilité à l'insuline des animaux. L'urée semble donc jouer un rôle important dans l'apparition d'une insulino-résistance en IRC. Son action est associée à une augmentation de la production de ROS (D'Apolito. M, 2010, *J Clin Invest*) et elle contribue à la dysfonction β -pancréatique (Koppe. L, 2016, *J Clin Invest*).

CHAPITRE III : Intestin et syndrome urémique

1/ Altérations fonctionnelles de l'intestin en IRC

Les différents éléments contenus dans le plasma et dont la concentration est modifiée en IRC sont principalement des facteurs inflammatoires et des toxines urémiques. Ils circulent à des concentrations élevées dans les vaisseaux sanguins qui alimentent l'ensemble des organes y compris l'intestin avec lequel ils interagissent. En 2004, Wu. MJ *et al* ont mis en place une expérience qui consistait à faire ingérer à des patients urémiques des microbilles qui, de par leur taille, ne peuvent pas passer la barrière intestinale et parcourent donc la totalité de la longueur du tube digestif. La mesure du temps d'élimination de ces microbilles a permis d'évaluer le temps du transit digestif. Cette étude a démontré que la vitesse de ce transit était presque deux fois plus lente chez les patients urémiques (Wu. MJ, 2004, *Am J Kidney Dis*). En 2017, il a été démontré que cette modification du transit était due à une modification de la fonction motrice du côlon (Wu. GJ, 2017, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*) (Figure 13). Le temps de transit plus long dans le côlon induit ainsi une digestion prolongée du chyme dans cet organe, une fermentation des nutriments par le microbiote plus importante et une augmentation de la production de toxines urémiques en IRC. L'eau est également davantage absorbée ce qui expliquerait les problèmes de constipation dont souffrent fréquemment les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (Sumida. K, 2016, *JASN*).

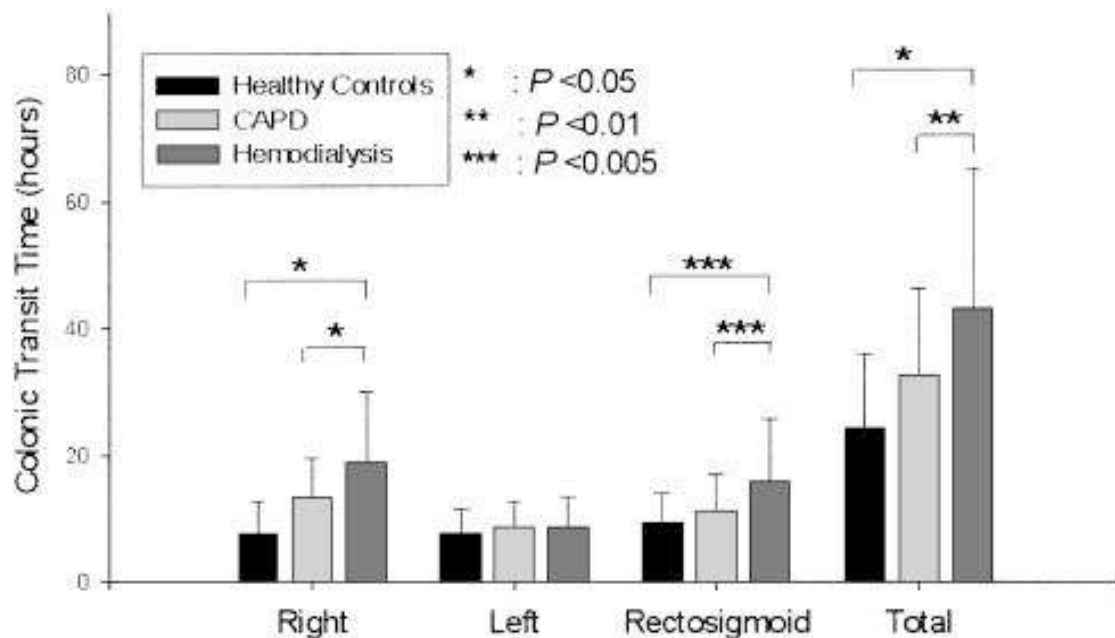


Figure 13 : Etude du transit colique chez les patients insuffisants rénaux chroniques. Des mesures de la vitesse du transit intestinal de plusieurs parties du côlon (Right/droit, left/gauche ou rectosigmoid/terminal) ou de son intégralité (total) ont été réalisées chez des volontaires sains (controls), des patients IRC traités en hémodialyse (Hemodialysis) ou des patients IRC traités en dialyse péritonéale (CAPD : Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis). Les résultats montrent une diminution de la vitesse du transit colique chez les patients IRC, indépendamment du type de dialyse. Ce ralentissement du transit semble être dû à des modifications impliquant principalement la partie droite et la partie terminale du côlon ; (d'après Wu. GJ, 2017, Am J Physiol).

En IRC, la fonction digestive de l'intestin est également altérée du fait d'une modification du microbiote. En effet il y a une réorganisation de celui-ci le long de l'intestin qui se traduit par une migration de bactéries du côlon vers le jejunum (Vanholder. R, 2015, Clin Kidney J). Cette modification de la répartition locale du microbiote intestinal induit ainsi une fermentation des nutriments, et donc une production de toxines urémiques, bien plus tôt et bien plus longue dans le tube digestif mais aussi à des endroits qui ne sont, à l'état physiologique, pas les lieux de tels processus (Sabatino. A, 2015, Nephrol Dial Transplant).

Cette altération de la répartition de la flore microbienne dans l'intestin n'est pas la seule modification observée en IRC. De nombreuses études ont démontré qu'on observe également une modification de la composition de ce microbiote et notamment une augmentation des bactéries putréfactives (Vanholder. R, 2015, Clin Kidney J). Il y a également une augmentation de la quantité de bactéries à l'origine de la production de certaines toxines urémiques particulièrement délétères comme le p-crésol et l'indole (Wong. J, 2014, Am J Nephrol). Enfin, il a été montré qu'une restauration de la flore bactérienne, par

administration de bactéries lactiques par exemple, à des patients IRC diminuait la concentration plasmatique, et donc la production, de p-crésol (*Bammens. B, 2003, Kidney Int & Hida. M, 1996, Nephron*). Ainsi, l'ensemble de ces études soulignent l'importance du lien existant entre une modification de la répartition et de la composition du microbiote avec la progression du syndrome urémique et démontrent que ces modifications vont dans le sens d'une augmentation de la production de toxines urémiques.

2/ Altérations de la fonction barrière de l'intestin en IRC

En IRC, il existe également des modifications structurales de l'intestin, notamment concernant l'organisation, et donc la capacité d'absorption, de la barrière intestinale.

En effet, une étude de Wang. F *et al* a montré, par des quantifications de l'ADN bactérien 16S dans le plasma de patients insuffisants rénaux, que des bactéries normalement exclusivement localisées dans l'intestin étaient détectées dans le sang de 20% des patients IRC. Cette translocation anormale de bactéries à travers la paroi intestinale était, de plus, corrélée à une augmentation de la concentration plasmatique d'interleukine-6 (*Wang. F, 2012, Nephrology*). La perméabilité de la barrière intestinale serait donc augmentée en IRC permettant le passage d'éléments, comme des bactéries du microbiote, dans la circulation sanguine. L'augmentation de cette perméabilité de l'intestin en IRC a également été mise en évidence par des mesures de la concentration de Polyéthylènes Glycols (PEGs) de différentes tailles dans les urines (taille comprise entre 326 et 1244 Da). Ces derniers ont été administrés par voie orale à des patients urémiques puis un prélèvement urinaire a été réalisé après 6h, 24h ou 48h. Chez les patients insuffisants rénaux, la taille des PEGs retrouvés dans les urines était plus importante que celle de ceux retrouvés dans les urines des volontaires sains appuyant l'hypothèse d'une augmentation de la perméabilité intestinale en IRC (*Magnusson. M, 1991, Gut*).

La régulation de la perméabilité intestinale est assurée principalement par les protéines des jonctions serrées : Occludine, JAM-A, Claudine-1 et ZO-1. Une altération de la structure ou de la fonction de ces protéines induit une altération de l'espace intercellulaire et donc de la perméabilité intestinale. En 2012, Vaziri. ND *et al* ont étudié l'expression et l'abondance de ces protéines en IRC. Il a été démontré que cette pathologie était associée à

une diminution de l'abondance des protéines des jonctions serrées Occludine, ZO-1 et Claudine-1 dans le côlon ascendant et descendant de rats rendus insuffisants rénaux par néphrectomie subtotale ainsi qu'à une augmentation de la perméabilité intestinale. Des résultats similaires ont été obtenus en incubant des cellules coliques T84 avec du plasma humain de volontaires sains (CTL) ou du plasma de patients IRC hémodialysés (HD). Les études *in vivo* de cette même équipe ont permis également de mettre en évidence que cette augmentation de la perméabilité intestinale observée en IRC était associée à une augmentation de l'expression de l'Occludine et de ZO-1 dans le côlon ascendant (Vaziri. ND, 2012, *Nephrol Dial Transplant* & Vaziri. ND, 2012, *Am J Nephrol*) (Figure 14). L'ensemble de ces études démontrent que l'IRC est associée à une altération de la régulation des protéines des jonctions serrées induisant une augmentation de l'espace entre les entérocytes adjacents et donc de la perméabilité intestinale. L'étude *in vitro* sur les cellules T84 incubées avec du plasma humain, faite par Vaziri. ND *et al*, apporte une information supplémentaire intéressante quand à l'origine des acteurs impactant la perméabilité intestinale et la régulation des protéines de jonctions serrées. En effet, dans cette étude le plasma HD suffit, à lui seul, à induire des altérations de la barrière intestinale ce qui suggère que les principaux éléments impactant significativement la structure de l'intestin s'accumulent dans le plasma urémique.

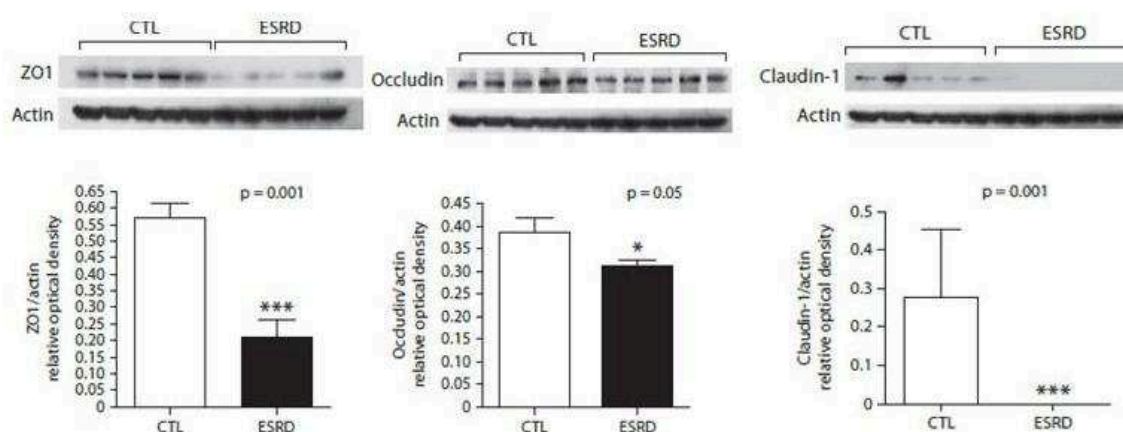


Figure 14 : Impact du plasma urémique sur la perméabilité intestinale. Les protéines contribuant au maintien et à la régulation des jonctions serrées (ZO-1, Occludine et Claudine-1) ont été quantifiées dans des cellules T84 incubées 24h avec du plasma humain sain (CTL) ou urémique prélevé avant dialyse (End Stage Renal Disease, ESRD). Il a été montré que le plasma urémique suffisait, à lui seul, à induire une altération des protéines ZO-1, Occludine et Claudine-1 des jonctions serrées et donc à augmenter la perméabilité de la monocouche de cellules T84 ; (d'après Vaziri. ND, 2012, *Am J Nephrol*).

En IRC, on observe donc, en plus des modifications de la fonction et de la composition intestinale, une altération de la fonction de la barrière de l'intestin induite par une modification de la régulation des protéines des jonctions serrées. L'espace intercellulaire et donc la perméabilité intestinale est augmentée. Les éléments qui impactent significativement cette modification de la barrière intestinale se trouvent de façon anormale ou en concentration différente de celle mesurée à l'état physiologique dans le plasma des patients urémiques suggérant ainsi l'implication des toxines urémiques.

3/ Impact des toxines urémiques sur la perméabilité intestinale

3/1/ Impact des toxines urémiques

En IRC, les toxines urémiques s'accumulent dans les fluides biologiques et, comme ce sont majoritairement des produits issus de processus métaboliques indispensables à la survie de l'organisme (digestion,..), leur production reste continue. Ces toxines ne sont pas les seuls éléments qui s'accumulent de façon continue dans le plasma en IRC cependant leur étude reste pertinente dans la compréhension des altérations intestinales qui sont associées au syndrome urémique. En effet, il s'agit de solutés dont la concentration plasmatique est corrélée au débit de filtration glomérulaire. De plus, ce sont des solutés dont l'implication dans de nombreuses pathologies est déjà bien établie. Peu d'études existent concernant l'impact des toxines urémiques sur la fonction et la structure intestinale mais l'hypothèse d'un impact significatif de celles-ci sur les altérations de l'intestin observées en IRC est soutenue par plusieurs données bibliographiques. Tout d'abord, le côlon est décrit comme le site principal de production des toxines urémiques via le processus de fermentation induit par le microbiote. Or il a été démontré qu'une réduction de la surface d'absorption du côlon et de la flore bactérienne chez des patients IRC ayant subi une colectomie suffisait à ralentir la progression du syndrome urémique y compris les altérations de la barrière intestinale (Aronov. PA, 2011, *J Am SocNephrol*). Les toxines produites par le microbiote semblent donc être fortement impliquées dans les altérations de l'intestin associées à l'IRC. L'étude de 2012 de Vaiziri. ND *et al* confirme cette hypothèse. En effet, du plasma HD riche en toxines urémiques incubé avec des cellules T84 suffit à induire une augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire associée à une altération des jonctions serrées. Par conséquent

ces toxines restent des candidats intéressants pour expliquer les altérations intestinales observées dans l'IRC (Vaziri. ND, 2012, *Nephrol Dial Transplant* & Vaziri. ND, 2012, *Am J Nephrol*).

D'autres études ont tenté de préciser davantage la nature de ces toxines. Concernant l'urée, son implication dans ce processus a été étudiée par une étude de Vaziri. ND *et al*, en 2013. Des cellules T84 ont été incubées 24h avec de l'urée à différentes concentrations (0,42 ou 72 mg/dL) supplémentée ou non avec de l'uréase. La TEER et l'abondance de certaines protéines des jonctions serrées (Occludine, ZO-1 et Claudine-1) ont été mesurés et il a été montré que la TEER et l'abondance des protéines des jonctions serrées sont diminués après incubation avec des concentrations en urée de 42 mg/dL (Figure 15). Enfin, cette diminution était encore plus importante si, en plus de l'urée, les T84 étaient incubées avec de l'uréase (Vaziri. ND, 2013, *Am J Nephrol*) (Figure 16). L'uréase est une enzyme exprimée par certaines bactéries intestinales qui, au contact de l'urée, catalyse la réaction de transformation de celle-ci en dioxyde de carbone et en ammoniac. D'après les résultats obtenus par Vaziri. ND *et al* l'ammoniac issu de la transformation de l'urée par l'uréase pourraient jouer un rôle significatif dans l'augmentation de la perméabilité intestinale associée à l'IRC. Cette hypothèse est confirmée par l'étude de Hughes. R *et al* qui a montré que l'incubation d'ammoniac, produit issu de cette réaction, avec des cellules Caco-2 suffisait à altérer la barrière formée par la monocouche de cellules (Hughes. R, 2008, *Nutrition and Cancer*). Pahl. MV *et al* soutiennent également, dans une étude de 2015, l'hypothèse d'un impact significatif de l'ammoniac en suggérant l'idée que ce pourrait être non pas l'urée directement mais son sous-produit l'ammoniac qui, en faisant varier le pH du tube digestif, serait à l'origine de l'augmentation de la perméabilité intestinale observée en IRC (Pahl. MV, 2015, *Semin Dial*).

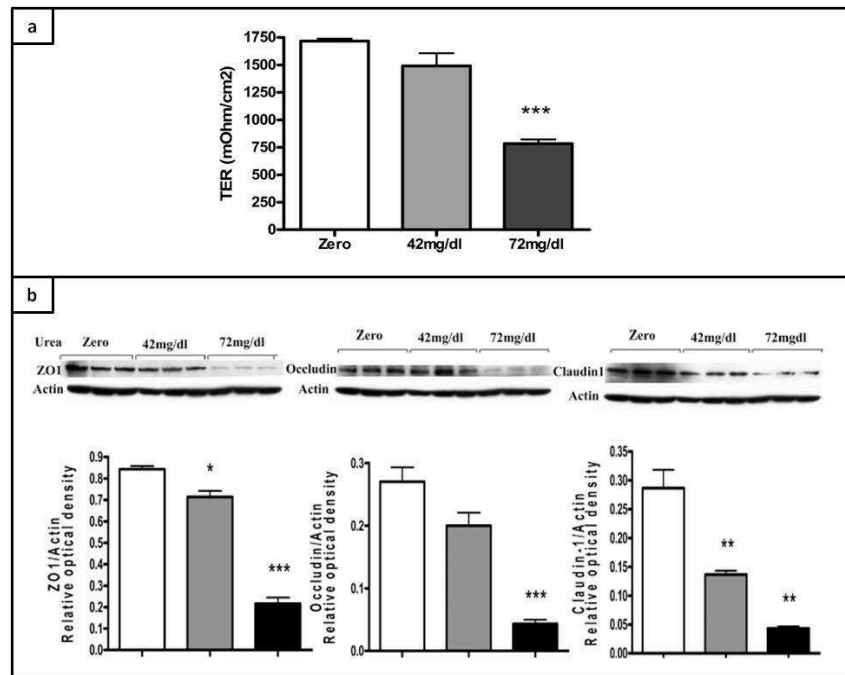


Figure 15 : Impact de l'urée sur la perméabilité intestinale. L'urée induit une diminution de la TEER de la monocouche cellulaire (a) ainsi qu'une diminution de l'abondance des protéines des jonctions serrées (b) ; (d'après Vaziri. ND, 2012, Am J Nephrol).

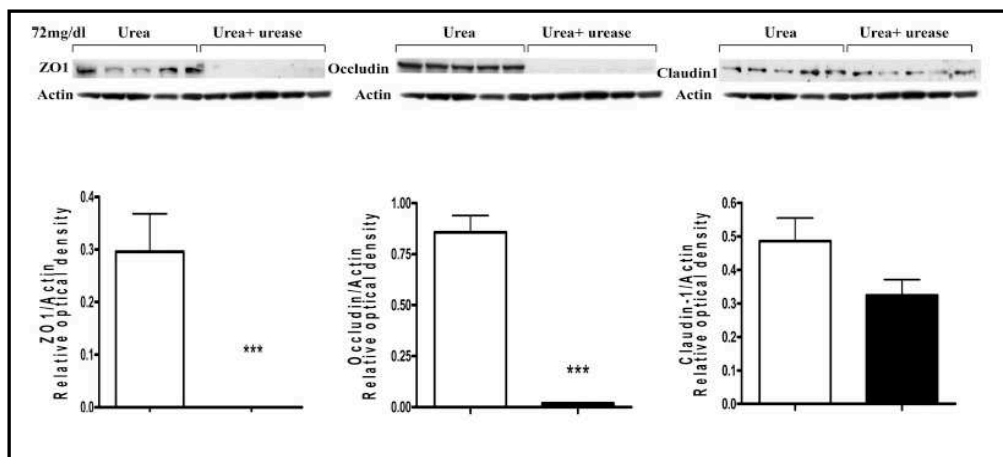


Figure 16 : Impact de l'urée et de l'uréase sur la perméabilité intestinale. L'ajout d'uréase potentialise l'effet toxique de l'urée en augmentant davantage la perméabilité de la monocouche cellulaire ; (d'après Vaziri. ND, 2012, Am J Nephrol).

D'après ces différentes études, il semble établi que l'urée est une toxine urémique impliquée dans l'augmentation de la perméabilité intestinale. Cependant certaines études nuancent en revanche l'hypothèse que l'impact de l'urée dans ce processus soit significatif. En effet, dans une étude de Vaziri. ND *et al*, des cellules T84 ont été incubées avec du plasma urémique prélevé avant dialyse (pré-dialyse) ou bien avec du plasma urémique prélevé après dialyse (post-dialyse) (Vaziri. ND, 2012, *Am J Nephrol*). Les résultats obtenus ont alors montré que la perméabilité de la monocouche de cellules incubées avec du plasma pré-dialyse était plus importante que celle des cellules incubées avec du plasma post-dialyse. Cette observation permet de conclure que certains éléments responsables de l'altération de la perméabilité intestinale en IRC sont des éléments du plasma qui sont en partie dialysables. Or l'urée est une toxine urémique hydrosoluble qui est aisément dialysée appuyant ainsi l'hypothèse d'une action de celle-ci sur la structure de la barrière intestinale. Cependant, dans cette même étude, il a aussi été montré que l'incubation de cellules T84 avec du plasma post-dialyse ne rétablit pas pour autant une perméabilité de la monocouche cellulaire identique à celle des cellules incubées avec du plasma contrôle (Figure 17). Ce résultat souligne ainsi que, si certains éléments impactant la perméabilité intestinale sont dialysables comme l'urée, ce ne sont peut être pas les candidats les plus pertinents pour expliquer les altérations de la barrière de l'intestin en IRC.

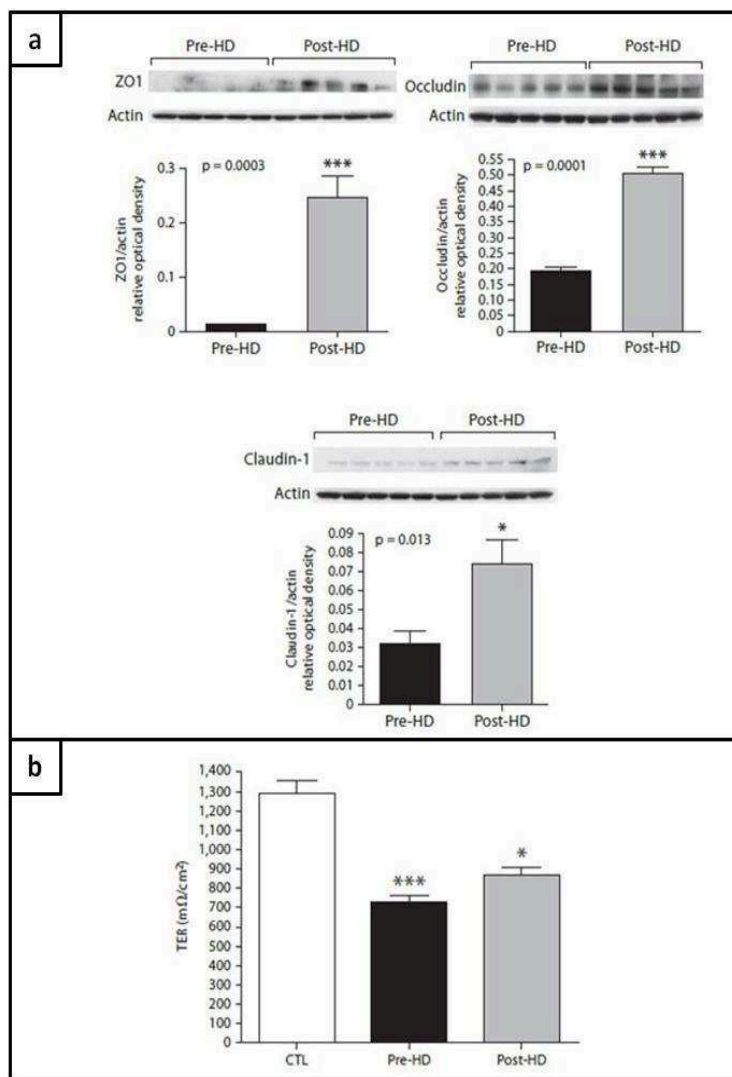


Figure 17 : Etude de l'effet du plasma urémique pré-HD ou post-HD sur la perméabilité intestinale. Des cellules T84 ont été incubées 24h avec du plasma urémique prélevé avant ou après dialyse (pre-HD et post-HD respectivement). On observe que les cellules incubées avec du plasma urémique pre-HD ont une perméabilité de la monocouche cellulaire beaucoup plus importante et une abondance des protéines de jonctions serrées plus faible qu'avec du plasma post-HD (a). Cependant, la TEER des cellules incubées avec du plasma post-HD reste significativement plus bas que celui des cellules incubées avec du plasma contrôle (CTL) (b) ; (Vaziri. ND, 2012, *Am J Nephrol*).

3/2/ Impact des toxines urémiques liées aux protéines

De nombreuses pistes suggèrent que les toxines urémiques liées aux protéines pourraient être responsables des altérations de la perméabilité intestinale observées en IRC. En effet, elles appartiennent au seul groupe contenant des éléments qui ne peuvent pas être éliminés par dialyse et cette propriété pourrait expliquer pourquoi les cellules T84 exposées à du plasma post-dialyse gardaient tout de même une perméabilité intestinale altérée

(Vaziri. ND, 2012, *Am J Nephrol*). De plus, l'impact de certaines de ces toxines liées aux protéines sur la barrière intestinale a été démontré dans des études comme, par exemple, les composés phénoliques qui incubés avec des Caco-2 induisent une diminution de la TEER de la monocouche cellulaire (Hughes. R, 2008, *Nutrition and cancer*).

Les stratégies thérapeutiques, qui se sont développées dans l'objectif de limiter l'accumulation plasmatique des toxines urémiques liées aux protéines en IRC appuient également cette hypothèse. Ainsi, il a été montré qu'on observe un ralentissement de la progression du syndrome urémique et de l'altération de la perméabilité intestinale chez des patients urémiques qui diminuaient leur apport en protéines, ces dernières étant les précurseurs de certaines toxines liées aux protéines comme l'indole ou le p-crésol. Cependant, les protéines étant indispensables à la survie de l'organisme, cette restriction induit des risques de malnutrition et ne s'avère donc pas être une solution de traitement pérenne (Bammens. B, 2003, *kidney Int*). De la même façon, il a été montré que les régimes riches en fibres induisent une diminution de la concentration de p-cresyl sulfate et de la concentration d'indoxyl sulfate associées une amélioration de la structure intestinale. Cependant, les aliments riches en fibres sont le plus souvent également riches en potassium et contribuent à l'hyperkaliémie souvent associée à l'IRC (Poesen. R, 2013, *Semin Dial*).

L'hypothèse d'un rôle important des toxines urémiques liées aux protéines dans les altérations de l'intestin en IRC est également appuyée par les résultats obtenus par les stratégies thérapeutiques visant à rétablir la normobiose du microbiote, principal producteur de ce groupe de toxines. Il s'agit principalement de stratégies centrées sur l'administration aux patients IRC d'antibiotiques, de prébiotiques comme les fibres solubles (Bliss. DZ, 1996, *Am J Clin Nutr*) ou de probiotiques. Il a ainsi été montré, par exemple, qu'une alimentation supplémentée en probiotiques *lactobacillus reuteri* ZJ617 et en *lactobacillus rhamnosus* GG normalisait la perméabilité intestinale et la production de lipopolysaccharides, ces derniers étant fortement impliqués dans les inflammations intestinales (Cui. Y, 2017, *Oncotarget*). De même, il a été montré que l'incubation de probiotiques issus de souches de bactéries lactiques (128, 131 et CELL_2) avec des cellules Caco-2 corrige la TEER. En modifiant le microbiote, et donc la quantité de toxines liées aux protéines produites dans le côlon, les altérations de l'intestin sont minorées (Yang. Y, 2017, *Poult Sci*). Toutes les études ne vont pas cependant dans le sens qu'une modification du microbiote assure une restauration de la perméabilité intestinale même si la majorité des

études sur le sujet s'accorde à l'affirmer. En effet, en 2017, Borges. NA *et al* ont démontré qu'une supplémentation en probiotiques *streptococcus thermophilus*, *lactobacillus acidophilus* et *bifidobacterialongum* dans l'alimentation de patients IRC n'induisait aucune diminution de la concentration plasmatique en marqueurs inflammatoires (C-reactive protein et interleukine-6) et, contre toute attente, une augmentation de la concentration plasmatique en urée, en potassium et en indoxyl-sulfate (Borges. NA, 2017, *J Ren Nutr*).

Enfin, d'autres stratégies thérapeutiques visant à diminuer l'absorption de toxines urémiques par l'épithélium intestinal ont permis de montrer qu'une diminution du temps de digestion des aliments dans le côlon par l'utilisation de laxatifs, par exemple, induit une diminution de la fermentation à l'origine de la production de toxines urémiques liées aux protéines, une diminution de l'absorption des toxines par la barrière épithéliale et une diminution des altérations de la perméabilité intestinale. Une interaction plus faible des toxines urémiques liées aux protéines avec les entérocytes permet donc une restauration de la barrière tissulaire. Cependant, si les conséquences observées par l'utilisation de laxatifs permettent d'appuyer l'hypothèse d'un impact important des toxines liées aux protéines sur la régulation de la perméabilité intestinale, l'utilisation excessive de ces produits est aussi à l'origine de carences alimentaires et de déshydratations ce qui ne permet pas une utilisation courante des laxatifs en thérapie (Poesen. R, 2013, *semin Dial*). Enfin, mis à part ces laxatifs, l'absorption intestinale de toxines peut également être diminuée avec la prise d'AST-120 (Kremezin®). C'est un chélateur de toxines comme le p-crésyl sulfates, l'indoxyl sulfate ou les AGEs. Il a été démontré qu'un traitement à l'AST-120 ralentissait la progression du syndrome urémique et l'altération de la barrière intestinale (Ueda. H, 2007, *TherApher Dial & Ueda. H, 2008, Ren Fail*). L'AST-120 est un traitement efficace permettant de diminuer significativement la clairance de la créatinine plasmatique dont la mesure permet d'évaluer l'insuffisance rénale (Yoshida. I, 2009, *Nihon Jinzo Gakkai Shi*) et son administration par voie orale à des rats IRC induit une restauration de l'abondance des protéines des jonctions serrées et donc de la perméabilité intestinale ainsi qu'une diminution des marqueurs de stress oxydant et d'inflammation au niveau de l'intestin (Vaziri. ND, 2013b, *Am J Nephrol*). Cependant si l'AST-120 induit bien des améliorations concernant de nombreuses pathologies associées à l'IRC dont celles concernant la perméabilité intestinale, elle ne permet pas pour autant d'arrêter la progression du syndrome urémique (Csaba. P, 2011, *Dial Transplant*). Quoi qu'il en soit, la diminution de l'interaction des toxines liées aux protéines avec l'intestin

grâce au chélateur AST-120, tout comme les autres stratégies mentionnées, induit bien une amélioration de la physiologie intestinale en IRC et appuie l'hypothèse d'un impact significatif de ce groupe de solutés sur les altérations de l'intestin associées à l'insuffisance rénale.

Ainsi, partant des résultats de ces différentes expériences, nous avons tout d'abord étudié le transit, la motilité et la perméabilité intestinale afin d'évaluer précisément les dérégulations de l'intestin en IRC, comparativement avec les publications existantes. Puis nous avons tenté de préciser les acteurs responsables de ces altérations de l'intestin en IRC.

Deuxième partie :

Travail personnel

CHAPITRE I : Matériel & méthodes

1/ Plasmas et toxines choisis pour l'étude

Du plasma a été prélevé chez des volontaires sains (CTL) ou chez des patients insuffisants rénaux hémodialysés avant une séance de dialyse (HD). Les plasmas ont été stérilisés par filtration (filtre PTFE 0,22 μm). Des pools ont ensuite été réalisés pour chaque groupe et les aliquots ont été conservés à -20°C .

