



HAL
open science

Le rein profond dans la physiopathologie des lésions rénales : rôle des structures médullaires, des capillaires pérیتubulaires et de l'urothélium

Nathalie Tabibzadeh

► **To cite this version:**

Nathalie Tabibzadeh. Le rein profond dans la physiopathologie des lésions rénales : rôle des structures médullaires, des capillaires pérیتubulaires et de l'urothélium. Urologie et Néphrologie. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS604 . tel-02937881

HAL Id: tel-02937881

<https://theses.hal.science/tel-02937881>

Submitted on 14 Sep 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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Laboratoire UMR_S 1155 / Equipe de recherche 2

Rôle du rein profond dans la physiopathologie des lésions rénales

*Rôle des structures médullaires, des capillaires péritubulaires
et de l'urothélium*

Par Nathalie Tabibzadeh

Thèse de doctorat de Sciences Biologiques

Dirigée par le Pr Jean-Philippe Haymann

Présentée et soutenue publiquement le 24 septembre 2018

Devant un jury composé de :

Pr Ivan Tack, Professeur des Universités, Rapporteur

Pr Pierre-Louis Tharaux, Directeur de Recherche, Rapporteur

Dr Emmanuelle Vidal-Petiot, Maître de Conférences, Examinatrice

Pr Alexandre Hertig, Professeur des Universités, Examineur

Pr Jean-Claude Dussaule, Professeur des Universités, Président

*Si tu n'as pas la place dans ton pauvre gosier
Pour un grain de patience, crois-tu que tu pourras
Être un jour compagnon d'ascèse de Simorgh ?*

*Si après une coupe, tu abandonnes déjà
Seras-tu familier de l'assemblée des rois ?*

*Si tu n'as pas la force et la taille d'un atome
Comment peux-tu prétendre au trésor du soleil ?*

*Toi que voilà noyé dans une goutte infime
Pourras-tu remonter des tréfonds de la mer ?*

*De ce qui est vraiment, il n'y a point trace
Ceci n'est pas l'affaire des êtres de surface.*

Farîd od-dîn 'Attâr

Le Cantique des Oiseaux

A Rémy,

Je te dédie cette thèse,

Car la transcendance est dans l'amour et le savoir.

Remerciements

Mes remerciements vont d'abord à mon directeur de thèse, le Pr Jean-Philippe Haymann. La relation de maître à élève relève bien des défis, et pourtant j'y ai trouvé bienveillance et empathie et j'ai pu avancer bon an mal an grâce à votre disponibilité et votre écoute. Je vous remercie aussi pour votre vision scientifique et la manière dont vous l'avez partagée avec moi. J'espère ne pas vous avoir (trop) déçu.

Je tiens ensuite à remercier mes juges,

Messieurs les Rapporteurs, Professeurs Ivan Tack et Pierre-Louis Tharaux, vos connaissances et votre rigueur incontestées aussi bien que l'ampleur de vos travaux scientifiques m'incitent à l'humilité en présentant ce travail. Soyez assurés de ma gratitude et de mon profond respect.

Les examinateurs,

Emmanuelle, je te remercie pour ton amitié et ta proximité dès notre rencontre et pour m'avoir incluse aussi vite. J'ai beaucoup de chance de continuer mon chemin professionnel à tes côtés.

Alexandre, je te remercie de m'avoir accompagnée avec toute ta bienveillance dès mes débuts. Ton aide a été précieuse alors que tu ne me connaissais pas, je l'apprécie et en suis d'autant plus honorée que tu sois membre du jury.

Le président, monsieur le Professeur Jean-Claude Dussaule, vous me faites l'honneur de présider mon jury et m'avez fait l'honneur de m'accueillir en physiologie, aux prémisses de ma découverte de ce monde médical et scientifique passionnant. Je vous en suis reconnaissante.

Je remercie ensuite les personnes – nombreuses – ayant contribué à la réalisation de ce travail,

Le comité de pilotage de la cohorte Nephrotest, outre mon directeur de thèse, les Professeurs Jean-Jacques Boffa, François Vrtovnik, Martin Flamant, Pascal Houillier, Eric Thervet et Bénédicte Stengel, et les statisticiennes Marie Metzger et Sandra Wagner pour leur contribution au travail de la première partie,

Les permanentes de l'unité UMR_S 1155, Sophie, Sandrine, Chantal et Joëlle, pour leur grande aide au quotidien, indispensable, et leur participation aux travaux présentés en seconde partie. Je remercie aussi Mélanie pour son accueil, sa disponibilité et son sourire,

Céline Estournet, qui a avancé pour une large part le travail de la deuxième partie avant mon arrivée, Héloïse Bilbault qui a contribué aux manipulations, et enfin Mathilde Guégan, qui a été ma co-équipière à la toute fin, et qui a donné le souffle nécessaire pour avancer.

Le directeur du laboratoire, le Pr Pierre Ronco, et le directeur de l'équipe, Christos Chatziantoniou, pour leur autorité bienveillante et leur disponibilité,

Les membres du service des explorations fonctionnelles multidisciplinaires, ceux qui ont contribué directement, gratuitement, et avec le sourire à ces travaux, Corinne, Ismaëlle, Chantal, Carole, Adrien, Nicolas et Gisèle, et Vincent Frochot. Je n'oublie pas Laurent Benzerara qui m'a formée aux dosages de l'hème. Je remercie également pour leur accueil et leur savoir Emmanuel et M. Daudon, et enfin bien sûr l'équipe soignante, pour leur aide, leur protection et leur bonne humeur, Cathy, Dalila, Martine, Nathalie et Nathalie, sans oublier leur rigueur dans la prise en charge des patients, notamment ceux de la cohorte Nephrotest. J'ai passé de magnifiques années à vos côtés à tous, vous me manquez déjà.

Je remercie également mes collègues et amis,

Marine, Anna, Pierre-Yves, Lynda, Raphaël et Fleuria, qui, dans l'ordre, ont été mes colocataires de bureau et de super partenaires de travail,

Alexandre Cez pour nos réflexions existentielles, son aide et sa présence dans les moments difficiles, et son expertise néphrologique,

Cédric Rafat, toujours présent, disponible et bienveillant, ainsi que tous les membres de son service,

Et enfin à mes amis et ma famille,

Florence, Victoire, Ghilava,

Slimane, Caroline, Marjorie, Agnès,

Chousty, Julia, Benjamin, Sarah, Antho, Sarah,

Jessica,

Les mêmes que 4 ans auparavant, et que certainement dans 4 ans, notre chemin ensemble s'allonge et se pave, et n'en est que plus beau,

Miems, Jean-Marie, Steve et Lise,

Mes parents et Omid, qui m'ont aidée dans le désordre, et qui m'ont fait confiance dans mes choix même s'ils ne les comprennent pas toujours,

Mes enfants, mes promesses.

Sommaire

Remerciements	2
Sommaire	5
Introduction	7
Physiologie du rein profond	8
Anatomie	8
Parenchyme rénal	8
Cortex	9
Médulla rénale	9
Sinus rénal	10
Voie excrétrice intra-rénale	10
Vascularisation rénale	11
Vascularisation lymphatique	12
Innervation	12
Microanatomie	12
Le néphron	12
La microvascularisation	14
L'urothélium intra-rénal	16
Fonctions de concentration du rein profond	19
Rôle des tubules	20
Rôle de la microcirculation	23
Rôle de l'interstitium	24
L'urothélium a-t-il un rôle dans les fonctions de concentration du rein profond ?	25
Physiopathologie du rein profond	27
Lésion et récupération rénales, indices d'une participation du rein profond ?	27
Rôle de la microvascularisation	28
La raréfaction des capillaires péri-tubulaires, cause et conséquence des lésions rénales	28
Dysfonction endothéliale et raréfaction des capillaires péri-tubulaires	29
Raréfaction des capillaires péri-tubulaires et altérations hémodynamiques	30
Atteinte microvasculaire et néphropathie hypertensive	31
Atteinte microvasculaire et néphropathie drépanocytaire	32
Atteintes de l'urothélium et connaissances en physiopathologie	33
Néphropathies obstructives	34
Urothélium intra rénal et accélération de la régénération rénale au décours d'une ischémie rénale	37
Objectifs de l'étude	39
Première partie	40
Fasting urinary osmolality: a relevant biomarker for CKD progression	41
Abstract	42
Introduction	44
Patients and Methods	46
Results	49
Discussion	51
Bibliography	54
Tables	57
Figures	60
Deuxième Partie	63
Troisième Partie	73

Matériels et Méthodes	74
1. Mise au point du modèle murin transgénique	74
1.1 Souris	74
1.2 Génotypage	76
1.3. Activation de la Cre recombinase	77
1.4. Destruction conditionnelle de l'urothélium	77
2. Analyse du phénotype des souris	78
2.1. Etat général	78
2.2. Biologie	78
2.3. Analyse anatomopathologique	78
2.4. Immunohistochimie	79
3. Analyses statistiques	79
Résultats	80
1. Sélection des souris double transgéniques	80
2. Mise au point du modèle expérimental	80
2.1. Induction du récepteur de la toxine diphtérique	80
2.2. Injection de la toxine diphtérique	81
3. Phénotype des animaux	82
4. Analyse de la destruction urothéliale	83
4.1. Atteinte urothéliale	83
4.2. Diminution de l'expression de l'uroplakine 3	84
Discussion	86
Conclusion	91
Bibliographie	92
Annexes	99
Annexe 1. Notification de la décision de l' <i>American Journal of Kidney Disease</i>	99
Annexe 2. Tableaux des amorces et anticorps utilisés dans la troisième partie	102
Table des illustrations	103

Introduction

Le rein profond correspond à l'ensemble des structures tubulo-interstitielles médullaires, aux structures vasculaires post-glomérulaires, et à l'urothélium intra-rénal. Cette définition large regroupe des acteurs de la physiologie rénale parfois moins connus, leur étude pouvant être délicate notamment en raison d'une localisation difficile à approcher. Il est pourtant clair que certaines fonctions se rattachent directement et quasiment exclusivement à ces structures profondes, telles que la fonction de concentration en particulier. Les autres fonctions rénales font interconnecter tous les segments et les structures, à des fins de filtration et de réabsorption des solutés et de l'eau, de régénération des tampons, et de maintien de la volémie.

Plus qu'une définition structurelle et topographique, le rein profond répond à une définition fonctionnelle. Nous en présenterons les aspects anatomiques et fonctionnels en situation physiologique, ainsi que les rôles en situation pathologique rénale.

En situation pathologique, il est souvent difficile d'établir une chronologie exacte permettant de définir une histoire naturelle. Il est encore plus difficile d'étudier les éléments indépendamment les uns des autres. Nous tenterons donc une approche physiopathologique des altérations du rein profond, qu'elles soient à l'origine de la pathologie rénale, ou qu'elles en soient le reflet. L'introduction générale sera suivie des manuscrits comprenant chacun une introduction et une mise en contexte spécifiques, et des résultats de la dernière partie du travail. La première partie du travail correspond à une réflexion physiopathologique à partir d'analyses épidémiologiques d'un des retentissements les moins connus de la maladie rénale chronique, l'hyposthénurie. La seconde partie du travail est une démarche expérimentale apportant des données sur l'atteinte de la microvascularisation rénale post-glomérulaire. Enfin la dernière partie s'intéresse au rôle de la structure la plus profonde et pourtant partie intégrante du rein, l'urothélium. Nous évaluerons par un travail préliminaire sa contribution aux fonctions rénales qui doit être encore précisée.

Physiologie du rein profond

Anatomie

Les reins sont situés de part et d'autre du rachis, dans la région lombaire, contre la paroi postérieure de l'abdomen (figure 1) (1). Ils sont de forme ovoïde aplatie, mesurent chez l'adulte jeune en moyenne 12 X 6 X 3 cm, la hauteur dépendant de la taille du sujet (2). Ils pèsent en moyenne 140 grammes chez l'homme et 125 grammes chez la femme. Ils comportent chacun deux faces, antérieure et postérieure, deux bords, médial et latéral (ou convexité du rein), et deux pôles, supérieur et inférieur. La cavité creusant la partie moyenne du bord médial est le sinus rénal, ouvert par le hile rénal. Celui-ci contient le pédicule vasculaire et la voie excrétrice supérieure du rein. La capsule rénale recouvre le parenchyme rénal et le sinus rénal et se prolonge au niveau des adventices vasculaires et de la voie excrétrice supérieur du hile rénal. Il s'agit d'une coque fibreuse, solide et peu extensible.

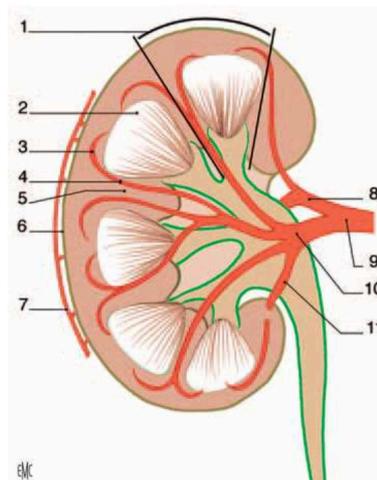


Figure 1. Morphologie interne du rein (droit). 1. lobule ; 2. pyramide ; 3. artère arquée ; 4. artère interlobaire ; 5. colonne rénale ; 6. capsule rénale ; 7. cercle artériel exorénal ; 8. artère rétro-pyélique ; 9. artère rénale ; 10. artère pré-pyélique ; 11. artère segmentaire inférieure.

Repris de l'EMC (1)

Parenchyme rénal

Il est constitué du cortex (zone superficielle) et de la médulla (zone profonde). Il contient environ un million de néphrons. Ceux-ci sont les unités fonctionnelles des reins, chacune étant constituée d'un glomérule et d'un tubule. Le canal collecteur collecte les urines

provenant de plusieurs néphrons (11 en moyenne) et s'achemine du cortex à la médullaire jusqu'à la papille.

Cortex

Le cortex rénal mesure 1 cm d'épaisseur entre la capsule et la base des pyramides rénales et se prolonge entre ces pyramides jusqu'au sinus, pour constituer les colonnes de Bertin. Le cortex superficiel contient ce qu'on appelle les corpuscules de Malpighi, correspondant aux glomérules entourés de leur capsule de Bowman et présentant un pôle vasculaire (artériole afférente) et un pôle urinaire (tube contourné proximal). Chaque pyramide rénale, avec la zone de cortex rénal qui l'entoure et la prolonge jusqu'à la capsule du rein, forme un lobule rénal.

Médulla rénale

La médulla rénale est constituée de zones triangulaires appelées pyramides rénales (ou pyramides de Malpighi). Elles sont striées parallèlement au grand axe du triangle. Elles sont au nombre de huit à dix par rein chez l'homme. Leur sommet fait saillie dans le sinus rénal et forme les papilles rénales. On peut distinguer trois zones concentriques dans la médulla : la strie externe de la médulla externe, la strie interne de la médulla externe et la médulla interne. La morphologie et les structures de chaque zone sont très distinctes (figure 2).

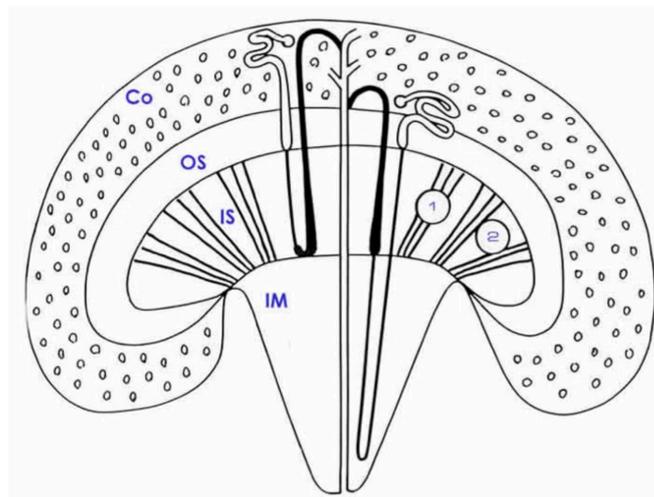


Figure 2. Schéma des différentes zones rénales. Co : cortex ; OS : *outer stripe*, strie externe de la médulla externe ; IS : *inner stripe*, strie interne de la médulla externe ; IM : médulla interne. 1 : faisceaux vasculaires médullaires ; 2 : zone interfasciculaire. Il s'agit ici d'un schéma représentatif de rat de rongeur. D'après Bankir L, Meulders Q, Relations vasculo-tubulaires dans le rein du mammifère, ISN 2018.

Sinus rénal

Le sinus rénal est une cavité qui contient les ramifications du pédicule rénal et la voie excrétrice supérieure. Ses parois sont constituées d'une part des papilles rénales qui font saillie, et d'autre part, des colonnes rénales recouvertes de capsule. Il existe en moyenne 8 à 10 papilles rénales chez l'homme (autant que de pyramides). Le sommet des papilles est perforé de petits trous formant l'aire criblée de la papille rénale, correspondant à l'abouchement des tubes collecteurs dans la voie excrétrice supérieure.

Voie excrétrice intra-rénale

L'urine excrétée par les tubes collecteurs se déverse via les papilles rénales dans les calices mineurs, conduits urinaires moulés sur les papilles par un anneau fibreux circulaire appelé fornix (1). Celui-ci est un élément de continuité entre la capsule rénale située au niveau du sinus rénal et l'adventice de la voie excrétrice urinaire. Deux à quatre calices mineurs forment ensuite un calice majeur, au nombre de deux à trois dans chaque rein. Les calices majeurs confluent vers le pelvis rénal (ou pyélon) (figure 3). La paroi interne de ces cavités est formée de trois tuniques, de l'intérieur vers l'extérieur, la muqueuse, la musculuse et l'adventice. La muqueuse est composée d'un épithélium appelé urothélium reposant sur le chorion. La musculuse comporte des cellules musculaires lisses longitudinales et circulaires, séparées par des travées conjonctives. Leur innervation permet une contraction autonome dans les calices, se propageant dans le pelvis. L'adventice est le tissu conjonctif au contact de la capsule, contenant vaisseaux, nerfs et tissu adipeux.

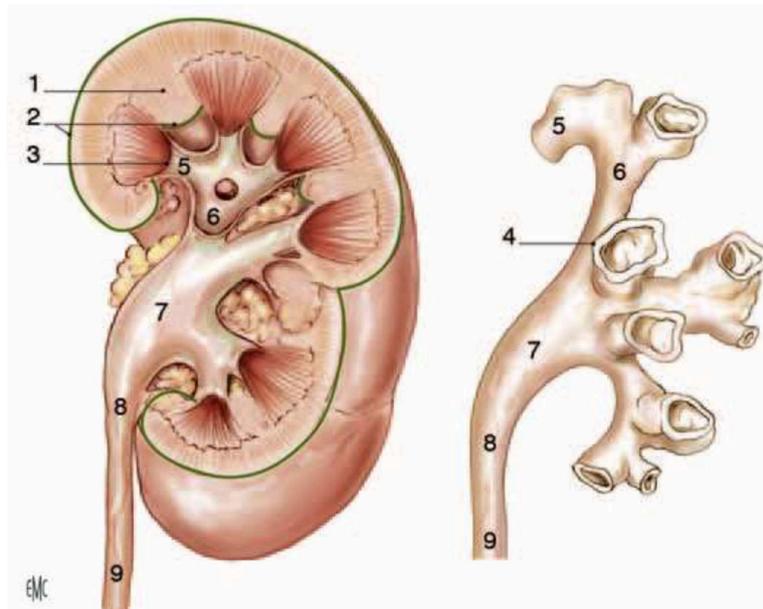


Figure 3. Voies excrétrices intra-rénales. 1 : colonne rénale ; 2 : capsule rénale ; 3 : papille rénale ; 4 : fornix ; 5 : calice mineur ; 6 : calice majeur ; 7 : pelvis rénal ; 8 : jonction pyélo-urétérale ; 9 : uretère. D'après l'EMC (1).

La capacité de la voie excrétrice intrarénale est faible, inférieure à 3 ml. Sa fonction excrétrice est permanente en collectant les urines sécrétées par les reins, mais elle ne constitue pas un réservoir des urines. La fonction de réservoir est entièrement assurée par la vessie. Grâce aux contractions musculaires lisses autonomes, le péristaltisme assure l'évacuation des urines vers l'uretère.

Vascularisation rénale

Le pédicule rénal est composé dans la majorité des cas d'une artère et d'une veine. La vascularisation rénale est de type terminale, c'est-à-dire sans anastomose entre les artères présentes dans l'organe (3). L'artère rénale naît en général de l'aorte abdominale. Le débit des deux artères rénales est d'environ 20% du débit cardiaque, soit 1,2 litre/minute en moyenne. L'artère rénale se divise en artères segmentaires intra-rénales qui se ramifient en artères interlobaires cheminant entre les papilles puis entre les pyramides. Elles donnent naissance aux artères arquées, dont le trajet suit la base des pyramides entre le cortex et la médulla, et qui donnent quant à elles les artères interlobulaires traversant le cortex jusqu'à la capsule. Ces dernières se distribuent en artérioles glomérulaires afférentes, chacune irrigant un glomérule. Le glomérule est lui-même un élément vasculaire formé d'anses capillaires organisées en pelote, se réunissant pour former à l'abouchement du glomérule l'artériole efférente. Cette artériole efférente est à l'origine de la microvascularisation rénale (voir *infra*). Le réseau

capillaire se regroupe en veines interlobulaires, puis arquées et interlobaires de manière parallèle aux artères. Enfin, les veines intra-rénales se jettent dans la veine rénale au niveau du hile rénal. Les veines rénales rejoignent la veine cave inférieure dont le débit provient pour un tiers de celles-ci. La veine cave inférieure représente deux tiers du débit arrivant à l'atrium droit.

Vascularisation lymphatique

La vascularisation lymphatique rénale est riche, et son débit global équivaut à la diurèse. Il est constitué d'un réseau superficiel sous-capsulaire, et d'un réseau profond suivant les vaisseaux interlobulaires puis les vaisseaux droits de la médulla. Ils rejoignent ensuite des vaisseaux parallèles aux artères et veines arquées, puis interlobaires, jusqu'au sinus rénal pour suivre les réseaux lymphatiques abdominaux (4).

Innervation

Les reins sont innervés par le système nerveux autonome, via des afférences sympathiques et parasympathiques. Le réseau nerveux longe la capsule rénale et les axes vasculaires avec de riches plexus autour des artères interlobulaires et artérioles, contrôlant ainsi la vasoconstriction.

Microanatomie

Le néphron

Le rein contient environ un million de néphrons. Ceux-ci sont les unités fonctionnelles des reins, chacune étant constituée d'un glomérule et d'un tubule (figure 4). Le tubule rénal possède 3 parties : le tube proximal, le tube rénal droit descendant et ascendant formant une anse (l'anse de Henle), et le tube distal. Le canal collecteur collecte les urines provenant de plusieurs néphrons (11 en moyenne) et s'achemine du cortex à la médullaire jusqu'à la papille.

On peut considérer que chaque néphron est un organe à part entière. Il est composé d'une partie corticale et d'une partie médullaire. Dans le sens de l'écoulement de l'urine, on observe d'abord le glomérule, dont les anses capillaires sont formées d'un endothélium fenestré. La pression d'ultrafiltration intra-glomérulaire permet de former ce qu'on appelle l'urine primitive. L'homme adulte sain produit environ 180 litres de cette urine primitive

chaque jour. La réabsorption des solutés et de l'eau sera effectuée dans les portions suivantes. Le tube proximal suit directement le glomérule au pôle urinaire, contenant une partie contournée puis une partie droite (pars recta). Ce segment tubulaire, présentant un épithélium avec bordure en brosse, permet une réabsorption de la plupart des composants (solutés et eau) en concentration iso-osmolaire au plasma filtré. Ensuite, l'anse de Henle est un segment tubulaire disposé en épingle à cheveux, présentant plusieurs segments, la branche descendante large, la branche descendante fine, l'anse, la branche ascendante fine et la branche ascendante large. Deux types d'anses de Henle coexistent, celles à branches courtes, dont l'anse est localisée au niveau de la strie externe de la médulla externe, et celles à branches longues dont l'extrémité correspond à la pointe de la papille. Vient ensuite le tube contourné distal, segment strictement cortical, qui se jette enfin dans le canal collecteur par l'intermédiaire d'un tubule connecteur. Le long de ces différents segments, les électrolytes, la charge acide (par l'intermédiaire de l'ion ammonium), l'eau et l'urée sont sécrétés et/ou réabsorbés selon les besoins. Il existe par ailleurs des mécanismes de recyclage de certains solutés permettant de maintenir une concentration suffisante et nécessaire à l'homéostasie de l'eau notamment (5).

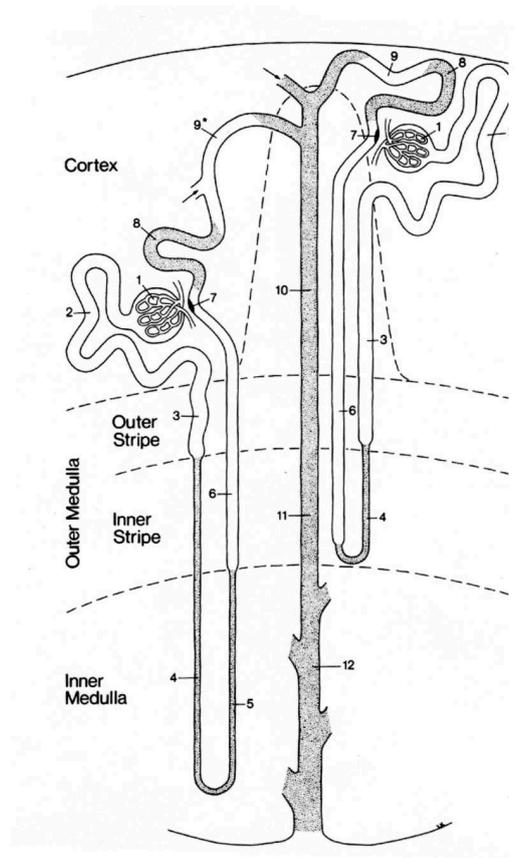


Figure 4. Schéma de deux néphrons, à gauche un néphron à anse longue, à droite un néphron à anse courte. 1. Glomérule ; 2. Tube contourné proximal ; 3. Pars Recta ; 4. Branche

descendante fine de Henle ; 5. Branche ascendante fine de Henle ; 6. Branche ascendante large de Henle ; 7. Appareil juxta-glomérulaire ; 8. Tube contourné distal ; 9. Tube connecteur ; 10. Canal collecteur. Reproduit de Bankir L et Meulders Q, Relations vasculo-tubulaires dans le rein du mammifère, ISN 2018.

La microvascularisation

Le glomérule est lui-même un élément vasculaire formé d'anses capillaires organisées en pelote, se réunissant pour former à l'abouchement du glomérule l'artériole efférente. Cette artériole efférente est suivie d'un réseau capillaire irrigant le cortex, sous la forme de plexus, et la médulla, l'irrigation médullaire étant assurée par les artérols efférents des glomérules plus profonds, juxta-médullaires. Des artérols efférents des glomérules « juxta-médullaires » naissent les vasa recta, système circulatoire permettant la vascularisation de la médulla (figure 5). De manière intéressante, le nombre de ces glomérules est proportionnel aux anses longues chez les différentes espèces de mammifères étudiés (6).

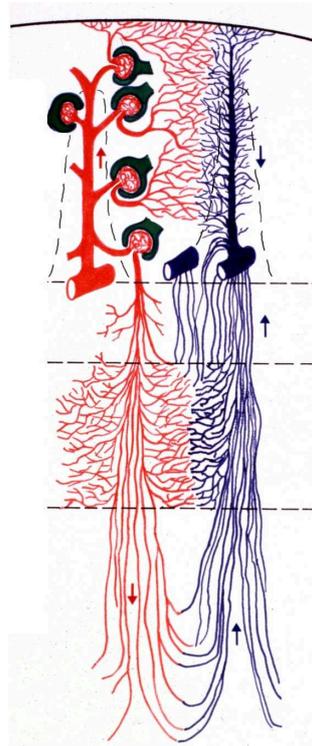


Figure 5. Territoires vasculaires du rein. En rouge, le sang artériel et en bleu, le sang veineux. Les flèches indiquent le sens de circulation. Les lignes pointillées représentent les limites entre chaque zone rénale, de haut en bas, le cortex, la strie externe de la médulla externe, la strie interne de la médulla externe, et la médulla interne. Reproduit de L. Bankir et Q. Meulders, Relations vasculo-tubulaires dans le rein du mammifère, ISN 2018.

Dans la strie externe de la médulla externe, les artérioles efférentes des glomérules juxta-médullaires se divisent en faisceaux de vaisseaux parallèles et verticaux (les vasa recta artériels) qui ne donnent guère de branches capillaires aux tubules de la strie externe. L'apport sanguin de cette zone est en fait assuré par du sang veineux issu des vasa recta ascendants provenant de la médulla interne (figure 6). Ces vaisseaux présentent une grande surface de contact avec la pars recta des tubules proximaux (segment droit descendant), sans interstitium, offrant une dernière possibilité de recyclage des solutés par ce segment tubulaire avant que ces solutés ne s'échappent de la médulla vers le sang veineux.

Dans la strie interne de la médulla externe, on peut observer deux territoires vasculaires : les faisceaux vasculaires se dirigeant vers et provenant de la médulla interne, et les régions interfasciculaires où les tubules sont entourés d'un plexus capillaire riche provenant des branches les plus externes de ces faisceaux, appelés capillaires périrtubulaires. Ce plexus irrigue les branches ascendantes larges de l'anse de Henlé, très actives et consommatrices d'énergie.

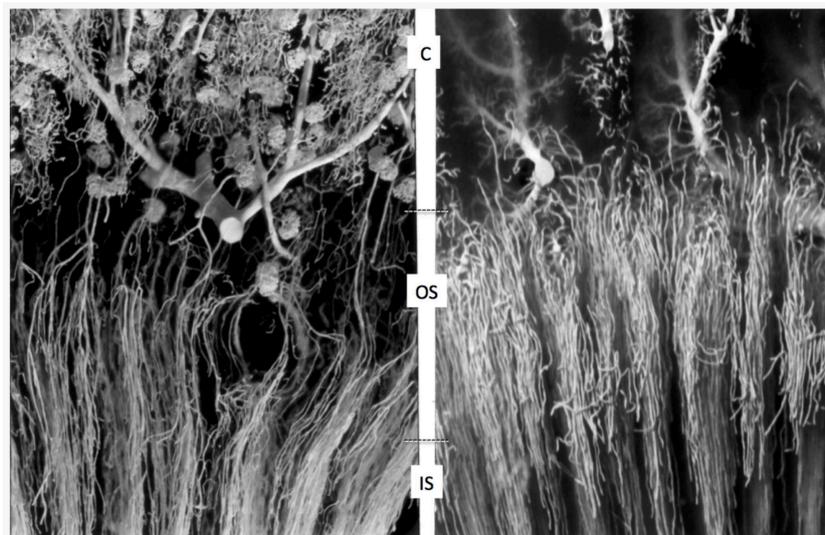


Figure 6. Microvascularisation artérielle (à gauche) et veineuse (à droite). Injection de Microfil permettant de visualiser les différents réseaux vasculaires du rein de rat. C : cortex ; OS : outer stripe, strie externe de la médulla externe ; IS : inner stripe, strie interne de la médulla interne. D'après L. Bankir et C. de Rouffignac (6)

Cette topographie de vascularisation s'arrête abruptement à la jonction médulla externe – médulla interne. La médulla interne est irriguée par les branches centrales des faisceaux vasculaires. Les vasa recta descendants et ascendants s'y situent, longeant les anses et les canaux collecteurs et entourés d'un riche interstitium. Les vasa recta ascendants, emplis de sang veineux se dirigent enfin vers la strie externe en passant par les faisceaux vasculaires

de la strie interne, et donc sans aucun contact avec les tubules et capillaires de cette zone (6). Cette organisation vasculaire particulière semble avoir un intérêt pour isoler chaque segment médullaire l'un de l'autre en créant des compartiments séparés. Ceci confère probablement plusieurs voies possibles pour le recyclage des solutés et entretient ainsi le gradient osmotique cortico-papillaire (7).

L'urothélium intra-rénal

L'urothélium est également appelé, à tort, « épithélium transitionnel ». Cette dénomination provient de l'assertion initiale que bien que stratifié, chaque couche de l'épithélium reposait sur une membrane basale (8). Cette définition repose d'ailleurs sur l'observation de l'urothélium vésical plutôt que l'urothélium intra-rénal, alors ces deux structures présentent des différences morphologiques majeures. En fait il a été démontré que les différentes couches de l'urothélium étaient bien délimitées, mais que quelques extensions des couches plus superficielles s'enfonçaient en profondeur jusqu'à la membrane basale (9).

Sous le même nom d'urothélium apparaissent ainsi des épithéliums très différents selon la localisation. Le phénotype cellulaire et la structure épithéliale varient extrêmement selon qu'il s'agit de l'urothélium de la vessie ou de l'urothélium intra-rénal, et dans le pelvis s'il couvre la papille ou non (10–12). Ces différentes localisations dérivent d'ailleurs embryologiquement de structures différentes. L'urothélium intra-rénal provient du mésoderme alors que celui de la vessie provient de l'endoderme (13,14). Cette hétérogénéité donc rend l'analyse commune difficile.

L'urothélium vésical et urétéral est le mieux connu. Sa structure comprend trois types cellulaires. A la surface luminale se trouvent de larges cellules multinucléées hexagonales appelées les cellules superficielles ou cellules « parapluies » (15). Les cellules sont connectées entre elles par des jonctions serrées incluant les claudines 8 et les zona occludens de type 1 (16). Elles présentent dans leur cytoplasme des vésicules discoïdales ou fusiformes contenant les uroplakines, dont l'expression à la surface est régulée par les processus d'exocytose et d'endocytose (17). Sous la couche superficielle se situent les cellules intermédiaires, bien plus petites. Enfin, le long de la membrane basale se trouvent les cellules basales, encore plus petites que les précédentes, et les plus abondantes. Chez la souris il existe trois couches urothéliales dans la vessie, tandis qu'on en observe jusqu'à 7 chez l'homme, donc les couches supplémentaires sont constituées de cellules intermédiaires (18). Alors que

les cellules superficielles expriment outre les uroplakines, la cytokératine 20 (Krt20), les couches basales expriment la cytokératine 5, et pour certaines d'entre elles la cytokératine 14 (Krt5 et Krt14) (19,20). Les cellules basales Krt5+/Krt14+ semblent jouer un rôle essentiel dans la régénération urothéliale puisqu'il s'agirait du contingent cellulaire progéniteur permettant le renouvellement de l'ensemble des cellules urothéliales après une atteinte tissulaire (21). Certains auteurs suggèrent en revanche que les cellules progénitrices sont distinctes et présentes temporairement dans les différentes couches urothéliales durant l'embryogénèse, appelées les cellules « P », et qu'arrivé au stade mature, ce sont les cellules intermédiaires exprimant les uroplakines qui sont à l'origine du renouvellement des cellules superficielles différenciées (22).

L'urothélium présente un des plus longs cycles de renouvellement dans l'organisme, puisque celui-ci irait jusqu'à 200 jours (23,24). Cette durabilité est intéressante pour la fonction de barrière que l'urothélium doit constamment porter. Cette fonction de barrière est particulièrement importante au niveau de l'uretère et de la vessie. La capacité de l'urothélium à se régénérer en réponse à une agression en est d'autant plus remarquable, puisqu'il prolifère dès les premières heures après une atteinte chimique (cyclophosphamide, sulfate de protamine) ou biologique (*E. coli* uropathogène) (22,25,26) ou encore physique (obstruction urétérale unilatérale) (27). Les processus exacts de régénération sont encore peu connus dans l'urothélium intra-rénal ; les plus larges analyses proviennent d'études sur la régénération de l'urothélium vésical, cette régénération étant impliquée notamment dans la tumorigénèse vésicale (15). Après une agression, les nouvelles cellules superficielles vont être soumises à différents stades de différenciation, avec d'abord l'expression de microvillosités, puis la formation de stries exprimant les uroplakines, et enfin la différenciation terminale en volumineuses cellules aux membranes plasmiques rigides exprimant fortement les uroplakines et la Krt20 (28). Cette régénération, du moins dans la vessie, dépend surtout de l'axe de l'EGFR et de ses ligands, dont l'EGF, TGF- α , HB-EGF, ou FGF2. Ces facteurs de croissance seraient produits par les cellules urothéliales lésées et auraient une action autocrine favorisant la régénération (15).

La biomembrane que représente la vessie est l'une des barrières les plus étanches de l'organisme, sa résistance dépassant celle de l'épiderme (29). Outre cette résistance nécessaire, l'urothélium vésical doit également être flexible puisque sa surface varie extrêmement et constamment lorsque la vessie se vide ou se remplit. Pour être à la fois

hautement flexible et imperméable, l'urothélium présente à sa surface des plaques urothéliales, présente sur environ 90% de la surface de l'épithélium (30). Ces plaques sont composées de ce qui est appelé les « unités asymétriques de membrane », formées de glycoprotéines appelées les uroplakines, Ia, Ib, II, et IIIa, et faisant partie du glycocalyx recouvrant l'épithélium. Ces uroplakines forment des hétérodimères (Ia/II et Ib/IIIa) à la surface des cellules urothéliales, et entre les différentes couches là où l'urothélium est pluristratifié (31). Les uroplakines semblent indispensables à la fois à la formation des voies urinaires et à la formation et à l'intégrité rénale. En effet, dans les modèles expérimentaux génétiquement déficients dans chaque type d'uroplakine, il existe non seulement des anomalies urologiques à type de reflux vésico-urétéral, mais également des anomalies rénales, avec insuffisance rénale et hydronéphrose (32–35). Des cas d'adysplasie rénale bilatérale due à des mutations hétérozygotes de novo du gène de l'uroplakine IIIa ont même été rapportés chez des enfants présentant de manière sporadique cette malformation rénale (36).

Le pelvis rénal est bordé quant à lui par un épithélium dont l'aspect structurel diffère non seulement largement de celui de la vessie, mais varie également selon sa topographie et le segment du parenchyme rénal à son contact (10,37,38). A l'inverse de l'épithélium pluristratifié étanche retrouvé dans l'uretère et la vessie, accolé à un chorion épais, l'urothélium intra-rénal est au maximum bi-stratifié, et repose sur une très fine lame basale. Chez les espèces dont les capacités de concentration urinaire dépassent l'osmolalité plasmatique, le pelvis rénal s'enfonce dans le parenchyme rénal jusqu'à la strie externe de la médulla externe, à la jonction cortico-médullaire. Des pyramides secondaires sont également visualisées, composées de médulla externe, et dont le sommet « nage » dans la cavité urinaire. Ces projections sont appelées les fornix spécialisés dans ses premières descriptions (39). L'urothélium y repose en contact très rapproché avec le parenchyme rénal, et notamment les structures tubulaires et vasculaires de la médulla externe et interne. Dans certaines zones il est même en contact direct avec le cortex et des glomérules juxta-médullaires.

Les cellules urothéliales intra-rénales présentent des aspects variés selon leur localisation en microscopie électronique. En effet, sur le versant papillaire, on retrouve des membranes cellulaires recouvertes de microvillosités absentes des cellules urothéliales extra-rénales, puis progressivement de plus en plus de cellules dont la surface présente des stries et des plaques à mesure que l'on s'éloigne du fornix sur le versant cortical et en contact avec la médulla externe (37) (figure 7). Ces plaques correspondent en fait aux uroplakines,

recouvrant l'urothélium de manière différenciée selon la localisation et la profondeur (31). Ces uroplakines sont absentes de la surface de l'urothélium papillaire (40). Les fonctions potentielles de l'urothélium intra-rénal pourraient dépasser la simple fonction de barrière, et seront discutées plus loin.

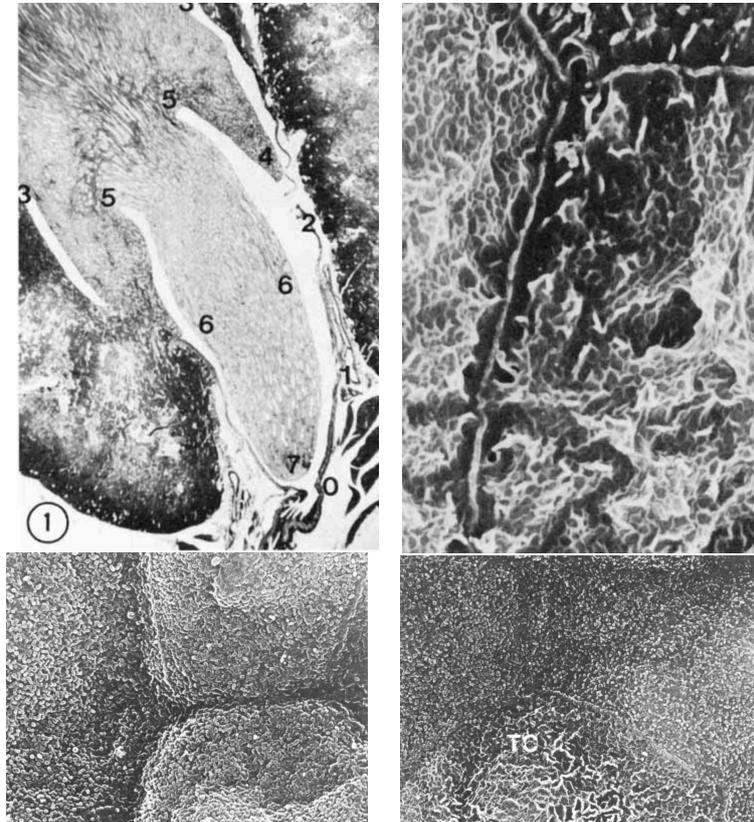


Figure 7. Etude ultrastructurale de R. Verani et M. Bulger des cellules urothéliales des différentes zones du pelvis rénal (37). En haut à gauche une coupe histologique transversale du rein de rat numérotant les différentes zones étudiées. Les autres photos sont en microscopie électronique à balayage. En haut à droite, l'aspect des cellules de la zone 1-2 (jonction pyélo-urétérale), avec des cellules présentant des plaques séparées par des stries. En bas à gauche, la zone 3-4 (fornix et sommet de la pyramide), avec une cellule présentant des plaques et des stries et deux cellules présentant des microvillosités. En bas à droite, la zone 5-6 (base et corps de la papille), avec des cellules microvillositaires exclusives. TC, *transitional cell*, cellule transitionnelle.

Fonctions de concentration du rein profond

L'adaptation à des environnements où l'accès à l'eau est limité a donné un avantage sélectif aux espèces ayant développé des capacités de concentration des urines. Cette capacité permet d'élever l'osmolalité urinaire au-dessus de l'osmolalité plasmatique dans un contexte de restriction hydrique. Plus la médullaire est profonde, et plus cette capacité de concentration

sera grande. La morphologie du rein profond est également différente selon les espèces et leur capacité de concentration des urines (6). Chez l'homme, l'osmolalité urinaire peut ainsi atteindre 1200 mOsm/kgH₂O selon les besoins de l'organisme. Ces capacités de concentration des urines mettent en jeu des mécanismes complexes dont la compréhension reste lacunaire, et font intervenir toutes les structures rénales.

Ce phénomène est d'abord possible grâce à la présence d'un gradient osmotique présent de la superficie à la profondeur du rein au niveau de la pointe de la papille où l'osmolalité est la plus élevée, appelé le gradient corticopapillaire. La présence de ce gradient de concentration osmotique dépend du fonctionnement de l'anse de Henle en premier lieu. Son maintien dépend de l'intégrité microvasculaire et interstitielle médullaire. L'osmolalité étant élevée dans le rein profond, les canaux collecteurs ont la possibilité de réabsorber l'eau de la lumière tubulaire selon les besoins hydriques et afin d'assurer l'homéostasie osmotique de l'organisme.

La création du gradient est possible car la perméabilité à l'eau, au NaCl et à l'urée est différente selon les segments tubulaires permettant de dissocier la réabsorption de chacun de ces éléments. Ensuite, la perméabilité à l'eau dans le canal collecteur est régulée par l'hormone antidiurétique, qui lorsqu'elle s'élève, augmente l'expression des aquaporines de type 2 au pôle luminal des cellules principales. L'eau est alors réabsorbée grâce au gradient osmotique transépithélial de la lumière tubulaire vers l'interstitium et la microcirculation qui la drainera (41).

Rôle des tubules

Le gradient osmotique procède d'abord de l'anse de Henle, de sa réabsorption active de NaCl et de sa disposition particulière en épingle à cheveux. Ces deux caractéristiques permettent de mettre en place ce qu'on appelle le système d'échange à contre-courant.

« L'effet simple » du système d'échange à contre-courant naît d'abord de la réabsorption active de NaCl par la branche ascendante large de l'anse de Henle, responsable d'une dilution du fluide tubulaire à ce niveau par rapport au fluide présent dans l'interstitium et les autres segments tubulaires. Cette réabsorption n'est pas accompagnée d'eau, ces segments y étant imperméables (42), tout comme probablement la branche descendante fine d'ailleurs (43). On partira schématiquement d'une réabsorption de 10 mOsm/kgH₂O,

entraînant une différence de 20 mOsm/kgH₂O, comme expliqué et illustré par JM Sands et HE Layton (44) (figure 8). Ce phénomène se poursuit lorsque ce fluide se déplace. Le fluide tubulaire que nous visualisons initialement dans la branche descendante, dont l'osmolalité est de 20 mOsm/kgH₂O supérieure au fluide le précédant, se trouve maintenant à mi-chemin entre la branche descendante et la branche ascendante. Il subit une réabsorption active du NaCl, de même ampleur (10 mOsm/kgH₂O). La différence à un même niveau entre la branche ascendante large, et le reste de l'environnement local reste alors de 20 mOsm/kgH₂O. En revanche, la différence entre l'osmolalité dans la portion la plus profonde de la branche descendante et la portion la plus superficielle de la branche ascendante large est maintenant de 40 mOsm/kgH₂O. Ce phénomène d'amplification se poursuit, augmentant progressivement la différence osmolaire entre la superficie et la profondeur puisque le fluide tubulaire s'écoule continuellement. C'est ce qu'on appelle le phénomène de multiplication à contre-courant de « l'effet simple » (45).

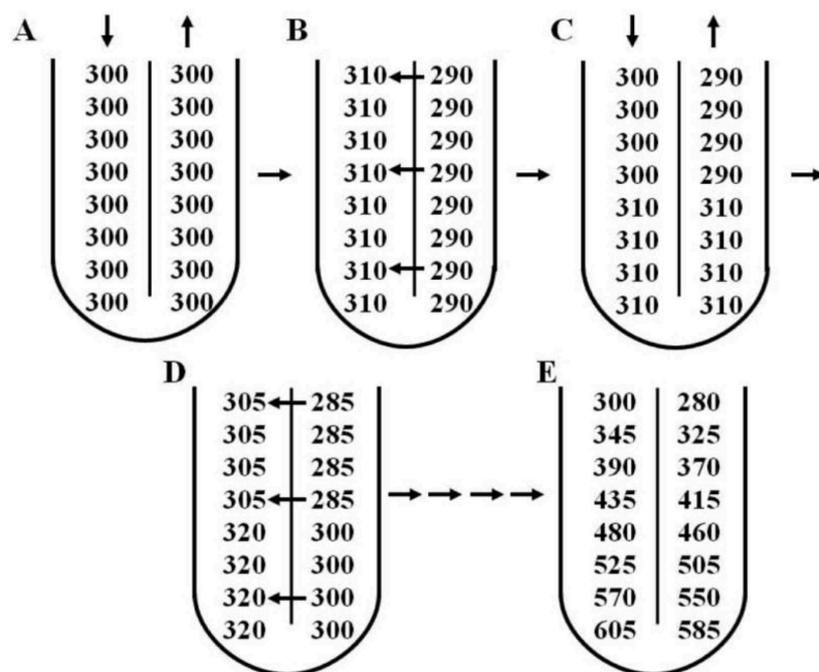


Figure 8. Schéma du phénomène de multiplication à contre-courant dans une anse de Henle au niveau de la médulla externe. **A** : le processus débute par l'arrivée de fluide tubulaire iso-osmolaire au plasma. **B** : l'effet simple est établi par réabsorption active de NaCl dans la branche ascendante, créant un gradient de 20 mOsm/kgH₂O entre la branche ascendante et descendante. **C** : ce fluide se déplace le long de son trajet. **D** : la réabsorption active crée à nouveau un gradient de 20 mOsm/kgH₂O. Cette fois-ci l'osmolalité au fond de cette zone est plus élevée que lors des étapes A, B et C. **E** : les processus B et C se répètent, et créent ainsi un gradient osmotique axial bien plus important que les 20 mOsm/kgH₂O initiaux. Reproduit de JM Sands et LH Layton (44).

Ce modèle explique le gradient présent au niveau de la médullaire externe, mais ne traduit pas ce qui se déroule au niveau de la médullaire interne. L'absence de branche ascendante large de Henle y implique l'absence de réabsorption active de NaCl et donc ce mécanisme de multiplication à contre-courant. Un modèle explicatif serait celui d'une réabsorption, passive cette fois-ci, des solutés, que ce soit le NaCl, mais également et en particulier l'urée, suivant des gradients de concentration entre la lumière tubulaire et l'environnement local (interstitium et vasa recta) (46). L'urée participerait de manière prépondérante, au niveau de ces segments profonds, à l'établissement du gradient osmolaire. En effet, l'hyperosmolalité du rein profond serait créée en premier lieu par le canal collecteur. L'urine présente dans la portion terminale du canal collecteur est concentrée en urée, établissant un gradient de concentration favorable à sa réabsorption, et favorisée par l'expression ADH-dépendante à la membrane des transporteurs de l'urée UT-A1, 2 et 3. Ceci diminuerait la concentration de NaCl dans l'interstitium, favorisant sa réabsorption passive par l'extrémité de l'anse fine (47) (figure 9).

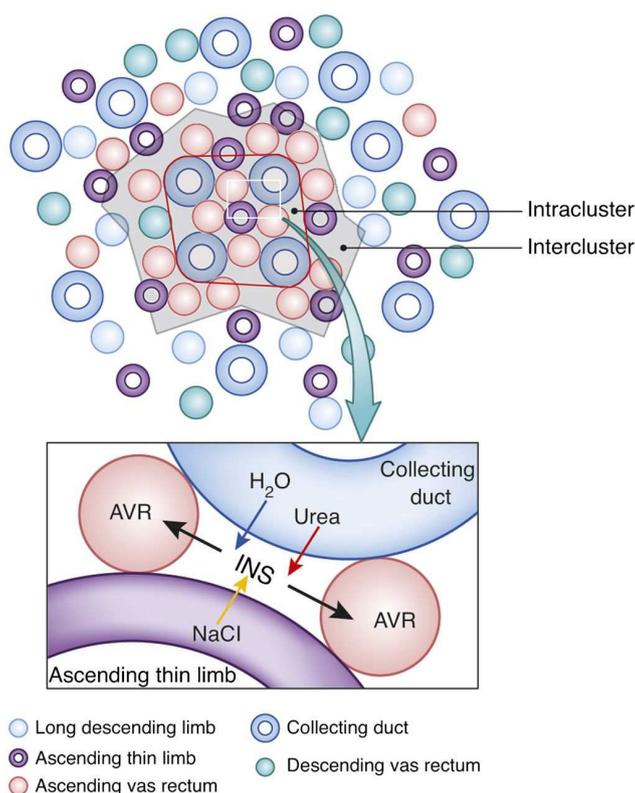


Figure 9. Schéma des regroupements médullaires de canaux collecteurs, vasa recta ascendants (AVR), et branches ascendantes fines de Henle. INS : interstitial nodal space (espace interstitiel nodal). Reproduit de AT Layton *et al* (48).

Néanmoins, ce mélange de solutés dans les espaces interstitiaux nodaux (cf *infra*) ne reproduit que partiellement la capacité maximale de concentration des urines des rongeurs par les modèles mathématiques publiés. D'autres facteurs pourraient donc intervenir pour expliquer ces observations. Parmi eux, le rôle de la réabsorption active de sodium par les cellules principales par l'intermédiaire d'ENaC (canal épithélial sodique) doit être précisé, celle-ci étant activée par l'ADH, et participant donc probablement au phénomène de mélange de solutés dans les clusters présents dans la médulla interne. L'ammonium, encore, est un cation prépondérant dans la composition de l'urine, dont le gradient de concentration interstitielle permet de potentialiser le pouvoir d'excrétion urinaire de la charge acide. Son potentiel osmotique pourrait donc participer au gradient osmotique présent, bien qu'à faibles proportions par rapport à l'urée (49). Ces deux derniers éléments s'accorderaient avec l'expression très importante du canal ClC-K1, canal perméable au chlore, présent dans les parties les plus profondes de l'anse fine de Henle, que ce soit sur le versant descendant ou ascendant (50). Ce canal est en effet indispensable à la fonction de concentration de la médulla interne dans les modèles expérimentaux (51).

Rôle de la microcirculation

La microcirculation rénale participe à la fonction de concentration des urines par trois grandes fonctions. D'abord elle apporte les substrats métaboliques nécessaires pour alimenter le transport actif de solutés de la lumière tubulaire à l'interstitium. Ensuite, grâce au système d'échange à contre-courant entre les vasa recta ascendants et descendants dans les faisceaux vasculaires, elle piège l'urée et le NaCl réabsorbés et maintient l'hyperosmolalité médullaire nécessaire à la concentration des urines. L'eau provenant des vaisseaux descendants est court-circuitée dans les vaisseaux ascendants, tandis que les solutés provenant de la zone riche en solutés de la médulla interne peuvent être transférés dans les vaisseaux descendants, évitant ainsi de les perdre dans le sang veineux. Enfin, elle retire de la médulla l'eau réabsorbée par les canaux collecteurs dans leur passage médullaire, préservant ainsi cette hyperosmolalité (52). En effet, les vasa recta ascendants en contact des tubes collecteurs seraient isolés des autres vasa recta (figure 9), ce qui permettrait de retourner l'eau réabsorbée à cet endroit dans la circulation générale sans altérer l'échange à contre-courant des autres segments vasculaires, permettant le recyclage des solutés et donc le maintien du gradient de concentration. Certaines publications suggèrent en revanche que ces vasa recta participent également à l'échange à contre-courant ; plutôt qu'un piégeage de l'urée dans cette portion, il s'agirait donc d'un cycle

permanent de retour dans la médulla interne par les circuits tubulaires et vasculaires d'échange à contre-courant (41).

Le flux sanguin médullaire a un rôle majeur dans la fonction de concentration des urines par des actions qui peuvent paraître contradictoires. Le flux sanguin médullaire doit être *suffisant* pour apporter les nutriments nécessaires au transport tubulaire actif, tout en étant *assez faible* pour ne pas rompre l'équilibre entre les vasa recta ascendants et descendants afin de piéger les solutés participant à l'hyperosmolalité locale, et *assez important* pour assurer l'évacuation de l'eau réabsorbée et ainsi prévenir la dilution de l'interstitium médullaire.

En effet, une augmentation du flux sanguin aura pour effet un « rinçage » des vasa recta responsable d'une perte du gradient osmotique, responsable d'une diminution de la concentration des urines. Par ailleurs, le réflexe tubuloglomérulaire permettant de maintenir le débit de filtration glomérulaire a un rôle majeur dans la fonction de concentration des urines. D'une part, celui-ci régule le débit de sodium dans l'anse de Henle, ce qui représente un des éléments influant sur la capacité de concentration comme décrit plus bas. D'autre part, en modifiant le tonus des artérioles afférente et efférente, le réflexe tubulo-glomérulaire entraîne une modification du flux sanguin en aval, notamment le flux sanguin médullaire assuré par les vasa recta (53).

Rôle de l'interstitium

L'interstitium est presque inexistant dans la strie externe de la médulla externe, c'est donc la région où les vaisseaux et les tubules présentent le contact le plus rapproché. La strie interne possède un interstitium modérément développé, qui augmente relativement dans la médulla interne jusqu'à la papille. Dans la strie interne, l'interstitium est présent dans les régions inter-fasciculaires où l'on retrouve les plexus capillaires. Son absence dans les faisceaux, couplé à l'arrangement parallèle des vaisseaux descendants et ascendants, favorise le système d'échange à contre-courant des solutés et de l'eau (6). Enfin, dans la médulla interne, l'interstitium est plus riche et prend une disposition particulière. Dans les groupes tubulaires centrés par les tubes collecteurs, entourés par des vasa recta ascendants, les cellules interstitielles sont organisées en échelle le long du tube collecteur. Entre ces cellules interstitielles se forme un espace appelé l'espace interstitiel nodal d'une épaisseur axiale de 1 à 10 microns (54) (figure 10). C'est cette disposition particulière qui permet la segmentation axiale dans la médulla interne et prévient donc la diffusion des osmoles. De plus, elle favorise

le phénomène local de mélange de solutés, hypothèse privilégiée actuellement pour expliquer le gradient osmotique dans la médulla interne (47).

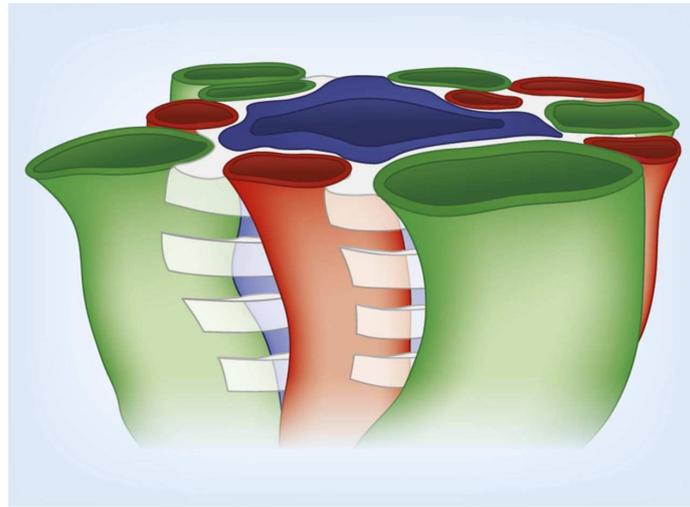


Figure 10. Espaces interstitiels nodaux empilés. Représentés en blanc, ils sont séparés par des cellules interstitielles, non représentées ici. Ces espaces sont centrés sur un canal collecteur (en bleu). Vasa recta ascendantes en rouge, branches ascendantes fines de Henle en vert. Reproduit de WH Dantzler *et al* (47).

L'urothélium a-t-il un rôle dans les fonctions de concentration du rein profond ?

La fonction de barrière de l'urothélium extra-rénal est indéniable, puisque comme décrit précédemment celui bordant la vessie et l'uretère est particulièrement étanche à l'eau et aux solutés avec plusieurs couches cellulaires, un imposant chorion sous-jacent et de volumineuses plaques à la surface (15). En revanche, d'après les observations anatomiques et histologiques, il est plus problématique d'attribuer cette fonction à l'urothélium intra-rénal. Bien que l'intégrité de l'urothélium intra-rénal semble essentielle à la fonction de concentration des urines (55), l'épithélium y est simple, avec un chorion sous-jacent fin voire virtuel. Les cellules urothéliales présentent par ailleurs des aspects différents selon leur localisation dans le pelvis. Les cellules bordant la papille rénale ont par exemple en microscopie optique et électronique la même morphologie que les cellules du canal collecteur, avec un aspect cuboïdal simple sans chorion visible (37).

Cette question est par ailleurs soulevée par la comparaison anatomique inter-espèces. Dans le livre d'anatomie du pelvis rénal et de l'uretère, Narath affirme qu' « il n'existe guère d'autre organe chez les mammifères qui présente autant de variations anatomiques que le

pelvis rénal » (39). En effet les espèces ayant la plus grande capacité de concentration des urines, et qui peut être réduit par une diminution des apports protidiques, sont celles présentant le pelvis le plus complexe (pelvis de type II). Le pelvis de type I quant à lui est simple, sans extension ni renforcements ; il existe chez des espèces qui ont un faible pouvoir de concentration (tel que le cochon ou le castor), celui-ci n'étant pas affecté par les apports protidiques (38).

Cette comparaison anatomique inter-espèces a son importance pour l'étude des mécanismes de concentration des urines. Il est en effet intéressant de noter que la présence de ces fornix spécialisés au sein des pelvis de type II augmente considérablement l'interface entre l'urothélium et l'urine intra-pelvique d'une part, et le parenchyme rénal d'autre part. Cette augmentation de surface urothéliale n'est donc pas seulement expliquée par la profondeur de la papille.