Le plasma ultrafiltré a été obtenu en plaçant du plasma CTL ou HD dans le compartiment supérieur des tubes d'ultrafiltration (cut-off 5 kDa). Les tubes sont ensuite centrifugés 1h-1h30 à 13 000rpm, à température ambiante. Cette centrifugation permet une séparation physique des éléments du plasma en fonction de leur poids moléculaire. On obtient ainsi du plasma ultrafiltré contrôle CTLU ou urémique HDU dans le compartiment inférieur contenant l'ensemble des composants du plasma de poids moléculaire (PM) inférieur à 5 kDa. Le compartiment supérieur contient, quand à lui, du plasma filtré contrôle CTLUF ou urémique HDUF contenant les composants du plasma avec un poids moléculaire supérieur à 5 kDa.

Le plasma HD dialysé (HDD) est obtenu en plaçant 1mL de plasma HD dans un boudin de dialyse qui est ensuite laissé une nuit, à 4°C , dans un bac de 3L de NaCl (9g/L). Le boudin de dialyse possède une membrane permettant de retenir l'ensemble des composants du plasma de poids moléculaire supérieur à 5 kDa. Le plasma HDD est donc assez similaire au plasma HDUF hormis sur deux points. Tout d'abord, contrairement à la centrifugation qui induit le passage de la totalité de l'eau à travers la membrane, la dialyse conserve un équilibre dans la quantité d'eau de part et d'autre de la membrane du boudin. Ensuite, la dialyse du plasma permet de déplacer les toxines liées aux protéines de l'albumine qui peuvent donc traverser la membrane du boudin (PM 60 kDa liées à l'albumine et < 500 Da sous forme libre). Ainsi le plasma HDD, contrairement au plasma HDUF où les toxines restent liées à l'albumine, ne contient aucune toxine liée aux protéines.

Concernant les toxines urémiques choisies pour l'étude, les concentrations ont été définies selon celles répertoriées par l'European Uremic Toxin Work Group (EuTox Database, www.uremic-toxins.org), base de données utilisée comme référence depuis longtemps pour

les études impliquant ces toxines. Ainsi, toutes les études *in vitro* ont été réalisées en accord avec les recommandations de l'EuTox (Cohen. G, 2007, *Nephrol Dial Transplant*).

2/ Culture cellulaire

Les cellules choisies pour les études *in vitro* sont des cellules Caco-2 issues d'une lignée de cellules tumorales de l'épithélium colorectal humain (ATCC[®] HTB-37[™], LC-GC, Molsheim, France). Les cellules sontensemencées dans des plaques 12 puits (30.10⁴ cellules par puit) ou dans des plaques 12 puits transwells (6.10⁴ cellules au pôle apical de chaque puit) puis cultivées trois semaines à 37°C, 5% de CO₂.

Dans les plaques 12 puits, les Caco-2 sont cultivées trois semaines dans un milieu composé de DMEM-GlutaMAX 1X (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) en provenance de Gibco et contenant 4,5g/L de D-glucose sans sodium-pyruvate ni HEPES. Le DMEM est supplémenté avec 10% (vol/vol) de sérum de veau fœtal (SVF), 100 units/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine.

Dans les systèmes transwells (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France), les Caco-2 sont cultivées une semaine dans un milieu identique à celui décrit plus haut puis deux semaines avec ce même milieu au pôle basal mais sans SVF 10% (vol/vol) au pôle apical (Figure 18).

La veille de l'expérience, les cellules sont incubées pendant 24h avec 10% (vol/vol) de SVF, de plasma CTL ou de plasma HD directement dans les puits pour les plaques 12 puits et au pôle basal pour les systèmes transwells. La mesure de la résistance électrique membranaire (TEER) est réalisée en utilisant un appareil Millicell ERS-2 Meter (Merck Millipore, Paris, France).

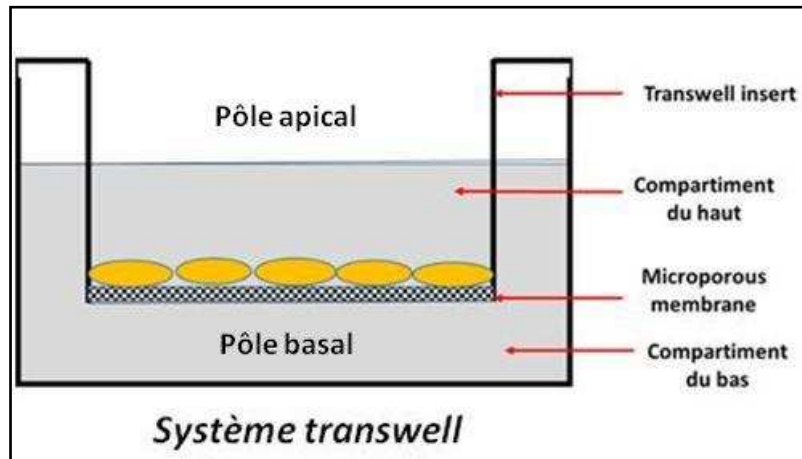


Figure 18 : Structure d'un système transwell. Un système transwell se décompose en deux compartiments séparés par une membrane hémiperméable. Les cellules sont cultivées sur cette membrane. La présence de deux compartiments permet l'incubation des cellules dans des milieux (au pôle apical et au pôle basal des cellules) différents et de pouvoir mesurer le potentiel électrique de part et d'autre de la monocouche cellulaire (TEER).

3/ Animaux

Les expérimentations animales ont été réalisées sous l'autorisation n°69-266-0501 (CarMeN lab, Direction Départementale des Services Vétérinaires du Rhône) et toutes les expériences ont été réalisées en accord avec les directives du Ministère de l'agriculture ainsi que les directives européennes 2010/63UE.

Les animaux utilisés pour l'étude sont des souris mâles C57Bl/6 âgées de trois semaines en provenance de Janvier SA (Le Genest-Saint-Isle, France). Les souris sont élevées dans une animalerie à température ($21 \pm 0.5^\circ\text{C}$) et humidité (60-70%) contrôlées. Elles sont soumises à un cycle jour/nuit 12/12h (lumière de 07:00 à 19:00) avec un libre accès à de la nourriture standard (STD) (A04, SAFE, Augny, France, 3,34 Kcal/g) et à de l'eau.

L'insuffisance rénale est induite chez les souris par néphrectomie chimique en les nourrissant pendant trois semaines avec un régime contenant 0,25% (wt/wt) d'adénine sur une base A04. Cette dernière est immédiatement métabolisée en 2,8-dihydroxyadénine qui précipite et forme des cristaux dans les tubules rénaux à l'origine d'une dégénérescence tubulaire. Après 16 jours de régime, les souris insuffisantes rénales chroniques (souris IRC) sont de nouveau nourries avec un régime STD pendant environ vingt jours (Figure 19).

Les souris IRC et les souris contrôles (souris CTL) sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (70 mg/kg, Ceva Santé Animale, France) ou par

inhalation au CO₂ en accord avec les directives de l'Association Américaine Médicale Vétérinaire (AVMA). Le protocole expérimental a été approuvé par le comité d'éthique de l'INSA-Lyon (CETIL, CNREEA n°102).

Le sang des animaux anesthésiés est prélevé par ponction cardiaque sur seringue héparinée. Le sang est centrifugé 2min à 3500rpm. Le plasma est ensuite récupéré, congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

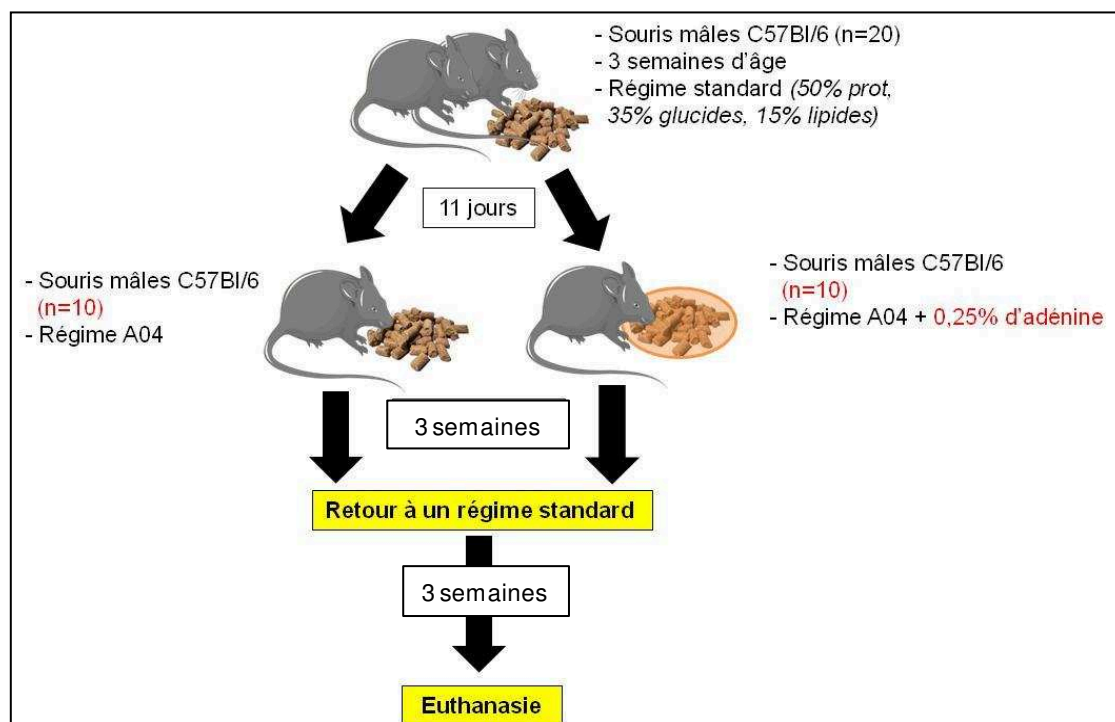


Figure 19: Protocole de néphrectomie chimique chez la souris. Vingt souris mâles C57Bl/6 ont été divisées en deux groupes après avoir été alimentées 11 jours avec le même régime STD (A04). Dix d'entre elles ont été alors nourries trois semaines avec un régime enrichi en adénine (0,25% wt/wt d'adénine) tandis que les 10 souris contrôles sont maintenues sous régime STD. Après trois semaines, toutes les souris sont renourries avec un régime STD pendant une vingtaine de jours.

4/ Dosage de l'urée

L'urée est le produit final majeur du catabolisme des protéines et sa concentration plasmatique est un index commun de fonction rénale. Le dosage plasmatique de l'urée a été réalisé avec un kit colorimétrique enzymatique (Laboratoire SOBIODA, Montbonnot, France). Dans une plaque 96 puits 100µL du réactif R1-R3 est déposé dans chaque puit. Dix microlitres de plasma dilué au 1/10ème ou de standard sont ajoutés et la plaque est incubée

pendant 10min à température ambiante. Cent microlitres du réactif R2 est ensuite ajouté dans chaque puit et, après 10min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 582nm.

5/ Etude du transit digestif

5/1/ Mesure du temps de transit gastrointestinal

Le rouge carmin est un colorant inerte qui n'est pas absorbé lors du transit intestinal et se retrouve donc entièrement éliminé dans les matières fécales. Une analyse de la durée de trajet du colorant dans le tube digestif permet ainsi de calculer le temps du transit gastrointestinal. Les souris sont mises à jeun pendant la nuit précédant l'expérience. Elles sont gavées avec 250-300µL de rouge carmin à 6% (wt/vol, Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) dilué dans 0,5% de méthyl cellulose (vol/vol). Un contrôle visuel régulier est ensuite réalisé afin de mesurer le temps d'apparition des premières fèces colorées en rouge.

5/2/ Mesure du transit colique

Afin de définir la motilité du côlon descendant, les souris sont mises à jeun une nuit puis une bille de 3mm de diamètre est insérée dans le côlon descendant. Le temps nécessaire à l'expulsion de la bille est ensuite mesuré.

5/3/ Collecte des fèces et mesure de l'eau fécale

Les souris sont placées pendant trois jours dans des cages métaboliques avec de l'eau et de la nourriture ad libitum. Chaque jour les fèces sont collectées, comptées et pesées. Pour mesurer le pourcentage d'hydratation, les fèces sont collectées pendant une heure et pesées sur une balance analytique. Les fèces sont séchées pendant 24h dans une étuve à

60°C et sont de nouveau pesées afin de définir la masse sèche. La différence entre poids sec et poids frais permet ainsi de définir le taux d'hydratation des fèces.

6/ Etude de la motilité intestinale *ex vivo*.

6/1/ Impact de l'IRC sur la motilité intestinale

Des souris IRC et CTL sont euthanasiées après une nuit de jeun. Des segments de côlon descendant ou de duodénum sont rapidement prélevés ($\approx 0,5\text{cm}$), placés dans une cuve à organe isolé contenant 20mL de tampon Tyrode¹ à 37°C et continuellement bullés. Le segment d'intestin est relié à un transducteur de force isométrique (AD Instrument, France) connecté à un amplificateur (Powerlab 10T, AD Instrument) et à un système d'acquisition numérique (Chart 5.3, AD Instrument) afin d'enregistrer la contraction isométrique. La tension du système est ajustée à 1g et le tissu est laissé à équilibrer pendant 20-30min puis 1mmol/L de Chlorure de Potassium (KCl) est ajoutée afin de définir la force de contraction maximale.

La force de contraction isométrique est évaluée en mesurant l'amplitude d'une centaine de contractions spontanées et les valeurs sont normalisées par la masse du tissu prélevé (mesuré par pesée sur une balance analytique à l'issue des enregistrements). La fréquence est évaluée en comptabilisant le nombre de contractions de dix séries d'une durée de 20 secs. L'indice de contraction est évalué en définissant le pourcentage de la force de contraction isométrique par rapport à la force de contraction maximale ce qui permet d'évaluer la proportion de force disponible sollicitée à l'état basal. Enfin, l'indice de motilité est évalué en normalisant la force de contraction isométrique par le temps nécessaire à l'induction de cent contractions. L'indice de motilité tient donc compte à la fois de la force émise mais également de sa rapidité d'induction.

¹ Composition du milieu de Tyrode: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, CaCl₂ 0.9 mM, MgCl₂ 0.5 mM, NaH₂PO₄ 0.4 mM, NaHCO₃ 11.9 mM et D-glucose 5.5 mM ajusté à pH7.

6/2/ Impact du plasma urémique sur la motilité du côlon descendant

Un prélèvement tissulaire de côlon descendant de souris CTL a été réalisé comme décrit ci-dessus. Ce fragment de côlon a été incubé pendant 2 heures dans du milieu de Tyrode contenant 20% (vol/vol) de plasma de patients CTL ou HD. Après changement du bain, différentes concentrations de Bethanechol ($5 \cdot 10^{-7}$, 10^{-6} , $5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ et 10^{-4} M) qui est un agoniste des récepteurs cholinergiques muscariniques ont été ajoutées au milieu afin de stimuler la contraction du côlon et de mesurer sa réactivité. La force de contraction est normalisée à la masse du tissu (mesurée par pesée sur balance analytique à l'issue des enregistrements).

7/ Mesure de la cytotoxicité des Caco-2

Afin de vérifier que l'incubation des cellules avec du plasma humain n'affecte pas la viabilité cellulaire, un test de cytotoxicité a été réalisé sur des cellules Caco-2 incubées avec 10% (vol/vol) de plasma CTL ou 10% (vol/vol) de SVF. De l'Alamar Blue (abD Serotec Biorad Compagny) 10X est ajouté 4h, à 37°C et 5% de CO₂. Deux mesures spectrophotométriques ont été réalisées à 570 nm et 600 nm afin de calculer le pourcentage de réduction de l'Alamar Blue.

8/ Mesure de la perméabilité intestinale avec la Fluorescéine Isothiocyanate-Dextran (FITC-Dextran)

8/1/ In vivo

Le FITC-Dextran est une molécule fluorescente qui à la propriété de traverser la barrière intestinale uniquement par voie paracellulaire, et donc au niveau des jonctions serrées. Ainsi, plus la perméabilité intestinale est importante plus le FITC-Dextran franchit la barrière rapidement et sa concentration plasmatique est élevée.

Le FITC-Dextran (Sigma-Aldrich, FD4, 4kDa) est administré par gavage aux souris, mises à jeun la nuit précédente. Le FITC-Dextran est dilué dans du PBS (Phosphate Buffered Saline)

pour que sa concentration soit de 44 mg/mL et administré aux souris à raison de 4,4 mg/10 g de la masse corporelle.

Après 4h, les souris sont euthanasiées au pentobarbital (70 mg/kg). Le sang est prélevé par ponction cardiaque, centrifugé 3min à 1000rpm et le plasma prélevé est congelé dans l'azote liquide. Une gamme étalon de FITC-Dextran dilué dans du PBS est préparée et des mesures de cette gamme et des échantillons ont été réalisées par spectrofluorimétrie (Spectrofluorimétrie, Jasco FP 8300 iRM, Vasco, Japon) avec le logiciel Spectro Management (excitation : 485nm ; émission : 528nm).

8/2/ In vitro

Les cellules Caco-2 sont cultivées pendant trois semaines dans des systèmes transwells. A confluence, les cellules sont incubées pendant 24h avec 10% (vol/vol) de SVF, de plasma humain CTL ou HD. Après 24h, le milieu est retiré et 2 mg/mL de FITC-Dextran (Sigma-Aldrich, FD4) dilué dans du HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) est placé au pôle apical des systèmes transwells. Après 1h d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, le milieu basal est prélevé et analysé en spectrofluorimétrie contre une gamme étalon de FITC-Dextran comme décrit pour les études *in vivo*.

9/ Analyse en microscopie à fluorescence

Des cellules Caco-2 sont incubées 24h avec 10% (vol/vol) de SVF, de plasma CTL ou de plasma HD dans un système transwell. Le milieu est ensuite retiré et les cellules sont fixées par ajout de 500µL de méthanol pendant 10min. Après un rapide rinçage au PBS, les cellules sont perméabilisées au triton X100 dilué dans du PBS, 5min, concentration 0,5% (vol/vol). Les cellules sont ensuite incubées pendant 1h avec un anticorps primaire dirigé contre la Claudine-1 ou l'Occludine (Santa Cruz, Heidelberg, Allemagne) dilué au 1/300^{ème} ; puis 30min avec un anticorps secondaire de souris marqué à l'Alexa Fluor (Cell Signaling, Danvers, Etats-Unis) dilué au 1/1000^{ème}. Enfin, la membrane du transwell est découpée et fixée avec un réactif Prolong Gold (Molecular Probes, Eugene, Etats-Unis). Les analyses sont réalisées sur un microscope à fluorescence (WEISS microscope, logiciel AXIOVISION ; excitation :

495nm ; émission : 519nm) et les protéines d'intérêt sont quantifiées grâce au logiciel Image J (<https://imagej.nih.gov/ij>). L'intensité de la fluorescence détectée est normalisée par l'aire totale des cellules analysées.

10/ Western Blot

Les cellules Caco-2 ou les tissus préalablement broyés (intestin ou côlon), sont lysés avec du réactif Cellytic TMM (Sigma Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) supplémenté avec 0,1% (vol/vol) d'EDTA (Ethylène Diamine Tétra-Acétique, 5mM) et 0,1% (vol/vol) de Dithiothréitol (DTT, 1mM) puis congelés. Après une décongélation lente sur glace, les échantillons sont centrifugés 20min, à 4°C, 13 000rpm. Les surnageants sont récoltés et la concentration en protéines est déterminée par la méthode de Bradford. Pour cela, dans une plaque 96 puits, sont mis en duplicat 10µL d'échantillons ou de standard de BSA (Bovine Serum Albumine). Deux cents microlitres du réactif de Bradford (Sigma Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) sont ajoutés et, après une incubation de 10min à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 595nm.

Les échantillons sont dilués de façon à obtenir la même concentration de protéines dans chaque tube puis dénaturés avec du tampon de Laemli 1X pendant 10min, à 75 °C. Vingt microgrammes de protéines sont séparés sur un gel de Polyacrylamide-Dodécylsulfate de Sodium (SDS-polyacrylamide) durant 2h à 0,03 A (BioRad, Hercules, Etats-Unis) dans un système baignant dans un tampon de migration 1X ². Le gel SDS-polyacrylamide est constitué de deux gels : un gel de séparation ³ qui occupe 5/6^{ème} de la partie inférieure et un gel de concentration ⁴ ajouté une fois le premier sec qui occupe le 1/6^{ème} restant. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham TM GE Hybond-ECL, Healthcare, Buc, Yvelines) grâce à un système humide (BioRad, Hercules, Etats-Unis)

² Tampon de migration 10X : 30g de Tris base + 140g de glycine + 10g de SDS (sodium dodecyl sulfate) + 1L d'H₂O.

³ Gel de séparation : H₂O + acrylamide 30% (w/v) + Tris 1,5M à pH 8,8 + SDS 10% (v/v) + PSA 10% (v/v)(ammonium persulfate) + TEMED (N,N,N',N'-tetraméthyléthyldiamine) en quantité variable selon le degré de réticulation souhaité du gel.

⁴ Gel de concentration : 3,4mL d'H₂O + 0,85mL d'acrylamide 30% (w/v) + 0,05mL de SDS 10% (v/v) + 0,625mL Tris 1M à pH 6,8 + 50µL PSA + 5µL TEMED pour un gel.

baignant dans du tampon de transfert 1X⁵, 1h, à 0,3 A. Le système est maintenu au froid en étant placé dans un bain de glace. La membrane est récupérée et saturée 1h, à température ambiante, dans une solution de Tris-Buffered Saline Tween 0,3% (vol/vol) contenant 5% (wt/vol) de BSA (TBST 0,3% : TBS 1X⁶ + 3 mL de Tween).

La membrane est ensuite incubée avec un anticorps primaire anti-Occludine de souris, anti-ZO-1 de lapin ou anti-Claudine-1 de souris (Santa Cruz, Heidelberg, Allemagne) dilué au 1/100^{ème} dans du TBST 0,1%-BSA 5%, pendant une nuit à 4°C. Après trois lavages au TBST 0,1%, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire dilué au 1/3000^{ème} dans du TBST 0,1%-BSA 5%, 1h, à température ambiante. Elle est ensuite de nouveau lavée trois fois au TBST 0,1%. Enfin, la membrane est exposée 5min avec un révélateur (kit ECL, Thermo Fisher, Waltham, Etats-Unis) et la révélation est faite avec un appareil Image Master VDS-Cl (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Royaume Unis). La quantification des protéines est réalisée à l'aide du logiciel Image J. L'abondance des protéines d'intérêt est normalisée à la tubuline. Cette dernière est quantifiée sur la même membrane après que celle-ci ait été deshybridée 15min dans une solution de stripping buffer (BioRad, hercules, Etats-Unis) à température ambiante.

11/ Analyse génomique

Les ARN des cellules Caco-2 et des tissus de souris IRC et CTL ont été extraits par ajout de 1mL de Tri Reagent (Sigma Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France). Ensuite 0,2 volume de chloroforme a été ajouté aux échantillons qui sont centrifugés 15min, à 4°C, 12 000rpm. La phase transparente est récupérée et 1 volume d'isopropanol est ajouté avant de re-centrifuger à nouveau les échantillons pendant 8min, à 4°C, 13 000rpm. Les échantillons ont été lavés trois fois avec de l'éthanol 75% (vol/vol) et centrifugés 5 min, à 4°C, 10 000rpm entre chaque lavage. Le culot est récupéré et 30µL d'eau RNase free ont été ajoutés. Les ARN ont été quantifiés avec un blanc composé d'eau RNase free et des tubes ont été

⁵ Tampon de transfert 10X : 30,3g de tris base + 144g de glycine + 1L d'H₂O.

⁶ TBS (Tris-Buffered Saline) 10X : 24,2g Tris base + 80,2g NaCl + 1L H₂O, pH 7,6.

préparés de telle sorte à avoir 1µg d'ARN dans 10µL. La RT a été obtenue grâce à un kit TAKARA ⁷.

Les échantillons ont ensuite été placés dans un Thermocycler PCP (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) avec un programme adapté RT TA KANA pré-enregistré. Les échantillons dilués au 1/10^{ème} (e10) ont été obtenus en ajoutant 180µL d'eau ARN free aux échantillons et ceux dilués au 1/60^{ème} (e60) ont été obtenus en prélevant 20µL des e10 auquel est ajouté 100µL d'eau ARN free. Les échantillons, dilués au e60 ont été ensuite amplifiés ensuite par QPCR grâce à un logiciel rotor-gene Q. Les amorces utilisées ont été ajoutées à des concentrations de 15 µM (Table 2). La mesure de l'expression des gènes est réalisée en mesurant le ratio de cette expression sur celle du gène de ménage TBP (TATA-Binding Protein).

<i>Tissu</i>	<i>Protéine</i>	<i>Amorce sens</i>	<i>Amorce antisens</i>
Côlon descendant de souris	Occludine	CCACCTATCACTTCAGATCAAC	TCAGCAGCAGCCATGTACTC
Côlon descendant de souris	Claudine-1	TCGACTCCTTGCTGAATCTG	TGCTGTGGCCACTAATGTCTG
Côlon descendant de souris	ZO-1	ACGCATCACAGCCTGGTTG	TGGCTCCTTCCTGTACACC
Cellules Caco-2	Occludine	CCACCTATCACTTCAGATCAAC	TCAGCAGCAGCCATGTACTC
Cellules Caco-2	Claudine-1	ACAGCATGGTATGGCAATAG	GGACAGGAACAGCAAAGTAG
Cellules Caco-2	ZO-1	TAAGCCTCCTGCACACATTG	GGATGGGTTTCATAGCGTTTC

Table 2 : Liste des oligonucléotides utilisés dans les RT-PCR.

12/ Analyse des données

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism v5.0 (GraphPad software, La Jolla, Etats-Unis). Un test de Levene est réalisé pour vérifier l'égalité des variances (homocédasticité). Un test de d'Agostino est réalisé pour vérifier la normalité si n ≥ 8, un test de Shapiro-wilk si n=7 et un test de Kolmogorov-Smirnov si n = [5; 6]. Les comparaisons simples ont été réalisées avec un

⁷ *Dosage du KIT pour 10µL d'échantillon : 4µL de Script Buffer 5X (v/v) + 1µL d'Oligo dT (50µM) + 4µL de Random hexamers (100µM) + 1µL PrimeScript RT Enzyme Mix.*

test de Student pour les données paramétriques et éventuellement une correction de Welch ou un test de Mann-Whitney pour les données non paramétriques. Les comparaisons multiples ont été réalisées avec une ANOVA (test post-hoc de Tukey) pour les données paramétriques ou un test de Kruskal Wallis (test post-hoc Dunns) pour les données non paramétriques. Les résultats sont considérés comme significativement différents lorsque $p < 0,05$.

CHAPITRE II : Résultats

1/ L'IRC est associée à des altérations de la fonction intestinale

1/1/ Validation des modèles in vivo

Les souris C57Bl/6 sont les animaux qui ont été choisis comme modèle d'étude. En effet, le font génétique de ces animaux est parfaitement connu, leur lignée est stable et leur manipulation expérimentale est simple. L'induction de l'insuffisance rénale chez ces souris est induite en supplémentant l'alimentation des animaux, pendant près de trois semaines, avec 0,25% (wt/wt) d'adénine. En effet cette dernière induit la formation de cristaux dans le tube proximal du rein et donc une nécrose tubulaire aigüe à l'origine d'une détérioration de la fonction rénale (Figure 20).

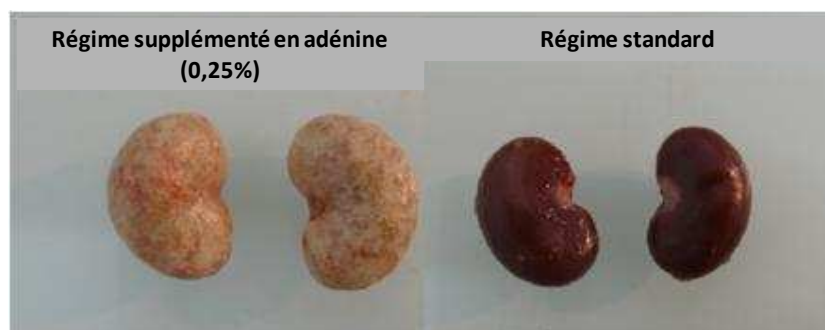


Figure 20 : Vue macroscopique des reins de souris IRC et CTL. L'ajout d'adénine dans l'alimentation des souris induit des modifications structurales et fonctionnelles des reins dont l'aspect fibrotique est visible à l'œil nu.

Afin de vérifier si le protocole impliquant l'ajout d'adénine dans l'alimentation est efficace pour induire une IRC chez la lignée de souris choisies comme modèle *in vivo* dans l'étude, un dosage de la concentration plasmatique en urée a été effectué car c'est une toxine dont la concentration plasmatique est corrélée à la capacité de filtration du glomérule rénal (Figure 21). Les résultats montrent que les souris IRC ont une concentration plasmatique en urée qui est trois fois plus élevée que celle des souris CTL (167 ± 8 mg/dL vs 52 ± 2 mg/dL ; $p < 0,001$). Ainsi, la supplémentation, trois semaines durant, avec 0,25%

(wt/wt) d'adénine dans l'alimentation de souris C57Bl/6 induit bien une dysfonction de la filtration glomérulaire et permet donc de valider le protocole choisi comme étant une méthode pertinente d'induction d'un modèle *in vivo* d'insuffisance rénale.

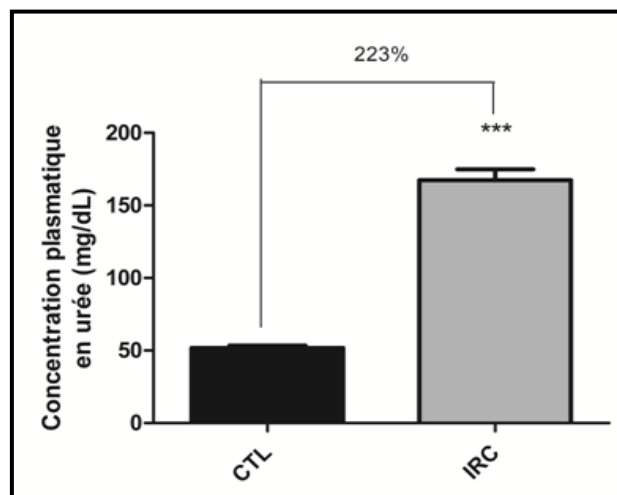


Figure 21 : Concentration plasmatique en urée chez les souris IRC et CTL. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour n=10 souris par groupe. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Student avec une correction de Welch. Les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les souris IRC ont une concentration plasmatique qui est 3 fois supérieure à celle des contrôles ; *** $p < 0,001$.

1/2/ Modifications biologiques associées à l'IRC

Des mesures de la prise alimentaire des souris IRC et CTL ont été réalisées durant l'ensemble du protocole *in vivo* afin de s'assurer que la différence de composition entre l'alimentation des deux groupes de souris (période concernée encadrée sur le graphique) n'induit aucune modification concernant l'appétence des animaux (Figure 22-a). En effet, une variation de l'apport énergétique entre les groupes pourrait être un paramètre à l'origine de modifications biologiques qui ne seraient pas directement liées à l'état d'IRC et qui pourrait biaiser l'étude. Les résultats montrent que les souris IRC ont une appétence plus faible que les CTL dès que leur régime est supplémenté en adénine. Cependant, cette différence n'est pas significative ce qui permet de s'assurer que ce paramètre n'est pas à prendre en considération dans les conclusions faites durant l'étude.

Une mesure du poids des animaux a également été réalisée (Figure 22-b). Les résultats montrent que la masse corporelle des animaux IRC est inférieure à celle des CTL dès lors que

les souris IRC sont nourries avec un régime supplémenté en adénine et que cette différence entre les groupes augmente durant toute la période de maintien de ce régime (encadré sur le graphique, $p < 0,001$). Les deux groupes de souris sont ensuite de nouveau nourris avec un régime STD et le poids des souris IRC augmente de nouveau avec une cinétique similaire à celle des CTL même s'il reste toujours significativement plus bas ($p < 0,001$).