Il pourrait donc exister une relation fonctionnelle entre le pelvis et le parenchyme rénal. Le contact étroit entre les vasa recta (et les faisceaux vasculaires), les anses de Henle et l'urine intra-pelvique est ainsi remarquable. L'urothélium intra-rénal serait d'ailleurs perméable à l'eau et à l'urée (56), et les transporteurs UT-B de l'urée sont exprimés à la surface de l'urothélium intra-rénal (57). Les espaces intercellulaires varient également selon le degré de restriction hydrique dans les modèles expérimentaux. L'urothélium papillaire présenterait en effet des espaces intercellulaires largement dilatés en contexte de restriction hydrique chez le rat (et donc de nécessité de concentration maximale), alors que ces espaces sont inexistantes en contexte d'accès libre à l'eau (58). La capacité de concentration urinaire est en outre influencée par la composition de l'urine pelvique (56).

Ces données nécessitent d'être précisées, et le phénotype exact de l'urothélium intra-rénal doit être étudié. Néanmoins, l'hypothèse du recyclage de l'urée, ou d'autres solutés, à partir de l'urine pelvique est posée ; les extensions du pelvis rénal jusqu'à la strie externe de la médulla externe permettraient d'y recycler l'urée présente dans l'urine vers les néphrons superficiels. Ainsi l'urine ne serait « finale » qu'une fois déversée dans l'uretère.

Physiopathologie du rein profond

Lésion et récupération rénales, indices d'une participation du rein profond ?

L'étude des mécanismes lésionnels rénaux est un enjeu majeur car elle ouvre la voie à des stratégies thérapeutiques préventives, que ce soit en contexte de souffrance rénale aiguë ou chronique. La compréhension et la maîtrise des mécanismes de régénération rénale conduiraient quant à elles potentiellement à des interventions de « post-conditionnement » qui pourraient accélérer cette réparation rénale. Les études portant sur ces deux versants permettent de soulever la participation potentielle des portions profondes du rein dans les mécanismes physiopathologiques.

Après résolution d'une ischémie rénale, on observe la persistance de lésions particulières de la médulla externe, caractérisées par une congestion et une hypoperfusion, alors que la perfusion corticale s'est normalisée. L'hypoxie présente en conditions physiologiques s'aggrave dans ce contexte alors que cette région perfuse des segments tubulaires particulièrement exigeants en énergie – *i.e.* les pars recta et les branches ascendantes larges de Henle. Ceci expliquerait la prédilection des lésions tubulaires dans cette région (59). La jonction cortico-médullaire est parallèlement le siège d'une intense régénération tubulaire (60). On observe donc une coexistence dans le temps de phénomènes lésionnels et de régénération tubulaire dans cette zone. La récupération rénale semble cependant mitigée dans des modèles d'obstruction urétérale unilatérale alors même qu'il n'existe pas de lésion structurelle visible, avec pourtant une diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG) et une augmentation des résistances vasculaires rénales (RVR) (61). Dans un modèle expérimental de choc hémorragique donnant lieu à une souffrance rénale aiguë, même après récupération du DFG ont été observés des troubles de concentration urinaire. Il est intéressant de noter dans ce modèle une récupération tubulaire épithéliale contrastant avec une fibrose interstitielle, présente de manière prédominante dans la médulla externe (62). La récupération à long terme dépend quant à elle de la plasticité cellulaire rénale ; les cellules mésenchymateuses qui peuvent probablement dériver de tous les contingents cellulaires rénaux, ont à la fois un potentiel pro-fibrosant et un potentiel régénérant (63).

Nous étudierons en particulier dans ces sections le rôle de la microvascularisation et de l'urothélium en physiopathologie rénale.

Rôle de la microvascularisation

La circulation microvasculaire rénale est constituée de deux lits capillaires connectés en série, et cette disposition, ainsi que la faible PO_2 médullaire, la rendent particulièrement sensible à l'hypoxie et à l'ischémie. Celle-ci peut être à la fois la cause de la maladie rénale, par exemple lors de la néphropathie drépanocytaire, mais également sa conséquence (64). Les anomalies microvasculaires compromettent d'une part l'apport normal en nutriments et métabolites nécessaire au fonctionnement du rein, et d'autre part directement la fonction rénale, notamment les fonctions médullaires. Liée à une vasoconstriction exagérée et/ou à une dysfonction endothéliale, l'atteinte microvasculaire peut entraîner des altérations hémodynamiques avec une diminution de la perfusion des capillaires péri-tubulaires. Ces anomalies peuvent être responsables d'une ischémie tubulo-interstitielle, instaurant un cercle vicieux qui aggrave encore l'atteinte rénale (65).

On peut distinguer deux types de raréfaction microvasculaire (ou raréfaction des capillaires péri-tubulaires). La raréfaction fonctionnelle est la conséquence d'une diminution de la perfusion sans anomalie quantitative anatomique, tandis que la raréfaction structurelle représente une réduction du nombre de microvaisseaux présents dans le tissu. Ces deux processus ne sont pas mutuellement exclusifs, puisque d'ailleurs la raréfaction fonctionnelle peut à terme être suivie d'une réelle raréfaction structurelle. L'histoire naturelle de la raréfaction capillaire peut être résumée ainsi : raréfaction fonctionnelle, remodelage microvasculaire, diminution puis perte structurelle des capillaires (65).

La raréfaction des capillaires péri-tubulaires, cause et conséquence des lésions rénales

Les capillaires péri-tubulaires représentent le second réseau capillaire rénal, après les capillaires glomérulaires et l'artériole efférente. Comme il a été développé plus haut, leur structure et leur fonction sont essentielles aux fonctions rénales « post-glomérulaires », c'est-à-dire l'homéostasie des fluides et des solutés dans l'organisme. Leur raréfaction semble être une des premières étapes dans la genèse des maladies rénales aiguës et chroniques.

La raréfaction microvasculaire a en effet été observée dans de nombreuses pathologies et dans de nombreux modèles expérimentaux de souffrance rénale, aiguë ou chronique (66). Elle accompagne aussi bien la glomérulosclérose, où l'atteinte glomérulaire peut altérer le flux sanguin en aval, que la fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire (67). L'accumulation de matrice extracellulaire caractéristique de la fibrose rénale retrouvée dans la maladie rénale chronique peut perturber les réponses angiogéniques normales consécutives à l'ischémie. Il existe en effet une interaction étroite entre ce tissu environnant et les vaisseaux. Par ailleurs, la fibrose interstitielle et l'accumulation de matrice extracellulaire diminuent l'oxygénation et l'apport en nutriments aux cellules tubulaires et interstitielles en augmentant la distance entre les vaisseaux et les tissus perfusés. Inversement, les zones d'hypoxie interstitielle induite par la raréfaction capillaire stimulent les signaux pro-fibrotiques notamment médiés par le TGF β et inflammatoires. Ces changements sont à leur tour responsables de lésions microvasculaires, créant ainsi un cercle vicieux contribuant à la fibrogénèse (68).

On peut néanmoins dégager certaines situations en physiopathologie rénale où la raréfaction des capillaires péri-tubulaires constitue le *primum movens*. Dans les modèles expérimentaux de diabète, l'atteinte microvasculaire précède l'altération du débit de filtration glomérulaire (69). De manière concordante, le flux des capillaires péri-tubulaires est diminué chez les patients diabétiques bien avant le stade de microalbuminurie ou d'insuffisance rénale (70). Une atteinte rénale microvasculaire a également été rapportée chez des patients atteints de syndrome néphrotique cortico-sensible (71). Enfin, l'étude de Steegh *et al* a montré que la raréfaction des capillaires péri-tubulaires précédait et était prédictive de la dysfonction de greffon dans la transplantation rénale (72).

Liée à une vasoconstriction exagérée et/ou à une dysfonction endothéliale, l'atteinte microvasculaire peut entraîner des altérations hémodynamiques avec une diminution de la perfusion des capillaires péri-tubulaires. La raréfaction est probablement multifactorielle et ses mécanismes font intervenir des anomalies de signalisation intracellulaires, une diminution de facteurs liés à la survie, ou des changements de perfusion des vaisseaux.

Dysfonction endothéliale et raréfaction des capillaires péri-tubulaires

La cellule endothéliale et ses facteurs de croissance jouent un rôle fondamental dans l'intégrité du réseau capillaire péri-tubulaire rénal. Outre la fonction de barrière, l'endothélium a des fonctions vasorégulatrices et immunitaires. Plusieurs études ont montré l'implication de

l'activation endothéliale et de la dysfonction microcirculatoire dans l'inflammation rénale (64,67,73,74). Concernant la fonction vasorégulatrice, celle-ci est altérée par l'inhibition de la production de monoxyde d'azote (NO), notamment par la NO-synthase endothéliale (eNOS) (75). Celle-ci limite la dysfonction endothéliale par un effet vasodilatateur direct, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et de l'activation leucocytaire. L'effet inverse et délétère est lié à la production locale de dérivés réactifs de l'oxygène tels que les peroxy-nitrites, qui consomment le NO biodisponible pour l'endothélium et stimulent la production de peptides vasoconstricteurs tels que l'endothéline-1 (76). Enfin, il a été démontré dans un modèle de souffrance rénale aigüe liée au sepsis, une augmentation de l'expression de tous les sous-types connus de NO-synthase dans le cortex rénal, et une diminution dans la médulla. Cette expression augmentée provoquerait donc un shunt vasculaire aux dépens de la médulla, et responsable d'une ischémie médullaire (77).

Les facteurs angiogéniques, en particulier le VEGF (vascular endothelial growth factor), sont également essentiels à l'intégrité et à la réparation vasculaires. Leur diminution peut être à la fois à l'origine et la conséquence de nombreuses maladies rénales (67). Cette diminution a été observée dans des contextes de souffrance rénale aigüe, corrélée à la diminution de la densité microvasculaire et à l'augmentation de la fibrose (78). Son administration dans ces conditions atténuerait les lésions et augmenterait la réparation rénale (79).

Les péricytes joueraient enfin probablement un rôle dans l'atteinte microvasculaire rénale. Ces cellules contractiles insérées dans la membrane basale de tous les capillaires rénaux possèdent des élongations encerclant la paroi endothéliale (80). Leur détachement des capillaires est responsable d'une instabilité vasculaire, et entraînerait leur transformation vers un phénotype myofibroblastique aggravant la fibrogénèse et la souffrance tubulaire (68). Leur densité est par ailleurs corrélée à l'intensité du retentissement de l'ischémie-reperfusion (81).

Raréfaction des capillaires péri-tubulaires et altérations hémodynamiques

Les capillaires sont d'une part les premiers vaisseaux qui souffrent d'une diminution du flux sanguin. D'autre part, un impact sur l'hémodynamique rénale a été démontré lors de la perte de la circulation microvasculaire (65,82). Dans le vieillissement normal, la raréfaction des capillaires rénaux est associée à une diminution du débit sanguin rénal et du débit de filtration glomérulaire (83).

Le débit sanguin rénal est déterminé par le gradient de pression hydrostatique entre le réseau artériel et veineux, divisé par les résistances vasculaires rénales (RVR) totales. Une augmentation des résistances vasculaires rénales peut donc être directement responsable d'une diminution du débit sanguin rénal (DSR). Le tonus des artérioles afférentes et efférentes détermine quant à lui le débit de filtration glomérulaire (DFG). Ainsi, une dysfonction endothéliale sévère peut, en diminuant la biodisponibilité de NO, augmenter la vasoconstriction des artérioles aussi bien que des capillaires post-glomérulaires, altérant à la fois le DSR et le DFG. L'activation du réseau nerveux autonome sympathique intrarénal peut aussi induire une vasoconstriction significative, augmentant les RVR, et ainsi diminuant le DSR (65). Le tonus microvasculaire rénal est donc essentiel à l'intégrité rénale et au maintien de ses fonctions (84). D'autres peptides vasoconstricteurs sont impliqués, tels que l'angiotensine II et l'endothéline-1. En quantités physiologiques, l'angiotensine II permet un maintien du DFG par vasoconstriction post-glomérulaire majoritaire (85). En situation pathologique, son augmentation excessive et prolongée est responsable d'un stress oxydatif, et promeut l'inflammation et la fibrose rénale, en partie par l'intermédiaire de la diminution de l'action des bradykinines (86). L'endothéline-1 est quant à elle un puissant vasoconstricteur sécrété par les cellules endothéliales endommagées responsable d'une aggravation de la souffrance microvasculaire dans le rein (87).

Atteinte microvasculaire et néphropathie hypertensive

L'HTA est un facteur majeur de risque cardiovasculaire. Elle est responsable d'une dysfonction endothéliale et d'un remodelage vasculaire, engendrant à terme une raréfaction capillaire et une hypoxie tissulaire. Il s'agit de la microangiopathie de l'hypertension, à l'instar de la microangiopathie diabétique. La raréfaction capillaire a été démontrée dans plusieurs organes lors de l'HTA (68), et impliquerait un certain degré d'inflammation (88). Elle serait par ailleurs liée à une transmission anormale de la pression artérielle dans les réseaux capillaires, en particulier dans les organes fortement perfusés et avec des résistances vasculaires relativement faibles, tels que le cerveau, le cœur et les reins. Les capillaires péri-tubulaires participent dans ces situations à l'augmentation des RVR en diminuant leur diamètre, en augmentant leur contractilité (notamment par l'intermédiaire des péricytes), voire en se raréfiant (65). Bien qu'il soit difficile de séparer les événements lors de la physiopathologie de la néphropathie hypertensive, l'atteinte microvasculaire, définie par la vasoconstriction et la dysfonction endothéliale et entraînant la raréfaction des capillaires

péritubulaires (89), pourrait être la première étape dans la séquence délétère entraînant les lésions rénales de l'HTA, notamment par la voie des récepteurs à l'EGF (90). L'atteinte endothéliale est d'ailleurs probablement un facteur déclenchant majeur de la glomérulosclérose secondaire à l'HTA (91).

Atteinte microvasculaire et néphropathie drépanocytaire

La drépanocytose est une maladie héréditaire de l'hémoglobine caractérisée par une déformation des globules rouges responsables d'une modification de la rhéologie sanguine, une hémolyse et des épisodes de vaso-occlusions, notamment dans les vaisseaux de petit calibre. Les atteintes d'organe de la drépanocytose sont également liées à d'autres mécanismes physiopathologiques tels que l'ischémie-reperfusion, l'inflammation, l'hémolyse, le stress oxydatif, le déficit en NO, l'activation endothéliale, ou encore le déséquilibre entre le tonus sympathique et parasympathique (92). Tous ces processus sont entremêlés dans la physiopathologie de la drépanocytose. L'hémolyse joue un rôle prépondérant dans le développement de la dysfonction endothéliale, et ce phénotype serait selon certains auteurs, plus important que l'hyperviscosité et la vaso-occlusion dans la genèse des atteintes d'organes dans la drépanocytose (93).

La néphropathie drépanocytaire est caractérisée par une atteinte glomérulaire liée à l'hyperfiltration, aboutissant à une glomérulosclérose et à une insuffisance rénale à terme, et une atteinte extra-glomérulaire associant des troubles de concentration et des troubles de l'acidification des urines. L'atteinte médullaire, en contraste avec l'atteinte corticale est communément expliquée par la vaso-occlusion des vasa recta. A l'inverse de cette ischémie médullaire, il existe une hyper-perfusion du cortex, avec une diminution des résistances vasculaires qui conduirait à l'augmentation du DFG (94). Cette atteinte différentielle soulève la question d'un déséquilibre lié à un shunt vasculaire au profit du cortex rénal. Ce déséquilibre pourrait être en lien avec l'hémolyse, qui aurait des effets à la fois vasoconstricteurs via la toxicité de l'hème, et à la fois vasodilatateurs via l'induction forte de l'hème-oxygénase de type 1 (93). L'hème-oxygénase de type 1, l'enzyme inductible induit non seulement par l'hème mais aussi par le stress oxydatif semble essentiel à la santé rénale, dans de nombreux modèles expérimentaux, notamment dans le diabète, où son déficit est responsable d'une atteinte microvasculaire intra-glomérulaire (95).

Le lien entre atteinte microvasculaire extra-glomérulaire, c'est-à-dire des capillaires péri-tubulaires, et la toxicité de l'hème dans la drépanocytose n'est en tout cas pas clairement établi.

Il est en revanche établi que l'hème provoque des altérations de l'endothélium vasculaire en augmentant le phénotype inflammatoire et ainsi l'infiltration leucocytaire, et pro-thrombotique (96). Son effet sur la raréfaction des capillaires péri-tubulaires n'est pas encore étudié mais est supposé étant donné sa toxicité endothéliale. Le recrutement leucocytaire par l'intermédiaire de l'endothéline 1 semble un élément majeur dans la physiopathologie de la vasculopathie de la drépanocytose (97). L'inhibition des récepteurs de l'endothéline a d'ailleurs un effet protecteur puissant dans les modèles expérimentaux de drépanocytose (98).

Atteintes de l'urothélium et connaissances en physiopathologie

La grande majorité des études portant sur le rôle de l'urothélium en physiopathologie se concentrent sur l'urothélium vésical et urétéral qui, comme nous l'avons vu précédemment diffère fondamentalement de l'urothélium intrarénal, que ce soit dans ses fonctions ou dans sa morphologie. Il a par exemple été étudié pour approcher les mécanismes de la tumorigénèse, ou encore des infections urinaires. Les uroplakines ont notamment un rôle dans le développement des infections urinaires et la migration des bactéries vers les voies urinaires hautes. Il a été démontré que les *E. coli* uropathogènes se fixent à l'uroplakine de type Ia pour pénétrer dans les cellules urothéliales (99), et se maintenir en statut quiescent dans les vésicules intracellulaires stockant les uroplakines (100). Ceci expliquerait la physiopathologie des infections urinaires récidivantes, de la cystite incrustante, ou encore des lithiases d'origine infectieuse (31).

Les données de la littérature sont en revanche plus limitées sur le rôle de l'urothélium intrarénal dans la physiopathologie rénale. Elles permettent néanmoins de dégager quelques informations intéressantes. En partant des connaissances embryologiques, on peut émettre l'hypothèse d'une communication entre le parenchyme rénal et l'urothélium intrarénal en situation pathologique. En effet, le blastème métanéphrogène (à l'origine du parenchyme rénal) recouvre chaque tube collecteur formé à partir du bourgeon urétéral (à l'origine des voies urinaires), et se condense. Sous l'influence de signaux diffusibles en provenance du bourgeon urétéral, les cellules mésenchymateuses subissent une transformation épithéliale et

forment des vésicules puis les tubules rénaux. L'interaction entre le bourgeon urétéral (structure épithéliale) et le blastème métanéphrogène (tissu mésenchymateux) est donc déterminante pour le développement rénal (101).

Néphropathies obstructives

Les uropathies malformatives représentent une des principales causes de maladie rénale chronique et d'insuffisance rénale terminale chez l'enfant. Chez l'adulte les néphropathies obstructives peuvent compliquer l'évolution de nombreuses pathologies dont les calculs rénaux, les tumeurs, les vessies neurologiques ou encore l'hypertrophie bénigne de prostate. L'obstruction peut être aiguë, répétée ou chronique. Dans le cas de l'obstruction aiguë, des phénomènes adaptatifs se mettent rapidement en place. D'une part, la perte du péristaltisme et la dilatation des cavités permet de diminuer les pressions dans les cavités intra-rénales. Des modifications hémodynamiques permettent d'autre part de limiter l'hyperpression intratubulaire (102).

Dans le modèle expérimental d'obstruction urétérale unilatérale (UUO), l'urothélium intrarénal présente initialement une desquamation, des jonctions serrées endommagées et une perte de l'expression des uroplakines à sa surface. Une prolifération urothéliale est néanmoins observée très rapidement après UUO, avec la formation d'un épithélium pluristratifié présentant des plaques plus abondantes, exactement à l'image de l'urothélium vésical (figures 11 et 12). Cette prolifération semble dépendante de l'activation des FGFR2 à la surface urothéliale par le facteur de croissance des fibroblastes FGF7 (27).

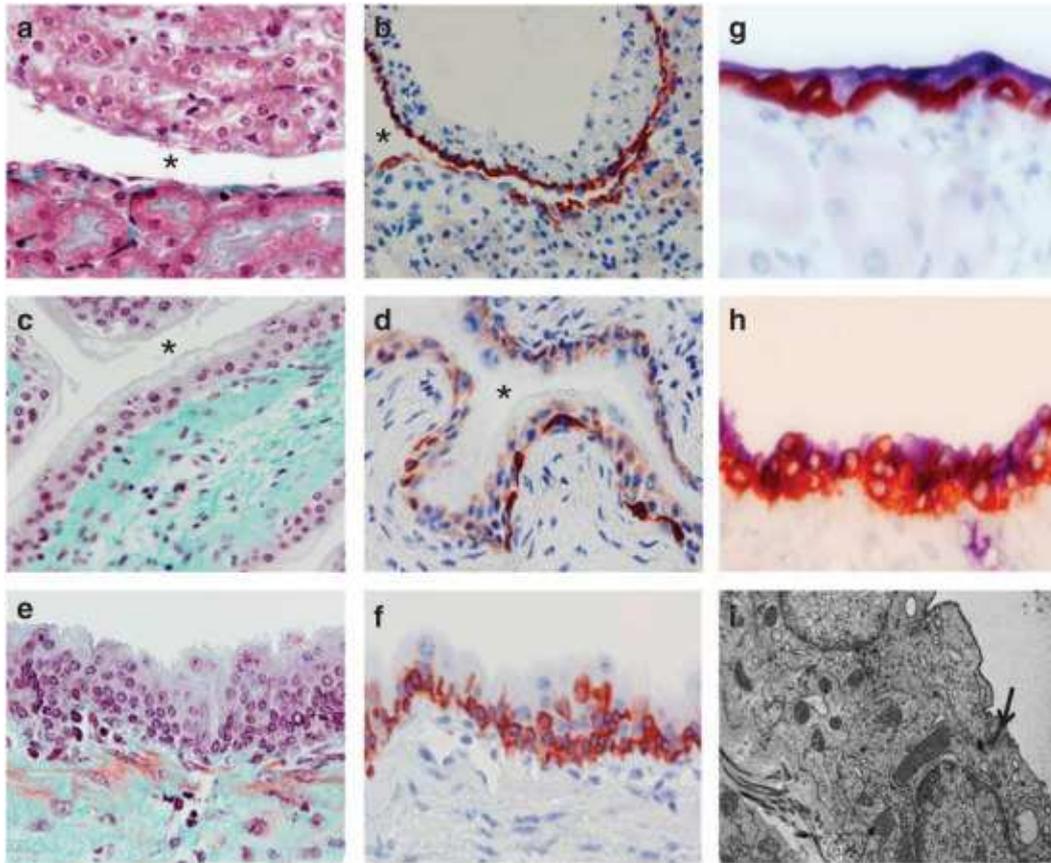


Figure 11. Vessie et urothélium intra-rénal normaux et après UUO. La première colonne montre des images de coloration au trichrome de Masson, la seconde colonne des marquages en immunohistochimie par un anticorps anti-Krt14, et la troisième colonne par un anticorps anti-uroplakine III de l'urothélium intrarénal normal (g) et 14 jours après UUO (h). a, b, fornix normal, c, d, vessie normale, e, f, urothélium intra-rénal 14 jours après UUO. En I, photographie de microscopie électronique de l'urothélium normal. D'après A. Girshovich et al. (27)

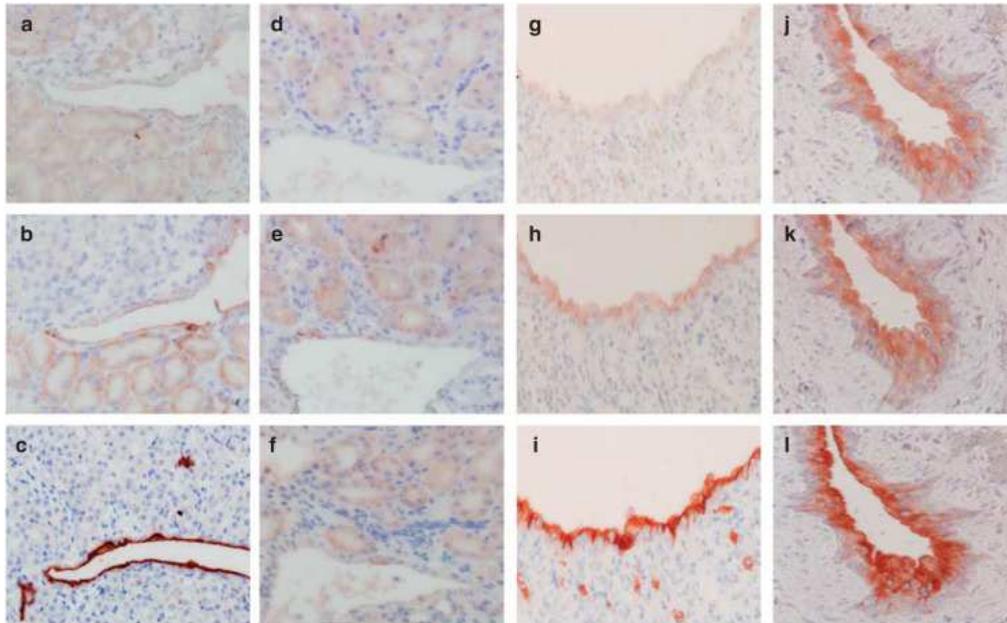


Figure 12. Expression des uroplakines dans l'urothélium intra-rénal normal et après UUO. La première colonne représente l'urothélium intra-rénal normal, la deuxième l'urothélium 2 jours après UUO, la troisième 14 jours après UUO et la quatrième la vessie normale. La première ligne correspond à l'expression de l'uroplakine I, la seconde à l'uroplakine II et la troisième à l'uroplakine III. D'après A. Girshovich *et al.* (27)

Cette prolifération pourrait également faire intervenir l'axe Il33-ST2, selon l'étude de Chen *et al.* : les cellules urothéliales exprimant la Krt5 produiraient de l'Il33 en contexte d'UUO, et les lésions urothéliales seraient moindres chez les souris déficientes en Il33 (103).

L'obstruction chronique est responsable à terme d'une atteinte rénale parenchymateuse pouvant, même en l'absence d'obstruction complète, mener à une insuffisance rénale chronique terminale. Les mécanismes de destruction parenchymateuse sont incomplètement compris dans ce contexte. Les modèles expérimentaux d'obstruction urinaire sont à ce titre intéressants. L'urothélium intrarénal étant la première barrière anatomique subissant la stase et l'hyperpression urinaire, son étude semble essentielle à la compréhension de la genèse de la néphropathie obstructive. Dans le modèle murin transgénique d'obstruction urinaire chronique par mégavessie (souris *Mgb^{-/-}*), le gène de la myocardine est muté, conduisant à l'absence de contraction musculaire lisse de la vessie (104). Ces souris présentent une métaplasie urothéliale intrarénale avec prolifération urothéliale, augmentation de l'expression des uroplakines, et dépôts collagéniques sous-urothéliaux (105). Ces altérations urothéliales sont probablement des phénomènes adaptatifs,

mais dont le rôle dans la protection, ou à l'inverse, l'atteinte du parenchyme rénal n'est pas encore prouvé. Certains auteurs suggèrent que les uroplakines agiraient comme des « capteurs » lors de l'obstruction. Leur élongation en réponse à une augmentation de surface et/ou de pression, serait responsable d'une cascade de signalisation intracellulaire conduisant au remodelage urothélial rencontré dans les différentes situations pathologiques (34). Ceci a en particulier été démontré dans les infections urinaires basses (106).

Urothélium intra rénal et accélération de la régénération rénale au décours d'une ischémie rénale

Les cellules urothéliales intra-rénales ne sont probablement pas étrangères à d'autres mécanismes physiopathologiques rénaux. Vinsonneau *et al.* l'ont illustré en les étudiant au décours d'une ischémie rénale sans insuffisance rénale aiguë (modèle d'ischémie-reperfusion) (107). Ces cellules, tout particulièrement celles situées près des fornix, sont le premier contingent qui prolifère dès la 18^{ème} heure avec un maximum entre 24 et 48 heures, avant les cellules tubulaires de voisinage (*i.e.* les cellules tubulaires de la jonction cortico-médullaire). Ces dernières présentent en effet une prolifération significative à partir de la 48^{ème} heure.

Alors que les éléments déclencheurs exacts restent à définir – l'hypoxie, l'hyperpression, ou encore l'acidose – cette prolifération de l'urothélium intrarénal requiert l'activation de la voie FGF7/FGFR2IIIb. De manière intéressante, des travaux antérieurs ont identifié l'importance de l'activation de FGF7/FGFR2IIIb au cours de la réparation tubulaire (108) ainsi que l'expression du FGFR2 par certaines cellules des canaux collecteurs (109). Plusieurs équipes ont aussi démontré l'effet délétère sur la fonction rénale du blocage de cette voie (110).

On peut ainsi supposer qu'il existe un lien entre la régénération tubulaire et la prolifération urothéliale. Ce lien pourrait être expliqué

- soit par un effet direct du FGF7 sur certaines cellules des canaux collecteurs qui expriment FGFR2IIIb,
- soit par un effet inductif de l'urothélium intrarénal, une fois stimulé par FGF7, à l'instar du processus d'induction du blastème par le bourgeon urétéral se déroulant au cours de l'embryogénèse.

Il n'est pas cependant actuellement pas possible de privilégier une des alternatives.

Objectifs des études

Les objectifs des études présentées sont de préciser les rôles du rein profond dans les processus physiopathologiques rénaux. Nous nous intéresserons en particulier à un des reflets de la maladie rénale profonde : les troubles de concentration des urines, que nous analyserons dans la maladie rénale chronique. Ensuite nous évaluerons le rôle des capillaires péri-tubulaires dans l'hémodynamique rénale et l'effet de l'hème sur cette vascularisation profonde. Enfin la dernière partie du projet visera à édifier le rôle de l'urothélium intrarénal dans la physiologie rénale dans l'optique, à terme, de définir sa contribution dans les processus physiopathologiques rénaux.

Première partie

L'atteinte du rein profond reflétée par les troubles de concentration des urines dans la maladie rénale chronique

A partir de données épidémiologiques provenant d'une cohorte prospective de patients suivis pour une maladie rénale chronique, nous avons tenté ici une approche physiopathologique pour interpréter les résultats de l'analyse.

Ce travail a été soumis à la revue *American Journal of Kidney Disease*. Les commentaires des reviewers exigent des révisions mineures (annexe 1).