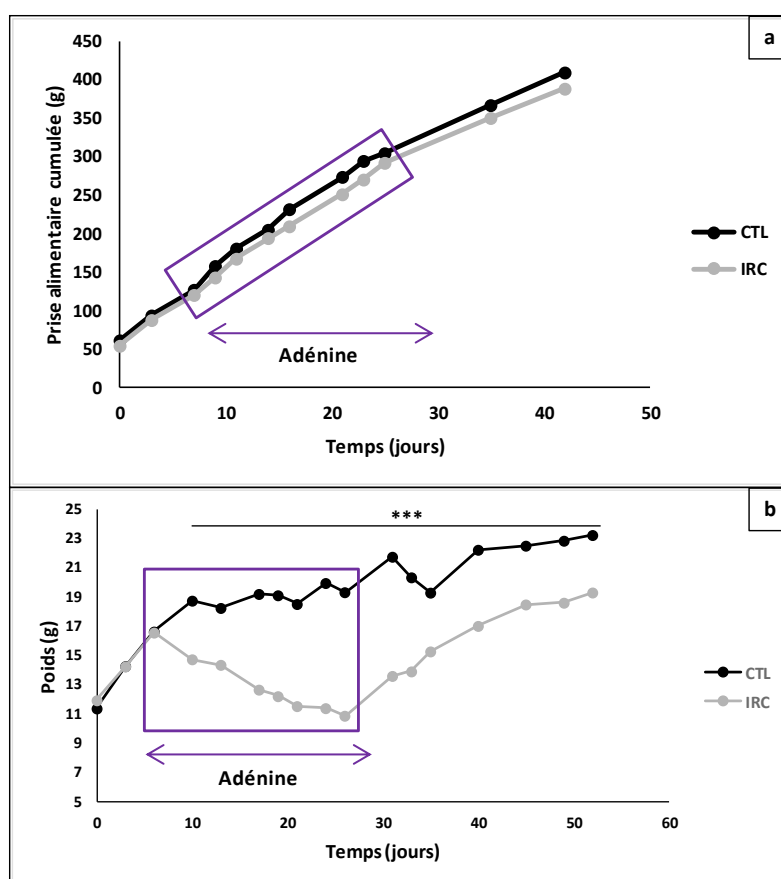


Figure 22 : Mesure de la prise alimentaire cumulée et évolution du poids corporel. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif $n=10$ souris par groupe. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Student avec une correction de Welch. Les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Il n'y a aucune différence significative entre les groupes concernant la prise alimentaire cumulée. En revanche, les souris IRC ont un poids significativement plus bas que les CTL dès supplémentation de leur nourriture en adénine ; $***p < 0,001$.

Les souris IRC et CTL ont ensuite été sacrifiées, elles ont été pesées et les masses de différents organes ont été relevées (Table 3). On observe, tout d'abord, que les souris IRC ont un poids 23% plus faible que les CTL. Concernant les reins, la masse des organes des souris IRC est 39% plus faible que celle des souris CTL ce qui confirme que le régime

supplémenté en adénine induit une dysfonction des reins associée à une atrophie tissulaire. Les masses du foie et du tissu adipeux épидидymal (eTAB) sont identiques entre les deux groupes. En revanche, le tissu adipeux rétropéritonéal (rTAB) des souris IRC a une masse 33% plus faible que celle des souris CTL. Enfin, la masse du cœur des souris IRC est 16% plus élevée que celle des CTL. L'intestin, quand à lui, a également une masse qui est modifiée en IRC. En effet, celle de l'intestin grêle des souris IRC est 15% plus élevée et celle de leur côlon est 23% plus élevée que ceux des CTL. Ainsi, en IRC il y a donc une augmentation de la masse tissulaire de certains organes dont l'intestin grêle et le côlon.

	CTL	IRC	IRC vs CTL	Valeur de p
Poids, g	20,6 ± 0,3	15,9 ± 0,3	-23%	< 0.001***
Reins, mg/10 g	125,9 ± 2,9	76,9 ± 4,1	-39%	0.0009***
Foie, mg/10 g	408 ± 4,1	415,4 ± 15,8	+2%	0.656
eTAB, mg/10 g	137,9 ± 8,4	116,7 ± 9,3	-15%	0.158
rTAB, mg/10g	25,3 ± 1,9	17,1 ± 2,7	-33%	0.044*
Intestin grêle, mg/10g	334,5 ± 6,2	385,2 ± 11	+15%	0.0009***
Côlon, mg/10g	53,3 ± 2,9	65,4 ± 4,6	+23%	0,041*
Coeur, mg/10g	53,4 ± 2,2	62,9 ± 3,5	+16%	0,031*

Table 3 : Mesures du poids et de la masse de différents organes. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM pour un effectif n=10 souris par groupe. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Student pour les reins, les eTAB, les rTAB, les côlons et les cœurs. Un test de Mann-Whitney a été réalisé pour comparer le poids et les masses des intestins grêles. Un test de Student avec une correction de Welch a été réalisé pour comparer les masses des foies. Les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$; * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$. Abréviations : eTAB (tissu adipeux épидидymal) rTAB (tissu adipeux rétropéritonéal).

1/3/ Le transit gastrointestinal est ralenti en IRC

Afin d'évaluer l'impact de l'IRC sur la fonction intestinale, une mesure du transit a été réalisée. Les souris IRC et CTL, mises à jeun la nuit précédant l'expérimentation, ont été gavées avec une solution de rouge carmin. Un contrôle visuel a ensuite été réalisé afin de mesurer le temps nécessaire au colorant ingéré pour parcourir la totalité du tube digestif. Le rouge carmin n'étant pas absorbé, le temps calculé permet donc de définir le temps de transit en excluant le processus d'absorption par l'épithélium intestinal (Figure 23).

Les résultats montrent que le transit des souris IRC est deux fois plus lent que celui des souris CTL (257 ± 16 min vs 134 ± 4 min ; $p < 0,001$).

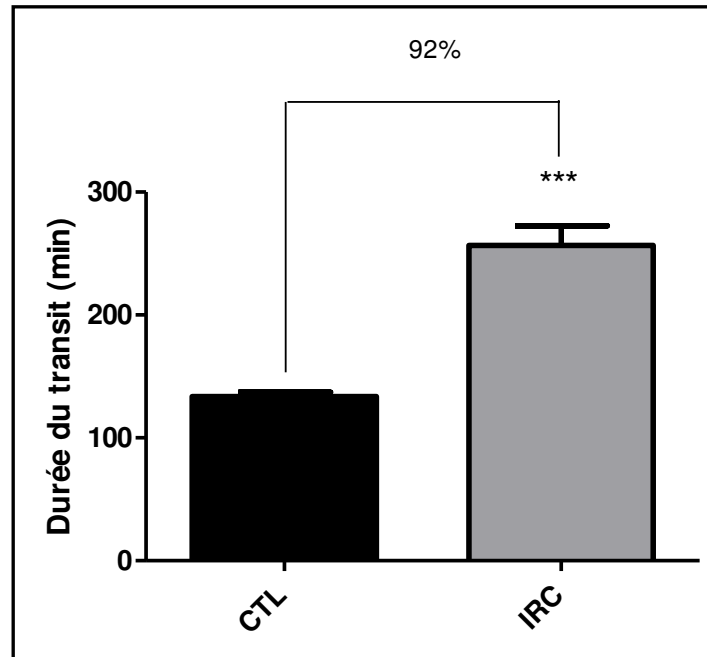


Figure 23 : Mesure du temps de transit gastro-intestinal. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif $n=10$ souris par groupe. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Student avec une correction de Welch. Les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats montrent que les souris IRC ont un temps de transit quasiment deux fois plus lent que les CTL ; *** $p < 0,001$.

1/4/ L'altération du transit gastro-intestinal observée en IRC est associée à un transit intestinal plus lent au niveau du côlon descendant

L'insertion de billes dans le côlon des animaux a permis d'évaluer la motilité de la partie terminale du côlon (Figure 24). Les souris IRC présentent un temps d'expulsion de la bille deux fois plus lent que les souris CTL ($16,6 \pm 1,3$ min vs $6,8 \pm 0,7$ min). L'insuffisance rénale induit donc une diminution de la motilité du côlon descendant qui pourrait contribuer à l'augmentation du temps de transit digestif observé en IRC et une augmentation du temps de résidence du bol alimentaire dans le côlon.

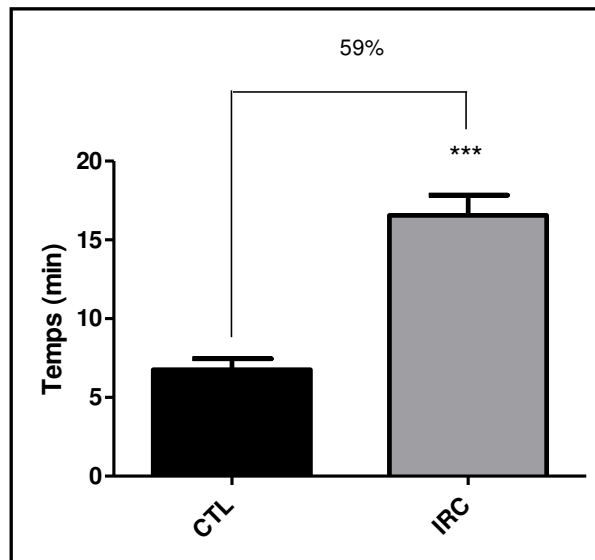


Figure 24 : Mesure de la motilité du côlon descendant. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif $n=10$ souris par groupe. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Student. Les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats montrent que les souris IRC ont une motilité colique diminuée par rapport aux CTL ; *** $p < 0,001$.

Les fèces de souris CTL et IRC placées 1h dans une cage métabolique ont été comptabilisées, pesées et le taux d'humidité a été mesuré. Les souris IRC excrètent deux fois moins de fèces que les souris CTL ($5,5 \pm 0,5$ vs $10,8 \pm 2,1$) (Figure 25-a). En revanche, la masse totale des fèces est identique entre les deux groupes (Figure 25-b). La masse fécale excrétée n'est donc pas modifiée en IRC mais les fèces ont une consistance différente. En effet, les fèces des souris IRC sont moins nombreuses pour une masse totale similaire à celles des souris CTL ce qui suggère que, en IRC, les fèces sont plus compactes. La mesure du taux d'humidité démontre que celui-ci est 26% plus faible chez les souris IRC que les souris CTL ($28,37 \pm 1,98$ % vs $38,43 \pm 1,36$ %) (Figure 25-c). L'insuffisance rénale est donc associée à une déshydratation plus importante des fèces qui deviennent plus compactes, confirmant ainsi les résultats précédents. En effet, lors de la digestion, la réabsorption d'eau ayant lieu principalement dans le côlon, ces résultats confirment que le temps de résidence des nutriments est augmenté dans le côlon et appuient ainsi l'idée que, en IRC, le transit colique est plus long en association avec une diminution de la motilité dans cette portion de l'intestin.

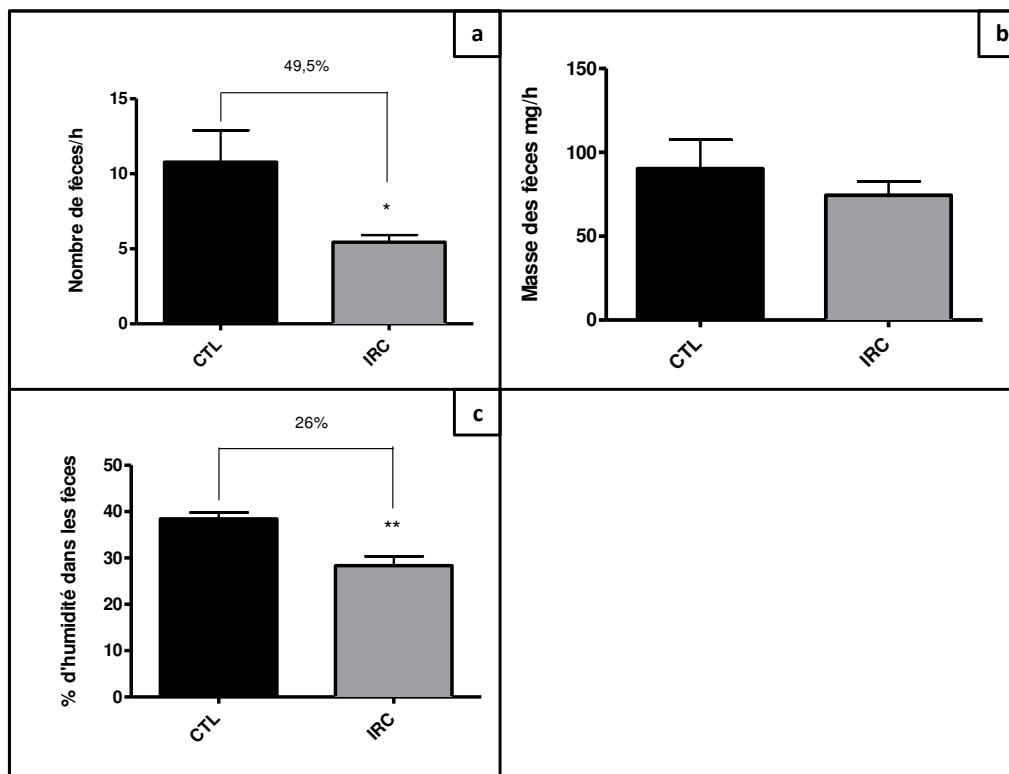


Figure 25 : Mesure de la quantité, de la masse et du pourcentage d'humidité des fèces. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour n=10 souris par groupe. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Student pour le nombre et la masse des fèces et un test de Mann-Whitney pour le pourcentage d'humidité. Les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats montrent que les souris IRC ont un nombre de fèces deux fois plus faible et que le taux d'humidité de ces dernières est 1,5 fois plus faible que les CTL ; * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

1/5/ Les propriétés contractiles de l'intestin grêle ne sont pas modifiées en IRC

L'IRC étant associée à un temps de transit plus lent, notamment au niveau du côlon descendant, des mesures de la motilité intestinale ont été réalisées. Des souris IRC ou CTL ont été sacrifiées après une nuit de jeun. Le duodénum et le côlon ont été prélevés puis ont été rapidement placés dans une solution de Tyrode 1X. L'ensemble est relié à un capteur isométrique permettant d'évaluer la dynamique de contraction du muscle lisse intestinal. Dans un premier temps l'amplitude moyenne, et donc la force de contraction isométrique, du duodénum a été mesurée et les résultats montrent que celle-ci n'est pas significativement différente entre les groupes IRC et CTL (Figure 26-a). La force de contraction maximale du muscle lisse est mesurée après ajout d'1mM de KCl au milieu de Tyrode 1X dans lequel baigne l'organe et a permis de mettre en évidence que celle-ci est aussi la même entre les deux groupes (Figure 26-b).

Enfin, la fréquence moyenne de chaque groupe a été mesurée et il n'a pas été possible de mettre en évidence de différence significative entre les souris IRC et les souris CTL (Figure 26-c).

Ainsi, l'ensemble des mesures réalisées sur le duodénum ont permis de mettre en évidence que, en IRC, il n'y a pas d'altération notable de la force et de la fréquence de contraction musculaire de l'intestin grêle.

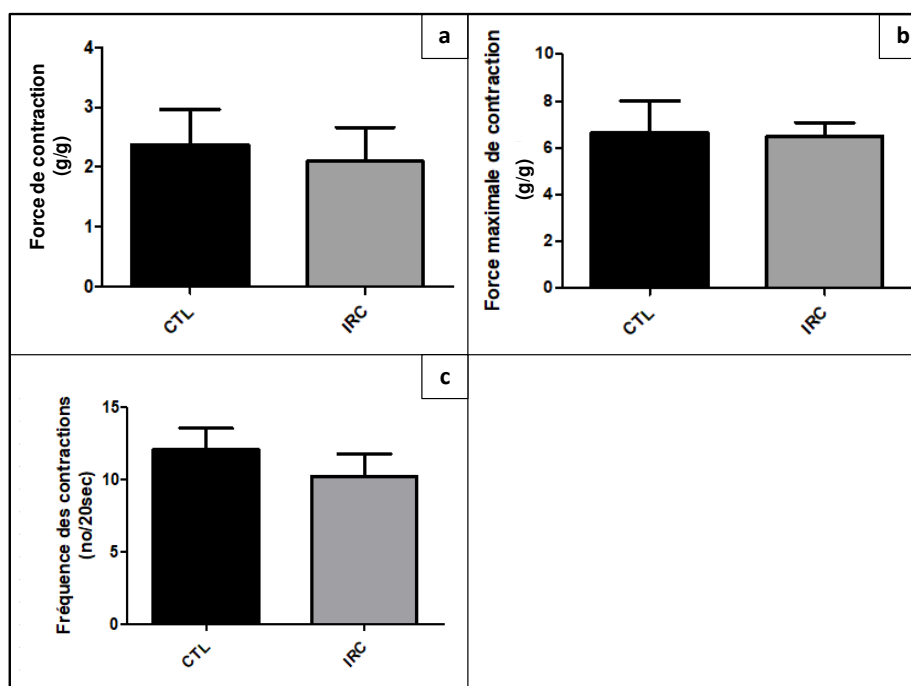


Figure 26 : Evaluation de l'activité contractile du duodénum. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif de $n=6$ pour les souris CTL et $n=5$ pour les souris IRC. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Student et les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats montrent qu'il n'y a aucune différence significative entre les groupes concernant la force et la fréquence de contraction du muscle lisse du duodénum.

Une mesure de l'indice de contraction permet d'évaluer le pourcentage de force de contraction isométrique par rapport à la force de contraction maximale. Il traduit ainsi la proportion de force totale disponible impliquée dans la contraction isométrique (Figure 27-a). Les résultats montrent que les deux groupes sollicitent la même proportion de force (environ 30% de la force totale). Une mesure de l'indice de motilité permet d'évaluer la force isométrique du muscle lisse normalisée au temps mis pour l'induction de 100

oscillations. L'indice de motilité, au niveau du duodénum, est identique entre les deux groupes malgré une légère tendance à la diminution chez les souris IRC (Figure 27-b).

En insuffisance rénale chronique il n'y a donc aucune modification dans le pourcentage de force contractile mobilisée à l'état basal ainsi que dans l'indice de motilité intestinale au niveau de l'intestin grêle. Ainsi le temps de transit gastrointestinal plus lent mis en évidence en IRC n'est pas associé à une modification de la motilité au niveau de l'intestin grêle.

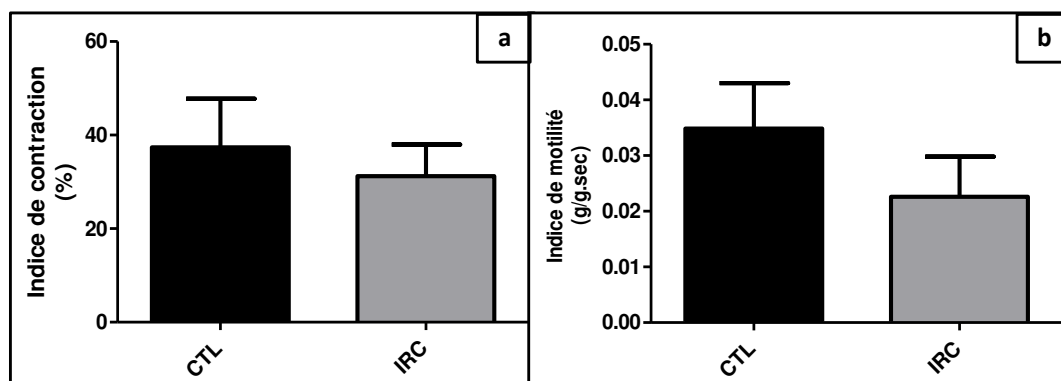


Figure 27 : Evaluation de la motilité du duodénum. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif de $n=6$ pour les souris CTL et $n=5$ pour les souris IRC. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Student et les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats montrent qu'il n'y a aucune différence significative concernant l'indice de contraction et de motilité entre les groupes IRC et CTL.

1/6/ Les propriétés contractiles du côlon sont modifiées en IRC

Des mesures similaires ont été réalisées sur le côlon descendant de souris IRC et CTL. Les oscillations du groupe IRC n'étant pas identifiables, les amplitudes et les fréquences ne peuvent donc pas être mesurées pour ce groupe (Figure 28). Une observation visuelle permet cependant de constater que la force de contraction isométrique des IRC est notablement inférieure aux CTL (Figure 29-a). La force maximale de contraction du muscle lisse, obtenue après ajout de KCL dans le milieu de survie, est quand a elle mesurable et est 98% plus faible chez les souris IRC ($0,8 \pm 0,3$ g/g vs 35 ± 5 g/g ; $p < 0,05$) (Figure 29-b). Concernant la fréquence de contraction du muscle du côlon, l'étude ne permet pas une comparaison des deux groupes car les ondes des groupes IRC ne peuvent être clairement délimitées (Figure 29-c). Ainsi, d'après l'ensemble des résultats mesurables et observables,

on peut donc conclure que l'IRC est associée à une altération de l'activité motrice spontanée du côlon.

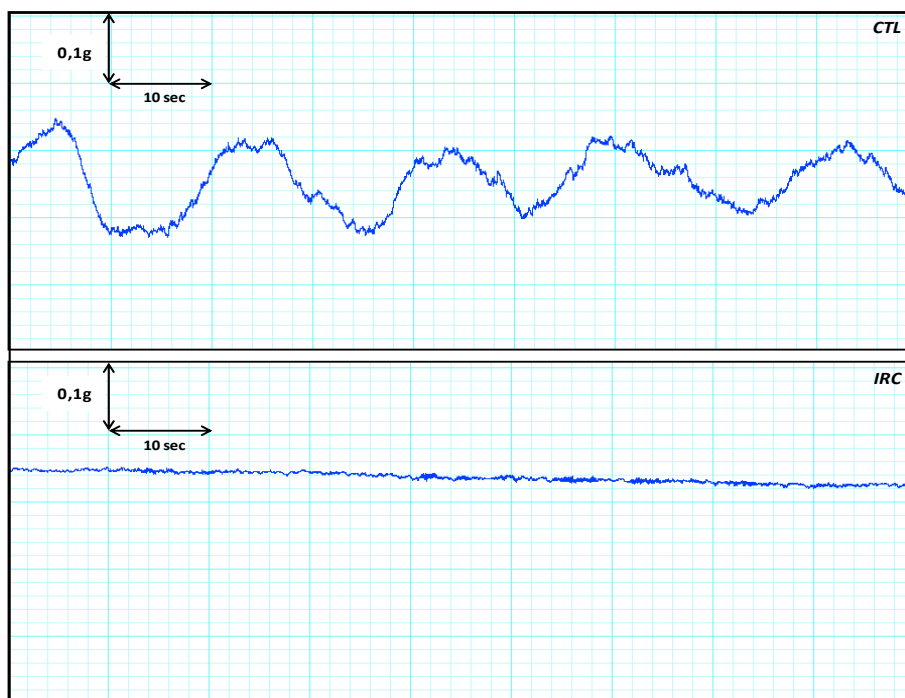


Figure 28 : Enregistrements du mécanogramme pour les côlons de souris IRC ou CTL. Les résultats montrent, d'après une analyse visuelle, que la force de contraction des souris IRC est plus faible que celle des CTL. En revanche, la fréquence du groupe IRC ne peut être mesurée, les oscillations n'étant pas perceptibles.

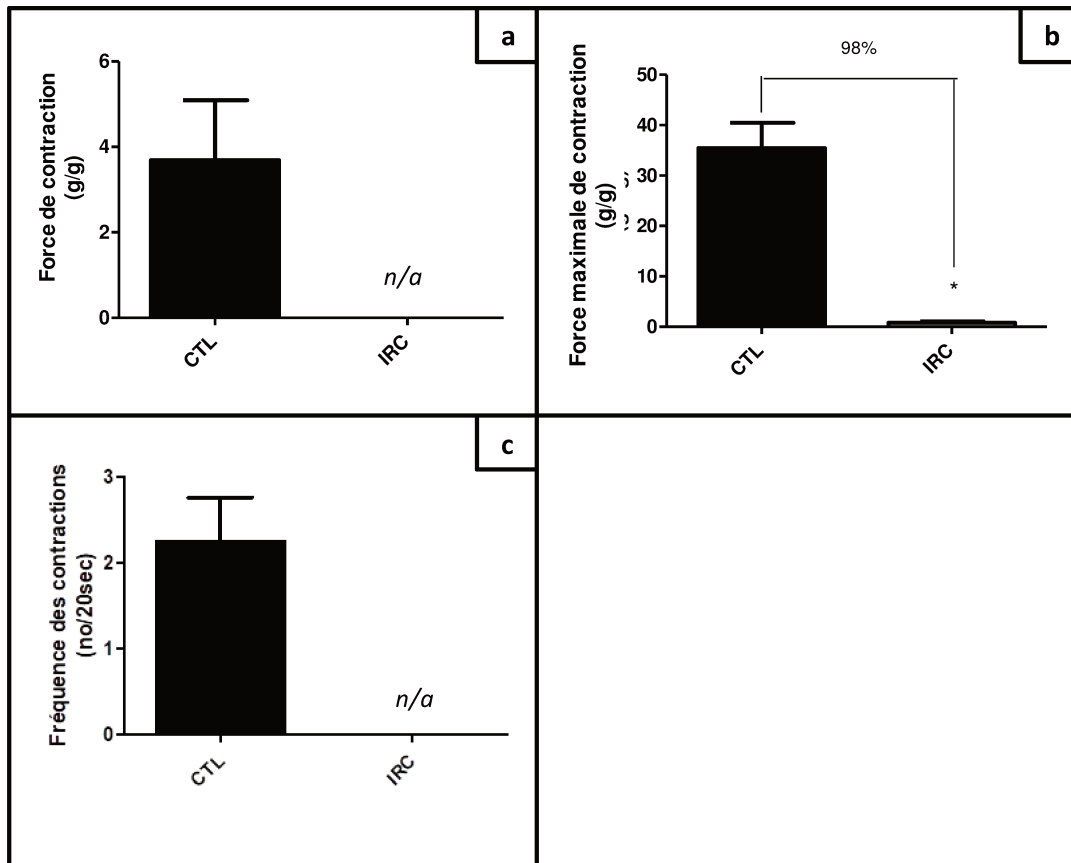


Figure 29 : Evaluation de la force et de la fréquence de contraction du côlon. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif de $n=5$ pour les souris CTL et $n=4$ pour les souris IRC. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Mann Whitney et les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats montrent une diminution de la force de contraction isométrique et maximale chez les souris IRC par rapport aux souris CTL ; * $p < 0,05$. Abréviations : n/a (non applicable).

Malgré une considération de la force isométrique de contraction des côlons des souris IRC trop faible étant donné le mécanogramme obtenu (Figure 28), on observe qu'en IRC le pourcentage de force mobilisée (indice de contraction) chez les IRC est visiblement plus faible que chez les CTL (Figure 30-a). En revanche, l'indice de motilité ne peut être évalué dans cette étude étant donné qu'il n'est pas possible de délimiter les oscillations sur le tracé du groupe IRC et donc de mesurer la fréquence de contraction (Figure 30-b). Ainsi, les mesures réalisées sur le côlon permettent de conclure que l'IRC est associée à une diminution de la force de contraction du muscle lisse du côlon et de l'indice de contraction ce qui laisse supposer que le transit plus lent observé en IRC est associé à une diminution de la motilité intestinale au niveau du côlon.

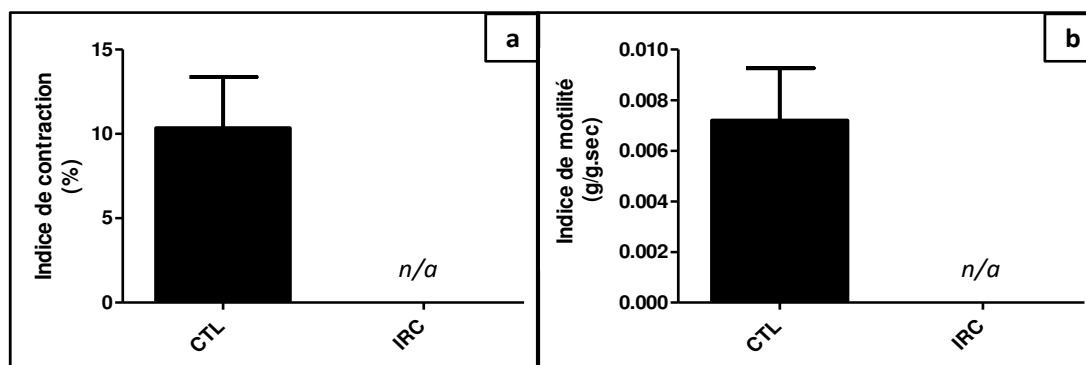


Figure 30 : Evaluation de la motilité du côlon. Graphique comparatif de la proportion de force contractile mobilisée (a) et de la motilité du côlon descendant (b). Un test de Mann Whitney a été réalisé pour comparer les données ; n=5 pour les souris CTL et n=4 pour les souris IRC. Abréviations : n/a (non applicable).

1/7/ L'altération de la motilité du côlon observée en IRC est induite par des constituants présents dans le plasma urémique

Des fragments de côlon descendant de souris CTL ont été incubés avec 20% (vol/vol) de plasma humain CTL ou HD puis différentes concentrations de Béthanechol ont été ajoutées afin d'évaluer l'impact du plasma urémique sur la motilité du côlon (Figure 31). Pour une concentration en Béthanechol identique, la contraction du muscle lisse du côlon des souris CTL incubé avec du plasma HD est environ 1,5 fois plus faible que celle du côlon des souris CTL incubé avec du plasma CTL. Le plasma HD contient donc les constituants qui induisent une diminution de la force de contraction du muscle lisse du côlon descendant et donc de sa motilité en IRC.

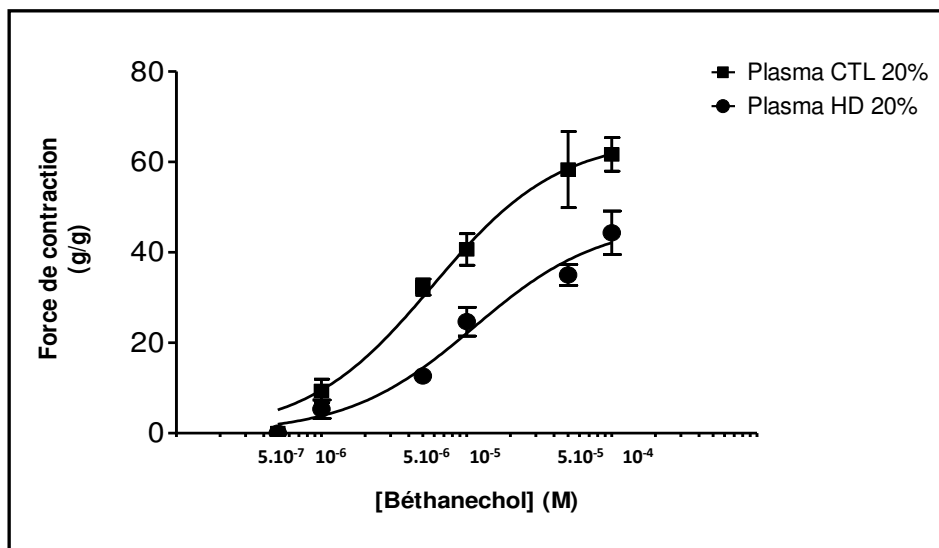


Figure 31 : Motilité du côlon incubé avec 20% (vol/vol) de plasma HD ou CTL. Courbes dose-effet de la force de contraction du muscle lisse du côlon descendant de souris CTL incubé avec 20% (vol/vol) de plasma HD ou CTL en fonction de différentes concentrations de Béthanechol. Les résultats montrent que, pour une même concentration de Béthanechol, la présence de plasma HD induit une force de contraction du muscle lisse du côlon plus faible. Un test de Mann Whitney a été réalisé pour comparer les données ; n=3 expériences indépendantes.

2/ La capacité d'absorption de l'intestin est modifiée en IRC

2/1/ L'IRC est associée à une augmentation de la perméabilité intestinale in vivo

Nous avons démontré que l'IRC était associée à une modification de la motricité du muscle lisse du côlon qui pourrait expliquer l'augmentation du temps de transit observé en insuffisance rénale. En plus de son rôle dans l'avancée du chyme, l'intestin est un organe qui est impliqué dans l'absorption des nutriments à travers l'épithélium intestinal vers la circulation sanguine. Afin d'évaluer en quoi les modifications physiologiques observées en IRC impactent les capacités d'absorption de l'intestin, des souris IRC et CTL ont été gavées avec du FITC-Dextran qui est une molécule fluorescente ayant la particularité de traverser la paroi intestinale uniquement par la voie paracellulaire (Figure 32). Par conséquent, toute élévation de sa concentration plasmatique traduit une augmentation de la perméabilité intestinale. La concentration en FITC-Dextran est cinq fois plus élevée dans le plasma des souris IRC que dans celui des souris CTL ($5,0 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$ vs $1,0 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$; $p < 0,001$). L'IRC est donc associée à une augmentation de la perméabilité intestinale impliquant une modification de la régulation de la voie paracellulaire.

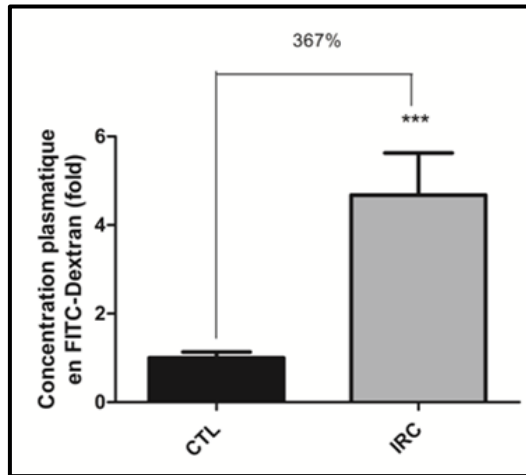


Figure 32 : Mesure de la concentration plasmatique en FITC-Dextran. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif de n=7 souris par groupe. Les valeurs sont normalisées par rapport à la moyenne des souris CTL. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Mann Whitney et les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats montrent que la concentration plasmatique en FITC-Dextran est cinq fois plus importante chez les souris IRC que chez les CTL ; *** $p < 0,001$.

2/2/ L'IRC est associée à une augmentation de la perméabilité d'une monocouche cellulaire de cellules Caco-2

2/2/1/ Validation des modèles in vitro

Pour les études *in vitro* des cellules Caco-2 ont été incubées 24h avec 10% (vol/vol) de plasma humain CTL ou HD. Le choix des patients dont le plasma a été retenu pour l'étude a été fait de telle sorte à exclure au maximum les altérations métaboliques qui ne sont pas associées au syndrome urémique (Table 4). Cependant les variabilités entre les individus étant nombreuses tous les paramètres non associés à l'IRC ne peuvent pas être homogènes et on observe tout de même une différence de 27% entre les groupes concernant le paramètre de l'âge ($p < 0,05$).

Effectifs	Contrôles 11		Hémodialysés 19		Valeur de p
Genre, M/F	6/5		13/6		0.696
Age, y	49.0	± 12.9	62.4	± 14.6	0.017 *
IMC, kg/m ²	24.9	± 2.5	26.9	± 5.0	0.229
PD, mmHg	87	± 11	65	± 16	0.006 **
PS, mmHg	136	± 19	130	± 26	0.523
Dialyse, y	n/a		3.7	± 2.6	-
Kt/V	n/a		1.59	± 0.22	-
Creatinine, µM	80	± 32	818	± 402	<0.001 ***
DFG, ml/min.1.73m ²	94	± 29	n/a		-
Urée, mM	6.6	± 2.7	20.7	± 8.0	0.007 **
Bicarbonates, mM	24.0	± 2.0	19.9	± 3.1	0.443

Table 4: Principales caractéristiques des patients contrôles et hémodialysés. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM pour un effectif de 11 volontaires sains et 19 patients hémodialysés. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Student. Les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Abréviations: IMC (Indice de Masse Corporelle), PD (Pression Diastolique), PS (Pression Systolique), DFG (Débit de Filtration Glomérulaire), n/a (non applicable); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

Afin de s'assurer que les conclusions observées *in vitro* sur les Caco-2 soient exclusivement dépendantes des différences de composition entre les plasmas CTL et IRC et non pas également dues à un effet de mort cellulaire induit par la présence de plasma dans le milieu cellulaire, les cellules ont été incubées 24h soit avec 10% (vol/vol) de SVF (condition standard de culture des Caco-2) soit avec 10% (vol/vol) de plasma CTL ou 10% (vol/vol) de plasma HD. De l'Alamar blue a ensuite été ajouté au milieu afin de définir la proportion de cellules vivantes dans chacune des conditions (Figure 33).

Les résultats montrent qu'il n'y a aucune différence significative entre les groupes concernant le pourcentage de cellules vivantes. Ces conclusions permettent de garantir que la présence de plasma n'induit aucune altération de la viabilité cellulaire et permettent d'exclure tout effet de cytotoxicité dans les résultats des études *in vitro*.

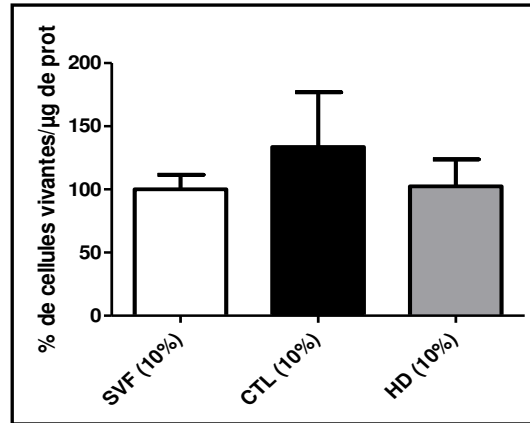


Figure 33 : Mesure de la cytotoxicité cellulaire de Caco-2 incubées avec du plasma HD ou CTL. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif n=4 expériences indépendantes par groupe. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la moyenne du groupe SVF et les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de kruskall-Wallis avec un test post-hoc de Dunns. Les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. La présence de plasma dans le milieu cellulaire n'induit aucune cytotoxicité.

2/2/2 Mesure de la perméabilité de la monocouche cellulaire

Une étude *in vitro* sur des cellules Caco-2, cultivées trois semaines dans un système transwell, confirme les études réalisées *in vivo* sur la perméabilité intestinale. Ces dernières ont été incubées 24h avec 10% (vol/vol) de SVF, de plasma CTL ou de plasma HD déposés au pôle basal du système transwell. Une mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) a été réalisée de part et d'autre de la membrane du transwell au moment de l'incubation et 24h après afin de comparer l'évolution de la TEER (Figure 34). La TEER est une résistance qui existe à l'état physiologique de part et d'autre de l'épithélium intestinal. Plus sa valeur est faible et plus cela traduit une augmentation de la perméabilité intestinale. On observe ainsi que la TEER de la monocouche des cellules incubées avec 10% (vol/vol) de plasma CTL est identique à celui des cellules incubées avec 10% (vol/vol) de SVF ce qui montre que le plasma humain de volontaires sains n'altère pas la perméabilité intestinale. En revanche la TEER de la monocouche des cellules incubées avec 10% (vol/vol) de plasma humain HD est deux fois plus faible que celui des cellules incubées avec 10% (vol/vol) de SVF ($0,5 \pm 0,03$ vs $1 \pm 0,05$; $p < 0,001$). L'étude de la perméabilité *in vitro* réalisée ici est en adéquation avec les résultats *in vivo* et confirme qu'en IRC il y a une augmentation de la perméabilité intestinale. Enfin, cette augmentation de la perméabilité est directement liée à

l'augmentation de la concentration plasmatique de toxines urémiques en IRC puisque le plasma HD suffit à lui seul à induire une altération de la structure de l'épithélium intestinal.

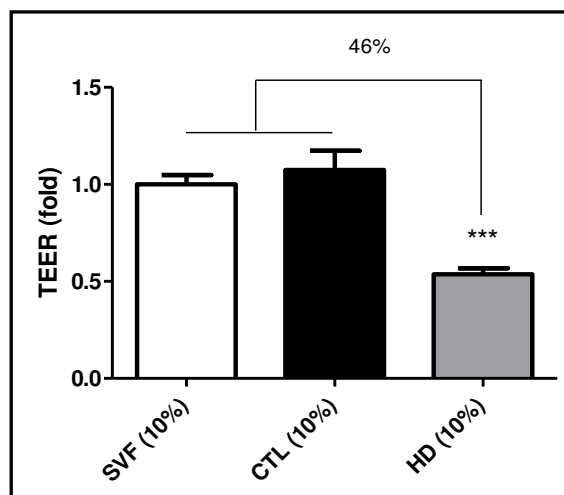


Figure 34 : Mesure de la TEER de la monocouche cellulaire de Caco-2. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif de $n=26$ pour les SVF, $n=27$ pour les CTL et $n=14$ pour les HD. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la moyenne des SVF. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis avec un test post-hoc de Dunns et les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats montrent que la présence de plasma HD dans le milieu diminue de moitié (-46%) la TEER de la monocouche cellulaire par rapport au groupe CTL et SVF et donc une augmentation de la perméabilité de celle-ci ; *** $p < 0,001$.

2/3/ L'augmentation de la perméabilité intestinale observée en IRC est associée à une dérégulation des protéines des jonctions serrées

2/3/1/ Régulation de ZO-1, Occludine et Claudine-1 dans le côlon

Le FITC-Dextran est une molécule fluorescente qui ne traverse la barrière intestinale que par la voie paracellulaire. De même, la TEER est une résistance qui est induit par l'existence de ce même espace permettant cette voie. Or, cet espace est structuré et finement régulé par les protéines des jonctions serrées. Les résultats précédents ayant montré que la perméabilité de l'épithélium intestinal régulée par ces protéines était augmentée en IRC (concentration plasmatique en FITC-Dextran augmentée et TEER plus faible), des analyses de celles-ci ont été réalisées sur des prélèvements de côlons descendants de souris ou de cellules Caco-2.

Concernant les analyses sur les côlons descendants (Figure 35), l'expression de la protéine des jonctions serrées Claudine-1 est deux fois supérieure dans les tissus de souris IRC que dans ceux des souris CTL ($1,70 \pm 0,20$ vs $1,00 \pm 0,04$; $p < 0,01$). Une quantification de cette même protéine a permis de mettre en évidence que son abondance est 37% plus importante dans les tissus IRC ($1,40 \pm 0,10$ vs $1,00 \pm 0,08$; $p < 0,05$). L'abondance de la protéine Occludine est trois fois plus importante dans le côlon descendant des souris IRC que dans celui des CTL ($2,60 \pm 0,80$ vs $1,00 \pm 0,20$; $p < 0,05$). En revanche, le niveau d'expression du gène de l'Occludine est similaire entre les groupes IRC et CTL. Enfin, l'expression et l'abondance de ZO-1, sont identiques entre les deux groupes. En IRC il y a donc une augmentation de la perméabilité intestinale associée à une altération de certaines protéines des jonctions serrées régulant la barrière intestinale. On observe ainsi une augmentation de l'expression de la Claudine-1 ainsi qu'une augmentation de l'abondance de la Claudine-1 et de l'Occludine dans le côlon.

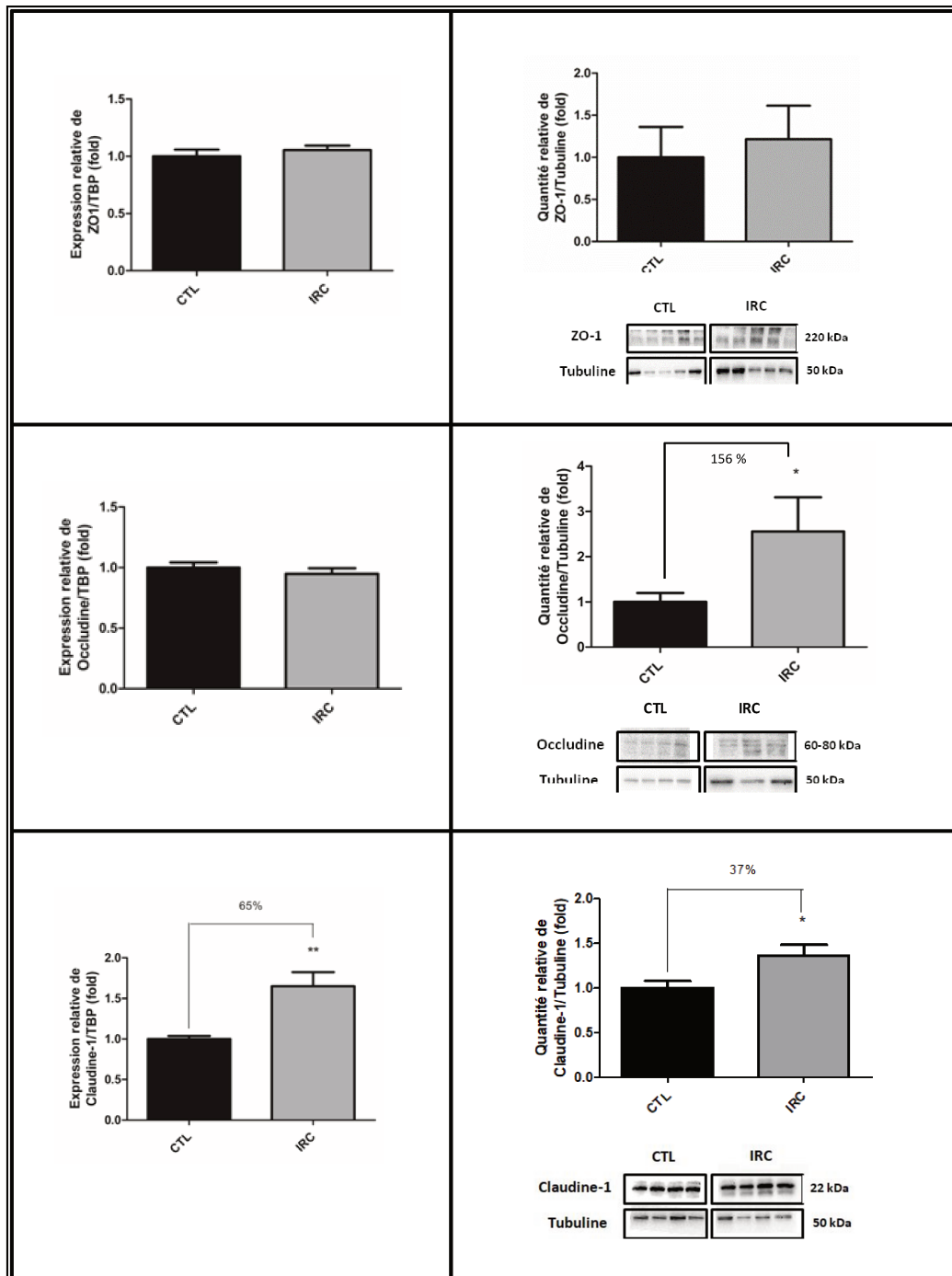


Figure 35 : Mesure de l'expression et de l'abondance des protéines des jonctions serrées dans le côlon. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour $n=20$ souris par groupe pour les mesures de l'abondance de l'Occludine et $n=10$ par groupe pour les autres mesures. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la moyenne des groupes CTL. Pour l'analyse de l'expression, les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Student pour mesurer ZO-1 et l'Occludine et à l'aide d'un test de Student avec une correction de Welch pour la Claudine-1. Pour l'analyse de l'abondance, les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Student pour la Claudine-1 et à l'aide d'un test de Mann & Whitney pour ZO-1 et l'Occludine. Les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats montrent une augmentation de 65% de l'expression de la Claudine-1 et une augmentation de, respectivement 156% et 37%, de l'abondance de l'Occludine et de la Claudine-1 en IRC ; * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Un test de Spearman a été réalisé afin d'évaluer la corrélation entre l'expression et l'abondance de chaque protéine chez les souris IRC et les souris CTL (Table 5). Les résultats montrent que cette corrélation est forte pour les protéines ZO-1 et Occludine du côlon descendant des souris IRC.

	CTL		IRC	
	<i>r</i>	<i>valeur de p</i>	<i>r</i>	<i>valeur de p</i>
ZO-1	-0,1	1	0,6	$0,4.10^{-1}$ *
Occludine	-0,1	0,9	0,9	$3,4.10^{-4}$ ***
Claudine-1	-0,2	0,7	0,2	0,7

Table 5 : Mesure de la corrélation entre l'expression et l'abondance des protéines des jonctions serrées dans le côlon. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour n=20 souris par groupe pour les mesures de l'abondance de l'Occludine et n=10 par groupe pour les autres mesures. Un test de Spearman a été réalisé; *p< 0,05 et ***p< 0,001.

2/3/2/ Régulation de ZO-1, Occludine et Claudine-1 in vitro

2/3/2/1/ Expression des protéines des jonctions serrées dans les Caco-2

Des mesures de l'expression des gènes de ces mêmes protéines des jonctions serrées ont été réalisées *in vitro* sur des modèles de cellules de côlon humain Caco-2 (Figure 36). Les résultats sur les expressions de ZO-1, de l'Occludine et de la Claudine-1 dans les Caco-2 sont en adéquation avec ceux obtenus par les mesures *in vivo* sur les côlons de souris. En effet, aucune différence significative n'est observée concernant l'expression de ZO-1 et de l'Occludine. En revanche, l'expression de la Claudine-1 est 22% supérieure dans les Caco-2 incubées avec 10% (vol/vol) de plasma HD par rapport à celles incubées avec 10% (vol/vol) de SVF ($1,20 \pm 0,04$ vs $1,00 \pm 0,02$; p< 0,05). Ces résultats *in vitro* permettent donc de confirmer que, en IRC, il y a une augmentation de la perméabilité intestinale dans le côlon associée à une augmentation de l'expression de la Claudine-1.

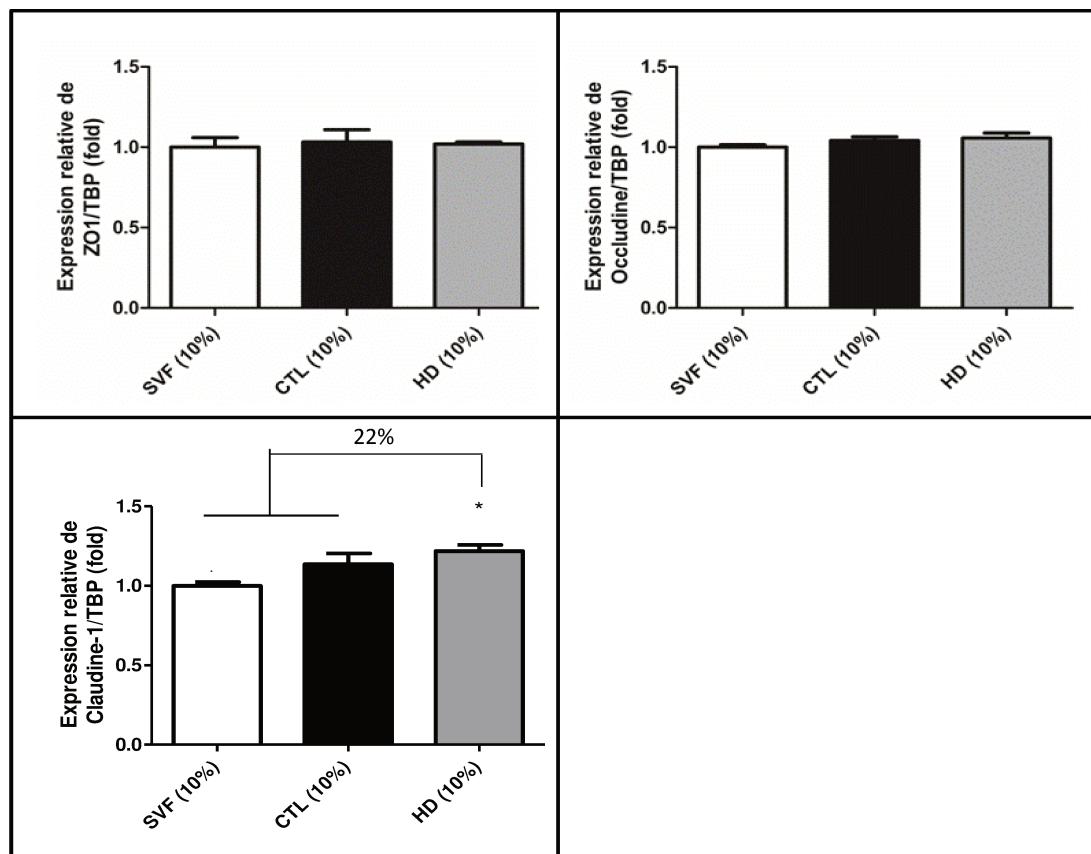


Figure 36 : Mesure de l'expression des protéines des jonctions serrées dans les Caco-2. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif de $n=4$ expériences indépendantes par groupe et les valeurs ont été normalisées par rapport à la moyenne des SVF. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test Anova avec un test post-hoc de Tukey et les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats démontrent que l'expression du gène de la Claudine-1 dans les Caco-2 incubées avec 10% (vol/vol) de plasma HD est 22% plus élevée que celle des Caco-2 incubées avec 10% (vol/vol) de SVF ; * $p < 0,05$.

2/3/2/2/ Quantification des protéines des jonctions serrées dans les Caco-2

Des mesures *in vitro* de l'abondance des protéines des jonctions serrées ZO-1 et Claudine-1 démontrent que les Caco-2 incubées avec 10% (vol/vol) de plasma HD ont une abondance en Claudine-1 86% augmentée par rapport à celles incubées avec 10% (vol/vol) de SVF ($1,80 \pm 0,12$ vs $1,00 \pm 0,13$; $p < 0,05$) (Figure 37). Ces résultats confirment ainsi ceux obtenus sur les tissus de côlon des souris IRC.

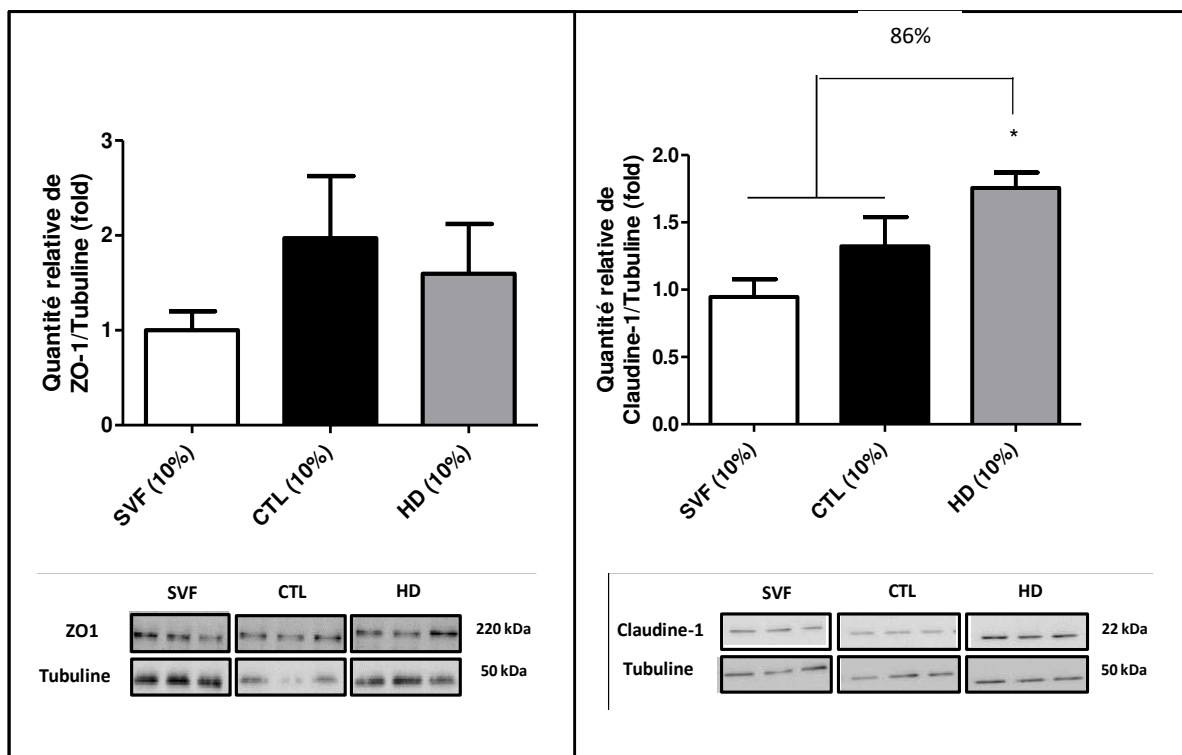


Figure 37 : Mesure de l'abondance des protéines des jonctions serrées dans les Caco-2. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif de $n=4$ pour ZO-1 et $n=6$ pour la Claudine-1. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la moyenne des SVF. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis avec un test post-hoc de Dunn pour ZO-1 et un test Anova avec un test post-hoc de Tukey pour la Claudine-1. Les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats montrent qu'il y a une augmentation de 86% de l'abondance de la Claudine-1 dans les cellules incubées avec 10% (vol/vol) de HD par rapport aux Caco-2 incubées avec 10% (vol/vol) de SVF ; * $p < 0,05$.

Une étude microscopique a également été réalisée afin de confirmer les résultats de quantification qui ont été faits *in vitro* sur les Caco-2 et compléter les mesures d'abondance des protéines des jonctions serrées qui n'ont pu être réalisées par Western Blot (Figure 38). Concernant l'analyse de l'Occludine, on note une différence significative de l'abondance des protéines présentes dans les cellules incubées avec 10% (vol/vol) de plasma CTL par rapport à celles incubées avec 10% (vol/vol) de SVF ($2,77 \pm 0,36$ vs $1,00 \pm 0,14$; $p < 0,001$). Le plasma impacte donc, par sa seule présence dans le milieu cellulaire, l'expérimentation. En adéquation avec les résultats obtenus par les analyses Western Blot réalisées sur le côlon et les Caco-2 (Figure 35 et 37), on observe une augmentation de l'abondance des protéines Occludine et Claudine-1. En effet, il y a 40% plus d'Occludine dans les Caco-2 incubées avec du plasma HD par rapport aux cellules incubées avec du plasma CTL ($3,88 \pm 0,33$ vs $2,77 \pm 0,36$; $p < 0,01$) et 4 fois plus de Claudine-1 dans le groupe HD que dans

le groupe SVF ($4,07 \pm 1,00$ vs $1,00 \pm 0,21$; $p < 0,01$). Ainsi, Ces résultats *in vitro* permettent de confirmer qu'en IRC il y a bien une augmentation de l'abondance de l'Occludine et de la Claudine-1 dans le côlon.

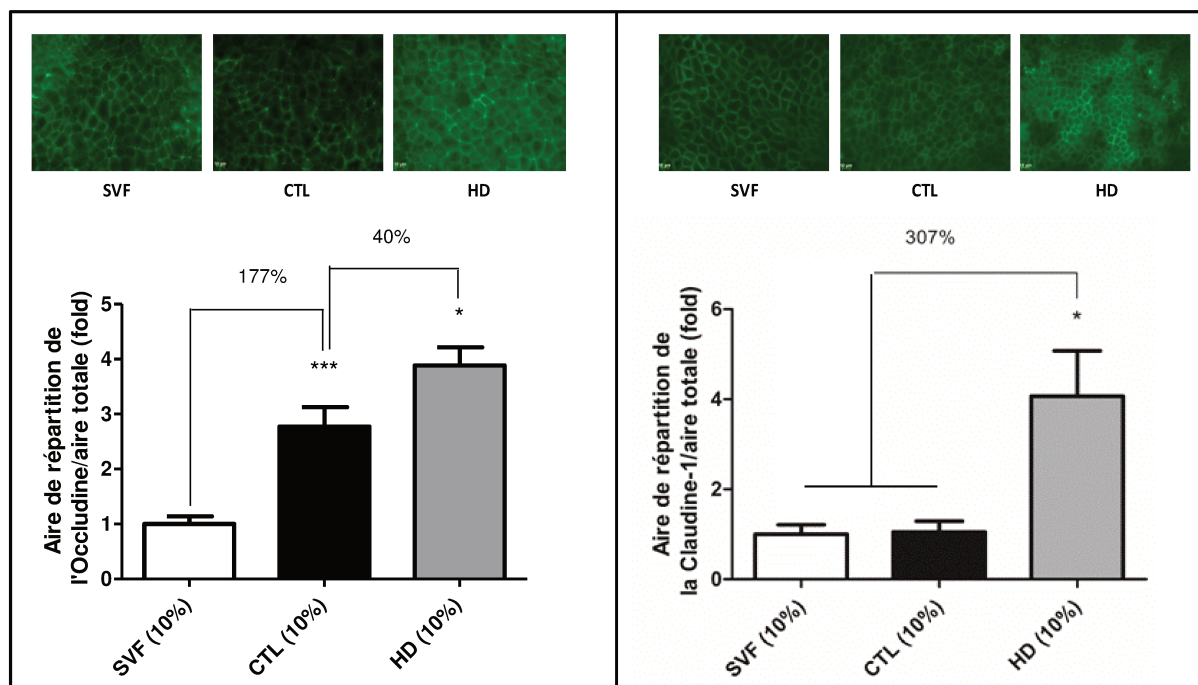


Figure 38 : Analyse en microscopie à fluorescence de l'abondance de l'Occludine et de la Claudine-1 dans les Caco-2. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif $n=20$ pour les SVF et les CTL, $n=14$ pour les HD concernant l'Occludine ; $n=33$ pour les SVF et HD, $n=37$ pour les CTL concernant la Claudine-1. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la moyenne des SVF. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test Anova avec un test post-hoc de Tukey pour l'Occludine et ils ont été comparés à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis avec un test post-hoc de Dunns pour la Claudine-1. Les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats montrent une augmentation de 40% de la quantité d'Occludine dans les Caco-2 HD par rapport aux CTL et une augmentation de 307% de la quantité de Claudine-1 dans les Caco-2 HD par rapport aux SVF ; * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$.

3/ Composants du plasma urémique responsables de l'altération de la perméabilité intestinale en IRC

3/1/ Impact de différentes fractions de plasma HD sur la perméabilité intestinale

Les précédents résultats *in vivo* ont permis de mettre en évidence que l'IRC induit une augmentation de la perméabilité intestinale associée à une augmentation de l'expression de

la Claudine-1 et une augmentation de l'abondance de la Claudine-1 et de l'Occludine dans le côlon (Figure 35). Les études *in vitro* ont permis de confirmer ces résultats et ont également pu mettre en évidence que la présence de plasma HD suffisait, à lui seul, pour reproduire des résultats similaires à ceux *in vivo* (Figure 36, 37 et 38). Ainsi, les éléments contenus dans le plasma urémique impactent de façon significative la perméabilité intestinale. Afin de tenter de définir quels sont ces composants plasmatiques, des cellules Caco-2 ont été incubées 24h avec 10% (vol/vol) de SVF ou 10% (vol/vol) de plasma CTL ou HD préalablement traités ou non et déposés au pôle basal du système transwell. Une mesure de la perméabilité a ensuite été réalisée au moment de l'incubation et 24h après afin de comparer l'évolution de la TEER (Figure 40).

Les cellules ont, tout d'abord, été incubées avec du plasma de patients urémiques de stade 5 qui ne sont pas hémodialysés (plasma CKD). On observe que l'incubation de Caco-2 avec du plasma CKD n'induit aucune altération de la perméabilité de la monocouche de cellules par rapport aux groupe SVF ou CTL. Les composants impactant la perméabilité intestinale en IRC ne sont donc présents dans le plasma (ou en concentration suffisamment élevée) qu'aux derniers stades de l'IRC.

Du plasma HD a été traité de différentes façons puis a été incubé avec des Caco-2. Tout d'abord, le plasma a été ultrafiltré (MWCO 5kDa) ce qui a permis une séparation physique des différents éléments du plasma. Le HDU, contenant l'ultrafiltrat est constitué des éléments du plasma dont le poids moléculaire est inférieur à 5 kDa. Il s'agit notamment de certains facteurs inflammatoires, de la totalité des toxines urémiques hydrosolubles, de certaines toxines de moyen poids moléculaire et des toxines liées aux protéines sous forme libre (représentant une faible fraction de ce groupe de toxines circulant dans le sang). Les résultats démontrent que le plasma HDU n'induit aucune variation de la TEER de la monocouche de Caco-2 ce qui laisse supposer et que les éléments du plasma HD responsables de l'augmentation de la perméabilité intestinale en IRC ont un poids moléculaire supérieur à 5 kDa.