Fasting urinary osmolality: a relevant biomarker for CKD progression

Nahid Tabibzadeh^{1,2*}, Sandra Wagner^{3,4*}, Marie Metzger⁴, Martin Flamant^{5,6}, Pascal Houillier^{7,8}, Jean-Jacques Boffa^{1,2,9}, Francois Vrtovsnik^{5,10}, Eric Thervet^{7,11}, Bénédicte Stengel^{3,4}, Jean-Philippe Haymann^{1,2} for the Nephrotest study group

¹ Sorbonne Université, Inserm UMR_S 1155, Paris, France

² Unit of Renal Physiology, AP-HP Hôpital Tenon, Paris, France

³ CESP, Inserm U1018, Université Paris-Saclay, Université Paris-Sud, UVSQ, Villejuif, France

⁴ FCRIN INI-CRCT, France

⁵ Université Paris Diderot, Paris, France

⁶ Unit of Renal Physiology, AP-HP Hôpital Bichat, Paris, France

⁷ Université Paris Descartes, Paris, France

⁸ Unit of Renal Physiology, AP-HP Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

⁹ Unit of Nephrology, AP-HP Hôpital Tenon, Paris, France

¹⁰ Unit of Nephrology, AP-HP Hôpital Bichat, Paris, France

¹¹ Unit of Nephrology, AP-HP Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

* These authors contributed equally to this work.

Keywords: CKD – ESRD – prognostic factor – urine osmolality

Abstract

Background. Chronic kidney disease (CKD) is characterized by renal tissue injury explaining a decreased glomerular filtration rate (GFR) altogether with various degree of impaired tubular functions both in the cortex and the medulla. Alteration of urine concentration ability is a well-known feature of CKD, however its relevance as a risk factor for end stage renal disease (ESRD) or GFR decline is poorly known.

Study Design. Prospective longitudinal observational study.

Setting and participants. 2,084 stable adult patients with CKD stages 1 to 4 from the NephroTest Cohort.

Predictor. Fasting urinary osmolality (Uosm).

Outcomes. End-stage renal disease (ESRD) and pre-ESRD death.

Measurements. Fasting Uosm measured by delta cryoscopy. Measured GFR (mGFR) assessed by ⁵¹Cr- EDTA renal clearance.

Results. 380 ESRD events and 225 deaths before ESRD occurred during a median follow-up of 5.9 years [3.8-8.2]. At baseline mean (\pm SD) age was 58.7 \pm 15.2 years with a median mGFR of 40.2 [29.1-54.5] ml/min/1.73m² and a median fasting Uosm of 502.7 \pm 151.7 mosm/kgH₂O. Fasting Uosm was strongly associated with mGFR (R=0.54, p<0.001). Patients with lower fasting Uosm had a higher risk of ESRD after adjustment for confounding factors (HRs 1.9 [1.2-3.0] for the lowest versus highest tertile) but not of mortality (HRs 0.99 [0.68 - 1.44]). In a mixed linear model, adjusted for baseline mGFR and patients characteristics, patients in the lowest tertile of Uosm had a higher decline of renal function (-4.9 \pm 0.9% per year, p<0.001) compared to the highest.

Limitations. Fasting was assessed on a patient declarative basis.

Conclusions. Fasting Uosm is easy to perform in a routine evaluation and a reliable prognostic factor for GFR decline and ESRD in CKD patients, independently of confounding factors such as basal GFR and albuminuria.

Introduction

The ability of kidneys to concentrate urine enables the excretion of a maximal amount of osmoles in a minimal urine volume, leading to a urinary osmolality value which can considerably exceed plasma osmolality. Indeed, human kidneys are able to raise urine osmolality to a maximum of 1200 mosm/kgH₂O after a fasting state, with differences among species depending on the axial length of the papilla ¹.

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by a decreased glomerular filtration rate and several tubular defects including impaired urine concentration ability especially at late stages of the renal disease. Of notice, regardless of the cause of renal failure, the natural history of chronic renal failure is characterized by hyposthenuria, in experimental models as well as in humans ²⁻⁴.

It is not currently known whether therapeutic interventions on urine concentration are efficient in preventing kidney function decline. Some authors suggest that decreasing urine osmolality, and consequently plasma vasopressin, would exert a beneficial effect on kidney protection ⁵⁻⁸ whereas others conclude that high water intake and high urine volume output could be deleterious ^{3,9-11}.

Renal function is usually assessed by the estimation or the measure of the glomerular filtration rate (GFR) i.e. the filtration process within glomeruli, whereas nephron functions also include other structures such as tubules and peritubular capillaries. Indeed, tubules ensure several other functions among which the onset and maintenance of a cortico-papillary concentration gradient. We presumed that fasting urine osmolality, a reliable marker of maximal urine concentration, would provide a relevant assessment of tubular dysfunction independently of glomerular alteration and thus could be of prognostic value. Based on a prospective stage 1-4 CKD cohort, our study aimed at investigating the association between fasting urine osmolality and CKD progression, i.e. end stage renal disease (ESRD) and mGFR

decline, and pre-ESRD death. We hypothesized that lower fasting urine osmolality would be associated with worse outcomes.

Patients and Methods

Study population and design

The NephroTest cohort is a prospective multicenter study that enrolled 2084 adult patients with all stages of CKD referred by nephrologists to three departments of physiology for extensive workups between January 2000 and December 2012¹². Eligible patients were ≥ 18 years of age at inclusion and had neither started dialysis nor received a kidney transplant. Pregnant women were excluded. After exclusion of 62 patients with missing data for urine osmolality measurement, 123 patients with $\text{mGFR} < 15 \text{ ml/min}$ and 103 patients lost to follow-up, this analysis included 1796 patients (Figure 1). All patients provided written informed consent. The NephroTest study design was approved by an ethics committee (CCTIRS MG/CP09.503).

Data collection and measurements

During a 5-h in-person visit, a large set of clinical and laboratory data were collected. They included demographics, renal diagnosis, medical history, height and weight, blood pressure (BP), and treatments received. Patients were instructed to fast from 8 p.m. the day before the admission. At each visit fasting blood samples, 24-h urine collection and fasting urine samples were collected. Fasting Uosm was measured by delta cryoscopy (Osmometer, Radiometer, Denmark).

At each visit, mGFR was measured by urinary $^{51}\text{Cr-EDTA}$ clearance (GE Healthcare, Velizy, France) and determined as the average of 5–7 consecutive 30 min clearance periods (fractionated clearances), as previously described¹³.

Over the study period, patients underwent a total of 5199 laboratory visits with Uosm and mGFR data and a median of 2 [IQR, 1-4] visits.

Outcomes

The primary end-point of this study was ESRD defined as initiation of renal replacement therapy (RRT) by dialysis or pre-emptive transplantation. The secondary end-points were pre-ESRD death and mGFR decline. Information about deaths and their causes and ESRD events was obtained either from patient medical records or linkage with the national death registry and the national *REIN* (Renal Epidemiology and Information Network) registry of treated ESRD. All survival data were right-censored on 31 December 2013, or on the last visit when the patients were not found in registries.

Statistical analyses

Patient characteristics were described according to gender-specific tertiles of Uosm.

First, differences between the three tertiles were tested with analysis of variance (ANOVA), the Kruskal–Wallis test or the Chi-square test, as appropriate.

Second, we performed cause-specific Cox-regression analyses to estimate crude and adjusted hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals [HR (95% CI)] for ESRD and pre-ESRD death associated with gender-specific Uosm tertiles, using the highest tertile as the reference category. In each models, the competing events were treated as censored observations. The cause-specific approach has indeed been shown to be the most suitable to account for competing risks of concurrent events for etiological studies¹⁴. Sequential models were developed for each outcome studied with adjustment covariates similar in both analyses: models 1 were adjusted for mGFR; model 2 included model 1 covariates and age, sex, center, ethnicity, obesity; model 3, model 2 covariates and ACR in class (<3, 3-30, >30 mg/mmol), high blood pressure, diabetes, CV history, smoking status, ACEi or ARBs, nephropathy type and natremia; model 4, model 3 covariates and 24h urine ammonium. In all models, we

performed tests for linear trend across tertiles of Uosm. Subsidiary analysis was performed with Uosm treated as a continuous variable. Assessment of the Schoenfeld residuals shown that none of the variables except mGFR studied violated the proportional-hazards assumption in the Cox model for ESRD. Consequently, interaction term between mGFR and log(time) was used in model 1 to 4 for ESRD to account for time-varying effects.

Third, we used linear mixed model with random intercepts and slope to study the association between baseline osmolality and mGFR slope in % per year. We estimated beta and standard deviations adjusted for baseline mGFR (<30, 30-45, >45 mL/min per 1.73 m²), as well as for the following covariates: baseline mGFR, estimated urine osmolality, age, sexe, center, ethnicity, log proteinuria, elevated blood pressure, BMI, CV history, diabetes, smoking, ACEi or ARBs intake. The covariance matrix for the random effects was estimated for each group of baseline mGFR separately, and robust sandwich variance estimators were used to estimate variances of regression coefficients. Interactions with time were tested for all covariates. Only those that were statistically significant according to the Wald test and improved the model according to the Akaike information criteria (AIC) were included in the final model. Missing values accounted for <5% of most variables. Mean or mode imputation was used for these variables in the multivariate analysis. For ethnicity and albumin/creatinine ratio, a missing class was created.

A two-sided P-value < 0.05 indicated statistical significance. Data analyses were performed with SAS software, version 9.3 (SAS institute, Cary, NC) and with R version 3.0.2 software (R Development Core Team, 2005).

Results.

Mean age at baseline was 58.7 ± 15.2 years, with 67.7% of male, 21.3% obese ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) and 27.3% with diabetes (Table 1). Diabetic nephropathy was present in 10.1%, vascular in 26.6%, glomerular in 14.5%, interstitial in 9.2% and polycystic kidney disease in 5.8%. 65.2% of patients had normal natremia, ranging from 138 to 142 mmol/L (18.1% of hyponatremia and 16.7% of hypernatremia). Median mGFR at baseline was 40.2 ml/min/1.73m² (IQR=29.1-54.5). Fasting urine osmolality (Uosm) ranged from 109 to 1114 mosm/kgH₂O, with a mean of 502.7 ± 151.7 and a median of 482 mosm/kgH₂O ([IQR]=401.5-591). Of notice median fasting Uosm value was higher in men than women (respectively 514.7 ± 150.4 and 477.5 ± 151.5 , $p < 0.001$). Fasting Uosm was positively associated with mGFR in men and women (Figure 2).

Patients in the lowest fasting Uosm tertile were older, with a higher prevalence of hypertension ($p=0.01$), diabetic nephropathy, polycystic kidney disease and tubulo-interstitial nephropathy ($p < 0.001$). They also experienced lower fasting urinary ammonium, higher 24-hour urine output, and higher proteinuria and albuminuria rates ($p < 0.001$) altogether with a higher rate of anti-proteinuric treatments ($p=0.01$). In addition, they were more treated with loop diuretics ($p < 0.001$). Of note, there was no difference according to fasting Uosm tertiles for natremia.

Hazard ratios for ESRD and death according to fasting Uosm

Over a median follow-up of 5.9 years [3.7-8.2], there were 380 ESRD events and 225 deaths before ESRD. Crude and adjusted HRs for ESRD were significantly higher in patients with lower fasting Uosm (with adjusted HRs of 1.97(1.26-3.08) or 1.18(1.06-1.32) for the lower tertile or 100 mosm/kgH₂O decrease respectively – table 2). Adjusting on urinary NH₄ did

not change the association (HRs of 1.91 (1.18-3.09) or 1.17 (1.03-1.33) associated with lower tertile or 100 mosm/l decrease respectively).

Crude HRs for pre-ESRD death were significantly higher in patients with lower fasting Uosm (with HRs of 1.42 (1.03-1.96) or 1.13 (1.04-1.24) for the lower tertile or 100 mosm/kgH₂O decrease respectively). In contrast, adjusted HRs for pre-ESRD death were not statistically significant either before or after adjusting for confounders such as natremia status (with adjusted HRs of 0.99 (0.68-1.44) or 1.04 (0.92-1.17) for the lower tertile or 100 mosm/kgH₂O decrease respectively - Suppl Table 1).

Fasting Uosm and mGFR decline over the study period

Mean annual decline in mGFR was $-6.1 \pm 2.8\%$ per year; it was steeper in patients with lower mGFR at baseline ($-9.4 \pm 0.8\%$ per year for <30 ml/min, $-6.7 \pm 0.6\%$ per year for 30-44 ml/min, $-4.5 \pm 0.4\%$ per year for ≥ 45 ml/min).

In the mixed model adjusted for baseline mGFR and patients characteristics, each 100 mosm/kgH₂O decrease of fasting Uosm at baseline was associated with an mGFR decline of $-1.0 \pm 0.2\%$ per year. Patients with urine osmolality in the lowest tertile had a higher decline of renal function compared to the highest tertile ($-4.9 \pm 0.9\%$ per year – Table 3). In this analysis proteinuria (log) was the only other variable significantly associated with GFR decline over time.

Discussion

Our study demonstrates, in a large prospective CKD cohort, an independent relationship between fasting urine osmolality and GFR decline rate and ESRD outcome. As a matter of fact, impaired ability to concentrate urine is reported in CKD, especially in pre-ESRD stages, and also in experimental models such as 5/6 nephrectomized rats^{2-4,15-18}. However, its prevalence is unknown according to CKD stages. Our results show that if we consider a normal fasting Uosm value above 600 mosm/l¹⁹, a concentrating defect is encountered in 77% of our study population: 42%, 69%, 84% and 98% of cases in CKD stage 2, 3a, 3b, and 4 subgroups. This high prevalence was expected as urine concentration depends noteworthy on corticopapillary osmotic gradient quality, and aquaporine 2 expression levels within collecting duct principal cells, both of which may be altered by CKD process²⁰.

To the best of our knowledge this is the first study examining fasting Uosm as a biomarker in CKD. In the same line, Hebert *et al* showed that 24-hour urine output was associated with faster eGFR decline⁹. In contrast, the link between 24-hour urine osmolality and renal outcome has been described in two other studies in global CKD patients and specifically in polycystic kidney patients, respectively^{8,21}. However, while fasting Uosm represents the nearest estimation of the maximal urinary concentration ability, 24-hour osmolality rather depends on salt and protein intakes.

CKD is currently assessed by GFR and albuminuria that evaluate rather glomerular function²². However chronic renal failure is characterized by alteration to various degrees of other kidney structures such as tubules^{23,24}, interstitium²⁵ and peritubular capillaries^{26,27}. As a matter of fact, all these structures (namely large ascending limb of Henle, peritubular microcirculation and collecting ducts cells) are involved in the onset and maintenance of

cortico-papillary osmotic gradient²⁰. Accordingly, for a given GFR, the magnitude of the gradient defect assessed by fasting Uosm should quantify tubular and peritubular capillaries damages, i.e. medullary function. In addition to GFR and ACR, fasting Uosm may thus provide relevant information on renal injury and its measurement is easy to perform in a routine clinical setting. Interestingly, urine ammonium excretion which depends both on daily acid intake and tubular function was previously reported as an independent ESRD risk factor²⁸. We show here that fasting Uosm prognostic value is independent of urine acid excretion.

The hypothesis of an impaired abnormal vasopressin secretion could also explain low urine concentrating capacity. Indeed, hypothalamic-pituitary axis dysfunction was reported in CKD²⁹. Alternatively, though not mutually exclusive, excessive vasopressin secretion due to tubule resistance^{17,30,31} was shown to be deleterious on renal outcome⁶. Our data may thus raise the issue whether increased plasma vasopressin or copeptin (as it is co-secreted with vasopressin could be its surrogate marker³²) in CKD would be an adaptive regulation for water balance due to impaired medulla function. Indeed, fasting Uosm remained of prognostic value independently of natremia levels. Conversely, hyponatremia, a state characterized by an impaired diluting ability of distal and collecting duct cells, did not seem to be associated with worse outcomes (i.e. ESRD or mortality) in our study. Further investigations are warranted in order to address this hypothesis.

Last, the finding that fasting Uosm was an independent risk factor for ESRD, and not for mortality, strengthens the hypothesis that cortico-papillary gradient evaluation provides kidney-specific information on the magnitude of tubular and microvascular lesions. Conversely, mGFR and albuminuria, which are both reported risk factors for ESRD and cardiovascular mortality would rather evaluate systemic endothelial dysfunction³³.

Our study displays limitations. First, fasting Uosm was assessed on a patient declarative basis and thus may neither be accurate for some individuals nor the maximum urine concentration

value one could expect. However, the range of Uosm throughout the study participants was quite reasonable, allowing us evaluating this parameter. Second, Uosm was measured by delta cryoscopy in our study, which is not broadly available. Calculated Uosm ($= (\text{Urinary Na}^+ + \text{Urinary K}^+) * 2 + \text{Urinary urea} +/- \text{Urinary glucose}$) was not available in our study although it is known to be an accurate estimation of measured osmolality ³⁴.

In conclusion, our study demonstrates that fasting Uosm could be a reliable, easy to perform, prognostic biomarker for GFR decline and ESRD outcome in CKD patients, independently of confounding factors such as basal GFR and albuminuria. These data strengthen the view that fasting Uosm may be a useful and interesting surrogate biomarker for medullary protection assessment in future therapeutic and preventive CKD trials.

Bibliography

1. Bankir L, Bouby N, Trinh-Trang-Tan M-M. The role of the kidney in the maintenance of water balance. *Baillières Clin Endocrinol Metab.* 1989;3(2):249-311. doi:10.1016/S0950-351X(89)80005-9
2. Pedersen EB, Thomsen IM, Lauridsen TG. Abnormal function of the vasopressin-cyclic-AMP-aquaporin2 axis during urine concentrating and diluting in patients with reduced renal function. A case control study. *BMC Nephrol.* 2010;11:26. doi:10.1186/1471-2369-11-26
3. Combs S, Berl T. Dysnatremias in patients with kidney disease. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2014;63(2):294-303. doi:10.1053/j.ajkd.2013.09.017
4. Conte G, Dal Canton A, Fuiano G, et al. Mechanism of impaired urinary concentration in chronic primary glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1985;27(5):792-798.
5. Bouby N, Bachmann S, Bichet D, Bankir L. Effect of water intake on the progression of chronic renal failure in the 5/6 nephrectomized rat. *Am J Physiol.* 1990;258(4 Pt 2):F973-979.
6. Bankir L, Bouby N, Ritz E. Vasopressin: a novel target for the prevention and retardation of kidney disease? *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(4):223-239. doi:10.1038/nrneph.2013.22
7. Clark WF, Sontrop JM, Macnab JJ, et al. Urine volume and change in estimated GFR in a community-based cohort study. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2011;6(11):2634-2641. doi:10.2215/CJN.01990211
8. Plischke M, Kohl M, Bankir L, et al. Urine osmolarity and risk of dialysis initiation in a chronic kidney disease cohort--a possible titration target? *PloS One.* 2014;9(3):e93226. doi:10.1371/journal.pone.0093226
9. Hebert LA, Greene T, Levey A, Falkenhain ME, Klahr S. High urine volume and low urine osmolality are risk factors for faster progression of renal disease. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2003;41(5):962-971.
10. Higashihara E, Nutahara K, Tanbo M, et al. Does increased water intake prevent disease progression in autosomal dominant polycystic kidney disease? *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2014;29(9):1710-1719. doi:10.1093/ndt/gfu093
11. Weber M, Berglund D, Reule S, Jackson S, Matas AJ, Ibrahim HN. Daily fluid intake and outcomes in kidney recipients: post hoc analysis from the randomized ABCAN trial. *Clin Transplant.* 2015;29(3):261-267. doi:10.1111/ctr.12514
12. Moranne O, Froissart M, Rossert J, et al. Timing of onset of CKD-related metabolic complications. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2009;20(1):164-171. doi:10.1681/ASN.2008020159
13. Froissart M, Rossert J, Jacquot C, Paillard M, Houillier P. Predictive performance of the modification of diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations for estimating renal function. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2005;16(3):763-773. doi:10.1681/ASN.2004070549
14. Noordzij M, Leffondré K, van Stralen KJ, Zoccali C, Dekker FW, Jager KJ. When do we need competing risks methods for survival analysis in nephrology? *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2013;28(11):2670-2677. doi:10.1093/ndt/gft355
15. Bricker NS, Dewey RR, Lubowitz H, Stokes J, Kirkensgaard T. OBSERVATIONS ON THE CONCENTRATING AND DILUTING MECHANISMS OF THE DISEASED KIDNEY*. *J Clin Invest.* 1959;38(3):516-523.

16. Coburn JW, Gonick HC, Rubini ME, Kleeman CR. Studies of Experimental Renal Failure in Dogs. I. Effect of 5/6 Nephrectomy on Concentrating and Diluting Capacity of Residual Nephrons*. *J Clin Invest.* 1965;44(4):603-614.
17. Teitelbaum I, McGuinness S. Vasopressin resistance in chronic renal failure. Evidence for the role of decreased V2 receptor mRNA. *J Clin Invest.* 1995;96(1):378-385. doi:10.1172/JCI118044
18. Suzuki K, Hatano R, Michimata M, et al. Residual urinary concentrating ability and AQP2 expression in a rat model for chronic renal failure. *Nephron Physiol.* 2005;99(1):p16-22. doi:10.1159/000081798
19. Osugi T, Tatara T, Yada S, Tashiro C. Hydration status after overnight fasting as measured by urine osmolality does not alter the magnitude of hypotension during general anesthesia in low risk patients. *Anesth Analg.* 2011;112(6):1307-1313. doi:10.1213/ANE.0b013e3182114df4
20. Sands JM, Layton HE. The Physiology of Urinary Concentration: an Update. *Semin Nephrol.* 2009;29(3):178-195. doi:10.1016/j.semnephrol.2009.03.008
21. Torres VE, Grantham JJ, Chapman AB, et al. Potentially modifiable factors affecting the progression of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2011;6(3):640-647. doi:10.2215/CJN.03250410
22. Fox CS, Matsushita K, Woodward M, et al. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis. *Lancet Lond Engl.* 2012;380(9854):1662-1673. doi:10.1016/S0140-6736(12)61350-6
23. Schelling JR. Tubular atrophy in the pathogenesis of chronic kidney disease progression. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2016;31(5):693-706. doi:10.1007/s00467-015-3169-4
24. Venkatachalam MA, Weinberg JM, Kriz W, Bidani AK. Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2015;26(8):1765-1776. doi:10.1681/ASN.2015010006
25. Zeisberg M, Kalluri R. Physiology of the Renal Interstitium. *Clin J Am Soc Nephrol.* March 2015;CJN.00640114. doi:10.2215/CJN.00640114
26. Thomas SE, Anderson S, Gordon KL, Oyama TT, Shankland SJ, Johnson RJ. Tubulointerstitial disease in aging: evidence for underlying peritubular capillary damage, a potential role for renal ischemia. *J Am Soc Nephrol JASN.* 1998;9(2):231-242.
27. Kida Y, Tchao BN, Yamaguchi I. Peritubular capillary rarefaction: a new therapeutic target in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2014;29(3):333-342. doi:10.1007/s00467-013-2430-y
28. Vallet M, Metzger M, Haymann J-P, et al. Urinary ammonia and long-term outcomes in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2015;88(1):137-145. doi:10.1038/ki.2015.52
29. Meuwese CL, Carrero JJ. Chronic kidney disease and hypothalamic-pituitary axis dysfunction: the chicken or the egg? *Arch Med Res.* 2013;44(8):591-600. doi:10.1016/j.arcmed.2013.10.009
30. Tannen RL, Regal EM, Dunn MJ, Schrier RW. Vasopressin-resistant hyposthenuria in advanced chronic renal disease. *N Engl J Med.* 1969;280(21):1135-1141. doi:10.1056/NEJM196905222802101
31. Fine LG, Schlondorff D, Trizna W, Gilbert RM, Bricker NS. Functional profile of the isolated uremic nephron. Impaired water permeability and adenylate cyclase responsiveness of the cortical collecting tubule to vasopressin. *J Clin Invest.* 1978;61(6):1519-1527. doi:10.1172/JCI109072
32. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin Chem.* 2006;52(1):112-119. doi:10.1373/clinchem.2005.060038

33. Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, Matsushita K, van der Velde M, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet Lond Engl.* 2010;375(9731):2073-2081. doi:10.1016/S0140-6736(10)60674-5
34. Penney MD, Walters G. Are osmolality measurements clinically useful? *Ann Clin Biochem.* 1987;24 (Pt 6):566-571. doi:10.1177/000456328702400603

Tables

Table 1. Patients characteristics according to baseline urinary osmolality (mOsm/kgH₂O)

	Baseline fasting urinary osmolality				p-value
	Overall (n=1796)	Tertile1 (n=594)	Tertile2 (n=598)	Tertile3 (n=604)	
Age (years)	58.7±15.2	58.0±15.8	60.4±14.4	57.7±15.2	0.01
Male Gender	67.7 (1216)	67.7 (402)	67.7 (398)	67.8 (416)	0.99
African	12.7 (228)	12.0 (71)	11.9 (70)	14.2 (87)	0.71
BMI (kg/m ²)	26.6±5.1	26.4±5.2	26.7±5.0	26.6±5.1	0.49
Former smokers	32.5 (583)	31.0 (184)	33.8 (199)	32.6 (200)	0.81
Current smokers	14.1 (253)	15.2 (90)	13.3 (78)	13.8 (85)	
Diabetes	27.3 (490)	27.1 (161)	30.3 (178)	24.6 (151)	0.11
Hypertension	91.4 (1641)	92.6 (550)	93.0 (547)	88.6 (544)	0.01
CV history	18.2 (326)	20.2 (120)	18.7 (110)	15.6 (96)	0.24
Type of nephropathy					<0.001
Diabetic	10.1 (181)	10.9 (65)	12.2 (72)	7.2 (44)	
Glomerular	14.5 (260)	14.8 (88)	14.3 (84)	14.3 (88)	
Vascular	26.6 (477)	23.9 (142)	28.7 (169)	27.0 (166)	
Polycystic	5.8 (105)	7.4 (44)	6.1 (36)	4.1 (25)	
Tubulo-interstitial	9.2 (166)	13.6 (81)	7.8 (46)	6.4 (39)	
Others	33.8 (607)	29.3 (174)	30.8 (181)	41.0 (252)	
mGFR (ml/min/1.73m ²)	40.2 (29.1-54.5)	30.7 (22.9-43.1)	36.5 (28.6-48.0)	53.7 (42.0-68.1)	<0.001
Volemia	21.5 (19.6-23.6)	21.6 (19.6-23.5)	21.4 (19.5-23.7)	21.5 (19.7-23.6)	0.94
ACR (mg/mmol)	8.0 (1.5-47.2)	18.7 (3.5-96.9)	11.7 (1.8-57.3)	3.0 (0.8-14.2)	<0.001
Albuminuria					
Microalbuminuria	32.3 (580)	31.1 (185)	33.7 (198)	32.1 (197)	<0.001
Macroalbuminuria	30.8 (553)	43.4 (258)	33.5 (197)	16.0 (98)	
PCR (mg/mmol)	25.9 (11.6-89.3)	52.3 (17.9-165.2)	32.4 (13.3-103.9)	14.7 (8.2-34.6)	<0.001
Fasting urinary osmolality (mOsm/kgH ₂ O)	482.0 (401.5-591.0)	364.5 (310.0-400.0)	481.0 (452.0-510.5)	647.0 (587.0-723.0)	<0.001
24h urinary output (l/24h)	2.0 (1.5-2.5)	2.3 (1.8-2.9)	2.0 (1.5-2.)	1.7 (1.4-2.2)	<0.001
Fasting urinary ammonium (mmol/l)	12.5 (7.6-21.0)	7.5 (4.6-10.9)	12.9 (9.2-18.7)	23.4 (15.5-32.0)	<0.001
Protein intake (g/kg/d)	1.0 (0.9-1.2)	1.0 (0.9-1.2)	1.1 (0.9-1.2)	1.0 (0.9-1.2)	0.42
Loop diuretics	28.4 (510)	33.7 (200)	32.8 (193)	19.1 (117)	<0.001
Thiazide diuretics	20.4 (366)	17.3 (103)	22.8 (134)	21.0 (129)	0.06
ACEi or ARBs	74.3 (1335)	75.4 (448)	77.9 (458)	69.9 (429)	0.01

Data are expressed as percentages (n), means ± SD or medians (interquartile range) as appropriate.

BMI: body mass index, CV: cardiovascular, mGFR: measured glomerular filtration rate, ACR: albumin/creatinine ratio, PCR: protein/creatinine ratio, ACEi: angiotensin converting enzyme inhibitor, ARB: angiotensin receptor blocker.

Tertiles were gender-specific: T1: 109-444 mosmol/kgH₂O for men, 121-402 mOsm/kgH₂O for women, T2: 445-557 mOsm/kgH₂O for men, 403-516 mOsm/kgH₂O for women, T3: 558-1114 mOsm/kgH₂O for men, 517-1031 mOsm/kgH₂O for women.

Table 2. Crude and adjusted hazard ratios (95% confidence intervals) for end-stage renal disease according to fasting urinary osmolality.

Baseline fasting urinary osmolality							
	For a 100 mOsm/kgH ₂ O decrease	p- value	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3	p-wald test	p for trend
N event/N total	380/1796		223/594	131/588	26/614		
M0	1.67 (1.54-1.80)	<0.001	10.65 (7.09-15.99)	5.43 (3.57-8.27)	1 (ref)	<0.001	<0.001
M1	1.28 (1.15-1.41)	<0.001	3.03 (1.97-4.66)	2.15 (1.40-3.32)	1 (ref)	<0.001	<0.001
M2	1.26 (1.14-1.40)	<0.001	2.68 (1.73-4.14)	2.05 (1.33-3.17)	1 (ref)	<0.001	<0.001
M3	1.18 (1.06-1.32)	0.004	1.97 (1.26-3.08)	1.62 (1.04-2.52)	1 (ref)	0.01	0.003

M0 : crude model

M1 : adjusted on mGFR with time depending effect

M2 : M1 + age, sex, center, ethnicity, obesity

M3: M2 + ACR in class (<3, 3-30, >30 mg/mmol), high blood pressure, diabetes, CV history, smoking status, ACEi or ARBs, nephropathy type and natremia

Tertiles were gender-specific: T1: 109-444 mOsm/kgH₂O for men, 121-402 mOsm/kgH₂O for women, T2: 445-557 mOsm/kgH₂O for men, 403-516 mOsm/kgH₂O for women, T3: 558-1114 mOsm/kgH₂O for men, 517-1031 mOsm/kgH₂O for women.