La fraction de plasma HD qui n'est pas ultrafiltrée (HDUF) contient les éléments du plasma dont le poids moléculaire est supérieur à 5 kDa ; c'est-à-dire des facteurs inflammatoires, des toxines de moyen poids moléculaire, les toxines liées aux protéines adhérant à l'albumine (90% de cette catégorie de toxines) mais également les protéines plasmatiques.

Cette fraction de plasma possède une concentration en protéine très différente du plasma natif. En effet, l'eau traversant la membrane de filtration, sa concentration est bien plus élevée. Afin de s'assurer que les mesures de la TEER ne soient pas influencées par cette concentration plus importante, des études préalables ont été réalisées avec du plasma CTL afin de définir la bonne concentration de plasma HDUF à incuber dans le milieu cellulaire. Pour cela, du plasma CTL a été ultrafiltré et différentes concentrations de la portion CTLUF ont été incubées 24h avec des Caco-2 pour déterminer la concentration de CTLUF induisant une TEER semblable à celui de Caco-2 incubées 24h avec 10% (vol/vol) de plasma CTL (Figure 39). Il a alors été démontré qu'une concentration de 2,5% (vol/vol) de plasma CTLUF était celle qui induisait une TEER proche de celui obtenu avec le plasma CTL non traité ($0,67 \pm 0,15$ vs $1,00 \pm 0,04$; $p > 0,05$). Ainsi, pour l'étude, le plasma HDUF a été incubé avec les Caco-2 à la même concentration de 2,5% (vol/vol).

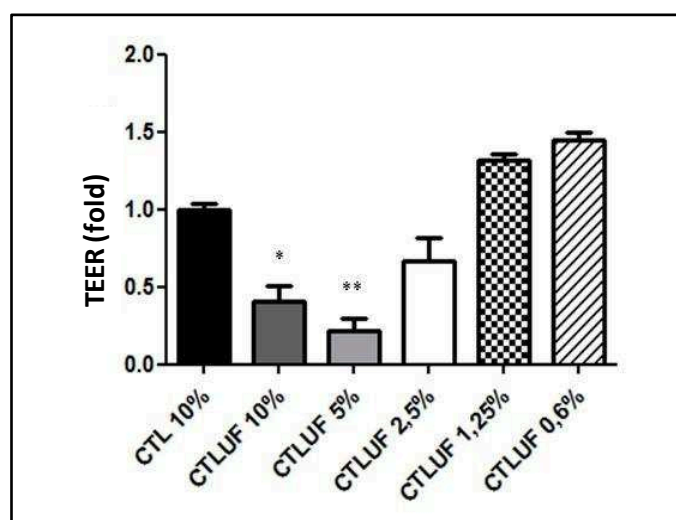


Figure 39 : Evaluation de la concentration en plasma CTLUF induisant une TEER similaire à celui obtenu avec 10% (vol/vol) de plasma CTL. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif $n=6$ pour les CTL 10% (vol/vol) et les CTLUF 2,5% (vol/vol), $n=3$ pour les autres groupes. Les valeurs sont normalisées par rapport à la moyenne des CTL 10% (vol/vol). Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test Anova avec un test post-hoc de Tukey. Les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats démontrent que la concentration de 2,5% est celle la plus pertinente pour l'étude ; * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Les résultats démontrent que les cellules incubées avec 2,5% (vol/vol) de plasma HDUF induit une TEER qui est six fois plus élevée que celui du groupe SVF. Ainsi, contre toute attente, le plasma HDUF induit une perméabilité plus faible de la monocouche de cellules et

donc une absorption plus restreinte et plus lente d'éléments à travers la paroi intestinale. Ces résultats rejettent donc l'hypothèse que les éléments du plasma HD induisant une augmentation de la perméabilité intestinale en IRC sont ceux ayant un poids moléculaire supérieur à 5 kDa.

Une dernière mesure a été réalisée avec du plasma HD dialysé à l'équilibre une nuit (plasma HDD). Ce procédé va permettre notamment aux toxines liées aux protéines de se détacher de l'albumine, leur poids moléculaire étant inférieur à 500 Da lorsqu'elles sont sous forme libre contre 60 kDa lorsqu'elles sont liées à l'albumine. Ainsi, le plasma HDD incubé avec les cellules sera d'une composition proche de celui HDUF (facteurs inflammatoires de poids moléculaire supérieur à 5 kDa, toxines de moyen poids moléculaire) mais dénué de toute toxine urémique liée aux protéines. Les résultats démontrent que le plasma HDD n'induit aucune variation de la TEER.

Ainsi, nos études de fractionnement du plasma HD n'ont donc pas permis de définir clairement quels sont les composants du plasma responsables de l'augmentation de la perméabilité intestinale en IRC.

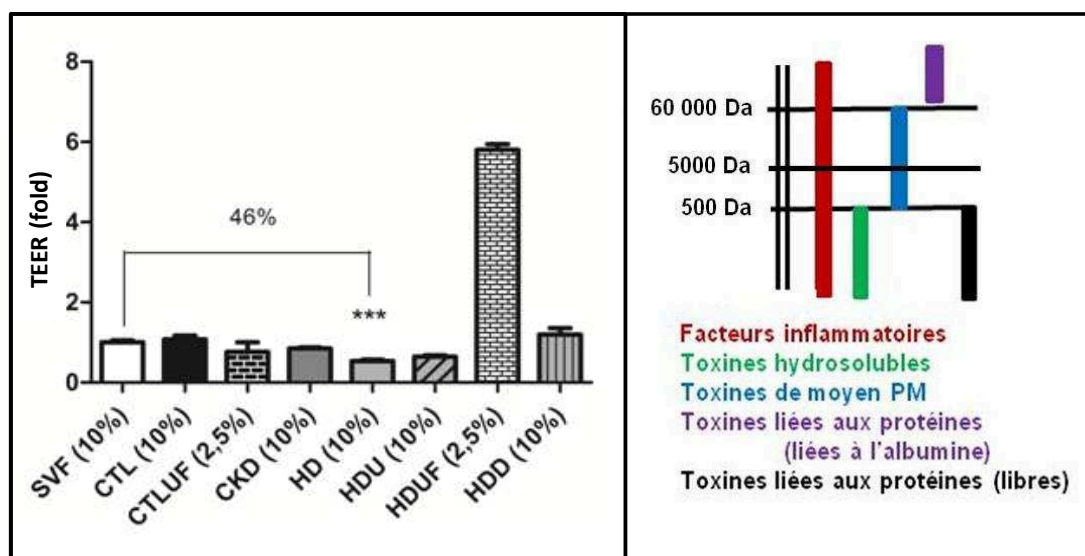


Figure 40 : Mesure de la perméabilité de la monocouche cellulaire de Caco-2 incubées avec différentes fractions de plasma. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif $n=26$ pour les SVF 10% (vol/vol), $n=27$ pour les CTL 10% (vol/vol), $n=6$ pour les CTLUF 2,5% (vol/vol) et les HDUF 2,5% (vol/vol), $n=3$ pour les CKD 10% (vol/vol), $n=14$ pour les HD 10% (vol/vol), $n=4$ pour les HDU 10% (vol/vol) et les HDD 10% (vol/vol). Les valeurs ont été normalisées par rapport à la moyenne des SVF. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis avec un test post-hoc de Dunns et les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats montrent que seul le plasma HD induit une diminution de la TEER de 46% par rapport au groupe SVF. Le plasma HDUF induit, quand à lui, une augmentation de 480% de la TEER et donc une diminution conséquente de la perméabilité intestinale ; $***p < 0,001$.

3/2/ Impact des toxines urémiques sur la perméabilité intestinale

3/2/1/ Impact des toxines urémiques liées aux protéines sur la perméabilité intestinale

Dans une étude de 2012, Vaziri *et al* ont démontré que l'incubation de cellules T84 avec du plasma urémique HD prélevé après dialyse induisait une restauration partielle de la perméabilité de la monocouche cellulaire (Vaziri. ND, 2012, Am J Nephrol). Cette étude ainsi que d'autres ont permis d'avancer l'hypothèse que les éléments du plasma responsables de l'augmentation de la perméabilité intestinale observée en IRC sont des éléments qui s'accumulent dans l'organisme en IRC et qui ne peuvent être totalement ou en grande partie dialysés. L'IRC se caractérise par une augmentation de la concentration plasmatique en toxines urémiques, celles-ci n'étant plus éliminées hors de l'organisme par le rein. Le groupe des toxines urémiques liées aux protéines est celui qui ne peut pas être éliminé efficacement par les systèmes de dialyse existants à l'heure actuelle ce qui fait de ces toxines de bons candidats d'étude. Il existe plus d'une vingtaine de toxines appartenant à ce groupe et le p-crésyl sulfate et l'Indoxyl sulfate en sont les plus représentatives. De plus, il a été montré dans de nombreuses études qu'elles avaient un impact délétère dans de nombreux systèmes biologiques en IRC. Pour ces raisons, ces deux toxines sont celles qui ont été choisies pour notre étude *in vitro*. Ainsi, des Caco-2 ont été incubées 24h avec du p-crésyl sulfate (p-CS) ou de l'Indoxyl sulfate (IS) déposés au pôle basal du système transwell, ou bien avec leurs précurseurs le p-crésol (p-C) et l'Indole (I) déposés au pôle apical du système transwell (Figure 41). Des mesures ont été réalisées au moment de l'incubation et 24h après afin de comparer l'évolution de la TEER. Les résultats démontrent qu'aucune de ces deux toxines ou de leurs précurseurs n'induit d'altération significative de la TEER et donc de la perméabilité de la monocouche cellulaire. Ainsi, l'Indoxyl sulfate, le p-crésol sulfate et leurs précurseurs ne joueraient pas de rôle significatif dans l'augmentation de la perméabilité intestinale observée en IRC.

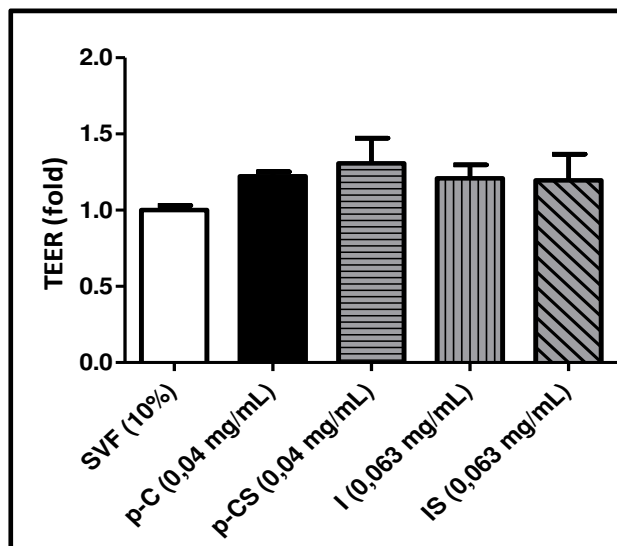


Figure 41 : Mesure de la perméabilité de la monocouche cellulaire de Caco-2 incubées avec les toxines p-C, p-CS, I et IS. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif n=22 pour SVF, n=4 pour p-C et n=7 pour les autres groupes. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la moyenne des SVF. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis avec un test post-hoc de Dunns et les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats démontrent qu'il n'y a aucune différence significative entre les groupes quelle que soit la toxine incubée dans le milieu.
Abréviations : p-C (p-crésol), p-CS (p-crésyl sulfate), I (Indole), IS (Indoxyl sulfate).

3/2/2/ Impact de l'urée sur la perméabilité intestinale

En 2013, Vaziri *et al* ont démontré que l'incubation de cellules T84 avec de l'urée induisait une forte augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire (Vaziri. *ND, 2013, Am J Nephrol*). Dans cette même étude il a également été démontré que la présence d'uréase, qui catabolise l'urée entre autre en ammoniac, potentialisait l'effet de l'urée sur la perméabilité cellulaire. L'urée est une toxine hydrosoluble qui est totalement éliminée par les systèmes de dialyse mais elle pourrait jouer un rôle significatif dans l'altération de la perméabilité intestinale associée à l'IRC sous sa forme d'ammoniac.

Afin de vérifier cette hypothèse, des cellules Caco-2 ont donc été incubées 24h avec de l'urée au pôle basal du système transwell ou avec différentes concentrations d'ammoniac au pôle apical du système transwell. Des mesures ont été réalisées au moment de l'incubation et 24h après afin de comparer l'évolution de la TEER (Figure 42). Tout d'abord, on observe que la TEER des cellules incubées avec de l'urée est deux fois plus élevé que celui du groupe SVF ($1,85 \pm 0,21$ vs $1,00 \pm 0,03$; $p < 0,05$). Contre toute attente, l'urée induit donc une

perméabilité de la monocouche cellulaire plus faible et donc ne semble pas jouer de rôle significatif dans l'augmentation de la perméabilité intestinale observée en IRC.

Concernant la TEER des cellules incubées avec de l'ammoniac (NH_3), les résultats démontrent qu'il n'y a aucune différence significative par rapport au groupe SVF. En revanche, on observe que plus la concentration en NH_3 augmente et plus la TEER diminue. En effet, comparativement au groupe SVF, la TEER du groupe NH_3 5mM est 5% plus bas que les SVF, celui du groupe NH_3 10mM est 17% plus bas et celui du groupe NH_3 20mM est 27% plus bas. Afin de vérifier l'hypothèse d'une corrélation entre la concentration en ammoniac et la valeur de la TEER, un test de Pearson a été réalisé (Figure 43). Les résultats obtenus confirment que l'ammoniac induit une diminution de la TEER qui est proportionnelle à l'augmentation de sa concentration dans le milieu de culture. Cette corrélation appuie ainsi l'hypothèse que l'ammoniac produit à partir de l'urée aurait un impact significatif sur l'augmentation de la perméabilité intestinale observée en IRC.

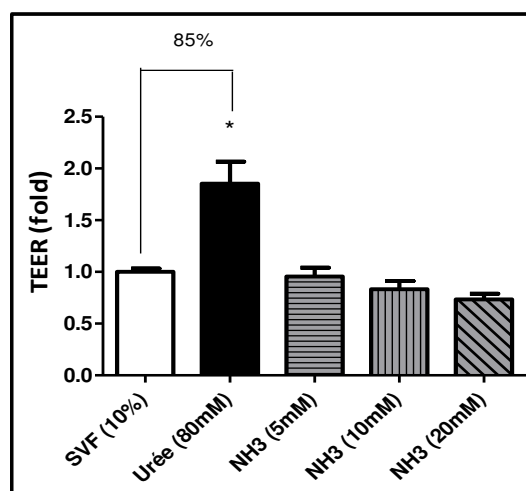


Figure 42 : Mesure de la perméabilité de la monocouche cellulaire de Caco-2 incubées avec de l'urée ou différentes concentrations d'ammoniac. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM pour un effectif $n=22$ pour les SVF, $n=9$ pour l'urée et $n=3$ pour les autres groupes. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la moyenne des SVF. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis avec un test post-hoc de Dunns et les différences sont considérées comme significatives au seuil $p < 0,05$. Les résultats démontrent que l'incubation des Caco-2 avec 80mM d'urée induit une augmentation de 85% de la TEER ; * $p < 0,05$. Abréviations : NH_3 (Ammoniac).

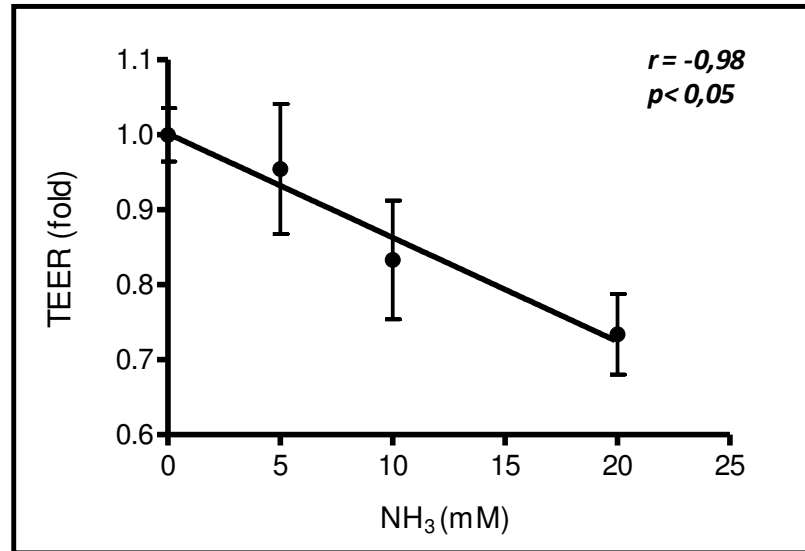


Figure 43 : Test de corrélation entre la TEER et la concentration en NH₃. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la moyenne du groupe SVF. Les groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Pearson. Les résultats démontrent qu'il y a bien une corrélation significative entre la concentration en NH₃ dans le milieu cellulaire et la TEER ; $p < 0,05$ avec un r de Pearson: -0,98.

Troisième partie :

Discussion

1/ Modèles et techniques

Les souris mâles C57Bl/6 sont les modèles qui ont été choisis pour nos études *in vivo* et *ex vivo* du fait que ce sont des animaux dont l'hébergement et la manipulation expérimentale est facilitée. Cependant, les rats sont les modèles qui restent le plus choisis pour les études sur l'insuffisance rénale. Ces derniers possèdent les mêmes avantages que les modèles de souris mais ils présentent cependant une contrainte non négligeable pour de telles études. En effet, la croissance des rats continue bien après le sevrage et le métabolisme élevé qui en découle peut interférer avec les résultats d'étude sur les altérations métaboliques induites par le syndrome urémique. La souris semble donc être le modèle le plus indiqué pour des études sur l'IRC.

La supplémentation de l'alimentation avec 0,25% (wt/wt) d'adénine, procédé choisi pour notre étude, induit une insuffisance rénale terminale et durable permettant de s'affranchir des effets secondaires observés lors d'interventions lourdes comme la néphrectomie des 5/6^{ème} subtotale qui induit à une hypertrophie de la portion du rein encore fonctionnelle. De plus, la néphrectomie chimique présente, du point de vue éthique, une alternative valable aux chirurgies de néphroréduction (ex néphrectomie subtotale des 5/6^{ème}) qui s'accompagnent d'une certaine mortalité et exposent les animaux à des douleurs post-opératoires.

Concernant les études *in vitro*, les Caco-2 sont des cellules humaines tumorales de l'épithélium colorectal. Elles sont, avec les T84, les modèles cellulaires les plus choisis pour les études biologiques de l'épithélium, de la perméabilité intestinale et de la régulation des protéines des jonctions serrées (Bolte. G, 1997, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*). En 2017, Devriese. S et al ont démontré, par des études de la structure des villosités intestinales et de l'expression de protéines, que les modèles les plus adaptés pour modéliser l'épithélium du côlon étaient les T84 (Devriese. S, 2017, *Histochem Cell Biol*). Cependant, Yamaura. Y et al ont réalisé une étude comparative entre les modèles cellulaires Caco-2 et T84 en se basant sur davantage de critères et ont démontré qu'il n'existait pas de modèle cellulaire plus pertinent qu'un autre pour les études sur le côlon (Yamaura. Y, 2016, *Drug Metab Dispos*).

2/ Altérations biologiques en IRC

Nos mesures de la masse des reins montrent une atrophie de 39% des reins chez les souris IRC du fait de leur dysfonctionnement et les souris IRC de notre étude ont un poids qui est 23% plus faible que les souris CTL. Ces résultats sont en corrélation avec des mesures qui ont été réalisées sur des chats IRC (*Freeman. LM, 2016, J Vet Intern Med*). Des études ont montré que l'IRC était associée à une augmentation de la dépense énergétique (*Panesar. A, 2003, Clin Nephrol & Bonanni. A, 2011, Int J Environ Res Public Health*) et à une dégradation plus importante des protéines musculaires (*Wang. XH, 2014, Nat Rev Nephrol*) ce qui pourraient expliquer la différence de poids observée entre les groupes IRC et CTL de notre étude malgré une prise alimentaire cumulée qui n'est pas significativement différente. La diminution de 33% de la masse du tissu adipeux rétro péritonéal que nous avons mesurée confirme l'hypothèse d'un déséquilibre de la balance énergétique en IRC induisant une diminution de la masse corporelle et des études ayant montré que l'IRC s'accompagne, chez le rongeur, d'un phénomène de lipoatrophie confirment cette idée (*Koppe. L, 2013, JASN*). De plus, l'IRC est associée à un défaut de clairance rénale, une augmentation de la sécrétion de Leptine qui est une hormone anorexigène sécrétée par les adipocytes (*Iglesias. P, 2010, Nephrol Dial Transplant*) et elle est associée à une augmentation d'inflammations dans le tissu adipeux blanc allant dans le sens d'une diminution des réserves énergétiques (*Xiang. DM, 2017, American Journal of Physiology-Renal Physiology*).

Nos souris IRC présentent une cardiomégalie (+16%) par rapport aux souris CTL. Ce résultat est en adéquation avec les études de *Di Lullo. L et al* qui ont démontré que l'IRC était associée à une hypertrophie du ventricule gauche du cœur (*Di Lullo. L, 2015, Cardiorenal Med*). Enfin, concernant l'intestin, l'augmentation de la masse de l'intestin grêle et du côlon chez nos souris IRC (15% et 23%) pourrait être due à une hypertrophie tissulaire.

3/ Altérations du transit en IRC

Un test au rouge Carmin et une étude de la vitesse d'expulsion des fèces nous ont permis de démontrer que le transit gastrointestinal est deux fois plus lent chez les souris IRC. Nos résultats concordent avec la littérature. En effet, l'ingestion de billes par des patients IRC a démontré un temps de transit gastrointestinal chez ces patients qui était du même

ordre que nos résultats, soit deux fois plus lent (Wu. MJ, 2004, *Am J kidney Dis*). Certaines études suggèrent que cette modification du transit serait due à une altération de la motilité de l'estomac associée à une altération de l'activité myoélectrique gastrique (Doğan. I, 1996, *Nephron ; Lin. X, 1997, Dig Dis Sci & Furgala. A, 2012, Folia Med Cracov*) et à une diminution de la vitesse de vidange gastrique (Fu. RG, 2011, *Ren Fail & Da Graça. JRV, 2015, Physiol Rep*). D'autres études penchent davantage vers une altération non pas de l'estomac mais de l'intestin (Wu. GJ, 2017, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*) et plus particulièrement du côlon (Lefebvre. HP, 2001, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*). La mesure du transit du côlon descendant à l'aide de billes qui a été réalisée dans notre étude a démontré que ce dernier était deux fois plus lent chez les souris IRC et appuie l'hypothèse que cette modification du transit gastrointestinal observé en IRC serait induite, de façon importante, par une altération de la motilité du côlon augmentant la fermentation et la réabsorption d'eau du chyme. Cette hypothèse est davantage confirmée par nos résultats qui ont démontré une diminution de 26% du taux d'humidité contenu dans les fèces des souris IRC et une structuration différente de celles-ci. Enfin, nous n'avons pas mesuré le transit de l'intestin grêle car il n'existe pas de méthodes non létales de mesure de cette portion d'intestin. Certains auteurs ont démontré, cependant, une diminution de celui-ci chez des rats insuffisants rénaux ce qui laisse supposer que le côlon pourrait ne pas être la seule portion de l'intestin dont la motricité est altérée en IRC (Fu. RG, 2011, *Ren Fail & Da Graça. JRV, 2015, Physiol Rep*).

4/ La motilité intestinale en IRC

L'intestin est composé de deux couches de muscles lisses soumises à une régulation nerveuse (système nerveux autonome) et hormonal et la contraction de ces muscles régule le transit digestif. Ce dernier étant altéré en IRC, nous avons mesuré la force contractile de fragments de tissu d'intestin grêle et de côlon. Aucune différence significative n'a été démontrée concernant la motilité du duodénum. En revanche, nous avons observé que la force maximale de contraction du muscle lisse était plus faible, de 98%, dans le côlon des souris IRC par rapport aux CTL. Nos résultats sont en corrélation avec des études ayant démontré qu'en IRC il y a une hypomotilité de l'intestin (Hirako. M, 2005, *J Gastroenterol & Adachi. H, 2007, J Smooth Muscle Res*) et notamment au niveau du côlon selon une étude de

Nagib. EM *et al* qui a démontré une diminution de 56% de la force et une diminution de 53% de la fréquence de contraction du côlon descendant de rats insuffisants rénaux (Nagib. EM, 2012, *Saudi Med J*). En revanche, cette même étude a également démontré, contrairement à nos résultats, que l'IRC était également associée à une diminution de 56% de la force et 13% de la fréquence de contraction du muscle lisse du duodénum (Nagib. EM, 2012, *Saudi Med J*). De même, Lefebvre *et al* ont démontré que l'IRC induisait chez le chien une altération de la motilité du duodénum et du jéjunum (Lefebvre. HP, 2001, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*).

Ainsi, nos données sur la motilité du duodénum ne concordent pas avec l'ensemble de la littérature. Des études ont mis en évidence une dépendance de la motilité du duodénum vis-à-vis de l'activité du côlon. Cette motilité diminue lorsque des nutriments sont présents dans le côlon via une régulation nerveuse (Wen. J, 1995, *Am J Physiol* & Wen. J, 1998, *Am J Physiol*). Cet impact significatif de l'activité du côlon sur la motilité de l'intestin grêle pourrait expliquer les différences de résultats entre notre expérience et celle de Lefebvre. HP *et al* réalisée sur des animaux anesthésiés et non *ex vivo* comme notre étude. En revanche, l'étude de Nagib. EM *et al*, réalisée sur des tissus isolés de rat, s'affranchit de ce facteur de dépendance fonctionnelle. L'altération du côlon en IRC semble, en tout cas quand à elle, bien établie et la diminution de sa motilité serait associée à une dérégulation nerveuse (Lin. X, 1997, *Dig Dis Sci*) et hormonale (Ravelli. AM, 1995, *Pediatr Nephrol*). L'augmentation du temps de transit dans le côlon associée à une diminution de la motilité musculaire augmente ainsi le temps de résidence des nutriments dans le côlon. Ce processus induit des problèmes de malabsorption (Ravelli. AM, 1995, *Pediatr Nephrol*) et une production accrue de toxines par fermentation des bactéries du microbiote (Aronov. PA, 2011, *J Am Soc Nephrol*). De plus, ce transit colique ralenti induit une réabsorption plus importante d'eau (Lefebvre. HP, 2001, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*). Ces données sont en adéquation avec nos études ayant démontré une diminution de 26% du taux d'humidité des fèces chez les souris IRC expliquant les constipations observées chez les insuffisants rénaux.

Nos résultats *ex vivo*, de part le procédé expérimental choisi, excluent l'hypothèse que ce serait un dysfonctionnement nerveux qui expliquerait la diminution de la motilité colique. L'IRC étant associée à une augmentation de la production et de la concentration plasmatique en toxines urémiques (Vanholder. R, 2015, *Clin Kidney J* & Wong. J, 2014, *Am J Nephrol*) nous avons alors, dans notre étude, étudié l'effet du plasma urémique sur la

motilité du côlon de souris. Après incubation 2h avec 20% (vol/vol) de plasma CTL ou HD, des concentrations croissantes de Bétanéchol ont été ajoutées au milieu afin d'évaluer la force de contraction du muscle lisse du côlon descendant. Nos résultats démontrent que, pour une même concentration en Bétanéchol, la contraction du muscle lisse des côlons des souris CTL incubés avec du plasma HD est plus faible de 30% à 60% par rapport à aux côlons de souris CTL incubés avec du plasma CTL. Ainsi, ces résultats supposent que la composition du plasma urémique pourrait jouer un rôle significatif dans les altérations du côlon observées en IRC. Ces résultats suggèrent qu'un ou des facteurs qui s'accumulent dans le plasma des patients IRC induisent une dysfonction du muscle lisse viscéral. Ces composés pourraient être des hormones ou des cytokines qui s'accumulent en IRC ou correspondre à des toxines urémiques.

5/ La perméabilité intestinale en IRC

Dans notre étude, une mesure de la perméabilité intestinale a été réalisée, *in vivo*, en mesurant la concentration plasmatique en FITC-Dextran chez des souris IRC et CTL et, *in vitro*, en mesurant la TEER de cellules Caco-2 incubées avec 10% (vol/vol) de plasma CTL ou HD. Nous avons ainsi pu démontrer que la concentration en FITC-Dextran était cinq fois plus élevée dans le plasma des souris IRC et la TEER deux fois plus faible dans les cellules incubées avec du plasma HD. Ces deux mesures démontrent sans ambiguïté une augmentation de la perméabilité intestinale en IRC. De plus, les études *in vitro* permettent de préciser que le facteur impactant la perméabilité de l'épithélium intestinal est localisé dans le plasma car ce dernier suffit, à lui seul, à induire des altérations de la barrière cellulaire similaires à celles observées *in vivo*. Nos résultats sont en adéquation avec la littérature. En effet, il a été démontré que la concentration en PEGs de grande taille dans les urines de patients IRC était plus importante que dans celles de volontaires sains CTL, traduisant une perméabilité intestinale plus élevée (Magnusson. M, 1991, Gut). De plus il a également été démontré que l'incubation de cellules T84, 24h, avec 10% (vol/vol) de plasma HD induisait une diminution de 58% de la TEER (Vaziri. ND, 2012, Am J Nephrol).

La perméabilité de l'intestin est finement régulée par les protéines des jonctions serrées. Dans notre étude, nous avons donc mesuré l'expression et l'abondance de trois de ces

protéines : ZO-1, l'Occludine et la Claudine-1. Dans le côlon descendant de nos souris IRC, nous avons démontré une augmentation de 65% de l'expression de la Claudine-1 et une augmentation de l'abondance de la Claudine-1 (+37%) et de l'Occludine (+156%). Les études menées par Vaziri. ND *et al* amènent à des conclusions différentes (Vaziri. ND, 2012, *Neph Dial Transplant*). En effet, dans le côlon descendant de rats rendus insuffisants rénaux par une néphrectomie subtotalaire il a été démontré qu'il n'y avait aucune variation dans l'expression de ZO-1, Occludine et Claudine-1. En revanche, l'abondance de ces trois protéines diminuait dans ce tissu (-93% pour ZO-1; -66% pour l'Occludine et -76% pour la Claudine-1). Notre étude diffère de celle-ci par le modèle animal et la technique d'induction de l'IRC choisis. Nous avons vu qu'il existait des différences physiologiques entre les rats et souris qui pouvaient influencer l'évolution du syndrome urémique notamment du fait que la croissance des rats continue bien après le sevrage. De plus la néphrectomie subtotalaire induit une hypertrophie rénale qui ne s'observe pas avec le régime supplémenté en adénine. Il n'est donc pas exclu que ces variations de modèles et de techniques expérimentales puissent induire des variations de résultats.

Nos études *in vitro* confirment nos résultats *in vivo* avec une augmentation de 22% de l'expression de la Claudine-1 dans les Caco-2 incubées avec 10% (vol/vol) de plasma HD ainsi qu'une augmentation de l'abondance de la Claudine-1 (+86% en Western Blot et +307% en Immunofluorescence) et une augmentation de l'abondance de l'Occludine (+40% en Immunofluorescence). Les mesures *in vitro* de l'abondance de ces protéines par l'équipe de Vaziri. ND *et al*, en 2012, sur des T84 incubées 24h avec 10% (vol/vol) de plasma humain HD ou CTL ont démontré que l'augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire est associée à une diminution de l'abondance de ZO-1 (-62,5%), de l'Occludine (-19%) et de la Claudine-1 (-99%) en adéquation avec leur études *in vivo* (Vaziri. ND, 2012, *Am J Nephrol*). Contrairement aux Caco-2 issues directement d'un adénocarcinome de l'épithélium du côlon, les T84 sont des cellules dérivées d'une métastase pulmonaire issue d'un carcinome colique. Les T84 ne sont donc pas issues de lignées cellulaires prélevées directement dans le côlon. De plus, contrairement aux Caco-2, que nous avons choisies et qui sont issues de cellules de la partie terminale du côlon, les T84 peuvent provenir de toutes les parties de l'intestin. Ces différences dans l'origine cellulaire pourraient expliquer les différences de résultats observées entre nos études et celles de cette équipe.