Table 3. Linear mixed model analysis of the mean effect of fasting urinary osmolality at baseline on change over time of mGFR decline (in % per year)

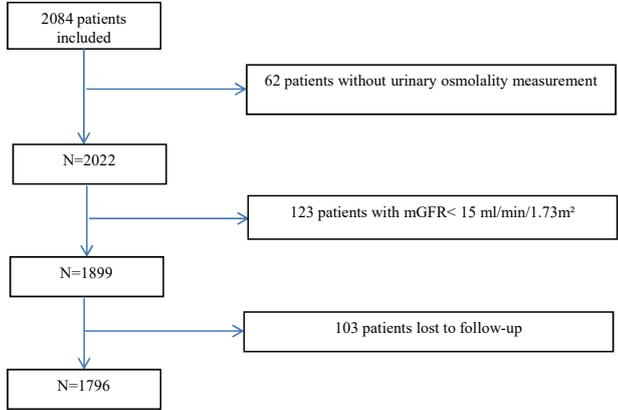
	Baseline fasting urinary osmolality						
	Each 100 mOsm/kgH ₂ O decrease	p-value	Tertile 1	p-value	Tertile 2	p-value	Tertile 3
M1 (beta ±SD)	-1.4 ± 0.2	<0.001	-4.9 ± 0.9	<0.001	-2.1 ± 0.6	<0.001	0 (ref)
M2 (beta ±SD)	-1.0 ± 0.2	<0.001	-4.9 ± 0.9	<0.001	-2.1 ± 0.6	<0.001	0 (ref)

M1: model adjusted for mean effect on intercept and GFR slope and 24h estimated urinary osmolality at baseline
M2: M1 adjusted for mean effect on proteinuria (log) slope and mean effect on GFR at baseline of the following covariates: age, sexe, center, ethnicity, diabetes, elevated blood pressure, BMI, cardiovascular history, smoking, and proteinuria (log). Interaction terms between covariates and time, except proteinuria (log) were non-significant in the final model including urinary osmolality and were not included in the final model.

Tertiles were gender-specific: T1: 109-444 mOsm/kgH₂O for men, 121-402 mOsm/kgH₂O for women, T2: 445-557 mOsm/kgH₂O for men, 403-516 mOsm/kgH₂O for women, T3: 558-1114 mOsm/kgH₂O for men, 517-1031 mOsm/kgH₂O for women

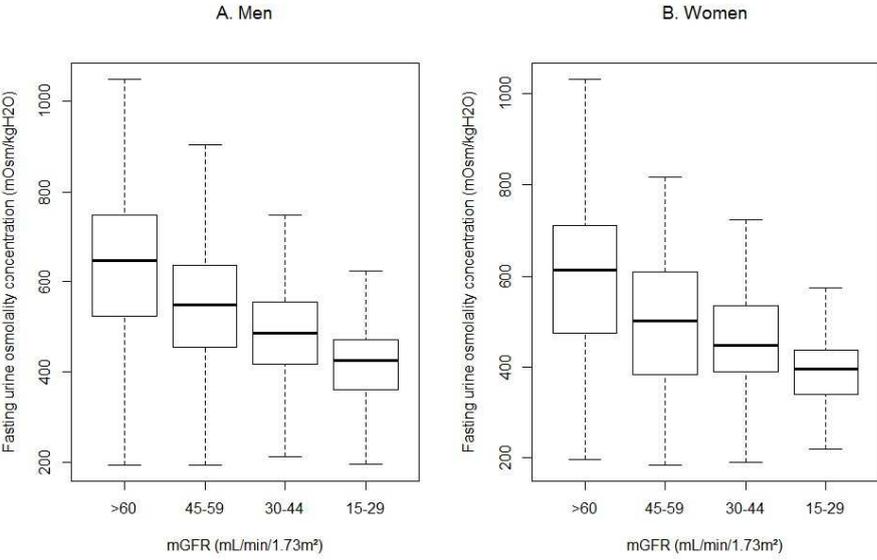
Figures

Figure 1. Study Flowchart.



mGFR: measured glomerular filtration rate.

Figure 2. Fasting Uosm according to CKD stages in men and women.



mGFR: measured glomerular filtration rate.

Support funding

The NephroTest cohort study was supported by grants from Inserm GIS-IreSPAO 8113LS TGIR; French Ministry of Health AOM 09114 and AOM 10245; InsermAO8022LS; Agence de la Biomédecine R08156LL; AURA, and Roche 2009 – 152-447G.

Disclosures

The authors declare that they have no competing interests.

Contributions of authors

MF, PH, JPH, FV, ET, JJB, and BS designed the NephroTest cohort and MF, PH, JPH collected data. MM, SW, NT and JPH designed the study analyses which were performed by MM and SW. NT, SW, MM and JPH drafted the manuscript. MM, SW, NT, JPH and BS contributed to the interpretation of the study results and revised the manuscript. All authors approved the manuscript.

Deuxième Partie

L'atteinte microvasculaire rénale et ses conséquences sur l'hémodynamique rénale

Les résultats de l'étude suivante soulignent l'importance des capillaires péri-tubulaires d'une part dans l'hémodynamique rénale, d'autre part dans l'apparition des lésions tubulaires. Bien que l'objectif initial de l'étude était d'évaluer l'impact de l'hème dans un modèle expérimental d'hypertension artérielle, elle fournit finalement des résultats intéressants quant au rôle des capillaires péri-tubulaires dans la toxicité rénale de l'hème.

Cette étude a été publiée dans la revue *Scientific Reports* (Nature Publishing Group).

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Plasma heme-induced renal toxicity is related to a capillary rarefaction

Nahid Tabibzadeh^{1,2,3,*}, Céline Estournet^{1,2,3,*}, Sandrine Placier³, Joëlle Perez², Héloïse Bilbault^{3,4}, Alexis Girshovich^{1,3}, Sophie Vandermeersch³, Chantal Jouanneau³, Emmanuel Letavernier^{1,2,3}, Nadjib Hammoudi^{1,5}, François Lionnet⁶ & Jean-Philippe Haymann^{1,2,3}

Received: 05 September 2016

Accepted: 02 December 2016

Published: 10 January 2017

Severe hypertension can lead to malignant hypertension (MH) with renal thrombotic microangiopathy and hemolysis. The role of plasma heme release in this setting is unknown. We aimed at evaluating the effect of a mild plasma heme increase by hemin administration in angiotensin II (AngII)-mediated hypertensive rats. Prevalence of MH and blood pressure values were similar in AngII and AngII + hemin groups. MH rats displayed a decreased renal blood flow (RBF), increased renal vascular resistances (RVR), and increased aorta and interlobar arteries remodeling with a severe renal microcirculation assessed by peritubular capillaries (PTC) rarefaction. Hemin-treated rats with or without AngII displayed also a decreased RBF and increased RVR explained only by PTC rarefaction. In AngII rats, RBF was similar to controls (with increased RVR). PTC density appeared strongly correlated to tubular damage score ($\rho = -0.65$, $p < 0.0001$) and also renal Heme Oxygenase-1 (HO-1) mRNA ($\rho = -0.67$, $p < 0.0001$). HO-1 was expressed in PTC and renal tubules in MH rats, but only in PTC in other groups. In conclusion, though increased plasma heme does not play a role in triggering or aggravating MH, heme release appears as a relevant toxic mediator leading to renal impairment, primarily through PTC endothelial dysfunction rather than direct tubular toxicity.

Heme is an essential component of several proteins in the organism including hemoglobin, mitochondrial cytochromes and NO synthase. Whereas a low heme synthesis is responsible for porphyria¹, heme intracellular accumulation is likely to be also deleterious through induction of intracellular oxidative stress as encountered in some ischemic and toxic conditions^{2,3}. Of notice, circulating heme (free or bound to hemopexin) may also lead to endothelial and renal tubular toxicity⁴⁻⁸. During hemolysis, substantial amounts of heme are indeed released by red blood cells, and form a heme-hemopexin complex which binds to its receptor CD91 on endothelial or renal tubular cell surface, leading to subsequent endocytosis, intracellular accumulation of heme and iron store leading ultimately to ROS generation⁹. Indeed, heme toxicity is considered to be responsible for sickle cell anemia nephropathy (SCAN) through renal microcirculation impairment¹⁰⁻¹² and cases of acute renal failure following administration of hematin for acute intermittent porphyrias were reported^{13,14}. Heme metabolism thus appears as a critical step to ensure cytoprotection. Heme-oxygenase 1 (HO-1) is an inducible enzyme which catabolizes heme, through an enzymatic reaction which produces biliverdin (subsequently converted to bilirubin), carbon monoxide and iron¹⁵. The ability to induce HO-1 within renal tissue appears a critical event for nephroprotection^{16,17} especially in the setting of vascular injuries¹⁸ or heme overload as illustrated by mice lacking HO-1 who develop more severe lesions after ischemia/reperfusion¹⁹. Accordingly, multi-organ failure including renal failure, and severe endothelial lesions were reported in a child with an inactivating mutation of HO-1²⁰. We thus speculated that in severe hypertensive subjects related to activation of the renin-angiotensin-aldosterone system, the onset of a mild hemolysis would be a critical event leading to an imbalance between heme overload and HO-1 induction and thus would trigger malignant hypertension.

¹Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, Paris, France. ²Service d'Explorations Fonctionnelles Hôpital Tenon, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France. ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR-S 1155, Paris, France. ⁴Ecole Vétérinaire de Maisons Alfort, France. ⁵Institut de Cardiologie, Pitié-Salpêtrière Hospital (AP-HP), Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), ACTION Study Group, INSERM UMRs 1166, Paris, France. ⁶Centre de la drépanocytose, service de médecine interne, Paris, France. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.T. (email: nathalie.tabibzadeh@aphp.fr)

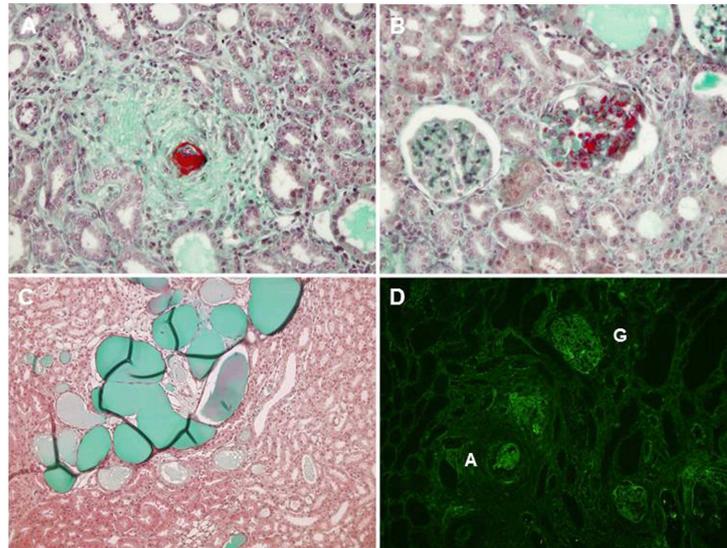


Figure 1. Renal histology of MH rats at day 28. Fibrinoid necrosis, hyperplastic arteriosclerosis and onion-skin thickening of the arteriolar wall (A). Arteriolar (A) and glomerular capillary (B) thrombosis. Acute tubular necrosis (C). Fibrin deposits (immunofluorescent staining) (D). A: arteriole, G: glomerulus.

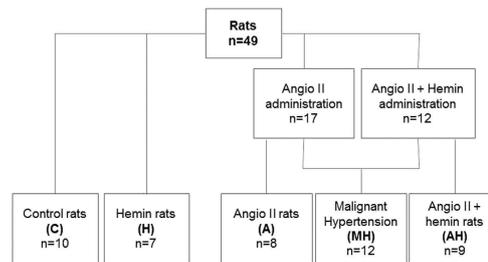


Figure 2. Experimental flow chart. C: control group, H: hemin group, A: angiotensin II group, AH: angiotensin II + hemin group, MH: malignant hypertension group. Angiotensin II infusion by a minipump (or vehicle) (400 ng/kg/min) was performed for 28 days. Hemin (or vehicle) was given (ip) from day 14 to day 28 (50 mg/kg), thrice a week.

Our results ruled out our working hypothesis but showed surprisingly that a mild rise of plasma heme for two weeks impaired renal blood flow through renal capillary rarefaction with no significant influence of angiotensin II mediated hypertension within this time frame.

Results

Among the 29 rats receiving angiotensin II, 45% developed malignant hypertension (MH) assessed by histological hallmark features, illustrated Fig. 1, such as proliferating endarteritis with arteriolar thrombosis, fibrinoid necrosis in vessel walls and/or glomerular capillary vessels (assessed by fibrin deposits). Indeed, necrosis was present in 53.7% \pm 5.7 of vessels and 63.2% \pm 3.8 of glomeruli in MH group samples with no necrosis detected in the other groups. In rats receiving angiotensin II alone, 53% (n = 9) developed MH, whereas MH occurred in 25% of rats receiving angiotensin II and Heme (NS). Thus, angiotensin II treated animals with no MH were classified as group Ang II (A) or Ang II + heme (AH) accordingly (flow chart see Fig. 2). Under Ang II treatment, systolic blood pressure increased as soon as day 7 and further increased up to day 28, with no significant difference in hemin treated group (Fig. 3). Moreover whereas blood pressure values were similar in control and group H, animals from group H experienced an average loss of 14% of body weight compared to controls after

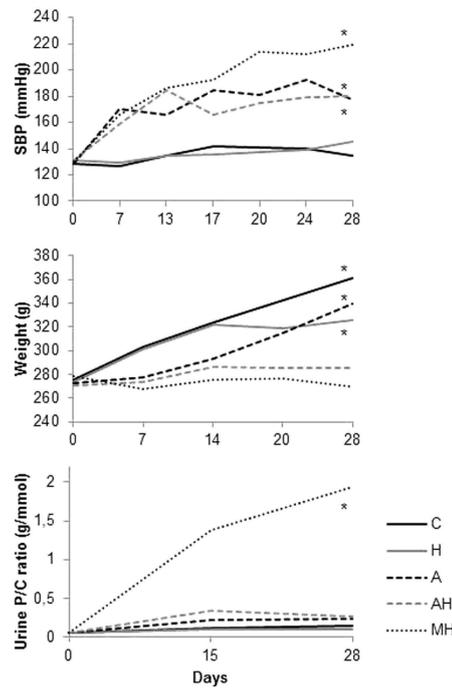


Figure 3. Blood pressure, weight and proteinuria during the study. SBP: systolic blood pressure, P/C: proteinuria/creatinuria ratio, C: controls, H: hemin group, A: angiotensin II group, AH: angiotensin II + hemin group, MH: malignant hypertension group. Asterisks indicate a p value < 0.05 compared to control rats.

Groups	C	H	A	AH	MH
Ht, (%)	54.9 [53.9–57.1]	55.7 [54.6–56.3]	56.8 [55.1–57.2]	58.7 [56.4–63.4]	48.6 [47.8–50.9]*
Plasma heme, (μmol/l)	18.4 [15.6–21.4]	30.4 [26.5–44.6]*	25.5 [24.8–36.2]*	45.1 [30.6–66.9]*	35.9 [27.6–48.9]*
Bilirubin (μmol/l)	1.7 [1.7–1.8]	1.8 [1.8–1.8]	1.8 [1.7–1.9]	2.3 [2.1–2.5]*	2 [1.9–2.8]*
LDH (IU/l)	779 [620–1953]	3844 [3711–4039]	1590 [934–2695]	968 [632–1353]	2042 [1344–2940]

Table 1. Biological data at day 28. Hematocrit, plasma heme, bilirubin, and LDH levels. Values expressed in Mean [SEM]. C: controls, H: hemin rats, A: angiotensin II rats, AH: angiotensin II and hemin rats, MH: malignant hypertension. Values with an asterisk indicate a p value < 0.05 compared to control rats. No significant difference was found between MH rats and groups A or AH.

initiation of hemin (between day 14 and 28) ($p < 0.01$). Similarly, AH and MH groups experienced an average 15% loss compared to A group ($p < 0.01$ and 0.01 respectively). Proteinuria assessed by urinary protein/creatinine ratio increased at day 15 and 28 in MH group only, with no significant difference between the two time points. At day 28, plasma heme was increased in rats receiving heme (H and AH rats, $p = 0.002$), with a mild increase detected in group A (Table 1). Moreover, MH rats had a higher plasma heme and bilirubin concentration than control group ($p = 0.03$ and 0.004) and also a decreased haematocrit ($p = 0.03$).

As expected MH group experienced a decreased RBF and increased RVR with an aorta remodelling (assessed by an increased intima/media ratio), an increased lumen of interlobar arteries but a decreased lumen of periglomerular arteries altogether with a rarefaction of peritubular capillaries assessed by RECA-1 staining (Figs 4 and 5a,b). Of notice, RBF was also decreased and RVR increased in hemin treated animals (i.e. H and AH rats) with no modification of vessel lumens except for peritubular capillaries which density appears dramatically reduced (especially in AH group). In group A, RBF value was not decreased compared to control group, despite an RVR increase, a decrease of periglomerular arteries lumen and a modest but significant peritubular capillaries rarefaction.

As shown Fig. 5c, peritubular capillaries rarefaction assessed by a renal RECA1 expression decrease was inversely correlated to tubular damage score. Tubular scoring and renal HO1 mRNA levels were higher in MH

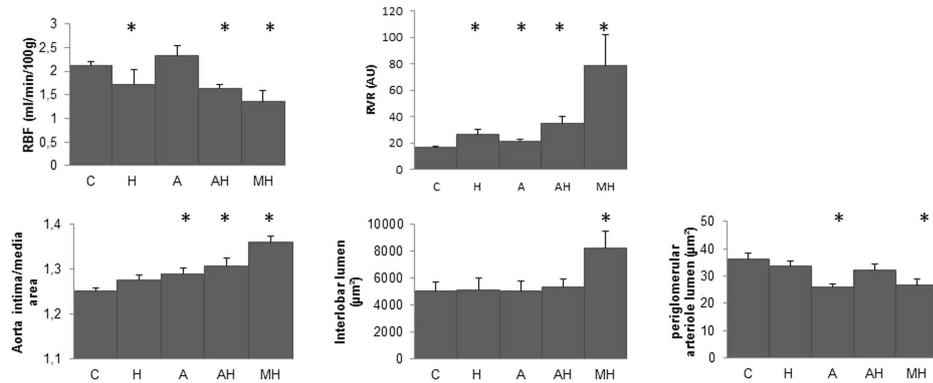


Figure 4. Renal hemodynamic and vessels morphometry evaluation at day 28. Values expressed in Mean [SEM]. RBF: renal blood flow, RVR: renal vascular resistance (AU: arbitrary units), C: controls, H: hemin rats, A: angiotensin II rats, AH: angiotensin II and hemin rats, MH: malignant hypertension. The asterisk indicates a p value < 0.05 compared to control rats.

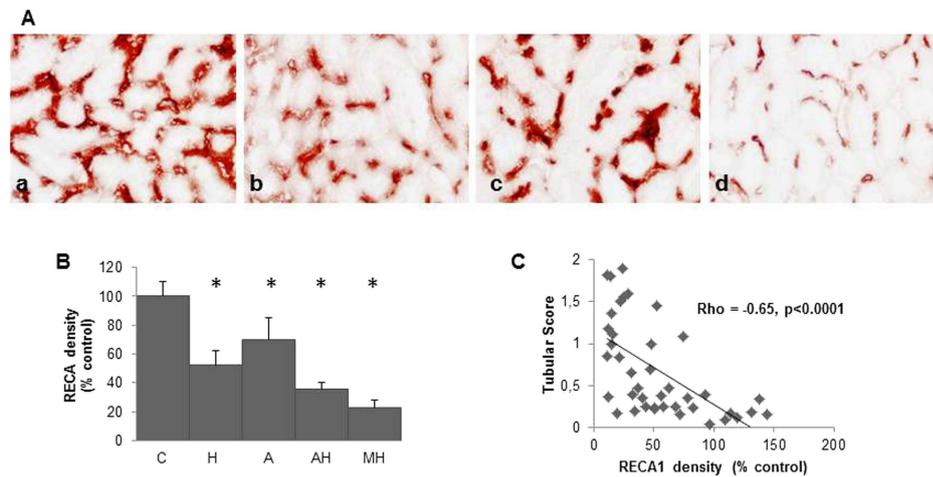


Figure 5. Peritubular capillary density evaluation at day 28. (A) RECA1 staining in kidneys of control rats (a), hemin rats (b), angiotensin II rats (c) and angiotensin II + hemin rats (d). Magnification X 600. (B) Quantification of RECA1 staining according to the different groups (data are expressed as % of controls). Values expressed in Mean [SEM]. The asterisk indicates a p value < 0.05 compared to control group. (C) Correlation between tubular damage score and capillary density assessed by RECA1 density in all rats.

group but they were also surprisingly high in all treated groups including H group (Fig. 6a and b). Accordingly, renal HO1 mRNA expression was strongly associated with tubular scoring ($\rho = 0.69$, $p < 0.0001$) (Fig. 6c) and RECA1 staining level ($\rho = -0.67$, $p < 0.0001$) (Fig. 6e). As shown Fig. 7, HO-1 staining was indeed upregulated within peritubular capillaries in H, AH (not shown) and MH groups whereas RECA1 staining was decreased respectively (Fig. 5). Of notice, a high HO-1 staining within numerous tubules was only detected in MH group (Fig. 7c and d). Western blot analysis performed on whole kidney extracts (Fig. 7e and f) demonstrated a significant increase of HO1 protein expression in MH group ($p < 0.001$) but also in H and AH groups ($p < 0.02$ and $p = 0.002$ respectively).

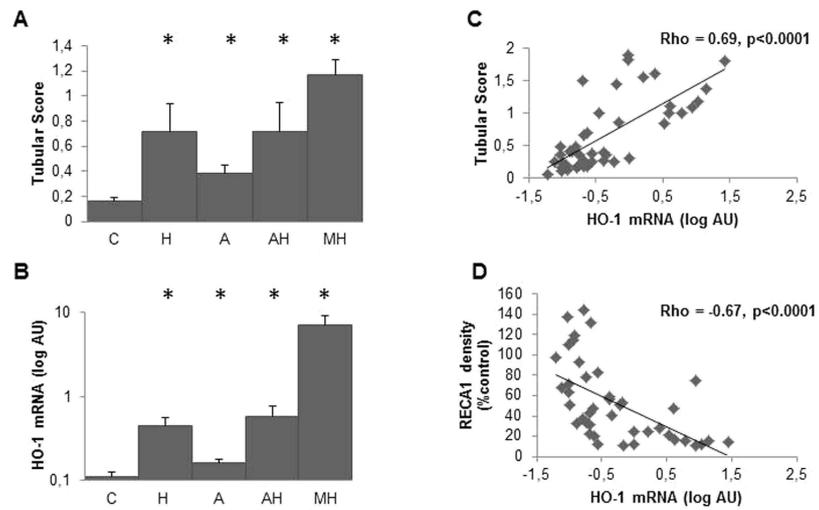


Figure 6. Tubular damage and renal HO-1 expression at day 28. (A) Comparison of tubular score between the different groups (C: controls, H: hemin rats, A: angiotensin II rats, AH: angiotensin II and hemin rats, MH: malignant hypertension). Values expressed in Mean [SEM]. (B) Comparison of renal HO-1 mRNA expression between the different groups. The asterisk indicates a p value < 0.05 compared to control rats. Correlation between renal HO-1 mRNA expression (C) tubular score and (D) RECA1 staining (density is expressed as % of controls).

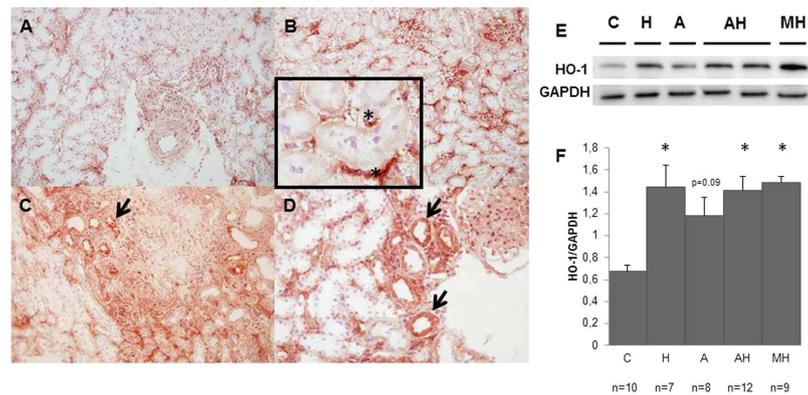


Figure 7. HO-1 expression in kidneys at day 28. Left panel, Representative renal HO-1 staining in a control rat (A), hemin rat (B), and a rat with malignant hypertension (C,D). A,B and C: magnification X 200, (D): magnification X 400. HO-1 protein expression is upregulated in hemin-treated rats capillaries, and in tubules and capillaries of rats with malignant hypertension. *Indicates HO-1 staining within peritubular capillary, arrow indicates HO-1 tubular staining. Right panel, representative western blot of HO-1 protein (E) with mean quantification \pm SEM (HO-1/GAPDH ratio) on whole kidney extracts of all animals included in the study (F). The asterisk indicates a p value < 0.05 compared to control rats.

Discussion

Our results show that hemin administration worsens angiotensin II mediated vascular nephropathy as assessed by renal hemodynamic and histologic studies. Of notice, renal microvascular impairment and tubular damage were detected even in the absence of angiotensin II and hypertension and plasma heme concentrations in

treated rats were in the same order of magnitude as values measured in some patients with chronic hemolysis such as sickle cell disease (personal data). Indeed, whereas high doses of heme were responsible of heme casts within tubules and animal death due to acute renal failure (data not shown), the issue whether a mild plasma heme increase in the setting of severe hypertension could trigger MH was unknown. Conversely to our working hypothesis, onset of MH was independent of heme administration among angiotensin II treated animals with an overall occurrence in 45% of cases. Indeed, urine protein/creatinine ratio was significantly higher at day 14 in MH group compared to other groups (Fig. 3), i.e. at an early time point, before randomization (when heme was not already initiated), thus suggesting that a genetic background heterogeneity, salt intake and angiotensin II doses (uncontrolled differences in AII administration flow through osmotic pumps) are more likely relevant factors triggering MH. On the other hand, a potential preventive effect of heme also seems unlikely given the detected detrimental effect of heme administration on vascular and tubular lesions. Moreover, no high protein/creatinine ratio detected at day 14 decreased at day 28 in any AII + heme animals thus reasonably ruling out a potential beneficial effect of increased plasma heme on glomerular lesions (at least within this concentration range). MH phenotype assessed by histological features at day 28 exhibited a dramatic renal blood flow decrease altogether with expected systemic features such as elevated plasma bilirubin and decreased hematocrit values. Vascular remodeling features were associating interlobar dilation, presumably suggestive of an increased pulse pressure responsible for downstream endothelium damage, including noteworthy glomerular and peritubular capillaries rarefaction assessed by endothelial RECA staining.

Analysis of angiotensin II treated animals with no MH, showed the presence of a high blood pressure with a preserved RBF as expected, despite a RVR increase suggesting effective autoregulatory processes at play. Indeed, aorta remodeling was detected in all the angiotensin II treated rats, in accordance with literature^{21,22}. Moreover, an expected angiotensin II induced small renal arteries vasoconstriction would explain a controlled downstream blood pressure allowing vessels protection (i.e. glomerular and peritubular capillaries) with a preserved RBF²³. However, some renal histological lesions and peritubular capillaries rarefaction were detected compared to controls suggesting that a mild endothelial dysfunction was nevertheless occurring.

Conversely, in the AH group with no MH, renal autoregulatory mechanisms appear impaired as RBF and peritubular capillaries were markedly decreased, with significant tubular damage. Noteworthy, AH rats did not display blood pressure or proteinuria changes compared to AII rats at variance with previous studies showing a vasodilator effect of heme (presumably related to carbon monoxide induction)^{24,25}. Blood pressure values were also similar between rats treated by heme alone (group H) and controls.

Surprisingly, rats receiving heme alone also displayed a decreased RBF and increased RVR suggesting marked renal damages. Morphometric analyses of renal vessels were thus performed in order to explain these features in heme rats and ruled out large, medium or small artery morphometric changes, but pointed out a significant peritubular capillary rarefaction assessed by RECA-1 staining. Thus, heme administration alone seems to induce a microangiopathy severe enough to decrease RBF and damage significantly tubules. In agreement with this view, a strong negative correlation was detected between endothelial RECA1 staining and tubular damage score. As a matter of fact, direct endothelial toxicity of heme is consistent with previous reports^{2,4,6,26} and direct toxicity of heme on tubules was ruled out by Perls staining (except in MH group, data not shown). Furthermore, renal HO-1 mRNA upregulation was strongly correlated with the degree of severity of tubular damage in all treated rats (including heme groups) though HO-1 protein expression was mostly expressed in peritubular capillaries further strengthening the view that capillaries are the main targets and that vessels rarefaction accounts indeed for RBF decrease. Thus, surprisingly, renal HO-1 quantification appears as a relevant and accurate marker of renal injuries (i.e. vascular and tubular) whereas HO-1 renal expression is supposed to counterbalance oxidative stress to ensure cellular protection and/or adapt heme overload²⁷. Accordingly, the presence of a strong HO-1 tubular staining detected only in HM rats appears as a hallmark of a genuine tubular necrosis.

To conclude, plasma heme increase does not trigger angiotensin II malignant hypertension or blood pressure control but damages renal peritubular capillaries leading to increased tubular lesions even in animals not receiving angiotensin II. Thus, our data favor the view that a sustained moderate increased plasma heme similar to the values encountered in chronic hemolysis such as sickle cell disease, but also possibly in some chronic kidney disease patients, induces (or worsens) a microvascular nephropathy. In this setting, occurrence of vascular lesions on larger vessels probably depends both on the magnitude of a sustained renin angiotensin system stimulation and on the duration of free plasma heme exposure.

Material and Methods

Animals. All procedures were performed in accordance with the French animal care legislation (January 2001), and were approved by the INSERM and Sorbonne University ethic committee. Wild-type male Sprague-Dawley rats (mean weight of 250 g, Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, USA) were fed a normal rat diet with free access to water.

Experimental protocol. Rats were initially randomly allocated into 2 groups: (1) control rats (n = 17), (2) Angiotensin II (Ang II) (n = 29) treated rats. Ang II (400 ng/kg/min) or vehicle was continuously infused into rats aged 8 weeks subcutaneously via an osmotic minipump (Alzet model, Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) for 28 days. In the group receiving angiotensin II, NaCl was added to drinking water (at a 6 g/l concentration). Animals were randomized at day 14 to receive either heme or control. Rats were anesthetized with isoflurane for intraperitoneal injections of heme (50 mg/kg, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) or control (Phosphate Buffer Saline) from day 14 to day 28, thrice a week.

Hemodynamic Measurements. Systolic BP (SBP) was measured indirectly by the tail-cuff method (CODA System, Kent Scientific, Torrington, CT, USA) twice a week during the 28 days of protocol. At day 28, rats were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital (100 µl/100 g), and placed on thermostatically controlled heated surgical table to maintain rectal temperature at 37 °C. The femoral artery was cannulated to allow continuous monitoring of systemic arterial blood pressure and heart rate. The femoral vein was cannulated to allow infusion of solutions. The left kidney was exposed from a laparotomy incision. The renal artery was separated carefully from the renal vein which enabled placement of a flow probe connected with a Transonic flowmeter (Transonic System Inc., Ithaca, NY, USA) for measurement of the total renal blood flow (RBF) and renal vascular resistances (RVR).

Sample processing. Plasma samples from the above experiments were taken at the moment of sacrifice and were assayed for hematocrit, urea, serum creatinine, lactate dehydrogenase (LDH) and plasma bilirubin by a KONELAB automate (Thermo Scientific, Waltham, MA). Individual rats were housed in metabolic cages and urine was collected over a 4-hour period. This process was repeated four times for each individual (once a week). Urinary protein concentration was normalized to urinary creatinine concentration, and values were expressed as g/mmol creatinuria.

Morphologic Analysis. Kidneys and aorta were rapidly excised after sacrifice. Aorta sections were rapidly frozen after excision and conserved at –80 °C. Sections 5 µm thick that included the entire circumference were cut from five different blocks of each animal. Kidneys were partly fixed in AFA solution (alcohol-formalin-acetic acid), dehydrated, embedded in paraffin, and further processed for Masson trichrome staining (5 µm sections), and partly frozen with RNA later solution (Qiagen) for subsequent analyses.

Morphometric analyses. Digital measurements were blindly performed using the Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA). Aortic remodeling was assessed by the averaged measure of intima/media ratio on five sections for each rat. Interlobar arteries and periglomerular arteries of ten representative fields (magnification X 400) were analyzed for each rat (longitudinal renal cutting)²⁸. Wall thickness and vascular lumen were measured for each structure. Necrosis was measured in glomeruli and in small vessels of ten representative fields for each rat (magnification X 400)²⁹.

Tubular Score. Tubular injury was scored by estimating the percentage of tubules that showed tubular dilatation, epithelial necrosis, luminal casts, loss of brush border or naked basement membrane as follows: 0, none; 1, <50%; 2, >50%. The mean tubular damage score was established blindly for each rat on ten representative fields (magnification X 200) of two renal cortical sections.

Immunofluorescent assay and immunohistochemistry. Snap-frozen kidney samples were processed for direct immunofluorescence microscopy using FITC-labeled antibody specific for fibrin or incubated with anti-RECA1 (ab22492 Abcam, Cambridge, UK) and heme-oxygenase type 1 (HO-1) (ab68477, Abcam, Cambridge, UK) then with appropriate secondary peroxidase labeled antibodies and revealed with AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, DakoCytomation, Santa Clara, CA, USA).

RT-PCR. The renal cortical samples were extracted for total RNA, which were assayed for (HO-1) mRNA by reverse transcription PCR (RT-PCR), the results being normalized to HPRT mRNA.

Western Blot. Proteins were extracted from renal cortex or isolated glomeruli using RIPA lysis buffer supplemented with sodium orthovanadate, PMSE, a protease inhibitor cocktail (Tebu Bio, Le Perray en Yvelines, France), and 10 mM sodium fluoride. After a centrifugation at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C, protein concentrations were determined from the supernatant using the Bradford assay. Aliquots of 10 µg of protein were run on NuPAGE 4/12% electrophoresis gels (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), then transferred onto a PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). Immunoblotting was performed using rabbit specific primary antibodies anti-HO1 (Abcam, Cambridge, UK), and rabbit anti-GAPDH (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for loading control. Then, the membrane was incubated with horseradish peroxidase-linked donkey secondary antibody (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). The revelation was performed with the ECL plus kit (GE Healthcare). Densitometric analysis on ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) was then performed for quantification.

Statistical Analysis. All data are presented as percentages or mean ± SEM values. Categorical variables were compared by the Fisher's exact test when appropriate. As some parameters were not normally distributed, non-parametric Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests as appropriate were used to test differences between groups. Non parametric Spearman tests were used to test associations between variables of interest. The significance level of a statistical hypothesis test was set at 0.05. All statistical analyses were performed using StatView software 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

References

- Anderson, K. E. *et al.* Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias. *Ann. Intern. Med.* **142**, 439–450 (2005).
- Higdon, A. N. *et al.* Hemin causes mitochondrial dysfunction in endothelial cells through promoting lipid peroxidation: the protective role of autophagy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **302**, H1394–1409 (2012).
- Jeney, V. *et al.* Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* **100**, 879–887 (2002).
- Gonzalez-Michaca, L., Farrugia, G., Croatt, A. J., Alam, J. & Nath, K. A. Heme: a determinant of life and death in renal tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **286**, F370–377 (2004).

5. Balla, J. *et al.* Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9285–9289 (1993).
6. Balla, J. *et al.* Haem, haem oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **18** Suppl 5, v8–12 (2003).
7. Belcher, J. D. *et al.* Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood* **123**, 377–390 (2014).
8. Camus, S. M. *et al.* Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. *Blood* **125**, 3805–3814 (2015).
9. Latunde-Dada, G. O., Simpson, R. J. & McKie, A. T. Recent advances in mammalian haem transport. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 182–188 (2006).
10. Nath, K. A. & Hebbel, R. P. Sickle cell disease: renal manifestations and mechanisms. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**, 161–171 (2015).
11. Nath, K. A. & Katusic, Z. S. Vasculature and kidney complications in sickle cell disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **23**, 781–784 (2012).
12. Csongradi, E., Juncos, L. A., Drummond, H. A., Vera, T. & Stec, D. E. Role of carbon monoxide in kidney function: is a little carbon monoxide good for the kidney? *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 819–826 (2012).
13. Frei, P. *et al.* Liver Transplantation because of Acute Liver Failure due to Heme Arginate Overdose in a Patient with Acute Intermittent Porphyrinuria. *Case Rep. Gastroenterol.* **6**, 190–196 (2012).
14. Dhar, G. J., Bossenmaier, I., Cardinal, R., Petryka, Z. J. & Watson, C. J. Transitory renal failure following rapid administration of a relatively large amount of hematin in a patient with acute intermittent porphyria in clinical remission. *Acta Med. Scand.* **203**, 437–443 (1978).
15. Ryter, S. W., Otterbein, L. E., Morse, D. & Choi, A. M. K. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol. Cell. Biochem.* **234–235**, 249–263 (2002).
16. Zager, R. A., Johnson, A. C. M. & Becker, K. Plasma and urinary heme oxygenase-1 in AKI. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **23**, 1048–1057 (2012).
17. Botros, F. T., Dobrowski, L. & Navar, L. G. Renal heme oxygenase-1 induction with hemin augments renal hemodynamics, renal autoregulation, and excretory function. *Int. J. Hypertens.* **2012**, 189512 (2012).
18. Wang, R., Shamloul, R., Wang, X., Meng, Q. & Wu, L. Sustained normalization of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats by implanted hemin pump. *Hypertension* **48**, 685–692 (2006).
19. Tracz, M. J. *et al.* Deficiency of heme oxygenase-1 impairs renal hemodynamics and exaggerates systemic inflammatory responses to renal ischemia. *Kidney Int.* **72**, 1073–1080 (2007).
20. Yachie, A. *et al.* Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J. Clin. Invest.* **103**, 129–135 (1999).
21. Griffin, S. A. *et al.* Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* **17**, 626–635 (1991).
22. Dzau, V. J., Gibbons, G. H. & Pratt, R. E. Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia. *Hypertension* **18**, II100–105 (1991).
23. Arendshorst, W. J., Brännström, K. & Ruan, X. Actions of angiotensin II on the renal microvasculature. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **10** Suppl 11, S149–161 (1999).
24. Jadhav, A., Torlakovic, E. & Ndisang, J. F. Hemin therapy attenuates kidney injury in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **296**, F521–534 (2009).
25. Shamloul, R. & Wang, R. Monitoring circulatory heme level in hemin therapy for lowering blood pressure in rats. *Cell. Mol. Biol. Noisy-Gd. Fr.* **51**, 507–512 (2005).
26. Vinchi, F. *et al.* Hemopexin therapy improves cardiovascular function by preventing heme-induced endothelial toxicity in mouse models of hemolytic diseases. *Circulation* **127**, 1317–1329 (2013).
27. Nath, K. A. *et al.* Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int.* **59**, 106–117 (2001).
28. Vinsonneau, C. *et al.* Intrarenal urothelium proliferation: an unexpected early event following ischemic injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **299**, F479–486 (2010).
29. Kerroch, M. *et al.* Genetic inhibition of discoidin domain receptor 1 protects mice against crescentic glomerulonephritis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **26**, 4079–4091 (2012).

Acknowledgements

We are very grateful to the staff of UMRS 1155 and laboratoire d'Explorations Fonctionnelles Multidisciplinaires (Hôpital Tenon) for their kind help. HB was a recipient of a grant of Fondation pour la recherche Médicale (FRM) DEA20140630461.

Author Contributions

N.T., C.E., S.P., J.P., H.B., A.G., S.V., C.J., E.L., N.H., F.L. and J.P.H. performed the experiments. N.T., C.E. and J.P.H. collected and analysed data and wrote the manuscript. J.P.H. designed the study. N.T. and C.E. prepared all the figures and the table. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Tabibzadeh, N. *et al.* Plasma heme-induced renal toxicity is related to a capillary rarefaction. *Sci. Rep.* **7**, 40156; doi: 10.1038/srep40156 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

Troisième Partie

L'urothélium intrarénal comme acteur dans les fonctions du rein profond

Cette dernière partie concerne la structure du rein profond la moins étudiée, l'urothélium intrarénal. Comme décrit dans l'introduction, elle mérite cependant de s'y intéresser bien que son étude soit délicate par sa faible accessibilité et sa surface limitée.

Les données suivantes présentent d'abord la mise au point du modèle expérimental de l'ablation conditionnelle de l'urothélium. Ensuite, les résultats préliminaires introduisent les rôles potentiels de l'urothélium en physiologie, notamment son rôle dans la fonction de concentration des urines.

Matériels et Méthodes

1. Mise au point du modèle murin transgénique

1.1 Souris

Les souris transgéniques sont issues du croisement de deux lignées existantes commercialisées par Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) et utilisant le système Cre-recombinase et loxP : les souris C57Bl/6-ROSA26STOP*DTR avec les souris C57Bl/6-UpK3a-Cre.

Chez les souris C57Bl/6-UpK3a-Cre, le gène de la Cre et les séquences mutantes des domaines de liaisons des protéines sont exprimées sous le contrôle de l'uroplakine de type 3a, spécifiquement exprimée dans les cellules urothéliales jusqu'au cul-de-sac papillaire. Toutes ces cellules expriment donc la protéine de fusion Cre-ERT2 (ER, estrogen receptor, récepteurs aux œstrogènes muté sensible uniquement au tamoxifène et non aux œstrogènes) inactive à l'état basal. Celle-ci est activée par liaison du tamoxifène permettant un changement de conformation de la protéine et ainsi sa translocation au sein du noyau (111).

Les souris C57Bl/6-ROSA26STOP*DTR comportent le gène simien du récepteur de la toxine diphtérique immédiatement après un codon STOP « floxé » *i.e.* entourée de séquences loxP. En l'absence de Cre recombinase, le récepteur de la toxine diphtérique n'est pas exprimé puisqu'un codon stop le précède. En revanche, en présence de Cre recombinase, les séquences floxées sont excisées par la Cre, le codon stop disparaît, permettant l'expression du récepteur de la toxine diphtérique (figure 12).

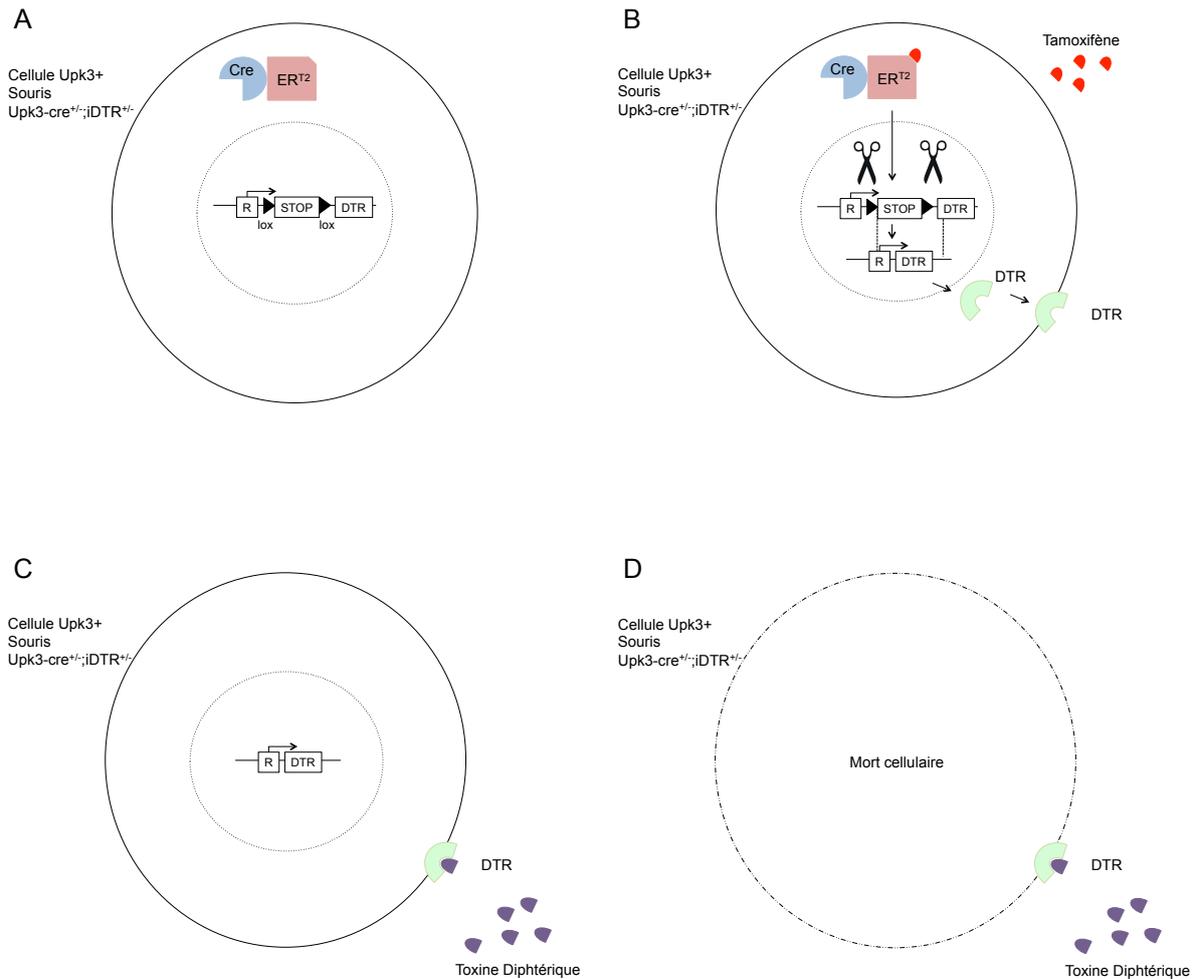


Figure 12. Mécanisme d’ablation conditionnelle des cellules exprimant l’uroplakine de type III. Upk3 : uroplakine de type III, DTR : récepteur de la toxine diphtérique.

Le croisement de ces deux lignées de souris permet d’obtenir des souris doubles transgéniques (figure 13). Après activation spécifique de tissu (cellules urothéliales) de la Cre par le tamoxifène, la Cre recombinase excisera le codon stop permettant l’expression au sein des cellules urothéliales du récepteur de la toxine diphtérique. Ces cellules deviennent alors sensibles à la toxine diphtérique (112,113).

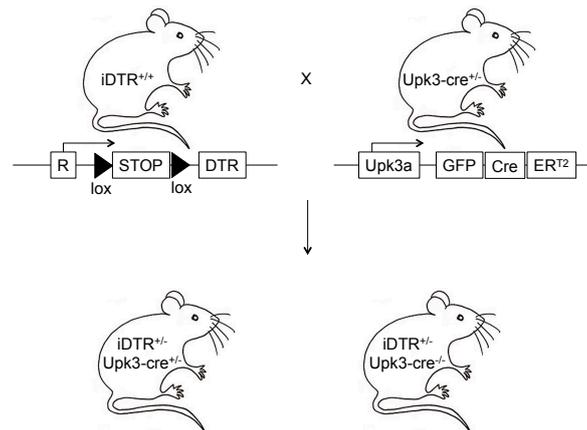


Figure 13. Croisement des souris C57Bl/6-ROSA26STOP*DTR et des souris C57Bl/6-UpK3a-Cre. Les souris double-hétérozygotes pour les deux transgènes sont sélectionnées pour les expériences *in vivo*, les autres souris correspondant au groupe témoin.

Les souris transgéniques présentent le même fond génétique (C57Bl/6) et sont élevées au sein d'une animalerie dépourvue de pathogènes agréant des contrôles sanitaires réguliers. Les sacrifices ont lieu chez des souris femelles à l'âge adulte entre 2 et 5 mois par anesthésie létale, prélèvement sanguin et des organes vitaux.

1.2 Génotypage

Extraction de l'ADN génomique par le DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne)

Le génotypage des souris est réalisé sur des queues de souriceaux prélevées durant le sevrage. Après une digestion à la protéinase K (20 μ l) diluée dans du tampon de lyse (ATL, 180 μ l) pendant une nuit à 56°C, l'ADN génomique précipite par l'adjonction successive de 200 μ l de tampon AL et de 200 μ l d'éthanol à 100%. L'ADN génomique se fixe spécifiquement au micro-colonnes fournies où le lysat est déposé puis centrifugé (8000 rpm, 1 minute, température ambiante), tandis que les déchets sont lavés successivement par 200 μ l de tampon de lavage AW1 (puis centrifugation 8000 rpm, 1 minute, température ambiante) et 200 μ l de tampon de lavage AW2 (puis centrifugation 14 000 rpm, 3 minutes, température ambiante). L'ajout final du tampon d'éluion (AE, 200 μ l) puis la centrifugation (8000 rpm, 1 minute, température ambiante) après une minute d'incubation à température ambiante permet d'obtenir l'ADN génomique dilué qui sera conservé à -20°C.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'amplification des transgènes est réalisée sur un appareil MJ Research PTC-200 Thermal Cycler (GMI, Ramsey, MN, USA). L'ADN génomique (3 µl) est amplifié dans un volume final de 12 µl contenant 0,06 µl de chaque oligonucléotide sens et antisens spécifique dont les séquences sont fournies par Jackson Laboratory (annexe 2), 7 µl de Taq Polymérase (Fast Start, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA USA) et de l'eau stérile. Après une première dénaturation de 4 minutes à 95°C, l'ADN est amplifié pendant 34 cycles comprenant une phase de dénaturation (94°C pendant 30 secondes), une phase d'hybridation des amorces (62°C pendant 30 secondes) et une phase d'élongation (72°C pendant 1 minute). Une extension finale à 72°C pendant 7 minutes a lieu au terme du dernier cycle. Les produits de la PCR ainsi qu'un marqueur de taille (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 1,5% dilué dans du tampon TBE 1X contenant de l'agent intercalant GelRed (Biotium, Fremont, CA, USA) dilué au 1/10000. Le GelRed intercalé entre les bases d'ADN double brin est révélé sous éclairage aux ultra-violets (Système Bio Capt Xpress, Vilber Lourmat, France).

1.3. Activation de la Cre recombinase

Les souris adultes double-transgéniques reçoivent les injections de tamoxifène (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) selon le protocole du fournisseur. Cette injection permet l'activation de la Cre et ainsi l'excision du codon stop induisant l'expression du récepteur de la toxine diphtérique dans les cellules exprimant l'uroplakine de type 3a. Après dilution du tamoxifène dans de l'huile de maïs à 20 mg/ml (dissolution du tamoxifène à 37°C pendant une nuit avec agitation à 300 rpm), 100 µl de la solution sont injectées par voie intrapéritonéale tous les jours pendant 5 jours (soit 75 mg/kg de tamoxifène). Afin de potentialiser l'expression de la Cre qui est sous le contrôle du promoteur de l'uroplakine de type 3a, une injection unique de FGF7 (60 µg/kg dilué dans du sérum salé isotonique, volume d'injection de 100 µl) accompagne la première injection de tamoxifène.

1.4. Destruction conditionnelle de l'urothélium

Un intervalle d'au moins 10 jours est assuré entre la dernière injection de tamoxifène et la première injection de toxine diphtérique pour assurer d'une part l'action génomique correcte de la Cre, et d'autre part l'absence d'influence des injections précédentes (FGF7 et

tamoxifène) sur le phénotype des souris étudiées. L'injection de toxine diphtérique est réalisée par voie intrapéritonéale à la dose de 50 µg/kg ou de 100 µg/kg, en une injection ou en 4 injections (une injection toutes les 12h), selon les références princeps concernant des cellules circulantes et des cellules hépatiques (ref). La toxine diphtérique est diluée dans du sérum salé isotonique stérile pour un volume d'injection constant de 100 µl.

2. Analyse du phénotype des souris

2.1. Etat général

Les souris sont pesées avant injection de toxine diphtérique puis tous les jours jusqu'au sacrifice. Leur état général et leur comportement sont surveillés 2 fois par jour.

2.2. Biologie

Les urines sont récupérées par contention avant sacrifice pour mesure de l'osmolalité urinaire par delta cryscopie (Osmometer, Radiometer, Danemark). Les souris sont sacrifiées par anesthésie létale à l'Euthasol® Vet (Lempdes, France) par injection intrapéritonéale d'un volume final de 100 µl dilué au 1/10 dans du sérum salé isotonique et prélèvement du sang (voie rétro-orbitaire), des reins et de la vessie. Le sang est prélevé en tube hépariné, puis centrifugé à 2000 rpm pendant 10 minutes pour récupérer le plasma permettant le dosage de l'urée et de la créatinine plasmatiques (automate de biochimie ids-isys, ImmunoDiagnostic Systems, The Boldons, Royaume-Uni).

2.3. Analyse anatomopathologique

Les reins sont fixés dans de l'alcool formolé acétique (AFA) pendant 24h à 4°C, puis inclus en paraffine. Ils sont coupés au microtome suivant un axe sagittal lorsque le rein est visualisé en position anatomique. Cette coupe particulière décrite par C. Vinsonneau *et al.* (107) permet une visualisation intéressante de l'urothélium intra-rénal dans la zone du fornix, et sa relation avec le parenchyme rénal cortical et médullaire, les artères interlobaires et les veines interlobaires. Les coupes sont réhydratées par bains successifs de xylène puis d'éthanol (3 minutes pour chaque bain) puis rincées à l'eau avant coloration. Les colorations sont réalisées manuellement. La coloration hématoxyline-éosine (HE) est réalisée par des bains d'hématoxyline (3 minutes), de carbonate de lithium (5 secondes) et d'éosine (30 secondes),

entrecoupés de rinçages de 3 minutes à l'eau courante. Les bains successifs d'éthanol puis de xylène (3 minutes pour chaque bain) permettent la déshydratation des coupes.

2.4. Immunohistochimie

Les reins sont fixés, inclus en paraffine et coupés au microtome pour le marquage de l'urolakine de type 3, et congelés puis coupés au cryostat pour les autres marquages.

Entre chaque étape – sauf après blocage par l'albumine – 3 lavages de 5 minutes au tampon PBS (phosphate buffer saline) 1X sont effectués. Le marquage des tissus comporte cinq étapes : 1) Blocage des peroxydases endogènes par incubation des lames pendant 5 à 10 minutes (Dako REALTM Peroxidase blocking solution, Dako Agilent, Santa Clara, CA, USA). 2) Blocage des sites non spécifiques par de l'albumine bovine sérique (BSA) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) diluée à 2% dans du tampon PBS 1X 30 minutes à température ambiante. 3) Incubation avec l'anticorps primaire dilué dans un tampon spécifique de dilution (Dako REALTM Antibody Diluent, Dako Agilent, Santa Clara, CA, USA), la nuit à 4°C. 4) Incubation avec l'anticorps secondaire couplée à la peroxydase de raifort (HRP, horseradish peroxydase), pendant 1h à température ambiante. 5) Révélation par incubation avec un substrat de l'HRP, le 3-Amino-9-EthylCarbazole (AEC, Dako Agilent, Santa Clara, CA, USA) pendant 3 à 5 minutes selon le marquage, surveillée par microscopie directe, puis rinçage à l'eau courante. La durée d'incubation est identique pour toutes les lames d'une même expérimentation pour un anticorps donné.

Les lames sont montées avec du milieu de montage aqueux (ScyTek Laboratory, Logan, UT, USA). Les lames sont enfin examinées au microscope optique et microphotographiées. Le tableau 2 (annexe 2) récapitule les anticorps et dilutions utilisés.

3. Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm erreur type (SEM). Les tests non paramétriques sont utilisés étant donné la distribution non normale de certaines variables. Le test de Mann-Whitney est utilisé pour la comparaison de variables entre 2 groupes, et le test de Wilcoxon pour des comparaisons de paires. La différence est significative lorsque $p < 0,05$. Les analyses statistiques sont menées sur le logiciel SPSS (Chicago, IL, USA). Les graphiques sont réalisés sur le logiciel Microsoft Excel (Redmond, WA, USA).

Résultats

1. Sélection des souris double transgéniques

Les souris iDTR^{+/+} fournies par Jackson Laboratory ont été croisées avec les souris Upk3-cre^{+/-} permettant de sélectionner les souris hétérozygotes pour les 2 transgènes (figure 13). La recherche du transgène Gt(ROSA)26Sortm1Sor permet d'étudier le nombre d'allèles mutés des souris avec une bande correspondant à l'allèle sauvage (650 paires de bases (pb)) et une bande correspondant à l'allèle muté (340 pb). La technique de recherche du transgène Upk3a-GFP/cre/ERT2 ne permet en revanche pas de sélectionner les souris homozygotes (figure 14).

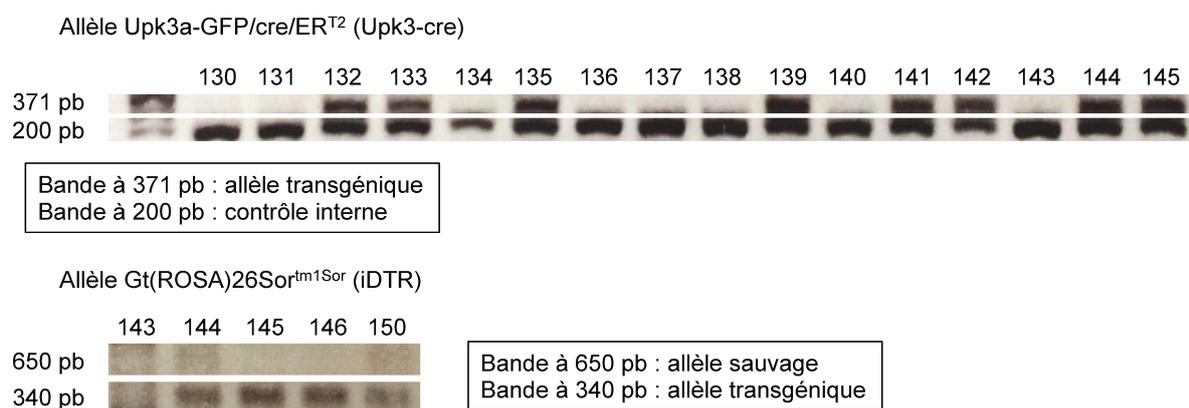


Figure 14. Electrophorèse des produits de PCR de l'ADN des souris. Pb : paires de base. Les numéros correspondent aux numéros identifiants des souris.

2. Mise au point du modèle expérimental

2.1. Induction du récepteur de la toxine diphtérique

L'induction du récepteur de la toxine diphtérique (DTR) chez les souris Upk3-cre^{+/-};iDTR^{+/-} par le tamoxifène n'a engendré aucune modification du phénotype ou du comportement des souris femelles. Les souris mâles ont présenté une hypertrophie scrotale décrite et attendue sans anomalie des organes génitaux mêmes (114). Nous avons néanmoins sélectionné les souris femelles pour les expérimentations suivantes. Nous n'avons par ailleurs retrouvé aucune anomalie péritonéale ou viscérale lors de la dissection des souris après injection de tamoxifène dilué dans l'huile de maïs.

2.2. Injection de la toxine diphtérique

L'injection de toxine diphtérique (DT) sera noté +DT par la suite. Plusieurs protocoles d'administration ont été mis en place dans cette étude. Les souris sacrifiées à 24h ont reçu une injection unique de 50 µg/kg (n=8) tandis que les souris sacrifiées à 48h (n=13) et 6 jours (n=13) ont reçu une injection toutes les 12h pour un total de 4 injections, chacune de 12,5 µg/kg permettant d'obtenir une dose cumulée de 50 µg/kg. Nous avons utilisé 2 groupes contrôles : l'un correspondant aux souris Upk3-cre^{+/-};iDTR^{+/-} n'ayant pas reçu la toxine diphtérique (n=8), afin d'évaluer l'effet éventuel propre du tamoxifène, et l'autre correspondant à des souris Upk3-cre^{-/-};iDTR^{+/-} +DT (n=4), c'est-à-dire des souris théoriquement insensibles à la toxine diphtérique et qui en ont reçu, afin d'évaluer l'effet éventuel non spécifique de l'injection de toxine diphtérique (figure 15). Après analyse séparée des 2 groupes contrôles montrant l'absence de différence de phénotype, ceux-ci ont été regroupés dans l'optique d'augmenter la fiabilité de nos analyses statistiques. Au total 5 séries d'expérimentations sont rapportées dans notre étude.