D'autres mesures de l'abondance des protéines des jonctions serrées ont été réalisées sur des modèles cellulaires identiques à ceux que nous avons choisis pour notre étude et ont démontré que l'augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire de Caco-2 incubées avec 5% d'éthanol était associée à une augmentation de l'abondance de la Claudine-1 (+45%) ce qui est en accord avec nos résultats. Cependant, contrairement à nos données, l'altération de la perméabilité était associée également à une diminution de l'abondance de ZO-1 (-74%) (Wang. Y, 2014, *Mol Med Rep*). Ainsi, les résultats de cette étude, différents des nôtres et de ceux de Vaziri. ND *et al*, semblent confirmer l'hypothèse que les données pourraient fortement dépendre du procédé expérimental.

Il est également intéressant de souligner, lorsque l'on tient compte de l'ensemble des publications ayant étudié les protéines des jonctions serrées dans d'autres portions de l'intestin, que l'expression et l'abondance de ces protéines lors d'une augmentation de la perméabilité intestinale semblent dépendre de leur localisation dans l'intestin. En effet, Dans une même étude, Vaziri. ND *et al* ont mesuré l'abondance et l'expression de ZO-1, Occludine et Claudine-1, à la fois, dans le côlon ascendant et dans le côlon descendant de rats rendus insuffisants rénaux par néphrectomie subtotale (Vaziri. ND, 2012, *Nephrol Dial Transplant*). Ils ont ainsi démontré que l'abondance de la Claudine-1 diminuait davantage dans le côlon ascendant des rats IRC par rapport au côlon descendant du même groupe (-94% vs -76%). Ils ont également démontré que l'expression de ZO-1 (+64%) et de l'Occludine (+35%) augmentaient dans le côlon ascendant de rats IRC alors qu'il n'y a aucune différence significative entre les groupes IRC et CTL au niveau du côlon descendant.

Des mesures au niveau de l'intestin grêle appuient davantage l'hypothèse que l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium en IRC est associée à une expression et une abondance des protéines de jonctions serrées qui sont fortement dépendantes de leur localisation dans l'intestin. En effet, l'augmentation de la perméabilité du jéjunum chez des souris mesurée par un ratio lactulose/mannitol est associée à une diminution de l'expression de l'Occludine (Noth. R, 2011, *BMC Gastroenterol*). De même, la diminution de la TEER chez des IEC-18, modèle cellulaire d'iléon de rat pour les études *in vitro*, est associée à une augmentation de l'expression de la Claudine-1 et à une diminution de l'expression de l'Occludine (Poritz. LS, 2011, *Dig Dis Sci*).

Malgré les résultats différents observés selon les espèces animales, la lignée cellulaire, le procédé expérimental et le fragment d'intestin analysé, l'ensemble des publications s'accordent en tout cas à affirmer, comme notre étude, que l'augmentation de la perméabilité intestinale observée en IRC est étroitement associée à une altération de la régulation des protéines des jonctions serrées et que ces dernières impactent significativement la barrière cellulaire de l'épithélium. En effet, certaines études ont démontré que l'inhibition de l'expression de la protéine de jonctions serrées JAM-A ou que la surexpression de la Claudine-1 dans le côlon suffisaient à induire une augmentation significative de la perméabilité intestinale (*Laukoetter. MG, 2007, J Exp Med & Pope. JL, 2014, Molecular Cancer*).

6/ Impact du plasma urémique sur l'altération de la perméabilité intestinale en IRC

L'IRC étant associée à une accumulation de toxines urémiques dans le plasma, nous avons incubé 24h des Caco-2 avec 10% (vol/vol) de plasma humain CTL ou HD et avons démontré que le plasma suffisait, à lui seul, à induire une augmentation de 46% de la perméabilité de la monocouche cellulaire. Les études réalisées par Vaziri. ND *et al* sur des T84 incubées 24h avec 10% (vol/vol) de plasma CTL ou HD démontrent des résultats en adéquation avec les nôtres (*Vaziri. ND, 2012, Am J Nephrol*). Ces résultats appuient l'hypothèse que les éléments impactant de façon significative la perméabilité intestinale sont des composants dont la concentration plasmatique augmente en IRC. Afin de définir plus précisément ces éléments, nous avons testé plusieurs fractions de plasma HD sur des cellules Caco-2. Ainsi, les cellules ont été incubées soit avec 10% (vol/vol) de plasma ultrafiltré contenant l'ensemble des composés de poids moléculaire inférieur à 5 kDa (10% vol/vol HDU), soit avec la fraction contenant les composés de PM supérieur à 5 kDa (2,5% vol/vol HDUF) ou bien un plasma dialysé à l'équilibre pour éliminer les toxines liées aux protéines (10% vol/vol HDD). De façon surprenante, aucune des fractions de plasma HD testées (HDU, HDUF et HDD) n'induit les altérations de la monocouche cellulaire que l'on observe avec le plasma HD natif. Aucune étude similaire n'a été réalisée dans la littérature. Nous ne pouvons donc qu'émettre des hypothèses pour expliquer ces résultats. La première hypothèse que nous pourrions émettre aurait une origine expérimentale. En effet, il est

possible, tout d'abord, que les composants du plasma impactant la perméabilité intestinale aient été absorbés par les « mailles » du filtre lors de l'ultrafiltration d'où leur absence dans le HDU et le HDUF. Le HDD s'affranchit de cette contrainte expérimentale car la séparation des éléments n'est pas physique mais induite par un processus d'osmose entre le dialysat dans le boudin et la solution dans laquelle celui-ci baigne. Ainsi, étant donné que la dialyse ne peut pas être biaisée à cause d'un paramètre lié à la membrane de filtration, les résultats obtenus avec le plasma HDD seraient alors les plus pertinents pour identifier les composants du plasma induisant l'augmentation de la perméabilité intestinale en IRC. Le plasma contenu dans le boudin de dialyse n'induisant aucune variation de la perméabilité de la monocouche cellulaire, on pourrait alors supposer que les éléments d'intérêt seraient ceux de poids moléculaire inférieur à 5 kDa ou bien qu'il s'agit des toxines liées aux protéines qui ont été exclues du boudin de dialyse par ce procédé. La seconde hypothèse que nous pouvons faire pour expliquer nos résultats est que l'altération de la perméabilité intestinale en IRC serait en fait induite par des interactions entre plusieurs éléments du plasma qui, séparés, n'auraient aucun impact sur la barrière épithéliale. Ces éléments d'intérêt seraient donc un groupe de toxines dont certaines auraient un poids moléculaire supérieur à 5 kDa et d'autres avec un PM inférieur (effet « synergique »).

7/ Toxines urémiques et perméabilité intestinale en IRC

Plusieurs études conduisent à l'hypothèse que ce seraient les toxines liées aux protéines qui impacteraient de façon significative la perméabilité intestinale associée à l'IRC. En effet, dans une étude de Vaziri. ND *et al*, en 2012, des cellules T84 ont été incubées 24h avec 10% (vol/vol) de plasma HD prélevé avant une dialyse (pré-HD) ou juste après (post-HD). Il a alors été démontré que les cellules incubées avec du plasma pré-HD (-43% vs CTL) avaient une TEER plus faible que celles incubées avec du plasma post-HD (-33% vs CTL) (Vaziri. ND, 2012, *Am J Nephrol*). Ces données suggèrent qu'une partie des éléments contenus dans le plasma et qui sont impliqués dans l'altération de la perméabilité intestinale en IRC sont des composants dialysables. Cependant, le groupe de cellules incubées avec du plasma post-HD conserve une perméabilité cellulaire significativement plus élevée que le groupe de T84 incubées avec du plasma CTL ce qui suggère que les facteurs impactant significativement la perméabilité intestinale en IRC ne peuvent être filtrés. Ainsi, les toxines

liées aux protéines, se présentent alors comme de bons candidats car elles ne peuvent être éliminées de l'organisme par le processus d'hémodialyse.

De plus, l'administration d'AST-120, chélateur de toxines comme le p-crésyl sulfate, l'Indoxyl sulfate ou les AGEs, induit une diminution de l'inflammation intestinale et une restauration de la perméabilité intestinale chez des rats IRC ce qui appuie l'hypothèse du rôle significatif de ce groupe de toxines sur les altérations intestinales associées à l'IRC.

Pour nos études, nous avons choisi deux toxines urémiques de ce groupe qui sont les plus représentatives et les plus étudiées. L'incubation de cellules Caco-2 avec du p-crésyl sulfate, de l'Indoxyl sulfate ou leurs précurseurs le p-crésol et l'Indole n'induit aucune variation significative de la perméabilité de la monocouche cellulaire. Nos résultats rejettent donc l'hypothèse d'un rôle significatif des toxines liées aux protéines sur l'augmentation de la perméabilité intestinale en IRC. Cependant, il existe environ 23 toxines appartenant à ce groupe. Il n'est donc pas exclu que les toxines que nous avons sélectionnées ne soient pas celles impactant la barrière de l'intestin et que, n'ayant pas testé la totalité des solutés de ce groupe, il nous ait impossible d'affirmer ou infirmer avec certitude notre hypothèse. Une analyse plus large seraient donc nécessaire ce qui rend le projet difficile du fait du nombre important des toxines urémiques appartenant à celles liées aux protéines du plasma.

L'Urée est une toxine qui, au premier abord, ne présente pas de pertinence dans l'étude des altérations de la barrière intestinale en IRC. En effet, elle appartient au groupe des toxines de faible PM hydrosolubles et sont parfaitement filtrées par les systèmes de dialyse actuels ce qui ne concorde pas avec l'étude de Vaziri. ND *et al* qui a démontré que le plasma post-HD, et donc épuré d'une large part des toxines hydrosolubles, augmente toujours de façon significative la perméabilité de la monocouche cellulaire (Vaziri. ND, 2012, *Am J Nephrol*). Cependant, l'urée est un soluté qui peut être substrat à l'uréase catabolisant l'urée en ammoniac (NH₃). En IRC, le NH₃ n'est plus éliminé avec les urines et des publications ont démontré qu'une hyperammoniémie était associée à des insuffisances hépatiques, des pathologies cardiaques et des saignements gastro-intestinaux.

Hughes. R *et al* ont démontré une corrélation entre la concentration de NH₃ dans le milieu de culture de Caco-2 et l'augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire (Hughes. R, 2008, *Nutrition and Cancer*). Dans notre étude nous avons incubé des Caco-2 avec 80mM (480 mg/dL) d'urée au pôle basal ou différentes concentrations en NH₃ (5mM, 10mM ou 20mM) au pôle apical des systèmes transwells. Contre toute attente, la présence

d'urée dans le milieu cellulaire induit une perméabilité de la monocouche cellulaire 85% plus faible que celle des Caco-2 incubées avec 10% (vol/vol) de SVF. Nos résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par l'équipe de Vaziri. ND *et al* (Vaziri. ND, 2013, *Am J Nephrol*). En effet, dans cette dernière étude, des cellules T84 ont été incubées avec des concentrations en urée bien plus faibles que celle que nous avons choisie pour notre étude. Pourtant, il a été montré qu'une concentration en Urée de 72 mg/dL suffisait à induire une diminution de 54% de la TEER et donc une augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire. Selon les données de l'EuTox (European Uremic Toxin Work Group), la concentration physiologique de l'urée dans le plasma est de [30 ; 40] mg/dL et celle en IRC est de [130 ; 460] mg/dL. Partant de ce constat, il est difficile d'expliquer pourquoi nos études, dont la concentration en urée choisie correspond à la concentration la plus élevée retrouvée en IRC (480 mg/dL), induit une diminution de la perméabilité intestinale alors que la concentration choisie par Vaziri. ND *et al*, dont la concentration correspond à celle trouvée à l'état physiologique (72 mg/dL), induit une augmentation de cette perméabilité. Dans les deux études, la perméabilité a été mesurée par TEER et l'urée a été incubée 24h dans le milieu cellulaire. La première différence entre notre étude et celle de Vaziri. ND *et al* concerne le modèle cellulaire choisi (i.e. T84 versus Caco-2) qui pourrait expliquer les différences de résultats. Enfin, l'urée est une toxine métabolisée majoritairement dans le foie lors du cycle de l'urée et qui va donc interagir avec l'intestin en circulant dans le plasma et donc au niveau du pôle basal des cellules de l'épithélium. Pour nos études, nous avons donc incubé l'urée dans le compartiment inférieur du système transwell, au contact du pôle basal des cellules. En revanche, aucune information concernant la méthode d'incubation choisie par Vaziri. ND *et al* n'est précisée dans l'article de cette équipe. Une incubation au pôle apical ou/et basal des cellules pourrait donc être un paramètre qui expliquerait la différence de résultats.

Enfin, l'incubation des cellules Caco-2 24h avec différentes concentrations en NH₃ n'induit aucune différence significative de la perméabilité de la monocouche cellulaire. Cependant un test de Pearson a permis de démontrer qu'il existe une corrélation entre l'augmentation de la concentration en NH₃ dans le milieu cellulaire et la diminution de la TEER. Nos résultats sont en adéquation avec ceux de Hughes. R *et al* où l'incubation de Caco-2 avec 10mM de NH₃ induit une diminution significative de la TEER (-43,5%), et donc une augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire de Caco-2 (Hughes. R, 2008,

Nutrition and Cancer). Pour un même modèle cellulaire, une technique de mesure identique et la même concentration de 10mM en NH_3 que notre étude, l'équipe de Hughes. R *et al* ont réussi à induire une TEER plus faible que celui que nous avons obtenu (-43,5% vs -17%). L'ammoniac étant un composé chimique produit dans le côlon, pour nos études nous avons donc incubé le NH_3 dans le compartiment supérieur du système transwell, au contact du pôle apical des Caco-2. Les études de Hughes. R *et al* ne donnent aucune précision sur le compartiment du transwell sélectionné pour l'incubation du NH_3 ce qui pourrait expliquer la différence de résultat entre cette étude et la nôtre.

Quatrième partie: Conclusions et perspectives

En France, 10% de la population souffre de maladies rénales pouvant amener à une IRC et cette proportion augmente chaque année. L'insuffisance rénale chronique est donc un problème de santé publique préoccupant et il est important d'étudier les altérations métaboliques associées à cette pathologie afin d'optimiser la survie et la qualité de vie des patients. Notre étude, centrée sur les altérations de l'intestin en IRC, a permis de démontrer le rôle central joué par l'intestin dans la progression du syndrome urémique. En effet, l'IRC est associée à une diminution de la fonction motrice du côlon induisant un transit colique plus lent. Le côlon est la portion de l'intestin permettant une réabsorption d'eau et une fermentation des nutriments par le microbiote. L'augmentation du temps de résidence dans le côlon induit donc une déshydratation plus importante des fèces mais pourrait également favoriser la production des toxines urémiques par fermentation et contribuer à l'hyperkaliémie. Nous avons également démontré, *in vivo* et *in vitro*, que l'IRC est associée à une augmentation de la perméabilité de l'épithélium colique impliquant une dérégulation de certaines protéines des jonctions serrées. Cette altération structurale induit une diffusion plus rapide des toxines urémiques à travers la barrière intestinale vers la circulation sanguine. Ainsi, en IRC, il y a des altérations de la fonction et de l'absorption colique qui vont dans le sens d'une augmentation de la production et de la diffusion des toxines urémiques. L'intestin jouerait donc un rôle important dans la progression du syndrome urémique en augmentant significativement la production, et donc la concentration plasmatique, de toxines urémiques mais également en optimisant sa capacité à le faire en interagissant avec les toxines qu'il a lui-même produites. En effet, les études *in vitro* que nous avons réalisées dans lesquelles nous avons incubé des Caco-2 avec du plasma humain CTL ou HD ont démontré que le plasma urémique suffit, à lui seul, à induire une augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire similaire à celle que nous avons observée *in vivo*. Les éléments impliqués dans les altérations de l'intestin seraient donc des composants qui s'accumulent de façon chronique dans le plasma en IRC comme les toxines urémiques. Il n'existe pas d'études ayant démontré la nature de ces éléments. Cependant, les toxines liées aux protéines étant celles qui ne sont pas filtrées par les systèmes de dialyse et qui s'accumulent donc de façon chronique chez les patients IRC hémodialysés, pourraient être les principaux acteurs induisant les altérations de l'intestin observées en IRC. L'étude des toxines urémiques en général, et de celles du groupe liées aux protéines en particulier, est difficile car il existe près d'une centaine de ces solutés et il n'est pas exclu que les altérations de l'intestin soient induites par une action synergique de plusieurs toxines. Il faudrait donc

pouvoir mettre en place, en parallèle de mesure de la perméabilité de l'épithélium intestinal, des analyses d'identification de l'ensemble des toxines présentes dans différentes fractions de plasma HD.

L'intestin semble, en tout cas, jouer un rôle central dans la progression du syndrome urémique car les altérations métaboliques de celui-ci induisent une augmentation majeure de la production et de la diffusion des toxines urémiques. Ces toxines qui s'accumulent dans le plasma lorsque la fonction rénale est altérée et dont l'intestin est le principal producteur, interagissent ensuite avec le côlon au niveau des vaisseaux sanguins induisant une augmentation encore plus importante de la perméabilité intestinale, de la concentration plasmatique en toxines urémiques et donc une progression des altérations métaboliques associées à l'insuffisance rénale (Figure 44). En IRC, se mettrait donc en place un système de « suicide » de l'intestin car les toxines qu'il produit de façon exponentielle par rapport à son niveau de dégradation sont directement impliquées dans l'amplification de ses altérations fonctionnelles et structurales. Ainsi, l'intestin se présenterait comme une cible thérapeutique intéressante pour empêcher l'accumulation des toxines urémiques dans le plasma et ralentir la progression du syndrome urémique.

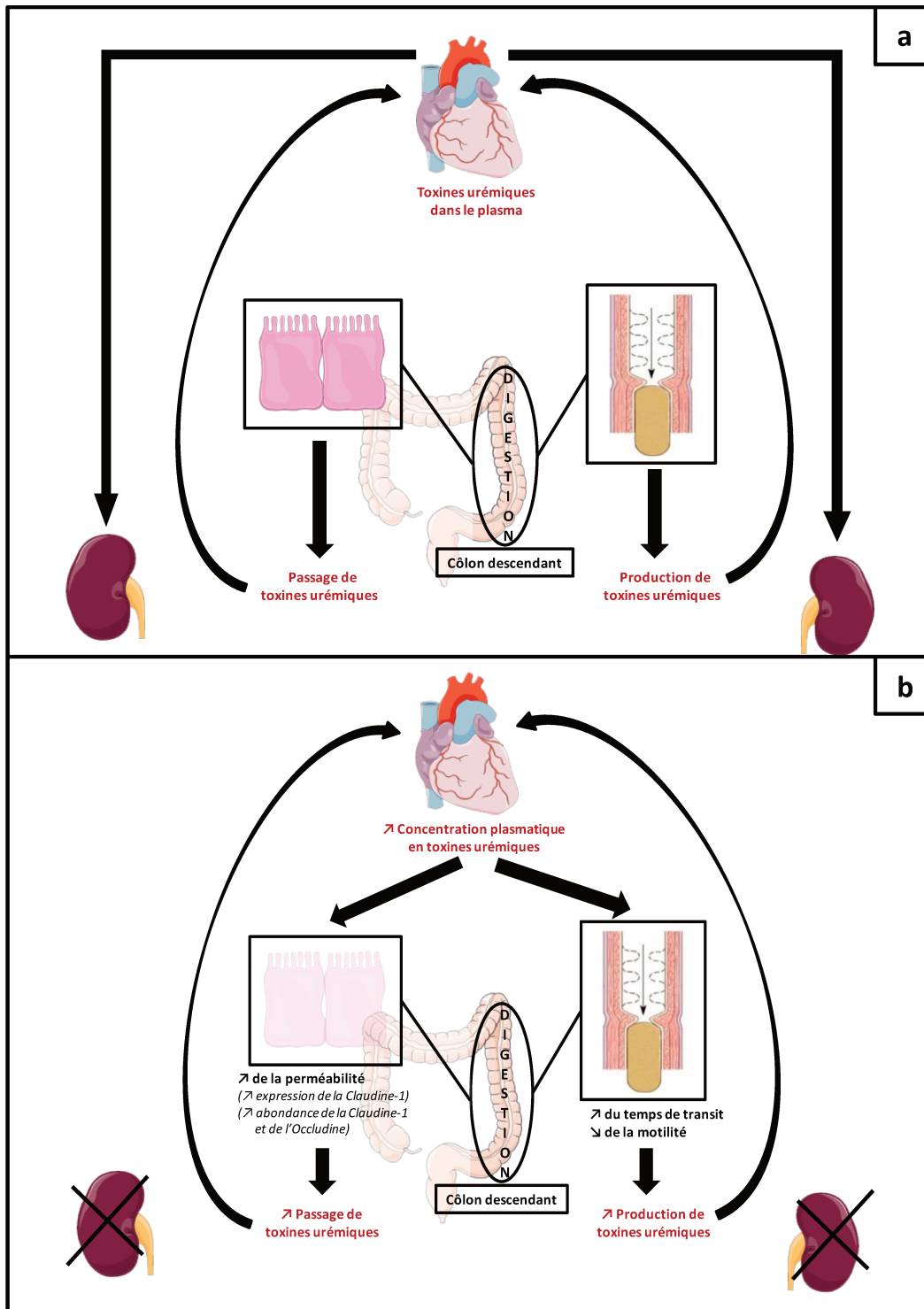


Figure 44: Schéma bilan. A l'état physiologique, les toxines urémiques, dont un grand nombre est produit par l'intestin, rejoignent les reins par la circulation sanguine pour y être éliminées (a). En IRC, ces toxines ne sont plus éliminées et s'accumulent dans le sang qui alimente les différents organes dont l'intestin induisant des modifications fonctionnelles et structurales de cet organe qui favorisent la production et l'absorption des toxines (b). L'urémie met en place un véritable "cercle vicieux" favorisant l'accumulation des toxines urémiques.

Références bibliographiques:

Adachi. H; et al., 2007. *Improvement of gastric motility by hemodialysis in patients with Chronic renal failure.* J Smooth Muscle Res. 43 (5): 179-189

Anovsky. A; et al., 2003. *Les modèles expérimentaux d'insuffisance rénale chez le chien.* Thèse pour le grade de vétérinaire. Université de Toulouse

D'Apolito. M; et al., 2010. *Urea-induced ROS generation causes insulinresistance in micewithchronicrenalfailure.* J Clin Invest. 120 (1): 203-213

Aronov. PA; et al., 2011. *Colonic contribution to uremic solutes.* J Am SocNephrol. 22 (9): 1769-1776

Bammens. B; et al., 2003. *Evidence for impaired assimilation of protein in chronic renal failure.* Kidney Int. 64 (6): 2196-2203

Bammens. B; et al., 2006. *Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients.* Kidney Int. 69 (6): 1081-1087

Bliss. DZ; et al., 1996. *Supplementation with gum Arabic fiber increases fecal nitrogen excretion and lowers serum urea nitrogen concentration in chronic renal failure patients consuming a low-protein diet.* Am J ClinNutr. 63 (3): 392-398

Bolte. G; et al., 1997. *The Cell lines Caco-2, T84 and HT-29: models of enterocytic differencaition and function.* Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 24 (4): 473-475

Bonanni. A; et al., 2011. *Protein-energy wasting and mortality in Chronic Kidney Disease.* Int J Environ Res Public Health. 8 (5): 1631-1654

Borges. NA; et al., 2017. *Probiotic supplementation in chronic kidney disease : a double-blind, randomized, placebo-controlled trial.* J Ren Nutr. 28 (1) : 28-36

Byrne. MM; et al., 2001. *Intestinal proliferation and delayed intestinal transit in a patient with GLP-1, GLP-2 and PYY-producing neuroendocrine carcinoma.* Digestion. 63 (1): 61-68

Chantrel. F; et al., 2013. *Survival and mortality in ESRD patients.* Nephrol Ther. 9 suppl 1: S127-137

Cheung. AK; et al., 2006. *Serum beta-2 microglobulin levels predict mortality in dialysis patients: results of the HEMO study.* J Am SocNephrol. 17 (2): 546-555

- Clever. HC; et al., 2013.** *Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts.* Annual Review of Physiology. 75 (1): 289-311
- Cohen. G; et al., 2007.** *Review on uraemic toxins III: recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro-towards a standardized approach for research on uraemia.* Nephrol Dial. 22 (12): 3381-3390
- Csaba. P; et al., 2011.** *AST-120 for preventing progression of chronic kidney disease : what can we conclude from the available evidence ?.* Dial Transplant. 40 (5) : 194-195
- Cui. Y; et al., 2017.** *Lactobacillus reuteri ZJ617 maintains intestinal integrity via regulating tight junction autophagy and apoptosis in mice challenged with lipopolysaccharide.* Oncotarget. 8 (44) : 77489-77499
- Da Graça. JRV; et al., 2015.** *Subtotal nephrectomy inhibits the gastric emptying of liquid in awake rats.* Physiol Rep. 3 (2): e12291
- Davenport. A; et al., 2009.** *Peritonitis remains the major clinical complication of peritoneal dialysis: the London, UK, peritonitis audit 2002-2003.* Perit Dial Int. 29 (3): 297-302
- Del Peso. G; et al., 2003.** *Risk factors for abdominal wall complications in peritoneal dialysis patients.* Perit Dial Int. 23 (3): 249-254
- Deportere. I; et al., 2006.** *Rôle de la Ghréline dans la regulation de la motricité gastro-intestinale.* Hepato Gastro. 3 (12): 219-224
- Devriese. S; et al., 2017.** *T84 monolayers are superior to Caco-2 as a model system of colonocytes.* Histochem Cell Biol. 148 (1): 85-93
- Di Lullo. L; et al., 2015.** *Left ventricular hypertrophy in Chronic Kidney Disease patients: from pathophysiology to treatment.* Cardiorenal Med. 5 (4): 254-266
- Doğan. I; et al., 1996.** *Esophageal motor dysfunction in chronic renal failure.* Nephron. (72 (2) : 346-347
- Doré. J; et al., 2010.** *Le microbiote intestinal humain.* Gastroentérologie Clinique et Biologique. 34 (4): 7-16
- Dou. L; et al., 2004.** *The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair.* Kidney Int. 65 (2): 442-451
- Dou. L; et al., 2007.** *The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells.* J ThrombHaemost. 5 (6): 1302-1308

- Durantón. F; et al., 2012.** *Normal and pathologic concentrations of uremic toxins.* J Am Soc Nephrol. 23 (7): 1258-1270
- Edelblum. KL; et al., 2017.** *The microbiome activates CD4 T-cell-mediated immunity to compensate for increased intestinal permeability.* Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 4 (2): 285-297
- Evenepoel. P; et al., 2009.** *Uremic toxins originating from colonic microbial metabolism.* Kidney International. 76 (114) : S12-S19
- Fasano. A; et al., 2012.** *Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications.* Clin Gastroenterol Hepatol. 10 (10): 1096-1100
- Fasano. A; et al., 2012.** *Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases.* Ann N Y Acad Sci. 1258 (1): 25-33
- Faure. V; et al., 2005.** *Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure.* J Thromb Haemost. 4 (3): 566-573
- Freeman. LM; et al., 2016.** *Evaluation of weight loss over time in cats with Chronic Kidney Disease.* J Vet Intern Med. 30 (5): 1661-1666
- Fu. RG; et al., 2011.** *Effects of chronic renal failure on gastrointestinal motility: a study on the changes of gastric emptying, small intestinal transit, interdigestive myoelectric complex, and fecal water content.* Ren Fail. 33 (6): 615-621
- Furgala. A; et al., 2012.** *Gastric dysfunction in dialysed patients with chronic renal failure.* Folia Med Cracov. 52 (1-2): 39-55
- Gerbe. F; et al., 2011.** *Distinct ATOH1 and neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium.* The Journal of Cell Biology. 192 (5): 767-780
- Gill. SR; et al., 2006.** *Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome.* Science. 312 (5778): 1355-1359
- Glasscock. RJ; et al., 2008.** *Uremic toxins: what are they ? An integrated overview of pathobiology and classification.* Journal of Renal Nutrition. 18 (1): 2-6
- Gutiérrez Sánchez. D; et al., 2017.** *Symptom burden clustering in chronic kidney disease stage 5.* Clin Nurs Res. In press, doi: 10.1177/1054773817740671

Hida. M; et al., 1996. *Inhibition of the accumulation of uremic toxins in the blood and their precursors in the feces after oral administration of Lebenin, a lactic acid bacteria preparation to uremic patients undergoing hemodialysis.* Nephron. 74 (2): 349-355

Hirako. M; et al., 2005. *Impaired gastric motility and its relationship to gastrointestinal symptoms in patients with chronic renal failure.* J Gastroenterol. 40 (12) : 1116-1122

Hughes. R; et al., 2008. *Effect of colonic bacterial metabolites on Caco-2 cell paracellular permeability in vitro.* Nutrition and cancer. 60(2) : 259-266

Iglesias. P; et al., 2010. *Adipose tissue in renal disease: clinical significance and prognostic implications.* Nephrol Dial Transplant. 25 (7): 2066-2077

Johnson. WJ; et al., 1972. *Effects of urea loading in patients with far-advanced renal failure.* Mayo Clin Proc. 47 (1): 21-29

Kalman. RS; et al., 2014. *Evidence-based review of gastrointestinal bleeding in the Chronic Kidney Disease patient.* Seminars in Dialysis. 28 (1): 68-74

Koppe. L; et al., 2013. *P-Cresyl sulfate promotes insulin resistance associated with CKD.* JASN. 24 (1): 88-99

Koppe. L; et al., 2016. *Urea impairs β cell glycolysis and insulin secretion in Chronic Kidney Disease.* J Clin Invest. 126 (9): 3598-3612

Kyoko. OO; et al., 2014. *Expression of tight junction proteins Occludin and Claudin-1 are under the circadian control in the mouse large intestine: implications in intestinal permeability and susceptibility to colitis.* PloS One. 9 (5): e98016

Laukoetter. MG; et al., 2007. *JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo.* J Exp Med. 204 (13): 3067-3076

Lefebvre. HP; et al., 2001. *Small bowel motility and colonic transit are altered in dogs with moderate renal failure.* Am J Physiol regul Integr Comp Physiol. 281 (1): R230-238

Lin. CS; et al., 2014. *Impact of the gut microbiota, prebiotics, and probiotics on human health and disease.* Biomed J. 37 (5): 259-268

Lin. X; et al., 1997. *Impaired gastric myoelectrical activity in patients with chronic renal failure.* Dig Dis Sci. 42 (5): 898-906

Magnusson. M; et al., 1991. *Impaired intestinal barrier function measured by differently sized polyethylene glycols in patients with chronic renal failure.* Gut. 32 (7): 754-759