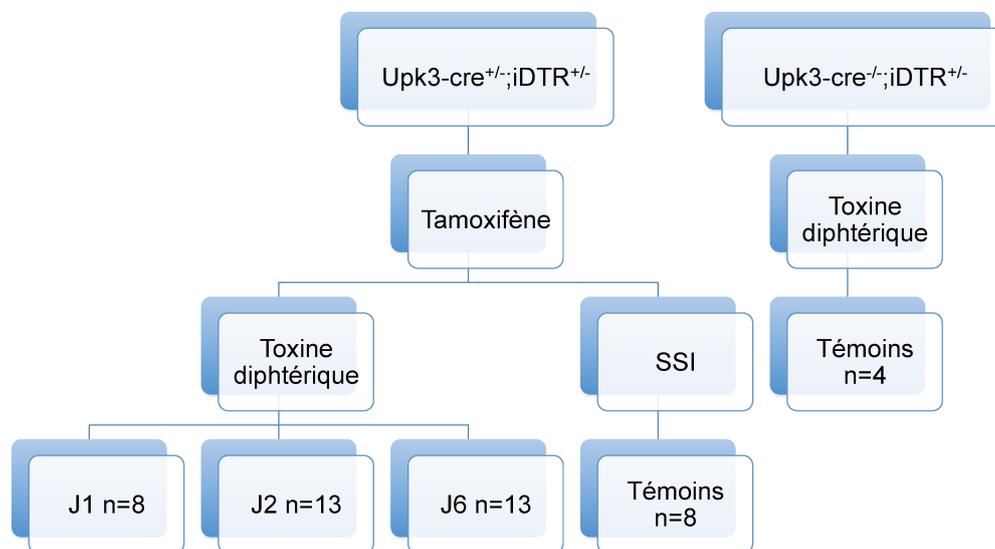


Figure 15. Organigramme de l'étude. iDTR : récepteur de la toxine diphtérique induit. SSI : sérum salé isotonique. J1 : sacrifice 24h après l'injection de toxine diphtérique (DT). J2 : sacrifice 48 après la première injection de DT, J6 : 6 jours après la première injection de DT.

3. Phénotype des animaux

Après injection de toxine diphtérique, une perte de poids significative était notée dès J2 pour les souris *Upk3-cre^{+/-};iDTR^{+/-} +DT* (20,4±0,53 g à J6, 20,57±0,52 g à J2 contre 22,28±0,41 g à J0 en moyenne, $p=0,01$ et $0,02$ respectivement). Il existait également à J6 une perte de poids chez les souris contrôles ayant reçu de la toxine diphtérique mais qui n'était pas significative (29 g à J0, 28,67g à J2, 28,07 g à J6 en moyenne, $p=0,66$ et $0,06$ respectivement) (figure 16A). On constatait par ailleurs une élévation significative de la créatinine plasmatique chez les souris *Upk3-cre^{+/-};iDTR^{+/-} +DT* entre J1 et J2 (en moyenne 20,47±4,34 $\mu\text{mol/l}$ contre 34,75±3,07 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,02$) et entre J1 et J6 (33,35±2,76 $\mu\text{mol/l}$ à J6, $p=0,03$) (figure 16C et 16D). L'urée s'élevait également à partir de J2 mais la différence n'était pas significative. Il existait par ailleurs dès J2 une diminution significative de l'osmolalité urinaire chez les souris *Upk3-cre^{+/-};iDTR^{+/-} +DT* comparée aux souris témoins (en moyenne 1908,5±94,6 mOsm/kgH₂O chez les témoins, 1508,6±134,5 mOsm/kgH₂O à J2, $p=0,02$, 1405,83±235,7 mOsm/kgH₂O à J6, $p=0,05$) (figure 16B).

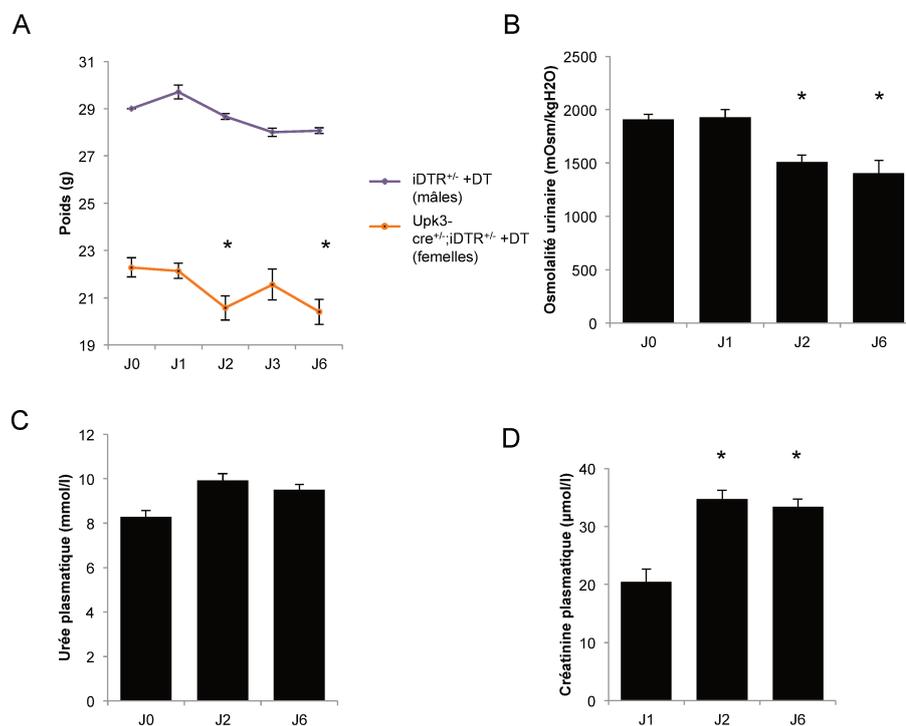


Figure 16. Phénotype des souris. A, évolution du poids des souris après injection de toxine diphtérique (DT). B, évolution de l'osmolalité urinaire après injection de DT. C, évolution de l'urée plasmatique après injection de DT. D, évolution de la créatininémie après injection de DT. iDTR : récepteur de la toxine diphtérique inductible, Upk3 : uroplakine III.

4. Analyse de la destruction urothéliale

4.1. Atteinte urothéliale.

L'analyse anatomopathologique rénale a permis d'évaluer le modèle expérimental. On observait une atteinte urothéliale marquée et sélective, caractérisée par une desquamation nette de l'urothélium, des cellules ballonnées et perdant leur phénotype pavimenteux. L'espace urinaire semblait élargie, au sein duquel demeuraient de nombreuses hématies et cellules épithéliales. Les lésions étaient sensiblement identiques à 2 et à 6 jours du début de l'administration de toxine diphtérique. Ces anomalies étaient présentes chez toutes les souris *Upk3-cre^{+/-};iDTR^{+/-} +DT* analysées, mais n'étaient pas observées chez les souris contrôles (figure 17).

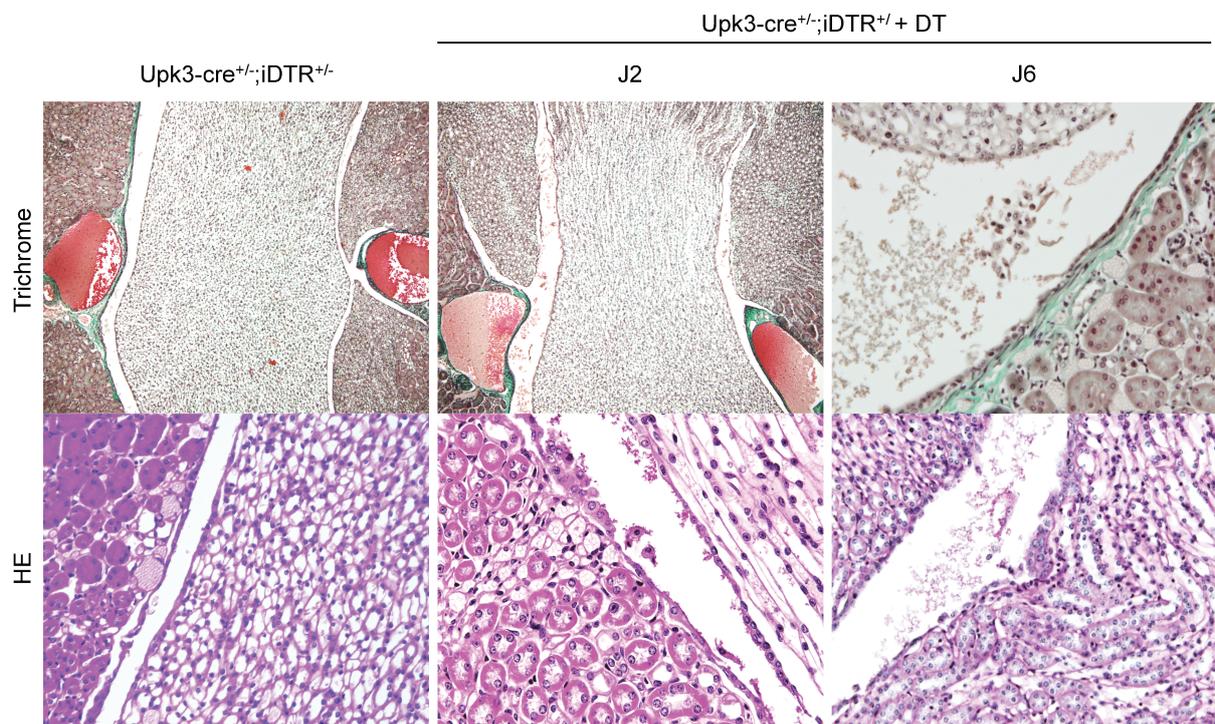


Figure 17. Destruction de l'urothélium. Microphotographies de microscopie optique en colorations HE et trichrome de Masson. En haut à gauche et au milieu, on observe les relations entre l'urothélium intrarénal, le parenchyme rénal, et les artères interlobaires remplies d'hématies. La lumière pelvique est montrée à plus fort grossissement sur les images suivantes. Grossissement X 100 pour les deux premières images en partant de gauche, en haut, X200 pour la troisième et la quatrième image, X400 pour la cinquième et la sixième image.

4.2. Diminution de l'expression de l'uroplakine 3.

Outre les anomalies cytologiques et épithéliales révélées par les colorations histologiques, une modification du phénotype urothélial était également présent. En effet, on constatait que l'expression de l'uroplakine de type 3 (Upk3) était nettement diminuée chez les souris Upk3-cre+/-;iDTR+/- +DT comparées aux souris témoins, et ceci dès 24h après l'injection. Cette diminution d'expression protéique persistait 6 jours après la destruction chez les souris ayant reçu 4 injections de toxine diphtérique. Quelques cellules Upk3+ étaient également visualisées dans l'espace urinaire. A noter l'absence habituelle et connue de marquage de l'Upk3 sur le versant papillaire en situation non pathologique (figure 18) (27,40).

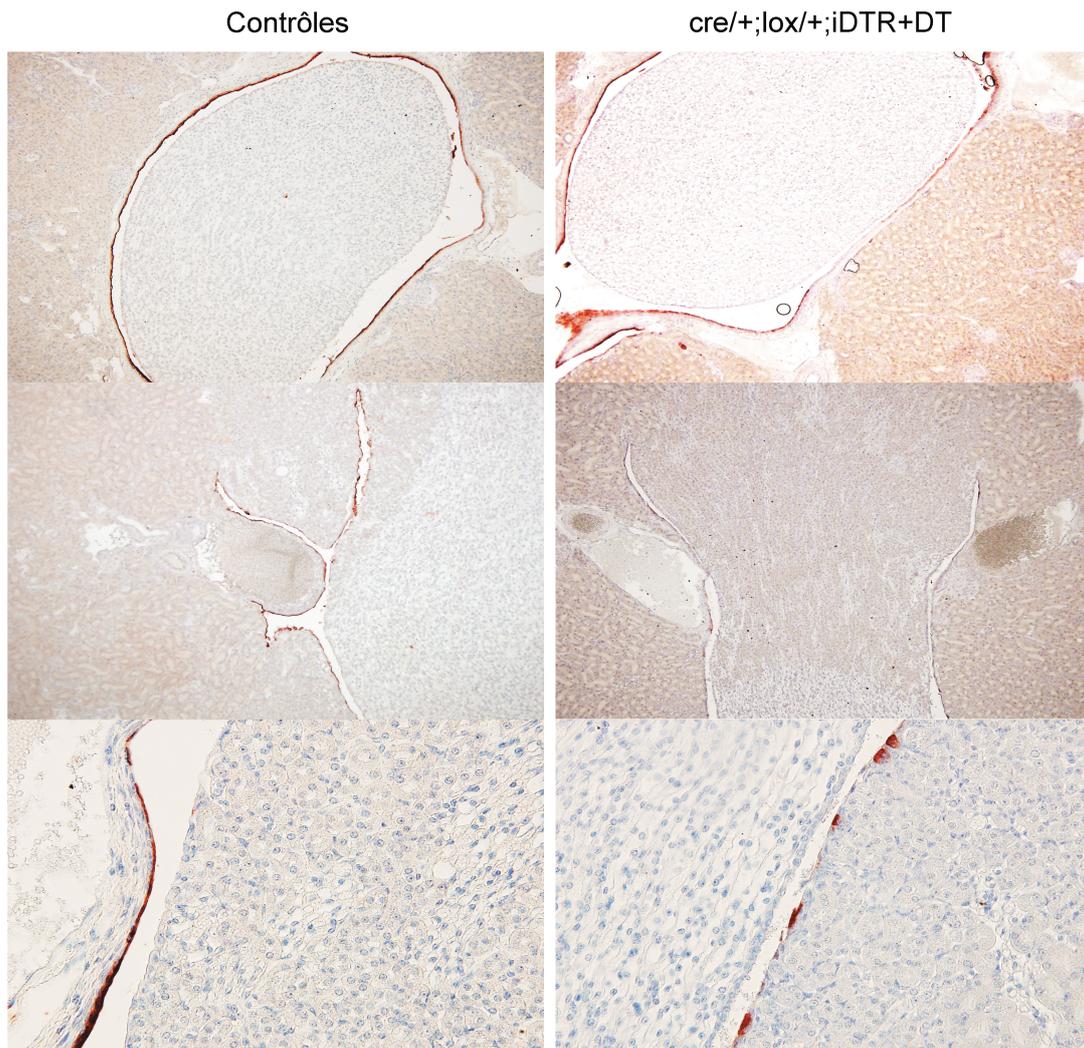


Figure 18. Expression de l'uroplakine III à la surface de l'urothélium intrarénal avant et après injection de toxine diphtérique (DT). iDTR : récepteur de la toxine diphtérique inductible.

Discussion

Les atteintes du rein profond sont multiples et peuvent être aussi bien vasculaires que tubulo-interstitielles, voire urothéliales. Ces structures peuvent être la cause et la conséquence de la maladie rénale, et induire un cercle vicieux où chaque structure peut être endommagée à son tour. Le reflet le plus spécifique de cette atteinte profonde semble être le trouble de concentration des urines. En effet, l'hypoosmolarité est caractéristique de l'atteinte de la médulla profonde, à l'instar de l'atteinte médullaire interne de la drépanocytose. Cette atteinte n'est-elle pas seulement un miroir du degré d'atteinte du rein profond, mais pourrait aussi avoir un impact pronostique, puisqu'elle est prédictive de la dégradation de la fonction glomérulaire et de l'insuffisance rénale terminale dans l'étude présentée en première partie.

Plusieurs interprétations peuvent être dégagées de ces résultats. D'abord, la fonction rénale est étudiée à travers le prisme de l'atteinte glomérulaire en pratique courante. Le débit de filtration glomérulaire, estimé ou mesuré, couplé à la protéinurie – et plus précisément l'albuminurie – sont les moyens habituels de définir la fonction rénale. Des marqueurs « tubulaires » tels que NGAL, KIM-1 ou NAG ont pourtant été évalués pour tenter d'avoir une vision plus complète de la situation rénale. Ils n'ont cependant jamais permis une assez bonne évaluation pronostique (115). Plus qu'un marqueur structurel, l'osmolalité urinaire à jeun serait pour sa part un marqueur fonction « extra-glomérulaire ». Cette étude épidémiologique n'a pour autant pas d'intention d'analyse mécanistique. Outre les atteintes des vasa recta, les troubles de concentration des urines peuvent provenir d'anomalies tubulaires (anses de Henle, canaux collecteurs). La fibrose interstitielle peut en elle-même également entraîner une hypoosmolarité, puisqu'elle augmente les espaces interstitiels et limite les échanges de solutés et d'eau dans ces espaces permettant de maintenir le gradient de concentration (47). Une atteinte tubulo-interstitielle peut enfin engendrer des anomalies microvasculaires, elles-mêmes entraînant possiblement une atteinte glomérulaire (65).

Ceci étant dit, la forte corrélation statistique entre DFG mesuré et osmolalité urinaire à jeun pourrait avoir une signification physiopathologique. Le lien entre ces deux paramètres pourrait en effet résider dans la microvascularisation. Comme nous l'avons vu dans l'étude présentée en deuxième partie, l'atteinte des capillaires péri-tubulaires semble influencer sur

l'hémodynamique rénale, et donc potentiellement sur la vascularisation glomérulaire. L'atteinte tubulaire, en particulier de l'anse de Henle, peut par ailleurs en elle-même être responsable d'une altération du réflexe tubuloglomérulaire, et donc potentiellement du débit de filtration glomérulaire (116).

Le lien entre altérations de l'hémodynamique rénale et troubles de la concentration urinaire doit en tout cas être précisé et serait très intéressant pour avoir une vision globale de la vascularisation rénale. L'influence de la macrovascularisation sur la perfusion capillaire et ainsi sur les fonctions vasculaires profondes, notamment le maintien du gradient osmotique cortico-papillaire serait un champ prometteur aussi bien en physiologie qu'en physiopathologie.

Il a notamment été rapporté un lien entre hypertension et troubles de concentration des urines chez des enfants atteints de polykystose rénale autosomique dominante (117). Il est intéressant de noter que cette association était observée bien avant le stade de l'insuffisance rénale – dans l'acception générale, c'est-à-dire d'une diminution du DFG. Les troubles de concentration des urines pourraient certes entrer dans le cadre des complications anatomiques de la polykystose, par rupture du gradient osmotique par les kystes comme le suggèrent les auteurs. Ceci serait responsable d'une résistance à l'action de la vasopressine, elle-même induisant un effet vasopresseur dépendant des récepteurs V1. L'intégrité microvasculaire n'a cependant pas été évaluée dans ce contexte et, lorsqu'on tient compte de l'effet des anomalies de la vascularisation des vasa recta sur la concentration maximale des urines, cette question semble légitime.

Il sera dans cette optique intéressant d'étudier une éventuelle toxicité différentielle de l'hème, corticale et médullaire, dans l'étude présentée en deuxième partie, avec mesure de l'osmolalité urinaire notamment. Ceci pourrait peut-être aider à une meilleure compréhension de la néphropathie drépanocytaire. En termes hémodynamiques, il serait également intéressant d'observer la distribution de la perfusion rénale, si celle-ci est augmentée dans le cortex aux dépens de la médulla, comme ceci a été démontré dans le sepsis (77).

Les effets hémodynamiques de l'hème, semblent en effet complexes, mal compris, et contradictoires au premier abord. Néanmoins, les doses d'hémine utilisées, les rythmes d'administration et les espèces étant variables, Nath *et al.* proposent dans leur dernière étude un effet variable selon la chronologie (118). L'hème exercerait d'abord un effet

vasoconstricteur direct dû à l'activation de TLR4 par l'hème à la surface endothéliale, puis un effet vasodilatateur lié à l'induction de l'hème-oxygénase de type 1, et enfin une raréfaction des capillaires avec dommage tissulaire irréversible, comme suggéré par notre étude, lors de l'administration intermittente et prolongée d'hémine, responsable d'une diminution du débit sanguin rénal.

Enfin, plus qu'une simple barrière anatomique, l'urothélium intrarénal semble être un acteur majeur des fonctions rénales, en particulier de la fonction de concentration comme en atteste la diminution significative de l'osmolalité urinaire après destruction des cellules urothéliales. Il faut d'ailleurs garder à l'esprit la proximité phénotypique de l'urothélium papillaire avec le tube collecteur (10), et leur origine embryologique commune (101). Des tests de restriction hydriques doivent être menés dans notre modèle expérimental afin de déterminer la capacité maximale exacte de concentration chez ces souris, et ainsi d'objectiver de manière certaine les troubles de concentration.

L'étude de la régénération urothéliale sera par ailleurs intéressante afin de mieux définir les précurseurs des cellules urothéliales là où l'épithélium ne présente qu'une couche. Une très récente étude a proposé dans cette optique d'étudier le rôle des uroplakines et des cellules urothéliales dans le modèle d'UUO (34). En réalisant une ablation conditionnelle des cellules exprimant les uroplakines de type 1b cette fois-ci, les auteurs ont montré une atteinte rénale plus marquée en contexte d'UUO, définie par un amincissement parenchymateux rénal. Il n'y a pas d'autre élément disponible pour étudier les fonctions rénales dans cette étude.

Nous avons mis en évidence dans notre étude une élévation de l'urée (non significative) et de la créatininémie. Pourtant, nous n'avons pas de substrat anatomopathologique pour expliquer ces anomalies, notamment pas de lésions glomérulaires ou tubulaires. L'augmentation de l'urée doit encore être confirmée statistiquement en augmentant les effectifs, et pourrait aussi être expliquée par une moindre sécrétion en raison de l'altération des échanges entre l'urine pelvique et le parenchyme, ou encore un « wash-out » de l'urée accumulée dans la papille vers la circulation générale. Une mesure du DFG sera donc intéressante pour vérifier ces anomalies, et complétées par des mesures hémodynamiques rénales qui pourraient apporter des explications aux modifications éventuelles du DFG.

L'étude de Jackson *et al.* a par ailleurs montré qu'après administration de toxine diphtérique, tout comme notre étude, il existait une atteinte urothéliale marquée et caractérisée par une desquamation, une ulcération épithéliale et une mort cellulaire débutant des 16h, et complète à 24h. Ils retrouvaient également des débris cellulaires luminaux, assez semblables à ceux que nous avons observés. Dès 48h en revanche, il existait une hyperplasie urothéliale Krt5+ que nous n'avons observé ni à 48h ni à 6 jours, et l'épithélium était totalement normalisé à 2 semaines. Notre étude se poursuit actuellement et les analyses sont en cours pour le phénotype à plus long terme, ainsi qu'à des doses plus importantes. Il est à noter que la même dose de toxine diphtérique a été utilisée dans leur étude que dans notre protocole expérimental (50 µg/kg). Néanmoins, notre protocole consistait en un étalement de la dose cumulée en 4 injections sur 2 jours (sauf pour les souris sacrifiées à 24h, où l'injection de 50 µg/kg était unique), ce qui pourrait expliquer cette différence. Par ailleurs, nous utilisons un modèle où la Cre s'exprime dans les cellules upk3+, et non upk1b+, dont l'expression est majoritaire à la jonction urétérocalicielle, où l'urothélium est pluristratifié. Dans l'étude de Jackson *et al.*, les cellules basales Krt5+ étaient d'ailleurs toujours présentes dans les zones étudiées de la jonction urétérocalicielle. Le calendrier de régénération est donc probablement différent dans ces deux modèles impliquant des localisations différentes avec des phénotypes variés.

La suite des analyses est actuellement en cours dans le laboratoire. Nous confirmerons notamment la baisse d'expression d'Upk3 par analyse quantitative des transcrits en qPCR. Il est à noter qu'outre l'efficacité réelle de l'injection de toxine diphtérique chez toutes les souris analysées, nous n'avons pas de preuve directe de l'expression du récepteur de la toxine diphtérique, les mises au point en RT-PCR et en immunohistochimie ayant à ce jour échoué. Il est important de signaler que la preuve de son expression n'est pas toujours publiée (119–121) et requiert parfois des techniques d'hybridation in situ (112), ou encore des techniques indirectes de génotypage prouvant l'excision du codon stop (113). Ces difficultés sont probablement en partie dues à l'homologie entre l'HBEGF simien (récepteur de la toxine diphtérique inséré chez la souris transgénique) et l'HBEGF murin. La recherche des variations entre les transcrits murin et simien est en cours dans notre laboratoire afin de déterminer les amorces adéquates pour révéler l'expression spécifique du récepteur de la toxine diphtérique.

L'étude des populations immunitaires rénales et de leur dynamique après ablation de l'urothélium est également en cours. Il pourrait en effet exister une différence de homing après lésion urothéliale, ce qui a peu été étudié. Il existe pourtant des voies lymphatiques au contact de l'urothélium, là où l'artère et la veine interlobaires rencontrent le fornix, ainsi que des cellules immunitaires, en particulier des monocytes/macrophages, résidant dans le parenchyme rénal (122).

Enfin, l'objet de l'étude sera d'ouvrir la voie à la physiopathologie en déterminant le rôle de l'urothélium dans les lésions et la récupération rénales. Pour ceci, nous souhaitons évaluer le phénotype rénal dans des modèles d'ischémie-reperfusion sans et avec ablation conditionnelle de l'urothélium. La réparation tubulaire sera intéressante à évaluer après administration de FGF7 afin d'évaluer si ce facteur de croissance sauve la réparation tubulaire en l'absence d'urothélium intrarénal (107). Si le rôle de l'urothélium intrarénal dans la régénération tubulaire se confirme, ceci pourrait avoir un impact important sur les recherches ultérieures sur ses potentielles actions paracrines sur les cellules tubulaires, voire sur les cellules endothéliales. Ces hypothèses nécessitent encore de nombreuses investigations qui se poursuivront dans notre laboratoire.

Conclusion

L'étude du rein profond permet une vision plus globale et fonctionnelle des structures rénales. Nous présentons des données suggérant que l'hémodynamique rénale et la fonction de concentration des urines sont toutes deux liées à des atteintes microvasculaires, et nous introduisons le rôle méconnu de l'urothélium dans les fonctions rénales et potentiellement dans la physiopathologie rénale.

L'intérêt porté pour ces questions permettra non seulement de mieux comprendre la physiologie et la physiopathologie rénales, mais aussi de tendre vers une translation médicale des données expérimentales et épidémiologiques. Ceci pourra être considéré aussi bien en termes de diagnostic (analyse histologique de la médullaire et de la microvascularisation en biopsie rénale, à l'instar de l'analyse histologique des greffons), de pronostic rénal (suivi de l'osmolalité urinaire chez les patients atteints d'une maladie rénale chronique), ou encore de thérapeutique. Le rôle de la résistance à l'ADH dans la progression de la maladie rénale chronique, et donc son éventuel blocage font par exemple l'objet d'études de plus en plus nombreuses. Des traitements à visée « vasculo-protectrice » sont également envisageables et pourraient être prometteurs dans la prise en charge de l'insuffisance rénale, qu'elle soit aiguë ou chronique.

Bibliographie

1. Masson E. Anatomie des reins et de la voie excrétrice supérieure [Internet]. EM-Consulte. [cited 2018 Aug 22]. Available from: <http://www.em-consulte.com/article/179610/anatomie-des-reins-et-de-la-voie-excretrice-superi>
2. Sampaio FJ. Renal anatomy. Endourologic considerations. *Urol Clin North Am*. 2000 Nov;27(4):585–607, vii.
3. Lippert H, Pabst R. Arterial Variations in Man: Classification and Frequency [Internet]. J.F. Bergmann-Verlag München; 1985 [cited 2018 Aug 22]. Available from: [//www.springer.com/gb/book/9783642805103](http://www.springer.com/gb/book/9783642805103)
4. Assouad J, Riquet M, Foucault C, Hidden G, Delmas V. Renal lymphatic drainage and thoracic duct connections: implications for cancer spread. *Lymphology*. 2006 Mar;39(1):26–32.
5. Chmielewski C. Renal anatomy and overview of nephron function. *Nephrol Nurs J*. 2003 Apr;30(2):185–90; quiz 191–2.
6. Bankir L, de Rouffignac C. Urinary concentrating ability: insights from comparative anatomy. *Am J Physiol*. 1985 Dec;249(6 Pt 2):R643–66.
7. Schmidt-Nielsen B, O'dell R. Structure and concentrating mechanism in the mammalian kidney. *Am J Physiol*. 1961 Jun;200:1119–24.
8. Melicow MM. The urothelium: a battleground for oncogenesis. *J Urol*. 1978 Jul;120(1):43–7.
9. Martin BF. Cell replacement and differentiation in transitional epithelium: a histological and autoradiographic study of the guinea-pig bladder and ureter. *J Anat*. 1972 Sep;112(Pt 3):433–55.
10. Khorshid MR, Moffat DB. The epithelia lining the renal pelvis in the rat. *J Anat*. 1974 Dec;118(Pt 3):561–9.
11. Hicks RM. The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter. *J Cell Biol*. 1965 Jul;26(1):25–48.
12. Hicks RM. The permeability of rat transitional epithelium. Kertinization and the barrier to water. *J Cell Biol*. 1966 Jan;28(1):21–31.
13. Batourina E, Tsai S, Lambert S, Sprenkle P, Viana R, Dutta S, et al. Apoptosis induced by vitamin A signaling is crucial for connecting the ureters to the bladder. *Nat Genet*. 2005 Oct;37(10):1082–9.
14. Viana R, Batourina E, Huang H, Dressler GR, Kobayashi A, Behringer RR, et al. The development of the bladder trigone, the center of the anti-reflux mechanism. *Development*. 2007 Oct;134(20):3763–9.
15. Balsara ZR, Li X. Sleeping beauty: awakening urothelium from its slumber. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017 01;312(4):F732–43.
16. Acharya P, Beckel J, Ruiz WG, Wang E, Rojas R, Birder L, et al. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Aug;287(2):F305–18.
17. Khandelwal P, Ruiz WG, Balestreire-Hawryluk E, Weisz OA, Goldenring JR, Apodaca G. Rab11a-dependent exocytosis of discoidal/fusiform vesicles in bladder umbrella cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Oct 14;105(41):15773–8.
18. Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2010 Jul 1;28(4):401–8.
19. Harnden P, Eardley I, Joyce AD, Southgate J. Cytokeratin 20 as an objective marker of urothelial dysplasia. *Br J Urol*. 1996 Dec;78(6):870–5.