- Malamut. G; et al., 2012.** *Intraepithelial lymphocytes: impact in gastroenterology.* Hepato-Gastro. 19 (5): 329-336
- Meijers. BK; et al., 2008.** *Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients.* Kidney Int. 73 (10): 1174-1180
- Mishima. E; et al., 2017.** *Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a CE-TOFMS-based metabolomics approach.* Kidney Int. 92 (3): 634-645
- Mowst. AM; et al., 2014.** *Regional specialization within the intestinal immune system.* Nat Rev Immunol. 14 (10): 667-685
- Nagib. EM; et al., 2012.** *Intestinal motility in acute uremia and effects of erythropoietin.* Saudi Med J. 33 (5): 500-507
- Noth. R; et al., 2011.** *Increased intestinal permeability and tight junction disruption by altered expression and localization of Occludin in a murine graft versus host disease model.* BMC Gastroenterol. 11 (109): 1-9
- Pahl. MV; et al., 2015.** *The chronic kidney disease-colonic axis.* Semin Dial. 28 (5): 459-463
- Pan. W; et al., 2017.** *Gut microbiota and chronic kidney disease: implications for novel mechanistic insights and therapeutic strategies.* Int Urol Nephrol. In press, doi: 10.1007/s11255-017-1689-5
- Panesar. A; et al., 2003.** *Resting energy expenditure in Chronic Kidney Disease : relationship with glomerular filtration rate.* Clin Nephrol. 59 (5) : 360-366
- Poesen. R; et al., 2013.** *The colon : an overlooked site for therapeutics in dialysis patients.* Semin Dial. 26(3) : 323-332
- Pope. JL; et al., 2014.** *Claudin-1 overexpression in intestinal epithelial cells enhances susceptibility to adenomatous polyposis coli-mediated colon tumorigenesis.* Molecular Cancer. 13 (167): 1-13
- Poritz. LS; et al., 2011.** *Increase in the tight junction protein Claudin-1 in intestinal inflammation.* Dig Dis Sci. 56 (10): 2802-2809
- Ravelli. AM; et al., 1995.** *Gastrointestinal function in chronic renal failure.* Pediatr Nephrol. 9 (6): 756-762
- Sabatino. A; et al., 2015.** *Alterations of intestinal barrier and microbiota in Chronic Kidney Disease.* Nephrol Dial Transplant. 30 (6): 924-933

- Schachter. J; et al., 2017.** *Effects of obesity on depression a role for inflammation and the gut microbiota.* Brain, behavior and Immunity. 159 (17): 1-37
- Schepers. E; et al., 2006.** *P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of P-cresol, activates leucocyte free radical production.* Kidney Int. 69 (6): 1081-1087
- Schepers. E; et al., 2007.** *P-cresylsulphate, the remain in vivo metabolic of p-cresol, activates leucocyte free radical production.* Nephrol Dial Transplant. 22 (2): 592-596
- Skye. SM; et al., 2016.** *Microbial modulation of a uremic toxin.* Cell Host Microbe. 20 (6): 691-692
- Slingeneyer. A; et al., 1983.** *Progressive sclerosing peritonitis: a late and severe complication of maintenance peritoneal dialysis.* Trans Am Soc Artif Intern Organs. 29 (1): 633-640
- Smith. HW; et al., 1951.** *The kidney: structure and function in health and disease.* Livre (éditeur: Oxford University Press)
- Sumida. K; et al., 2016.** *Constipation and incident CKD.* JASN. 28 (4): 1248-1258
- Stanislas. Q; et al., 2016.** *Single cell next generation sequencing and characterization of new cell types.* Med Sci. 32 (5): 447-449
- Swidsinski. A; et al., 2007.** *Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon.* Gut. 56 (3): 343-350
- Ueda. H; et al., 2007.** *AST-120, an oral adsorbent delays the initiation of dialysis in patients with chronic kidney diseases.* TherApher Dial. 11 (3): 189-195
- Ueda. H; et al., 2008.** *AST-120 treatment in pre-dialysis period affects the prognosis in patients on hemodialysis.* Ren Fail. 30 (9): 856-860
- Uribarri. J; et al., 2005.** *Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects.* Ann N Y Acad. 1043 (1) : 461-466
- Valenzano. MC; et al., 2015.** *Remodeling of tight junctions and enhancement of barrier integrity of the Caco-2 intestinal epithelial cell layer by micronutrients.* PLoS One. 10 (7) : e0133926
- Vanholder. R; et al., 2003.** *Les toxines urémiques.* Nephrology. 24 (7): 373-376

- Vanholder. R; et al., 2003.** *New insights in uremic toxins.* *Kidney International.* 63 (84) : 506-510
- Vanholder. R; et al., 2008.** *A Bench to bedside view of uremic toxins.* *JASN.* 19 (5) : 863-870
- Vanholder. R; et al., 2015.** *The intestine and the kidney: a bad marriage can be hazardous.* *Clin Kidney J.* 8 (2): 168-179
- Vaziri. ND; et al., 2012.** *Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD associated inflammation.* *Nephrol Dial Transplant.* 27 (7): 2686-2693
- Vaziri. ND; et al., 2012.** *Uremic plasma impairs barrier function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium.* *Am J Nephrol.* 36 (5): 438-443
- Vaziri. ND; et al., 2013.** *Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease.* *Am J Nephrol.* 37 (1): 1-6
- Vaziri. ND; et al., 2013b.** *Oral activated charcoal adsorbent (AST-120) ameliorates chronic kidney disease-induced intestinal epithelial barrier disruption.* *Am J Nephrol.* 37 (6) : 518-525
- Vaziri. ND; et al., 2013.** *Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora.* *Kidney Int.* 83 (2): 308-315
- Velasquez. MT; et al., 2015.** *Urea and protein carbamylation in ESRD: surrogate markers or partner in crime ?* *Kidney Int.* 87 (6): 1092-1094
- Wang. F; et al., 2012.** *Gut bacterial translocation is associated with microinflammation in end-stage renal disease patients.* *Nephrology.* 17 (8): 733-738
- Wang. XH; et al., 2014.** *Mechanisms of muscle wasting in Chronic Kidney Disease.* *Nat rev Nephrol.* 10 (9): 504-516
- Wang. Y; et al., 2014.** *Effects of alcohol on intestinal epithelial barrier permeability and expression of tight junction-associated proteins.* *Mol Med Rep.* 9 (6): 2352-2356
- Wen. J; et al., 1995.** *PYY and GLP-1 contribute to feedback inhibition from the canine ileum and colon.* *Am J Physiol.* 269 (32): G945-952
- Wen. J; et al., 1998.** *Duodenal motility in fasting dogs: humoral and neural pathways mediating the colonic brake.* *Am J Physiol.* 274 (1): G192-195
- Wong. J; et al., 2014.** *Expansion of urease- and uricase-containing indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD.* *Am J Nephrol.* 39 (3): 230-237

Wu. MJ; et al., 2004. *Colonic transit time in long term dialysis patients.* Am J Kidney Dis. 44(2) : 322-327

Wu. GJ; et al., 2017. *Circulating motilin, ghrelin, and GLP-1 and their correlations with gastric slow waves in patients with chronic kidney disease.* Am J Physiol regul Integr Comp Physiol. 313 (2) : R149-R157

Xiang. DM; et al., 2017. *Chronic Kidney Disease promotes chronic inflammation in visceral white adipose tissue.* American Journal of Physiology-Renal Physiology. 312 (4) : F689-F701

Xu. H; et al., 2017. *Insulin resistance in Chronic Kidney disease.* Nephrology. 22 (4) : 31-34.

Yamaura. Y; et al., 2016. *Functional comparison of human colonic carcinoma cell lines and primary small intestinal epithelial cells for investigations of intestinal drug permeability and first-pass metabolism.* Drug Metab Dispos. 44 (3) : 329-335

Yang. Y; et al., 2017. *Characterization and evaluation of lactic acid bacteria candidates for intestinal epithelial permeability and salmonella typhimucium colonization in neonatal turkey poults.* Poult Sci. In press, doi: 10.3382/ps/pex311

Yokozawa. T; et al., 1986. *Animal model of Adenine-induced Chronic Renal Failure in rats.* Nephron. 44 (3) : 230-234

Yoshida. I; et al., 2009. *Effect of oral adsorbent AST-120 under standard treatment of care in patients with chronic renal failure.* Nihon Jinzo Gakkai Shi. 51 (2) : 121-129

Zhu. Y; et al., 2017. *Beef, chicken, and soy proteins in diets induce different gut microbiota and metabolites in rats.* Front Microbiol. 8 (1395) : 1-11

Annexes

Article

Distal Colon Motor Dysfunction in Mice with Chronic Kidney Disease: Putative Role of Uremic Toxins

Elsa Hoibian ¹, Nans Florens ^{1,2}, Laetitia Koppe ^{1,3}, Hubert Vidal ¹ and Christophe O. Soulage ^{1,*}

¹ Univ. Lyon, CarMeN lab, INSERM U1060, INRA U1397, INSA de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, F-69621 Villeurbanne, France; elhoibian@gmail.com (E.H.); nans.florens@chu-lyon.fr (N.F.); laetitia.koppe@chu-lyon.fr (L.K.); hubert.vidal@univ-lyon1.fr (H.V.)

² Department of Nephrology, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, F-69437 Lyon, France

³ Department of Nephrology, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, F-69495 Pierre-Bénite, France

* Correspondence: christophe.soulage@insa-lyon.fr; Tel.: +33-(0)4-72-43-81-96

Received: 16 April 2018; Accepted: 15 May 2018; Published: 16 May 2018



Abstract: Although gastrointestinal complications are a common feature of patients with chronic kidney disease (CKD), the impact of uremia on bowel motility remains poorly understood. The present study was, therefore, designed to investigate the impact of uremia on gut motility. Kidney failure was induced in mice by chemical nephrectomy using an adenine diet (0.25% *w/w*). Gastrointestinal transit time and colon motility were explored *in vivo* and *ex vivo*. Colons from control mice were incubated with uremic plasma or uremic toxins (urea, indoxyl-sulfate or p-cresyl-sulfate) at concentrations encountered in patients with end-stage renal disease. Mice fed an adenine diet for 3 weeks exhibited a 3-fold increase in plasma urea ($p < 0.001$) evidencing kidney failure. The median gastrointestinal transit time was doubled (1.8-fold, $p < 0.001$) while a reduction in colonic propulsive motility was observed in CKD mice (3-fold, $p < 0.001$). Colon from CKD mice exhibited an abnormal pattern of contraction associated with a blunted maximal force of contraction. Control colons incubated with plasma from hemodialysis patients exhibited a blunted level of maximal contraction ($p < 0.01$). Incubation with urea did not elicit any difference but incubation with indoxyl-sulfate or p-cresyl-sulfate decreased the maximal force of contraction (−66% and −55%, respectively, $p < 0.01$). Taken together, these data suggest that uremia impairs colon motility probably through the retention of uremic toxins. Colon dysmotility might contribute to the gastrointestinal symptoms often reported in patients with CKD.

Keywords: uremia; chronic kidney disease; gastrointestinal motility; colon; uremic toxins

Key Contribution: Chronic kidney disease is associated in mice with colon motor dysfunction that could be related to the retention of uremic toxins.

1. Introduction

Gastrointestinal disorders are a common feature of patients with chronic kidney disease (CKD) [1]. Among the gastrointestinal complaints of CKD patients, dyspepsia, nausea, vomiting, abdominal pain, constipation and diarrheas are most commonly reported. However, the impact of an altered gut motility in CKD remains unclear. Some dysfunctions of the oesophagus [2] and stomach motility [3–5] have already been reported in patients with CKD. The cause–effect relationship between potential lesions and gut dysfunction is, nonetheless, ambiguous. Indeed, gastrointestinal symptoms occur in 40% of hemodialysis patients without detectable anatomical/histological lesions, while 60% of patients with

evidenced gastric or duodenal lesions did not exhibit any gastrointestinal symptoms [6]. Intestinal motility disorders have also been reported in patients with end-stage renal disease paradoxically including diarrheas and constipation. On the one hand, disturbed small intestinal motility was found to be involved in diarrheas in some patients with CKD [7]. On the other hand, the prolongation of colonic transit time [8] was reported to contribute to constipation in hemodialysis patients. End-stage renal disease patients (ESRD, before initiation of renal supplementation therapy) exhibit normal or delayed transit time [9] and altered gastric myoelectrical activity [3]. Abnormal intestinal motility could further contribute to the intestinal malabsorption and thus to malnutrition/wasting observed in ESRD patients [10]. Experimental studies were performed to address the effects of renal dysfunction on gut motility. In a rat model of acute kidney injury (induced with gentamycin), a significant decrease in duodenum and colon motility was observed [11]. Lefèvre et al. demonstrated that duodeno-jejunal motility and colonic transit time were altered in dogs with moderate renal failure [12]. Rats with CKD (induced surgically by 5/6 subtotal nephrectomy) exhibited alteration of the interdigestive migrating complex (IMC), reduced gastric emptying and small intestinal transit [13,14]. However, limited data is available regarding the mechanisms that underlie gut dysmotility associated with renal failure. Several factors associated with uremia could account for the gastrointestinal tract dysmotility: (i) The level of several gastrointestinal hormones involved in gut motility (e.g., gastrin, cholecystokinin, motilin) are increased in CKD patients [15–19]; (ii) patients with CKD often exhibit autonomic dysfunction [20]; (iii) many compounds that accumulate in kidney failure may impair the contractility of gut smooth muscle. The present study investigated in a mouse model of CKD (induced non-surgically by chemical nephrectomy) the effect of renal failure on total gastrointestinal transit and mechanical activity of the gut. We further studied in vitro the impact of uremic plasma and some major uremic toxins on colon motility.

2. Results

2.1. Mice Fed an Adenine Diet Developed Renal Failure

The cumulative food intake was 275 ± 13 and 260 ± 21 kJ/mouse for control and CKD mice, respectively ($p = 0.765$). Biological data for each group are shown in Table 1. CKD mice exhibited a lower body weight than control mice (-23% , $p < 0.001$). Chemical nephrectomy resulted in a significant decrease in kidney mass (-39% , $p < 0.001$) and a cardiomegaly (heart weight $+19\%$, $p < 0.05$). A macroscopic view of kidneys from control and CKD mice is shown as Supplementary Figure S1. CKD also exhibited a significant decrease in intestine weight while liver weights and colon weights were unaffected. CKD mice exhibited an elevated plasma urea (3.2 folds, $p < 0.001$) unambiguously evidencing the development of renal failure and a non-significant increase in proteinuria ($p = 0.100$).

Table 1. Biometry and biochemistry in control and chronic kidney disease (CKD) mice.

	Control (n = 16)			CKD (n = 15)			p-Value
Biometry							
Body weight, g	20.6	±	0.2	15.9	±	0.8	<0.001
Kidney, mg/10 g bw	126	±	9	77	±	12	<0.001
Heart, mg/10 g bw	53	±	7	63	±	11	0.023
Liver, mg/10 g bw	408	±	13	415	±	50	0.529
Intestine, mg/10 g bw	335	±	20	385	±	35	<0.001
Colon, 10 mg bw	53	±	9	65	±	14	0.065
Biochemistry							
Plasma urea, mmol/L	8.6	±	0.8	27.9	±	4.0	<0.001
Proteinuria, mg/24 h	7.9	±	6.9	36.0	±	21.8	0.100

Data are mean ± standard deviation (SD). Abbreviations: bw, body weight. Differences were considered significant at the $p < 0.05$ level.

2.2. Effect of Uremia on Gastrointestinal Transit Time

To investigate gut motility, gastrointestinal transit time, fecal pellet output and colon motility were measured *in vivo*. CKD mice exhibited an increase in total whole gut gastrointestinal transit time as estimated with carmine red (Figure 1). The median gastrointestinal transit time was 2.25 (interquartile range (IQR): 2.00–2.31) and 4.13 (IQR: 3.75–4.81) hours in control and CKD mice, respectively (2-folds increase, $p < 0.001$). A significant correlation was found between the plasma concentration of urea and the gastrointestinal transit time (Spearman $r = 0.82$; $p < 0.001$). A significant reduction of colonic motility in CKD mice was observed in the bead expulsion time assay (Figure 2). The expulsion time was 6.1 (IQR: 5.2–8.7) min and 17.5 (IQR: 13.1–19.4) min in control and CKD mice, respectively ($p < 0.001$). The fecal output was similar (Figure 3A) while the number of fecal pellets produced in 24 h (Figure 3B) was substantially lower in CKD compared to control mice. As a result, the mean weight of fecal pellets was higher in CKD mice (Figure 3C). Feces were collected over one hour to measure the fecal water content. CKD mice produced a reduced number of fecal pellets over the 1 h period while the fecal output was similar to control mice (Figure 3D,E). Fecal water content was significantly decreased in CKD mice (Figure 3F) supporting an increased colonic transit time as described in reference [12]. Taken together, these results suggested that uremia is associated with reduced propulsive colonic motility.

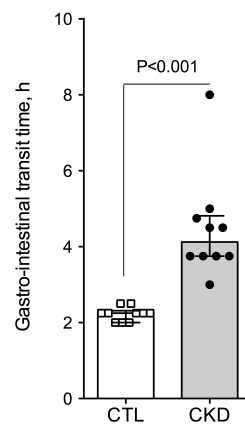


Figure 1. Alteration in gastro-intestinal transit time in mice with CKD. Whole gut transit time was measured by the carmine red method in control and CKD mice. Data are presented as median (interquartile range (IQR)) for $n = 10$ animals in each group. Data were compared using the Mann and Whitney U test. Differences were considered significant at the $p < 0.05$ level.

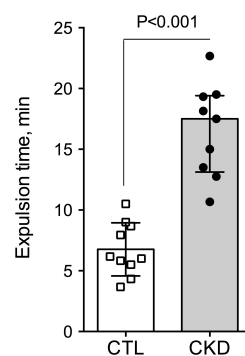


Figure 2. Reduced propulsive colonic motility in CKD mice. Distal colon motility was measured *in vivo* as the expulsion time for a 3 mm plastic bead inserted into the rectum. CKD mice exhibited an increased expulsion time evidencing a reduced colonic motility. Data are presented as median (IQR) for $n = 10$ animals in each group. Data were compared using the Mann and Whitney U test. Differences were considered significant at the $p < 0.05$ level.

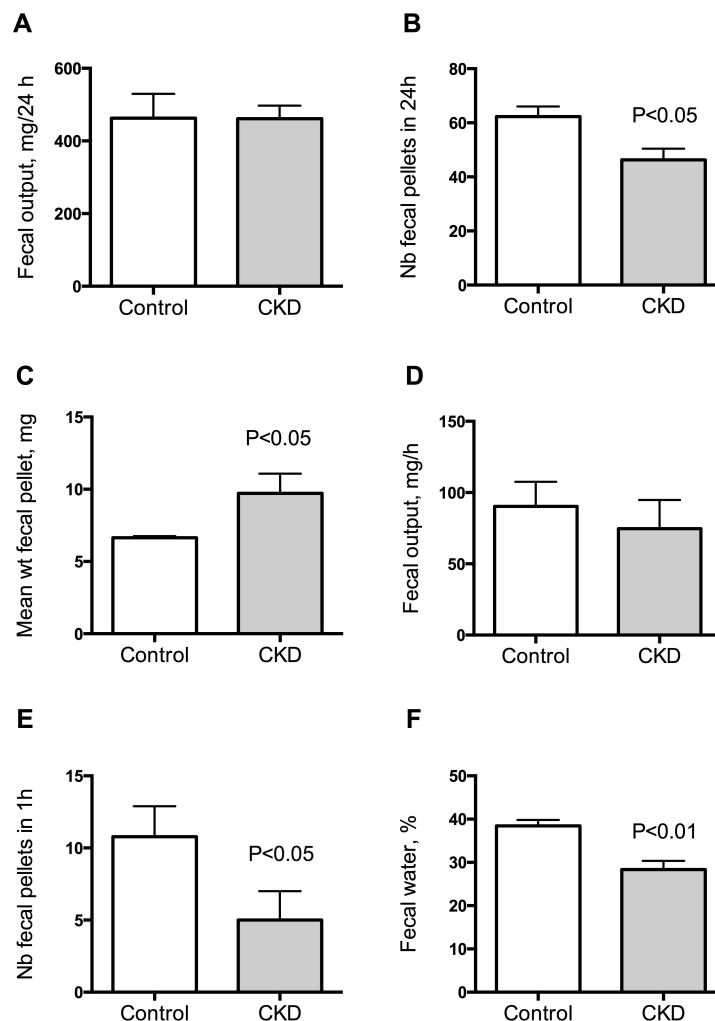


Figure 3. Measurement of fecal output in control and CKD mice. Fecal pellet output was measured over a 24 h period for 3 consecutive days in each mouse. The 3 day average for each mouse was used as a measurement of fecal output for that animal. Fecal output (A), number of fecal pellets (B) and mean weight of fecal pellets (C) in control and CKD mice. Fecal pellets were collected over a 1 h period for measurement of fecal water content. Wet weight (D), number of fecal pellets (E) and fecal water content (F) of feces collected over a 1 h period. Data are mean \pm SD for $n = 10$ animals in each group. Differences were considered significant at the $p < 0.05$ level.

2.3. Effect of Uremia on Duodenum and Colon Motility

CKD mice exhibited no significant difference in duodenal frequency of contraction ($p = 0.414$), average duration of contraction ($p = 0.355$), average force of contraction ($p = 0.414$), or motility index ($p = 0.288$) as compared with the control group (see Table 2). In contrast, CKD mice exhibited a striking reduction in all descending colon motility parameters compared with the control group. Indeed, CKD mice exhibited a very low level of spontaneous activity and a blunted average force of contraction compared to control mice. A typical tracing of baseline descending colon motility in control and CKD mice is shown in Figure 4. The maximal contraction of a duodenum and colon segment was elicited using 1 mM potassium chloride, used as a depolarizing agent (Table 2). While no difference was noticed for the duodenum, the colon from CKD mice exhibited a sharp decrease in the maximal force of contraction ($p < 0.001$).

Table 2. Duodenum and colon motility parameters in the control and CKD mice.

	Control (n = 6)		CKD (n = 5)		p-Value
Duodenum					
Frequency of contraction, min ⁻¹	36.3	± 4.5	30.7	± 4.7	0.583
Average duration of contraction, s	1.8	± 0.3	2.3	± 0.4	0.355
Average force of contraction, g/g wet wt	2.4	± 0.6	1.8	± 0.6	0.485
Maximal force of contraction, g/g wet wt *	6.6	± 3.3	6.5	± 1.4	0.920
Motility index, AU	8.8	± 0.4	7.0	± 1.5	0.288
Descending colon					
Frequency of contraction, min ⁻¹	6.8	± 3.5	<1		-
Average duration of contraction, s	14.1	± 6.7	nd		-
Average force of contraction, g/g wet wt	3.7	± 1.4	0.07	± 0.03	0.016
Maximal force of contraction, g/g wet wt *	35.5	± 11.2	0.9	± 0.6	<0.001
Motility index, AU	8.8	± 1.1	nd		-

Data are mean ± SD. AU, arbitrary unit. * Maximal force of contraction was elicited with 1 mmol/L of KCl.

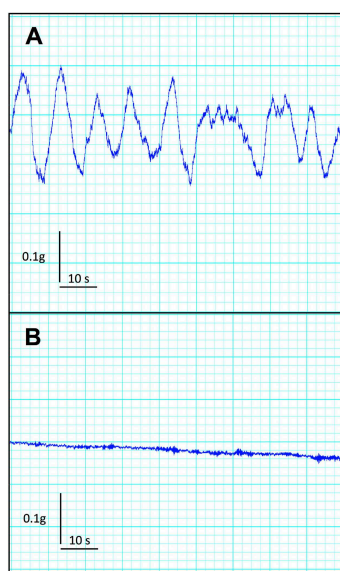


Figure 4. Typical mecanogram of isolated descending colon in control (A) and CKD mice (B). Note the absence of spontaneous motility in colon from CKD mice.

2.4. Uremic Plasma and Uremic Toxins Induce Gut Dysmotility

Ex vivo, we used the muscarinic receptor cholinergic agonist bethanechol to elicit the contraction of a segment of distal colon of control mice incubated prior to the experiment with plasma from healthy volunteers or hemodialysis (HD) patients. The main demographic and clinical characteristics of healthy volunteers and HD subjects are shown in Table 3. Colon incubated with plasma from HD patients exhibited a blunted level of contraction when compared to those incubated with healthy plasma (Figure 5). Indeed, the maximal contraction was 30% lower in colon incubated with HD plasma compared to control ($p < 0.001$). In contrast, no difference was observed in cholinergic sensitivity as evidenced by the similar values of pD_2 for bethanechol: 5.22 (95%CI: 5.06–5.51) and 4.91 (95%CI: 4.77–5.26) for control and CKD mice, respectively. When expressed as a percent of the maximal contraction, no difference was observed between the two conditions excluding any difference in sensitivity to the cholinergic agonist (data not shown). To get further insight into the uremic factors involved in colon dysfunction, we incubated colon from control mice with 3 major uremic toxins (i.e., urea, *p*-cresyl-sulfate and indoxyl-sulfate, see Figure 6) at the concentration encountered in patients with ESRD [21] according to the guidelines laid down by the European Workgroup on Uremic Toxins (EuTox, www.uremic-toxins.org) [22]. Incubation with urea (50 mM) did not elicit any difference

but incubation for two hours with IS or p-CS sharply blunted the maximal contraction elicited by potassium chloride (-66% and -55% , respectively. $p < 0.01$).

Table 3. Demographic and clinical characteristics of the subjects.

	Control (n = 11)		Hemodialysis (n = 19)		p-Value
Gender, M/F	6/5		13/6		0.696
Age, y	49.0	± 12.9	62.4	± 14.6	0.017
Dialysis vintage, y	n/a		3.7	± 2.6	-
Creatinine, μM	80	± 32	818	± 402	<0.001
eGFR, mL/min.1.73m ²	94	± 29	<15		-
Urea, mM	6.6	± 2.7	20.7	± 8.0	0.007

Data are expressed as means \pm SD. Means were compared with Student t-test. Proportions were compared using Fisher's exact test. Statistical significance was set at the $p < 0.05$ level. Abbreviations: CKD, chronic kidney disease; eGFR, estimated glomerular filtration rate; n/a, not applicable. GFR was estimated according to the CKD-EPI formula.

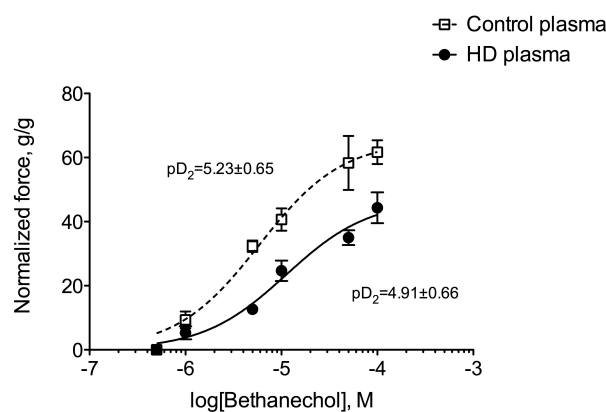


Figure 5. Comparison of in vitro cholinergic reactivity in the distal colon of control mice incubated with plasma from control or hemodialysis patients. Colons were incubated for 2 h with 20% (*v/v*) plasma from healthy volunteers or hemodialysis patients. Contraction of the smooth muscle of the colon was then elicited by stimulation with the muscarinic receptor agonist bethanechol (5.10^{-7} – 10^{-4} M). Data were expressed as mean \pm SD for $n = 4$ independent experiments.

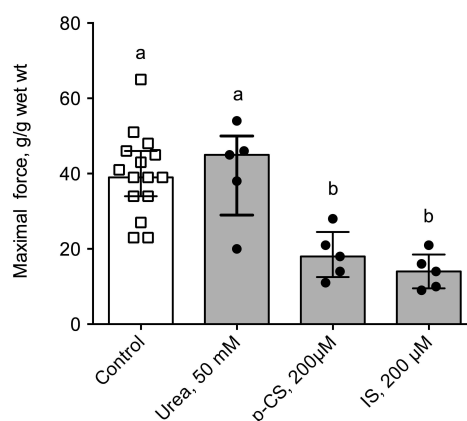


Figure 6. In vitro cholinergic reactivity in the distal colon of control mice incubated with uremic toxins. Colons were incubated for 2 h with urea (50 mM), p-cresyl sulfate (p-CS, 200 μM) or indoxyl-sulfate (IS, 200 μM). A maximal contraction of the smooth muscle of the colon was then elicited by stimulation with the muscarinic receptor agonist bethanechol (10^{-4} M). Data were expressed as median (IQR) for $n = 5$ independent experiments. Data were compared using the Krukall and Wallis test. Different letters indicate a significant difference between groups at $p < 0.05$ level.

3. Discussion

The gastro-intestinal symptoms in CKD patients are strongly related to gastrointestinal motor dysfunctions [4]. The aim of the present study was, therefore, to evaluate the effects of chronic kidney disease on intestinal motility in a mouse model of CKD. We further evaluated the impact of uremic plasma, collected from HD patients on the colon contractility. We observed that CKD mice exhibited an increased transit time and a blunted motility of the distal colon evidenced through *in vivo* as well as *ex vivo* experiments. We further observed that plasma from HD patients and some uremic toxins (i.e., IS and p-CS) impaired gut smooth muscle contractility.

The present results are in line with previous reports supporting a gut dysmotility in animal models or humans. Da Graça et al. reported an impaired gastric emptying in 5/6 nephrectomized rats [14]. Acute renal failure results decreased motility of the duodenum and the distal colon in rats [11]. In good agreement, Wu et al. reported that, total, right segmental, as well as rectosigmoid segmental colonic transit times were prolonged in HD patients compared with healthy controls [8]. They further observed that increased individual colonic transit times were correlated with self-reported constipation in HD patients. In contrast, some other studies yielded some conflicting results. Dogs with moderate renal failure exhibit a decreased velocity in the myoelectrical migrating complex in the small intestine associated with a decreased transit time [12]. Fu et al. reported that the interdigestive myoelectric complex (IMC) of 5/6 nephrectomized rats was altered and based on fecal water content (used as a “proxy” of colonic transit time), and that the colonic transit time was decreased [13]. The different animal models (i.e., dogs, rats or mice) and the method used to produce the kidney failure (i.e., subtotal nephrectomy vs chemical nephrectomy) could account for such discrepancies between experimental studies. The level of kidney failure (i.e., moderate or terminal) reached in each experimental model could also account for these differences. The most common rodent model of CKD is the 5/6 subtotal nephrectomy model (also referred to as the “remnant kidney” model) in which there is a surgical reduction of the renal mass and nephrons number. Chemical nephrectomy using an adenine diet has, however, been proved to be a good model of renal failure [23]. The adenine diet induces a reproducible kidney failure [23,24] depending on the duration and the concentration of adenine in the diet [25]. The three weeks of adenine diet used in the present study produced irreversible kidney damage (see Table 1 and Supplementary Figure S1). The surgical process (i.e., 2-step nephrectomy) could per se have an impact on gastrointestinal transit (e.g., post-surgical adhesences, fibrosis, ...). It is noteworthy that the use of a non-surgical model of CKD avoids these possible biases related to the surgical process. The study of gut motility (either *in vivo* or *in vitro*) was performed after a washout period of 3 to 4 weeks (i.e., mice were fed a normal chow for 3 or 4 weeks) excluding that adenine intake directly interfered with the measurement of motility. The adenine diet has already been successfully used to study the impact of renal failure on gut permeability [26,27]. Vaziri et al. [26] compared rats with renal failure induced either surgically by 5/6 subtotal nephrectomy or by chemical nephrectomy with adenine. Of note, no significant difference in gut structure or permeability was noticed between the two methods used to induce renal failure. In preliminary experiments, we incubated colon from control mice with a concentration of adenine 25 μ M to mimic the adenine diet and failed to observe any difference of colon motility (data not shown). Thus, pre-incubation with adenine does not affect intestinal motility. The gut dysmotility is, therefore, an effect of kidney failure and uremia rather than an effect of adenine intake on the gut.

Only scarce data is available in the biomedical literature regarding the mechanisms that underlie impaired gut motility in kidney disease. Many factors could account for a reduced gut motility among which are: (i) abnormal levels of gastrointestinal hormones involved in the control of gut motility; (ii) autonomic nervous system dysfunction or imbalance; and (iii) the impact of the uremic environment. These putative mechanisms deserve some comments. Many gastrointestinal hormones display increased circulating levels in CKD (e.g., gastrin, motilin, cholecystokinin, vaso-intestinal peptide, ...) [15–19,28–30]. Altered circulating levels of gastrointestinal hormones could have a strong impact on gut motility. Autonomic dysfunction in CKD leads to an increased sympathetic

nervous system activity and depressed parasympathetic activity [20,31]. Since sympathetic system and parasympathetic systems, respectively, inhibit and stimulates gut motility, autonomic dysfunction could contribute to the dysmotility and the delayed gastrointestinal transit time observed in CKD. The fact that colon exhibits an abnormal motility *ex vivo*, however, challenges the role of autonomic dysfunction. An altered “humoral” environment including accumulation of inflammatory factors and/or uremic toxins could explain the colon dysfunction. This view is favoured by the significant negative correlation between plasma urea concentration and colon maximal force of contraction ($r_s = 0.82$; $p < 0.001$). To challenge this hypothesis, we incubated colon from control mice (i.e., healthy colons) with plasma from healthy volunteers or HD patients. Plasma from HD patients impaired the colon contraction elicited by a potent cholinergic agonist, suggesting that uremic plasma contains one or several factor(s) accumulated in CKD that could impair smooth muscle contraction. In good agreement, it was shown that HD treatment improves gastric hypo-motility and reduces the severity of gastrointestinal symptoms in CKD patients [32] suggesting that at least some of these factors could be removed by HD. Many compounds that accumulate in kidney failure may impair the contractility of gut smooth muscle among which many cytokines and uremic toxins. The “uremic syndrome” (also referred to as uremia) is indeed attributed to the progressive retention of numerous compounds, which in healthy individuals are normally excreted by the kidneys. The European Uremic Toxin Work Group (EuTox) listed about 90 uremic retention solutes (or uremic toxins) that accumulate in ESRD and exhibit deleterious effects on biological systems [21,22,33–35]. Based on their behaviour during dialysis process, uremic toxins were divided into three main groups: low-molecular-weight (MW) water-soluble compounds (<500 Da), large-molecular-weight compounds (the so-called “middle-molecules”, 0.5–60 kDa) and compounds tightly bound to plasma proteins (<500 Da). Of note, compounds belonging to the latter group are poorly removed by most of the conventional HD treatments due to their tight interactions with plasma proteins. Colon from control mice were incubated with some prototypical uremic toxins using relevant concentrations in the context of CKD [21,22]. Urea (60 Da) is the prototype of small water-soluble compounds. While older studies examining acute urea infusion suggested that urea only exhibited limited toxicity, more recent studies carefully re-evaluated the actual toxicity of urea [36]. In our hands, urea did not exhibit any effect on colon motility *ex vivo*. It was, however, demonstrated that urea, at a concentration relevant for uremia, triggers the disintegration of the gut epithelial barrier [37] by increasing gut permeability through the breakdown of the tight junctions. Furthermore, the effect of urea was dramatically amplified by the microbial enzyme urease added to simulate the presence of microbial flora [37]. Urease converts urea into ammonia, a compound shown to be highly toxic for the gut epithelia. However, we cannot rule out the role and the impact of ammonia on colon motility. Further experiments, directly using ammonia or urea in the presence of urease, are needed to confirm this point. IS (251 Da) and p-CS (188 Da) are prototypical of protein-bound uremic toxins. Colon incubated with IS or p-CS exhibited a blunted force of contraction (see Figure 6) suggesting that these toxins could have deleterious effect on colon smooth muscle cells. No data are available regarding the impact of p-CS/IS on visceral smooth muscle cells but extensive studies were conducted on vascular smooth muscle cells. p-Cresyl-sulfate was shown to damage vascular smooth muscle cells by inducing oxidative stress [38]. Indoxyl-sulfate was shown to promote proliferation [39,40] and calcification [41,42] of vascular smooth muscle cells, two hallmarks of the atherosclerotic process. Taken together, these data support the possible toxicity of these uremic toxins on visceral smooth muscle cells. These direct effects could explain the decrease in motility observed *in vivo* (e.g., reduced propulsive colon motility) but defects in proliferation or calcifications for instance cannot explain the effect observed *ex vivo* with incubation of control colon with uremic plasma or uremic toxins. However, as tissues were incubated with uremic toxins for two hours, oxidative stress or stimulation of cell-signaling pathways (such as for instance activation of aryl hydrocarbon receptor –AhR- by IS [43]) could account for the observed effects. We previously reported that incubation of muscle cells for 30 min with p-CS was sufficient to elicit biological effects [44]. Further studies are, however, needed to decipher the molecular mechanisms involved.

The putative consequences of an increased colonic transit time deserve some comments. The major role of the colon is to absorb water and electrolytes in order to concentrate the waste products of digestion in order to facilitate their disposal. The laxative bisacodyl was proved to be efficient to decrease serum potassium concentration in HD patients [45]. Thus, an increased residence time of stools in the colon could alter the absorption/secretion of potassium and contribute to the hyperkalaemia observed in CKD patients. Since the colon is a major site of water reabsorption, prolonged colon transit time could favour the formation of hard stools and promote constipation in CKD patients. The colon also provides an important reservoir for a microbial community, often referred to as the gut microbiota (thought to constitute 10^{11} – 10^{12} microbial cells per g of content). The colon is, nowadays, recognized as a major source of uremic toxins in CKD [46–48]. p-Cresyl-sulfate and IS are actually prototypes of uremic toxins originating from colonic bacterial metabolism. Pinpointing the major role of the gut microbiota, the survival time of bilaterally nephrectomized germ-free rats is doubled compared to that of conventional animals [49]. Colonic microbial metabolism can be categorized roughly as saccharolytic (i.e., carbohydrate fermentation) or proteolytic (i.e., protein fermentation). Carbohydrate fermentation predominates in the right (i.e., ascending) colon while protein fermentation predominates in the left (i.e., descending) colon [50,51]. Saccharolytic metabolism is considered beneficial for the host while proteolytic metabolism generates many toxic by-products such as p-cresol and indole (i.e., precursors of pCS and IS, respectively). Increasing the residence time in the right colon could, therefore, promote the production and the absorption of these uremic toxins [52]. Interestingly, Cummings et al. reported a significant correlation between a longer colonic transit time and urinary excretion of phenols [53]. In good agreement, treatment of CKD mice with lubiprostone (a drug commonly used for the treatment of constipation) decreased the plasma level of uremic toxins derived from gut microbiota, such as indoxyl sulfate and hippuric acid [27]. Such a phenomenon could, therefore, promote a vicious cycle between the production of colon-derived uremic toxins and their direct impact on colon motility (see scheme in Figure 7).

The vicious cycle of uremia in colon

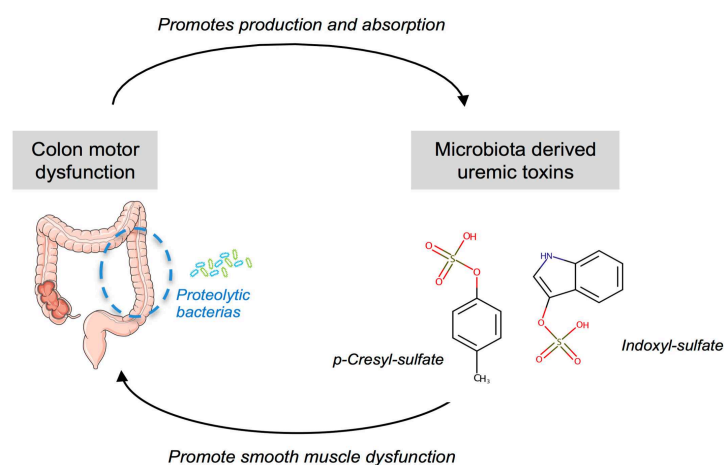


Figure 7. Illustration of the potential vicious cycle of uremia in the colon.

4. Conclusions

In conclusion, this study might confirm that the colic motility is altered in CKD, as evidenced by an increased gastrointestinal transit time and a reduced propulsive colonic motility. The gastro-intestinal complaints in CKD patients seem to be related to gastrointestinal motor dysfunction [4]. We speculate that reduced colon propulsive motility and increased colonic transit time could strongly contribute to the constipation often observed in patients with CKD. The increased residence time of the stools in the

colon might further increase the production/absorption of colon-derived uremic toxins and alter the reabsorption of water and electrolytes. As previously mentioned by Poesen et al. [51], colon motility could be an emerging target for therapeutic interventions in uremic patients.

5. Materials and Methods

5.1. Chemicals and Reagents

Unless otherwise stated, all chemicals were obtained from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Indoxyl sulfate (IS, ref I3875) was purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). The potassium salts of *p*-cresyl sulfate (*p*-CS) was synthesized according the method described by Feigenbaum and Neuberg [54]. Since *p*-CS and IS are mainly protein-bound in biological systems, all in vitro experiments were performed in a medium supplemented with 35 g/L bovine serum albumin (BSA) according to the recommendations of EuTox [22]. Since *p*-CS and IS were synthesized (or purchased) as potassium salts, a final concentration of 200 μ M KCl in saline was chosen as control to equal the potassium concentration in the K-salt of *p*-CS or IS.

5.2. Patients

Nineteen hemodialysis patients and 11 non-CKD controls were recruited from an ongoing study at Hospices Civils de Lyon (Department of Nephrology). The patient characteristics are presented in Table 3. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethical committee (reference L16-57 and DC-2009-1066, CPP Lyon Sud-Est IV). Written informed consent was obtained from all subjects. Blood samples were collected, centrifuged at $1500 \times g$ for 10 min to isolate plasma. Plasma from non-CKD and hemodialysis (HD) patients were pooled in equal amounts and thereafter referred to as 'Control pool' and 'HD pool', respectively. The control pool and HD pool were sterile filtered (cut-off 0.22 μ m), aliquoted, and stored at -80 °C until use.

5.3. Animals

Animal experiments were performed under the authorization n°69-266-0501 (INSA-Lyon, DDPP-DSV), according to the guidelines laid down by European Union Council Directive 2010/63UE. The project was approved by the local institutional review board for animal care and use (CETIL) under the reference # 3210 (29 February 2016). Three-week old male C57Bl/6 JRj mice were purchased from Janvier SA (Le Genest-Saint-Isle, France) and housed in an air-conditioned room with a controlled environment of 21 ± 0.5 °C and 60–70% humidity, under a 12 h light/dark cycle (light on from 07:00 to 19:00) with free access to standard food (A04, SAFE, Augy, France) and water. CKD was induced non-surgically by feeding the mice with an adenine-enriched diet. Thirty mice were randomized to either a CKD ($n = 15$) or a control group ($n = 15$). The animals assigned to the CKD group were fed a chow containing 0.25% (*w/w*) adenine on A04 basis (SAFE, Augy, France) for 21 days. The control animals were pair-fed with a regular chow (A04) throughout the period of induction of CKD. Then, all mice were fed with standard diet for 21 days prior to the experiments.

5.4. Measurement of Total Gastrointestinal Transit Time

Carmines red (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was prepared as a 6% (*w/v*) solution in 0.5% methyl cellulose and sterile-filtered. Mice were individually housed and fasted overnight. Mice were force-fed with 0.3 mL of the carmine red solution between 09:00 and 10:00 AM and monitored every 30 min until the appearance of the first red fecal pellet. The time from gavage to the appearance of the first red pellet was recorded as total gastrointestinal transit time [55].

5.5. Urine Collection and Biochemical Measurements

The mice were individually placed into metabolic cages to collect 24-hour urine. Urine volume was determined gravimetrically and urine protein concentration was measured with Bradford protein

assay (BioRad, Marne-la-Coquette, France) using BSA as standard. The plasma concentration of urea was determined using an enzymatic kit from Sobioda (Montbonnot, France).

5.6. Fecal Water Content

Fecal pellet output was evaluated in control and CKD mice. Mice were individually housed in a metabolic cage for 3 consecutive days with food and water available ad libitum. Fecal pellets were collected daily from each mouse and pellets were counted and weighed to the nearest milligram. Fecal pellets were placed into a 60 °C oven overnight and dry weight was then determined. Fecal pellet wet and dry weights from each animal was averaged over the 3-day period and that average value was used for each mouse.

5.7. Measurement of Colonic Motility In Vivo

Colonic motility was assessed in vivo by measuring time to expulsion of a 3 mm diameter plastic bead inserted into the descending colon. Mice were fasted 12 h prior to experimentation. A single plastic bead was inserted 15 mm into the distal colon of control and CKD mice and expulsion time was measured [56].

5.8. Sacrifice and Tissue Dissection

Animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg i.p.). Blood was collected through cardiac puncture in a heparinized syringe. Blood was centrifuged for 5 min at 3500× g to obtain plasma. Plasma were snap frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until analysis. A part of the duodenum and of the descending colon were rapidly dissected out and ice-cold saline for ex vivo experiments as described below. Liver, heart, kidneys, small intestine, colon were dissected out, weighed, snap frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C.

5.9. Isolated Duodenum and Colon

Segments of either duodenum or descending colon (approximately 0.5 cm long) were mounted onto stainless steel supports and suspended in an organ tissue bath containing 20 mL of warmed (37 °C) Tyrode's solution (containing in mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 0.9 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 0.4 NaH₂PO₄, 11.9 NaHCO₃, and 5.5 D-glucose, adjusted to pH 7.40) continuously bubbled with air. The tissues were connected to an isometric force transducer (AD Instrument, Paris, France), connected to an amplifier (Powerlab 10T, AD Instrument, Paris, France) and a computerized acquisition system (Chart 5.3, AD instrument, Paris, France) to record changes in isometric force. The resting tension was adjusted to 1 g and the tissues were then equilibrated for 30 min. Baseline motility was recorded for 30 min. Then, a record was obtained in the presence of 1 mM of potassium chloride (KCl). For evaluation of basal intestinal motility, the frequency of contraction, average duration of contraction, average force of contraction, and motility index was computed from the record. Duodenum and colon motility was expressed as the motility index calculated as Ln (number of peaks × sum of peak amplitudes +1) [57]. The absolute force of contraction in response to KCl was measured. At the end of the experiments, the segment of duodenum or colon used for the recording was blotted dry and weighed to the nearest milligram for normalization of tension (expressed as g/g of wet weight). In a second set of experiments, mice were euthanized by inhalation of carbon dioxide according to the American Veterinary Medical Association (AVMA) guidelines and as approved by the regional ethics committee (CETIL, CNREEA n°102). Tissues were incubated with 20% (v/v) of plasma from the Control or HD pools. The muscarinic cholinergic receptor agonist, bethanechol (5.10^{−7} to 10^{−4} M) was then tested to determine visceral smooth muscle reactivity in the colon. Some tissue was also incubated for 2 h with urea (50 mM), *p*-CS (200 μM) or IS (200 μM). Bethanechol (10^{−4} M) was then used to elicit the maximal contraction of the colon segment. At the end of the experiments, the section of colon used for the recordings were blotted dry and weighed to the nearest milligram for normalization of tension (expressed as g/g of wet weight). pD₂ was calculated as −log₁₀(EC₅₀) with EC₅₀, effective concentration 50% of bethanechol.

5.10. Statistics

Data are expressed as means \pm standard deviation (SD) or median (interquartile range) and were analyzed using the GraphPad Prism, version 5.0, software (GraphPad software, La Jolla, CA, USA). Simple comparisons were performed using Mann and Whitney U tests. Multiple comparisons were performed using Kruskal and Wallis tests and appropriated with Dunn's tests. Differences were considered significant at the $p < 0.05$.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6651/10/5/204/s1>. Figure S1: Macroscopic view of the kidney of control and CKD mice.

Author Contributions: C.O.S. conceived and designed the study. E.H. and C.O.S. performed the experiments. L.K. and N.F. included the patients, collected clinical data and prepared plasma pools. C.O.S. performed statistical analysis. C.O.S. wrote the manuscript. E.H., L.K., N.F., H.V. and C.O.S. edited and revised the manuscript.

Acknowledgments: This study was supported by INSERM and INSA-Lyon. E. Hoibian was supported by a grant from the French "Ministère de la Recherche et de la Technologie" (MRT).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cano, A.E.; Neil, A.K.; Kang, J.Y.; Barnabas, A.; Eastwood, J.B.; Nelson, S.R.; Hartley, I.; Maxwell, D. Gastrointestinal symptoms in patients with end-stage renal disease undergoing treatment by hemodialysis or peritoneal dialysis. *Am. J. Gastroenterol.* **2007**, *102*, 1990–1997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Doğan, I.; Unal, S.; Sindel, S.; Tunçer, C.; Arinsoy, T.; Bali, M.; Kandilci, U.; Hasanoğlu, E. Esophageal motor dysfunction in chronic renal failure. *Nephron.* **1996**, *72*, 346–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lin, X.; Mellow, M.H.; Southmayd, L.; Pan, J.; Chen, J.D. Impaired gastric myoelectrical activity in patients with chronic renal failure. *Dig. Dis. Sci.* **1997**, *42*, 898–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hirako, M.; Kamiya, T.; Misu, N.; Kobayashi, Y.; Adachi, H.; Shikano, M.; Matsuhisa, E.; Kimura, G. Impaired gastric motility and its relationship to gastrointestinal symptoms in patients with chronic renal failure. *J. Gastroenterol.* **2005**, *40*, 1116–1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Furgała, A.; Błaut-Kadzielska, U.; Stojakowska, M.; Dobrek, L.; Mazur, M.; Machowska, A.; Thor, P.J. Gastric dysfunction in dialysed patients with chronic renal failure. *Folia Med. Cracov.* **2012**, *52*, 39–55. [[PubMed](#)]
6. Musola, R.; Franzin, G.; Mora, R.; Manfrini, C. Prevalence of gastroduodenal lesions in uremic patients undergoing dialysis and after renal transplantation. *Gastrointest. Endosc.* **1984**, *30*, 343–346. [[CrossRef](#)]
7. Strid, H.; Simrén, M.; Stotzer, P.-O.; Ringström, G.; Abrahamsson, H.; Björnsson, E.S. Patients with chronic renal failure have abnormal small intestinal motility and a high prevalence of small intestinal bacterial overgrowth. *Digestion* **2003**, *67*, 129–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Wu, M.J.; Chang, C.S.; Cheng, C.H.; Chen, C.H.; Lee, W.C.; Hsu, Y.H.; Shu, K.H.; Tang, M.J. Colonic transit time in long-term dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* **2004**, *44*, 322–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Kang, J.Y. The gastrointestinal tract in uremia. *Dig. Dis. Sci.* **1993**, *38*, 257–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Ravelli, A.M. Gastrointestinal function in chronic renal failure. *Pediatr. Nephrol.* **1995**, *9*, 756–762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Nagib, E.M.; El-Sayed, M.H.; Ahmed, M.A.; Youssef, M.H. Intestinal motility in acute uremia and effects of erythropoietin. *Saudi Med. J.* **2012**, *33*, 500–507. [[PubMed](#)]
12. Lefebvre, H.P.; Ferré, J.P.; Watson, A.D.; Brown, C.A.; Serthelon, J.P.; Laroute, V.; Concordet, D.; Toutain, P.L. Small bowel motility and colonic transit are altered in dogs with moderate renal failure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2001**, *281*, R230–R238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Fu, R.G.; Wang, Y.; Yuan, H.Z.; Zhou, J.P.; Wang, L.; Liu, X.D.; Ma, F.; Zhang, J. Effects of chronic renal failure on gastrointestinal motility: A study on the changes of gastric emptying, small intestinal transit, interdigestive myoelectric complex, and fecal water content. *Renal Fail.* **2011**, *33*, 615–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Da Graça, J.R.V.; Parente, C.C.; Fiúza, R.F.; da Silva, P.A.F.; Mota, B.T.; Salles, L.D.; de Souza Silva, C.M.; da Silva, M.T.B.; de Oliveira, R.B.; Dos Santos, A.A. Subtotal nephrectomy inhibits the gastric emptying of liquid in awake rats. *Physiol. Rep.* **2015**, *3*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hegbrant, J.; Thysell, H.; Ekman, R. Plasma levels of gastrointestinal regulatory peptides in patients receiving maintenance hemodialysis. *Scand. J. Gastroenterol.* **1991**, *26*, 599–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. McLeod, R.S.; Track, N.S.; Reynolds, L.E. Elevated plasma motilin concentrations in chronic renal disease. *Can. Med. Assoc. J.* **1979**, *121*, 268–273. [[PubMed](#)]
17. Piga, M.; Altieri, P.; Floris, A.; Barraca, A.; Tagleri, G.; Madeddu, G.; Bolasco, F.; Gervasi, F.; Piras, M.R.; Serra, A.R. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) plasma levels in chronic renal failure. *J. Nucl. Med. Allied Sci.* **1984**, *28*, 77–80. [[PubMed](#)]
18. Shima, K.; Shin, S.; Tanaka, A.; Hashimura, E.; Nishino, T.; Imagawa, K.; Kumahara, Y.; Yanaihara, N. Heterogeneity of plasma motilin in patients with chronic renal failure. *Horm. Metab. Res.* **1980**, *12*, 328–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Sirinek, K.R.; O'Doriso, T.M.; Gaskill, H.V.; Levine, B.A. Chronic renal failure: Effect of hemodialysis on gastrointestinal hormones. *Am. J. Surg.* **1984**, *148*, 732–735. [[CrossRef](#)]
20. Chou, Y.H.; Tsai, T.J. Autonomic dysfunction in chronic kidney disease: An old problem in a new era. *J. Formos. Med. Assoc.* **2016**, *115*, 687–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Duranton, F.; Cohen, G.; De Smet, R.; Rodriguez, M.; Jankowski, J.; Vanholder, R.; Argiles, A. European Uremic Toxin Work Group. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2012**, *23*, 1258–1270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Cohen, G.; Glorieux, G.; Thornalley, P.; Schepers, E.; Meert, N.; Jankowski, J.; Jankowski, V.; Argiles, A.; Anderstam, B.; Brunet, P.; et al. Review on uraemic toxins III: Recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro—towards a standardized approach for research on uraemia. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2007**, *22*, 3381–3390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Yokozawa, T.; Zheng, P.D.; Oura, H.; Koizumi, F. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron.* **1986**, *44*, 230–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Yokozawa, T.; Oura, H.; Okada, T. Metabolic effects of dietary purine in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1982**, *28*, 519–526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Okada, H.; Kaneko, Y.; Yawata, T.; Uyama, H.; Ozono, S.; Motomiya, Y.; Hirao, Y. Reversibility of adenine-induced renal failure in rats. *Clin. Exp. Nephrol.* **1999**, *3*, 82–88. [[CrossRef](#)]
26. Vaziri, N.D.; Yuan, J.; Rahimi, A.; Ni, Z.; Said, H.; Subramanian, V.S. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: A likely cause of CKD-associated inflammation. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2012**, *27*, 2686–2693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Mishima, E.; Fukuda, S.; Shima, H.; Hirayama, A.; Akiyama, Y.; Takeuchi, Y.; Fukuda, N.N.; Suzuki, T.; Suzuki, C.; Yuri, A.; et al. Alteration of the Intestinal Environment by Lubiprostone Is Associated with Amelioration of Adenine-Induced CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 1787–1794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wu, G.J.; Cai, X.D.; Xing, J.; Zhong, G.H.; Chen, J.D.Z. Circulating motilin, ghrelin, and GLP-1 and their correlations with gastric slow waves in patients with chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2017**, *313*, R149–R157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Wang, X.; Luo, S.; Liu, Y. Effects of changes of plasma motilin level on the motility of gallbladder in patients with chronic renal failure. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* **1996**, *35*, 86–88. [[PubMed](#)]
30. Taylor, I.L.; Sells, R.A.; McConnell, R.B.; Dockray, G.J. Serum gastrin in patients with chronic renal failure. *Gut.* **1980**, *21*, 1062–1067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Hausberg, M.; Kosch, M.; Harmelink, P.; Barenbrock, M.; Hohage, H.; Kisters, K.; Dietl, K.H.; Rahn, K.H. Sympathetic nerve activity in end-stage renal disease. *Circulation.* **2002**, *106*, 1974–1979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Adachi, H.; Kamiya, T.; Hirako, M.; Misu, N.; Kobayashi, Y.; Shikano, M.; Matsuhisa, E.; Kataoka, H.; Sasaki, M.; Ohara, H.; et al. Improvement of gastric motility by hemodialysis in patients with chronic renal failure. *J. Smooth Muscle Res.* **2007**, *43*, 179–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Vanholder, R.; Baurmeister, U.; Brunet, P.; Cohen, G.; Glorieux, G.; Jankowski, J. European Uremic Toxin Work Group. A bench to bedside view of uremic toxins. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, *19*, 863–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Vanholder, R.; De Smet, R.; Glorieux, G.; Argilés, A.; Baurmeister, U.; Brunet, P.; Clark, W.; Cohen, G.; De Deyn, P.P.; Deppisch, R.; et al. Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* **2003**, *63*, 1934–1943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Vanholder, R.; Meert, N.; Schepers, E.; Glorieux, G.; Argiles, A.; Brunet, P.; Cohen, G.; Drüeke, T.; Mischak, H.; Spasovski, G.; et al. Review on uraemic solutes II—variability in reported concentrations: Causes and consequences. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2007**, *22*, 3115–3121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lau, W.L.; Vaziri, N.D. Urea, a true uremic toxin: The empire strikes back. *Clin. Sci.* **2017**, *131*, 3–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Vaziri, N.D.; Yuan, J.; Norris, K. Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease. *Am. J. Nephrol.* **2013**, *37*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Watanabe, H.; Miyamoto, Y.; Enoki, Y.; Ishima, Y.; Kadowaki, D.; Kotani, S.; Nakajima, M.; Tanaka, M.; Matsushita, K.; Mori, Y.; et al. *p*-Cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2015**, *3*, e00092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Yamamoto, H.; Tsuruoka, S.; Ioka, T.; Ando, H.; Ito, C.; Akimoto, T.; Fujimura, A.; Asano, Y.; Kusano, E. Indoxyl sulfate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* **2006**, *69*, 1780–1785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Muteliefu, G.; Enomoto, A.; Niwa, T. Indoxyl sulfate promotes proliferation of human aortic smooth muscle cells by inducing oxidative stress. *J. Ren. Nutr.* **2009**, *19*, 29–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Muteliefu, G.; Enomoto, A.; Jiang, P.; Takahashi, M.; Niwa, T. Indoxyl sulphate induces oxidative stress and the expression of osteoblast-specific proteins in vascular smooth muscle cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2009**, *24*, 2051–2058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zhang, H.; Chen, J.; Shen, Z.; Gu, Y.; Xu, L.; Hu, J.; Zhang, X.; Ding, X. Indoxyl sulfate accelerates vascular smooth muscle cell calcification via microRNA-29b dependent regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Toxicol. Lett.* **2018**, *284*, 29–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Schroeder, J.C.; Dinatale, B.C.; Murray, I.A.; Flaveny, C.A.; Liu, Q.; Laurenzana, E.M.; Lin, J.M.; Strom, S.C.; Omiecinski, C.J.; Amin, S.; et al. The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor. *Biochemistry.* **2010**, *49*, 393–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Koppe, L.; Pillon, N.J.; Vella, R.E.; Croze, M.L.; Pelletier, C.C.; Chambert, S.; Massy, Z.; Glorieux, G.; Vanholder, R.; Dugenet, Y.; et al. *p*-Cresyl sulfate promotes insulin resistance associated with CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2013**, *24*, 88–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mathialahan, T.; Sandle, G.I. Dietary potassium and laxatives as regulators of colonic potassium secretion in end-stage renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2003**, *18*, 341–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Aronov, P.A.; Luo, F.J.-G.; Plummer, N.S.; Quan, Z.; Holmes, S.; Hostetter, T.H.; Meyer, T.W. Colonic contribution to uremic solutes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2011**, *22*, 1769–1776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Wikoff, W.R.; Anfora, A.T.; Liu, J.; Schultz, P.G.; Lesley, S.A.; Peters, E.C.; Siuzdak, G. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3698–3703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Mishima, E.; Fukuda, S.; Mukawa, C.; Yuri, A.; Kanemitsu, Y.; Matsumoto, Y.; Akiyama, Y.; Fukuda, N.N.; Tsukamoto, H.; Asaji, K.; et al. Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a CE-TOFMS-based metabolomics approach. *Kidney Int.* **2017**, *92*, 634–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Einheber, A.; Carter, D. The role of the microbial flora in uremia. I. Survival times of germfree, limited-flora, and conventionalized rats after bilateral nephrectomy and fasting. *J. Exp. Med.* **1966**, *123*, 239–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Evenepoel, P.; Meijers, B.K.I.; Bammens, B.R.M.; Verbeke, K. Uremic toxins originating from colonic microbial metabolism. *Kidney Int. Suppl.* **2009**, *76*, S12–S19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Poesen, R.; Meijers, B.; Evenepoel, P. The colon: An overlooked site for therapeutics in dialysis patients. *Semin. Dial.* **2013**, *26*, 323–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Vanholder, R.; Glorieux, G. The intestine and the kidneys: A bad marriage can be hazardous. *Clin. Kidney J.* **2015**, *8*, 168–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Cummings, J.H.; Hill, M.J.; Bone, E.S.; Branch, W.J.; Jenkins, D.J. The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism. II. Bacterial metabolites in feces and urine. *Am. J. Clin. Nutr.* **1979**, *32*, 2094–2101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Feigenbaum, J.; Neuberger, C.A. Simplified Method for the Preparation of Aromatic Sulfuric Acid Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 3529–3530. [[CrossRef](#)]
55. Dey, N.; Wagner, V.E.; Blanton, L.V.; Cheng, J.; Fontana, L.; Haque, R.; Ahmed, T.; Gordon, J.I. Regulators of gut motility revealed by a gnotobiotic model of diet-microbiome interactions related to travel. *Cell.* **2015**, *163*, 95–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Camilleri, M.; Linden, D.R. Measurement of Gastrointestinal and Colonic Motor Functions in Humans and Animals. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *2*, 412–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Wen, J.; Luque-de Leon, E.; Kost, L.J.; Sarr, M.G.; Phillips, S.F. Duodenal motility in fasting dogs: Humoral and neural pathways mediating the colonic brake. *Am. J. Physiol.* **1998**, *274*, G192–G195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



FOLIO ADMINISTRATIF

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON OPEREE AU SEIN DE L'INSA LYON

NOM : **HOIBIAN**

DATE de SOUTENANCE : **14/09/18**

(avec précision du nom de jeune fille, le cas échéant)

Prénoms : **Elsa**

TITRE :

Impact de l'insuffisance rénale chronique et de l'urémie sur la motilité et la perméabilité intestinale

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 2018-LYSEI-066

Ecole doctorale : Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science Santé (EDISS, ED 205)

Spécialité : Biologie

RESUME :

L'Insuffisance Rénale Chronique (IRC) résulte de la destruction progressive et irréversible des reins. Elle est associée à une rétention de toxines urémiques à l'origine des nombreuses complications de la maladie rénale chronique (cardiovasculaires, osseuses ou métaboliques). Nos travaux se sont focalisés sur l'impact de la dysfonction rénale et de l'urémie sur la fonction barrière de l'intestin et la motilité intestinale. Deux modèles d'IRC ont été implémentés : un modèle animal, chez la souris par néphrectomie chimique (régime alimentaire enrichi en adénine) et un modèle cellulaire d'urémie en incubant des cellules coliques Caco-2 avec 10% de plasma de patients hémodialysés (HD). Le transit, la motilité, la perméabilité intestinale et la régulation des protéines des jonctions serrées ont été explorés. Les animaux urémiques présentent un transit gastro-intestinal ralenti et une perméabilité intestinale augmentée associée à une dérégulation de l'expression et de l'abondance des protéines des jonctions serrées dans le côlon (surexpression de la Claudine-1, abondance augmentée de la Claudine-1 et de l'Occludine). La perméabilité de la monocouche cellulaire de Caco-2 incubées avec du plasma HD est significativement augmentée et est associée à une augmentation de l'expression et de l'abondance de la Claudine-1 et une augmentation de l'abondance de l'Occludine. En IRC, la motilité digestive et la fonction barrière de l'intestin sont significativement altérées. Ces dysfonctions pourraient contribuer à la production intestinale et l'absorption des toxines urémiques accélérant ainsi la progression du syndrome urémique et installant un véritable « cercle vicieux ».

MOTS-CLÉS : Insuffisance Rénale Chronique (IRC), intestin, toxines urémiques, jonctions serrées

Laboratoire (s) de recherche : Laboratoire de recherche CarMen
(Cardiovasculaire, Métabolisme, diabétologie et Nutrition)

Directeurs de thèse: Dr VIDAL Hubert & Dr SOULAGE Christophe

Président de jury : Pr Hédi Soula

Composition du jury : Dr Sophie Thenet, Pr Pierre-Henri Ducluzeau, Pr Hédi Soula, Dr Hubert Vidal et Dr Christophe Soulage