20. Guo C, Balsara ZR, Hill WG, Li X. Stage- and subunit-specific functions of polycomb repressive complex 2 in bladder urothelial formation and regeneration. *Development*. 2017 01;144(3):400–8.
21. Papafotiou G, Paraskevopoulou V, Vasilaki E, Kanaki Z, Paschalidis N, Klinakis A. KRT14 marks a subpopulation of bladder basal cells with pivotal role in regeneration and tumorigenesis. *Nat Commun*. 2016 20;7:11914.
22. Gandhi D, Molotkov A, Batourina E, Schneider K, Dan H, Reiley M, et al. Retinoid signaling in progenitors controls specification and regeneration of the urothelium. *Dev Cell*. 2013 Sep 16;26(5):469–82.
23. Walker BE. Renewal of cell populations in the female mouse. *Am J Anat*. 1960 Sep;107:95–105.
24. Hicks RM. The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1975 May;50(2):215–46.
25. Mysorekar IU, Isaacson-Schmid M, Walker JN, Mills JC, Hultgren SJ. Bone morphogenetic protein 4 signaling regulates epithelial renewal in the urinary tract in response to uropathogenic infection. *Cell Host Microbe*. 2009 May 8;5(5):463–75.
26. Shin K, Lee J, Guo N, Kim J, Lim A, Qu L, et al. Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature*. 2011 Apr 7;472(7341):110–4.
27. Girshovich A, Vinsonneau C, Perez J, Vandermeersch S, Verpont M-C, Placier S, et al. Ureteral obstruction promotes proliferation and differentiation of the renal urothelium into a bladder-like phenotype. *Kidney Int*. 2012 Aug;82(4):428–35.
28. Kreft ME, Sterle M, Veranic P, Jezernik K. Urothelial injuries and the early wound healing response: tight junctions and urothelial cytodifferentiation. *Histochem Cell Biol*. 2005 Jun;123(4-5):529–39.
29. Negrete HO, Lavelle JP, Berg J, Lewis SA, Zeidel ML. Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. *Am J Physiol*. 1996 Oct;271(4 Pt 2):F886–94.
30. Lewis SA, de Moura JL. Incorporation of cytoplasmic vesicles into apical membrane of mammalian urinary bladder epithelium. *Nature*. 1982 Jun 24;297(5868):685–8.
31. Wu X-R, Kong X-P, Pellicer A, Kreibich G, Sun T-T. Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. *Kidney International*. 2009 Jun 1;75(11):1153–65.
32. Hu P, Deng FM, Liang FX, Hu CM, Auerbach AB, Shapiro E, et al. Ablation of uroplakin III gene results in small urothelial plaques, urothelial leakage, and vesicoureteral reflux. *J Cell Biol*. 2000 Nov 27;151(5):961–72.
33. Kong X-T, Deng F-M, Hu P, Liang F-X, Zhou G, Auerbach AB, et al. Roles of uroplakins in plaque formation, umbrella cell enlargement, and urinary tract diseases. *J Cell Biol*. 2004 Dec 20;167(6):1195–204.
34. Jackson AR, Li B, Cohen SH, Ching CB, McHugh KM, Becknell B. The Uroplakin Plaque Promotes Renal Structural Integrity During Congenital and Acquired Urinary Tract Obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018 Jun 13;
35. Carpenter AR, Becknell MB, Ching CB, Cuaresma EJ, Chen X, Hains DS, et al. Uroplakin 1b is critical in urinary tract development and urothelial differentiation and homeostasis. *Kidney Int*. 2016 Mar;89(3):612–24.
36. Jenkins D, Bitner-Glindzicz M, Malcolm S, Hu C-CA, Allison J, Winyard PJD, et al. De novo Uroplakin IIIa heterozygous mutations cause human renal adysplasia leading to severe kidney failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Jul;16(7):2141–9.
37. Verani R, Bulger RE. The pelvic epithelium of the rat kidney: a scanning and transmission electron microscopic study. *Am J Anat*. 1982 Mar;163(3):223–33.
38. Pfeiffer EW. Comparative anatomical observations of the mammalian renal pelvis and medulla. *J Anat*. 1968 Jan;102(Pt 2):321–31.

39. Narath PA. Renal pelvis and ureter [Internet]. New York: Grune & Stratton; 1951 [cited 2018 Aug 23]. 429 p. Available from: <https://catalog.hathitrust.org/Record/001579889>
40. Jenkins D, Woolf AS. Uroplakins: New molecular players in the biology of urinary tract malformations. *Kidney International*. 2007 Feb 1;71(3):195–200.
41. Yang B, Bankir L. Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2005 May 1;288(5):F881–96.
42. Rocha AS, Kokko JP. Sodium chloride and water transport in the medullary thick ascending limb of Henle. Evidence for active chloride transport. *J Clin Invest*. 1973 Mar;52(3):612–23.
43. Zhai X-Y, Fenton RA, Andreasen A, Thomsen JS, Christensen EI. Aquaporin-1 Is not Expressed in Descending Thin Limbs of Short-Loop Nephrons. *JASN*. 2007 Nov 1;18(11):2937–44.
44. Sands JM, Layton HE. The physiology of urinary concentration: an update. *Semin Nephrol*. 2009 May;29(3):178–95.
45. Gottschalk CW, Mylle M. Micropuncture study of the mammalian urinary concentrating mechanism: evidence for the countercurrent hypothesis. 1959. *J Am Soc Nephrol*. 1997 Jan;8(1):153–64; discussion 153–9.
46. Kokko JP, Rector FC. Countercurrent multiplication system without active transport in inner medulla. *Kidney Int*. 1972 Oct;2(4):214–23.
47. Dantzer WH, Layton AT, Layton HE, Pannabecker TL. Urine-concentrating mechanism in the inner medulla: function of the thin limbs of the loops of Henle. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014 Oct 7;9(10):1781–9.
48. Layton AT, Pannabecker TL, Dantzer WH, Layton HE. Functional implications of the three-dimensional architecture of the rat renal inner medulla. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Apr;298(4):F973–87.
49. Packer RK, Desai SS, Hornbuckle K, Knepper MA. Role of countercurrent multiplication in renal ammonium handling: regulation of medullary ammonium accumulation. *J Am Soc Nephrol*. 1991 Jul;2(1):77–83.
50. Pannabecker TL, Abbott DE, Dantzer WH. Three-dimensional functional reconstruction of inner medullary thin limbs of Henle’s loop. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Jan;286(1):F38–45.
51. Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y, Miyazaki H, Ko SB, Hayama A, et al. Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat Genet*. 1999 Jan;21(1):95–8.
52. Marsh DJ, Segel LA. Analysis of countercurrent diffusion exchange in blood vessels of the renal medulla. *Am J Physiol*. 1971 Sep;221(3):817–28.
53. Müller-Suur R, Ulfendahl HR, Persson AE. Evidence for tubuloglomerular feedback in juxtamedullary nephrons of young rats. *Am J Physiol*. 1983 Apr;244(4):F425–31.
54. Layton AT, Gilbert RL, Pannabecker TL. Isolated interstitial nodal spaces may facilitate preferential solute and fluid mixing in the rat renal inner medulla. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Apr 1;302(7):F830–9.
55. Oliver RE, Roy DR, Jamison RL. Urinary concentration in the papillary collecting duct of the rat. Role of the ureter. *J Clin Invest*. 1982 Jan;69(1):157–64.
56. Schütz W, Schnermann J. Pelvic urine composition as a determinant of inner medullary solute concentration and urine osmolarity. *Pflugers Arch*. 1972;334(2):154–66.
57. Tsukaguchi H, Shayakul C, Berger UV, Tokui T, Brown D, Hediger MA. Cloning and characterization of the urea transporter UT3: localization in rat kidney and testis. *J Clin Invest*. 1997 Apr 1;99(7):1506–15.
58. Bonventre JV, Karnovsky MJ, Lechene CP. Renal papillary epithelial morphology in antidiuresis and water diuresis. *Am J Physiol*. 1978 Jul;235(1):F69–76.

59. Devarajan P. Update on Mechanisms of Ischemic Acute Kidney Injury. *JASN*. 2006 Jun 1;17(6):1503–20.
60. Witzgall R, Brown D, Schwarz C, Bonventre JV. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest*. 1994 May;93(5):2175–88.
61. Chaabane W, Praddaude F, Buleon M, Jaafar A, Vallet M, Rischmann P, et al. Renal functional decline and glomerulotubular injury are arrested but not restored by release of unilateral ureteral obstruction (UUO). *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013 Feb 15;304(4):F432–9.
62. Mayeur N, Minville V, Jaafar A, Allard J, Al Saati T, Guilbeau-Frugier C, et al. Morphologic and functional renal impact of acute kidney injury after prolonged hemorrhagic shock in mice. *Crit Care Med*. 2011 Sep;39(9):2131–8.
63. Dussaule J-C, Guerrot D, Huby A-C, Chadjichristos C, Shweke N, Boffa J-J, et al. The role of cell plasticity in progression and reversal of renal fibrosis. *Int J Exp Pathol*. 2011 Jun;92(3):151–7.
64. Guerrot D, Dussaule J-C, Kavvadas P, Boffa J-J, Chadjichristos CE, Chatziantoniou C. Progression of renal fibrosis: the underestimated role of endothelial alterations. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(Suppl 1):S15.
65. Chade AR. Renal vascular structure and rarefaction. *Compr Physiol*. 2013 Apr;3(2):817–31.
66. Bábíčková J, Klinkhammer BM, Buhl EM, Djudjaj S, Hoss M, Heymann F, et al. Regardless of etiology, progressive renal disease causes ultrastructural and functional alterations of peritubular capillaries. *Kidney Int*. 2017;91(1):70–85.
67. Zafrani L, Ince C. Microcirculation in Acute and Chronic Kidney Diseases. *Am J Kidney Dis*. 2015 Dec;66(6):1083–94.
68. Afsar B, Afsar RE, Dagele T, Kaya E, Erus S, Ortiz A, et al. Capillary rarefaction from the kidney point of view. *Clin Kidney J*. 2018 Jun;11(3):295–301.
69. Maric-Bilkan C, Flynn ER, Chade AR. Microvascular disease precedes the decline in renal function in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Feb 1;302(3):F308–15.
70. Futrakul N, Futrakul P. Renal microvascular disease predicts renal function in diabetes. *Ren Fail*. 2012;34(1):126–9.
71. Futrakul N, Yenrudi S, Sensirivatana R, Watana D, Laohapaibul A, Watanapenphaibul K, et al. Peritubular capillary flow determines tubulointerstitial disease in idiopathic nephrotic syndrome. *Ren Fail*. 2000 May;22(3):329–35.
72. Steegh FMEG, Gelens MACJ, Nieman FHM, van Hooff JP, Cleutjens JPM, van Suylen RJ, et al. Early Loss of Peritubular Capillaries after Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Jun;22(6):1024–9.
73. Wu X, Guo R, Wang Y, Cunningham PN. The role of ICAM-1 in endotoxin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Oct;293(4):F1262–71.
74. Kelly KJ, Williams WW, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest*. 1996 Feb 15;97(4):1056–63.
75. Schwartz D, Mendonca M, Schwartz I, Xia Y, Satriano J, Wilson CB, et al. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J Clin Invest*. 1997 Jul 15;100(2):439–48.
76. Araujo M, Welch WJ. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006 Jan;15(1):72–7.

77. Langenberg C, Gobe G, Hood S, May CN, Bellomo R. Renal histopathology during experimental septic acute kidney injury and recovery. *Crit Care Med.* 2014 Jan;42(1):e58–67.
78. Basile DP, Fredrich K, Chelladurai B, Leonard EC, Parrish AR. Renal ischemia reperfusion inhibits VEGF expression and induces ADAMTS-1, a novel VEGF inhibitor. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Apr;294(4):F928–36.
79. Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF, Johnson RJ. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Jul;12(7):1448–57.
80. Pannabecker TL. Renal vascular pericytes: long overlooked and poorly understood, but clearly important, and what about those regulatory pathways? *Am J Physiol Renal Physiol.* 2018 01;314(1):F67–9.
81. Crislip GR, O'Connor PM, Wei Q, Sullivan JC. Vasa recta pericyte density is negatively associated with vascular congestion in the renal medulla following ischemia reperfusion in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017 Nov 1;313(5):F1097–105.
82. Iliescu R, Fernandez SR, Kelsen S, Maric C, Chade AR. Role of renal microcirculation in experimental renovascular disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2010 Apr;25(4):1079–87.
83. Urbieta-Caceres VH, Syed FA, Lin J, Zhu X-Y, Jordan KL, Bell CC, et al. Age-dependent renal cortical microvascular loss in female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Apr 15;302(8):E979–86.
84. Boulos N, Helle F, Dussaule J-C, Placier S, Milliez P, Djudjaj S, et al. Notch3 is essential for regulation of the renal vascular tone. *Hypertension.* 2011 Jun;57(6):1176–82.
85. Denton KM, Anderson WP, Sinniah R. Effects of angiotensin II on regional afferent and efferent arteriole dimensions and the glomerular pole. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000 Aug;279(2):R629–38.
86. Buléon M, Allard J, Jaafar A, Praddaude F, Dickson Z, Ranera M-T, et al. Pharmacological blockade of B2-kinin receptor reduces renal protective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in db/db mice model. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 May;294(5):F1249–56.
87. Kelsen S, Hall JE, Chade AR. Endothelin-A receptor blockade slows the progression of renal injury in experimental renovascular disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011 Jul;301(1):F218–25.
88. Pauletto P, Rattazzi M. Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol Dial Transplant.* 2006 Apr;21(4):850–3.
89. Greene AS, Tonellato PJ, Lui J, Lombard JH, Cowley AW. Microvascular rarefaction and tissue vascular resistance in hypertension. *Am J Physiol.* 1989 Jan;256(1 Pt 2):H126–31.
90. Helle F, Jouzel C, Chadjichristos C, Placier S, Flamant M, Guerrot D, et al. Improvement of renal hemodynamics during hypertension-induced chronic renal disease: role of EGF receptor antagonism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 Jul;297(1):F191–9.
91. Luque Y, Lenoir O, Bonnin P, Hardy L, Chipont A, Placier S, et al. Endothelial Epas1 Deficiency Is Sufficient To Promote Parietal Epithelial Cell Activation and FSGS in Experimental Hypertension. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Dec;28(12):3563–78.
92. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation.* 2004 Mar;11(2):129–51.
93. Nath KA, Katusic ZS. Vasculature and Kidney Complications in Sickle Cell Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2012 May;23(5):781–4.
94. Nath KA, Katusic ZS, Gladwin MT. The perfusion paradox and vascular instability in sickle cell disease. *Microcirculation.* 2004 Mar;11(2):179–93.
95. Lenoir O, Gaillard F, Lazareth H, Robin B, Tharaux P-L. Hmox1 Deficiency Sensitizes Mice to Peroxynitrite Formation and Diabetic Glomerular Microvascular Injuries. *J*

Diabetes Res. 2017;2017:9603924.

96. Immenschuh S, Vijayan V, Janciauskiene S, Gueler F. Heme as a Target for Therapeutic Interventions. *Front Pharmacol* [Internet]. 2017 Apr 4 [cited 2018 Aug 17];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5378770/>
97. Koehl B, Nivoit P, El Nemer W, Lenoir O, Hermand P, Pereira C, et al. The endothelin B receptor plays a crucial role in the adhesion of neutrophils to the endothelium in sickle cell disease. *Haematologica*. 2017;102(7):1161–72.
98. Sabaa N, de Franceschi L, Bonnin P, Castier Y, Malpeli G, Debbabi H, et al. Endothelin receptor antagonism prevents hypoxia-induced mortality and morbidity in a mouse model of sickle-cell disease. *J Clin Invest*. 2008 May;118(5):1924–33.
99. Wu XR, Sun TT, Medina JJ. In vitro binding of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroplakins Ia and Ib: relation to urinary tract infections. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Sep 3;93(18):9630–5.
100. Bishop BL, Duncan MJ, Song J, Li G, Zaas D, Abraham SN. Cyclic AMP-regulated exocytosis of *Escherichia coli* from infected bladder epithelial cells. *Nat Med*. 2007 May;13(5):625–30.
101. Vainio S, Lin Y. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. *Nat Rev Genet*. 2002 Jul;3(7):533–43.
102. Haymann J-P, Vinsonneau C, Girshovich A, Daudon M. [Acute obstructive nephropathy: A pathophysiological view]. *Nephrol Ther*. 2017 Apr;13 Suppl 1:S1–5.
103. Chen W-Y, Yang J-L, Wu Y-H, Li L-C, Li R-F, Chang Y-T, et al. IL-33/ST2 axis mediates hyperplasia of intrarenal urothelium in obstructive renal injury. *Exp Mol Med*. 2018 Apr 20;50(4):36.
104. McHugh KM. Megabladder mouse model of congenital obstructive nephropathy: genetic etiology and renal adaptation. *Pediatr Nephrol*. 2014 Apr;29(4):645–50.
105. Becknell B, Carpenter AR, Allen JL, Wilhide ME, Ingraham SE, Hains DS, et al. Molecular basis of renal adaptation in a murine model of congenital obstructive nephropathy. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e72762.
106. Thumbikat P, Berry RE, Zhou G, Billips BK, Yaggie RE, Zaichuk T, et al. Bacteria-induced uroplakin signaling mediates bladder response to infection. *PLoS Pathog*. 2009 May;5(5):e1000415.
107. Vinsonneau C, Girshovich A, M'rad MB, Perez J, Mesnard L, Vandermersch S, et al. Intrarenal urothelium proliferation: an unexpected early event following ischemic injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Sep;299(3):F479–86.
108. Ichimura T, Finch PW, Zhang G, Kan M, Stevens JL. Induction of FGF-7 after kidney damage: a possible paracrine mechanism for tubule repair. *Am J Physiol*. 1996 Nov;271(5 Pt 2):F967–76.
109. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*. 2000 Sep;7(3):165–97.
110. Villanueva S, Cespedes C, Gonzalez AA, Roessler E, Vio CP. Inhibition of bFGF-receptor type 2 increases kidney damage and suppresses nephrogenic protein expression after ischemic acute renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Mar;294(3):R819–28.
111. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Aug 28;237(3):752–7.
112. Saito M, Iwawaki T, Taya C, Yonekawa H, Noda M, Inui Y, et al. Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotechnol*. 2001 Aug;19(8):746–50.
113. Buch T, Heppner FL, Tertilt C, Heinen TAJ, Kremer M, Wunderlich FT, et al. A Cre-

inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods*. 2005 Jun;2(6):419–26.

114. Reinert RB, Kantz J, Misfeldt AA, Poffenberger G, Gannon M, Brissova M, et al. Tamoxifen-Induced Cre-loxP Recombination Is Prolonged in Pancreatic Islets of Adult Mice. *PLoS One* [Internet]. 2012 Mar 28 [cited 2018 Jul 24];7(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314663/>
115. Zhou L-T, Lv L-L, Pan M-M, Cao Y-H, Liu H, Feng Y, et al. Are Urinary Tubular Injury Markers Useful in Chronic Kidney Disease? A Systematic Review and Meta Analysis. *PLoS One* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2018 Aug 26];11(12). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5131971/>
116. Brezis M, Rosen S, Silva P, Epstein FH. Renal ischemia: a new perspective. *Kidney Int*. 1984 Oct;26(4):375–83.
117. Seeman T, Dusek J, Vondrák K, Bláhová K, Simková E, Kreisinger J, et al. Renal concentrating capacity is linked to blood pressure in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Physiol Res*. 2004;53(6):629–34.
118. Nath KA, Belcher JD, Nath MC, Grande JP, Croatt AJ, Ackerman AW, et al. Role of TLR4 signaling in the nephrotoxicity of heme and heme proteins. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018 May 1;314(5):F906–14.
119. Arruda-Carvalho M, Akers KG, Guskjolen A, Sakaguchi M, Josselyn SA, Frankland PW. Posttraining Ablation of Adult-Generated Olfactory Granule Cells Degrades Odor–Reward Memories. *J Neurosci*. 2014 Nov 19;34(47):15793–803.
120. Aychek T, Mildner A, Yona S, Kim K-W, Lampl N, Reich-Zeliger S, et al. IL-23-mediated mononuclear phagocyte crosstalk protects mice from *Citrobacter rodentium*-induced colon immunopathology. *Nat Commun* [Internet]. 2015 Mar 12 [cited 2018 Aug 27];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4382688/>
121. Birey F, Kloc M, Chavali M, Hussein I, Wilson M, Christoffel DJ, et al. Genetic and Stress-Induced Loss of NG2 Glia Triggers Emergence of Depressive-like Behaviors through Reduced Secretion of FGF2. *Neuron*. 2015 Dec 2;88(5):941–56.
122. Cao Q, Wang Y, Wang XM, Lu J, Lee VWS, Ye Q, et al. Renal F4/80+CD11c+ Mononuclear Phagocytes Display Phenotypic and Functional Characteristics of Macrophages in Health and in Adriamycin Nephropathy. *JASN*. 2014 Jul 10;ASN.2013121336.

Annexes

Annexe 1. Notification de la décision de l'*American Journal of Kidney Disease*

Jul 26, 2018

Manuscript AJKD-D-18-00745

Dear Dr Tabibzadeh,

Your manuscript "Fasting urinary osmolality: a relevant biomarker for CKD progression" has been externally reviewed and discussed by our editorial committee. We would be pleased to consider a revised version that fully and satisfactorily addresses the concerns of the editors and reviewers. Although we can offer no guarantee of acceptance, a majority of manuscripts that reach this stage of the consideration process are eventually accepted for publication.

To prepare the revision, please attend to the requests in each of the following sections of this letter:

1. Editorial Comments (please provide a point-by-point response to each comment)
2. Reviewer Comments (please provide a point-by-point response to each comment)
3. Requests from Editorial Office Staff (responses requested only if needed for clarity)

We ask that you submit your revised manuscript to us by **Sep 26, 2018**, using the Editorial Manager online manuscript handling system (see end of email for step-by-step guidance). If you find that you require more time to prepare a revision, please contact our editorial office at AJKD@penncmedicine.upenn.edu and they will be happy to assist you.

Thank you for choosing to submit your manuscript to *AJKD*. If you have any questions or comments, please do not hesitate to contact us.

Sincerely,

Laura Dember, MD

Acting Editor-in-Chief*

Reviewer 1:

This work is of interest. It is a reliable estimate of the association of Uosm (accurately measured under fasting conditions) and the risk of CKD progression. This work shows that lower fasting Uosm is associated with faster measured (m) GFR decline, which has numerous important implications. However, the most important implication, its relevance to tolvaptan therapy in ADPKD, is not discussed.

Recently tolvaptan has been approved for use in Europe and now in the US. The apparent benefits of tolvaptan treatment on eGFR decline are based on very small changes in serum creatinine which might be largely explained by decreased intake of cooked meat (sources of dietary creatinine) because of thirst/hyponatremia. The concern is that the obligatory high fluid intake of tolvaptan therapy, which necessarily results in high urine output, could be deleterious to polycystic kidney function. The present work is in the position to address that risk. For example, by examining quantitatively the relationship between increased urine values and estimate eGFR decline.

The authors suggest that this work could be used to identify renal risk in individual patients. That seems unlikely. Although there is a highly significant correlation between lower urine osmolality and increased renal risk, the r^2 of that association shows that 75% of the association is explained by factors other than low Uosm.

The authors do not show ROC curves to further assess for sensitivity and specificity of low Uosm on the risk of renal progression. That would be appropriate and would give a better idea of the extent to which the present work is relevant to individual patient management.

Reviewer 2:

This paper, "Fasting urinary osmolality: a relevant biomarker for CKD progression" by Dr Tabibzadeh et al presents interesting findings and context for the possible relevance of measuring fasting urine osmolality as a biomarker for renal proximal tubular function in the context of chronic kidney disease, with potential for clinical utility in assessing risk of progression to ESRD.

A few comments on this work:

The study has a few limitations that are not mentioned by authors.

First, the population is limited to CKD patients. The range of osmolality in general population or its association with CKD, ESRD, or mortality risk are therefore unknown, and so these data have unclear relevance or generalizability to non-CKD populations.

24 h urine collections were done, but there is no discussion of measurement error. Patients tend to introduce substantial measurement error in these types of collections, predominantly due to lack of familiarity with protocols and variation in discard of the first urination. This should be mentioned in limitations as a possible source of random error.

The authors defined ESRD as initiation of RRT, but many patients delay initiation of RRT for several months after ESRD diagnosis. Therefore, there could be ESRD cases that are not identified by this definition. Authors could consider adding patients with $eGFR < 15$ or physician diagnosis of ESRD to their definition, or else consider this a possible source of measurement/Type II error.

The patient population included people as young as 18; however, ostensibly, the pathologic features of CKD and ESRD in these young adult age ranges is very different from older ages. The authors may consider effect modification by age, with either stratified or interaction modeling.

More details are needed on measurement and data collections, particularly with respect to variable and covariate definitions. E.G. race/ethnicity, smoking habits and history, obesity, CV history, etc.

Annexe 2. Tableaux des amorces et anticorps utilisés dans la troisième partie

Allèle concerné	Oligonucléotides	Séquence
Upk3a-GFP/cre/ER ^{T2}	Transgène sens	AGG AGC TTT GCA GAA GAC CA
	Transgène antisens	GAA CTT CAG GGT CAG CTT GC
	Contrôle sens	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG
	Contrôle antisens	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT
Gt(ROSA)26Sor ^{tm1Sor}	Commun (sens)	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT
	Mutant (antisens)	GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC
	Sauvage (antisens)	GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG

Oligonucléotides fournis par Eurofins Genomics (Luxembourg), séquences fournies par Jackson Laboratory. L'allèle Upk3a-GFP/cre/ER^{T2} correspond à l'allèle porté par les souris Cre⁺, le gène de fusion cre/ER^{T2} étant sous le contrôle du promoteur de l'uroplakine de type 3a (upk3a). ER, estrogen receptor. L'allèle Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor} est porté par les souris lox/lox, dont le génome comporte le gène du récepteur de la toxine diphtérique précédé par un codon stop encadré par des séquences loxP.

Cible de l'anticorps	Laboratoire	Dilution	Espèce cible de l'anticorps secondaire
Uroplakine de type 3	Santa Cruz, Dallas, TX, USA	1/200	Mouton
CD3	Dako, Santa Clara, CA, USA	1/200	Lapin
F4/80	BioRad, Hercules, CA, USA	1/1000	Rat
Ki67	Abcam, Cambridge, Royaume Uni	1/500	Lapin

Anticorps secondaires ciblant les IgG des espèces citées, couplées à la peroxydase de raifort (Histofine, Nishirei Biosciences, Tokyo, Japon).

Table des illustrations

Figure 1. Morphologie interne du rein	8
Figure 2. Schéma des différentes zones rénales.	9
Figure 3. Voies excrétrices intra-rénales.....	11
Figure 4. Schéma de deux néphrons.....	13
Figure 5. Territoires vasculaires du rein.....	14
Figure 6. Microvascularisation artérielle et veineuse.....	15
Figure 7. Etude ultrastructurale de R. Verani et M. Bulger des cellules urothéliales des différentes zones du pelvis rénal	19
Figure 8. Schéma du phénomène de multiplication à contre-courant dans une anse de Henle au niveau de la médulla externe.....	21
Figure 9. Schéma des regroupements médullaires de canaux collecteur, vasa recta ascendants (AVR), et branches ascendantes fines de Henle.....	22
Figure 10. Espaces interstitiels nodaux	25
Figure 11. Vessie et urothélium intra-rénal normaux et après UUO.....	35
Figure 12. Expression des uroplakines dans l'urothélium intra-rénal normal et après UUO..	36
Figure 12. Mécanisme d'ablation conditionnelle des cellules exprimant l'uroplakine de type III.....	75
Figure 13. Croisement des souris C57Bl/6-ROSA26STOP*DTR et des souris C57Bl/6-UpK3a-Cre.	76
Figure 14. Electrophorèse des produits de PCR de l'ADN des souris.....	80
Figure 15. Organigramme de l'étude.....	81
Figure 16. Phénotype des souris.....	82
Figure 17. Destruction de l'urothélium.....	83
Figure 18. Expression de l'uroplakine III à la surface de l'urothélium intra-rénal avant et après injection de toxine diphtérique (DT).....	85

Résumé :

Le rein profond correspond aux structures médullaires, vasculaires post-glomérulaires, et à l'urothélium intrarénal. Cette définition regroupe des acteurs de la physiologie rénale dont l'étude est parfois difficile du fait de leur localisation. La fonction de concentration en particulier se rattache directement à ces structures profondes. L'objet de l'étude est donc une approche physiopathologique des altérations du rein profond, qu'elles soient à l'origine de la pathologie rénale, ou qu'elles en soient le reflet. La première partie du travail repose sur des données épidémiologiques de patients atteints d'une maladie rénale chronique et montre que la diminution de l'osmolalité urinaire à jeun est prédictive d'une dégradation du débit de filtration glomérulaire et d'une insuffisance rénale terminale chez ces patients. La deuxième étude porte sur le rôle des capillaires péritubulaires d'une part dans l'hémodynamique rénale, d'autre part dans l'apparition des lésions tubulaires. Dans un modèle d'hypertension artérielle, le rôle des capillaires péritubulaires dans la toxicité rénale de l'hème y est précisé. Enfin, la troisième partie concerne la structure la plus profonde du rein, l'urothélium intrarénal. Des données de la littérature laissant entrevoir son rôle potentiel dans les fonctions rénales, un modèle murin transgénique d'ablation conditionnelle de l'urothélium a été mis au point. L'osmolalité urinaire était diminuée et l'urée et la créatininémie étaient augmentées après ablation des cellules urothéliales. Ces résultats suggèrent un rôle de l'urothélium intrarénal dans la fonction de concentration des urines ; son rôle en physiopathologie doit encore être précisé.

Mots clés : [Médulla rénale – hyposthénurie – microvascularisation – physiopathologie rénale]

The deep kidney in kidney disease physiopathology

Abstract :

The deep kidney corresponds to medullary tubulo-interstitial, post-glomerular vascular structures and to intrarenal urothelium. Localization of these structures often renders their study and analysis difficult. Several kidney functions are related to these structures, in particular urine concentrating ability. The aim of the study was to investigate deep kidney damage, as the cause or the consequence of renal disease. The first part is based on a chronic kidney disease cohort, showing that fasting urine osmolality was decreased in these patients and that this decrease was independently predictive of kidney function decline et end-stage renal disease. The second part displays the role of peritubular capillaries on renal hemodynamics as well as on tubular lesions. Renal heme toxicity on these capillaries is presented in an experimental model of hypertension. Finally, based on literature suggesting its potential role in kidney functions, the third part aims at studying intrarenal urothelium in a murine model of conditional ablation of these cells. The study showed an effective cell ablation and, interestingly, a urine osmolality decrease along with plasma urea and creatinine increase. These results suggest that intrarenal urothelium contributes to urine concentrating mechanisms; its role in renal physiopathology needs further investigation.

Keywords : [Kidney medulla – hyposthenuria – microvascularization – renal physiopathology]