



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par

l'Université Toulouse III - Paul Sabatier (UT3Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Physiopathologie en Réanimation

Présentée et soutenue par :

Nicolas MAYEUR

Le mercredi 24 octobre 2012

Titre :

Caractérisation de l'impact rénal à court et long terme du choc hémorragique expérimental murin

JURY

Mr Jean-Michel Constantin (PU-PH, Clermont-Ferrand)-Examineur

Mr Jean Claude Dussaule (PU-PH, Paris)-Rapporteur

Mr Olivier Fourcade (PU-PH, Toulouse)-Examineur

Mr Vincent Minville (PU-PH, Toulouse)-Co-directeur

Mr Samir Jaber (PU-PH, Montpellier)-Rapporteur

Mr Ivan Tack (PU-PH, Toulouse)-Directeur

Ecole doctorale : *Biologie, Santé, Biotechnologie (BSB)*

Unité de recherche : *Inserm UMR-1048 équipe 12 et Laboratoire de Physiologie*

Directeur(s) de Thèse : *Mr Ivan Tack (PU-PH) et Mr Vincent Minville (PU-PH)*

Rapporteurs :

Mr Jean Claude Dussaule (PU-PH, Paris)

Mr Samir Jaber (PU-PH, Montpellier)



THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Paul Sabatier

Discipline ou spécialité : Physiopathologie en Réanimation

Présentée et soutenue par **Nicolas MAYEUR**

Le mercredi 24 octobre 2012

Caractérisation de l'impact rénal à court et à long terme du choc hémorragique expérimental murin

Ecole doctorale : Biologie, Santé, Biotechnologie

Unité de recherche : Inserm UMR-1048 équipe 12 et laboratoire de Physiologie

Directeurs de Thèse : Mr Ivan Tack (PU-PH) et Mr Vincent Minville (PU-PH)

Rapporteurs :

Mr Jean Claude Dussaule (PU-PH, Paris)

Mr Samir Jaber (PU-PH, Montpellier)

Membre(s) du jury :

Mr Jean Michel Constantin (PU-PH, Clermont-Ferrand)-Examinateur

Mr Jean Claude Dussaule (PU-PH, Paris)-Rapporteur

Mr Olivier Fourcade (PU-PH, Toulouse)-Examinateur

Mr Samir Jaber (PU-PH, Montpellier)-Rapporteur

Mr Vincent Minville (PU-PH, Toulouse)-Co-directeur

Mr Ivan Tack (PU-PH, Toulouse)-Directeur

Je remercie,

les Prs Jean Claude Dussaule et Samir Jaber ainsi que le Pr Jean Michel Constantin d'avoir accepté d'améliorer et juger mon travail,

le Pr Olivier Fourcade de m'avoir soutenu et encouragé à réaliser cette Thèse,

mes deux directeurs de Thèse, les Prs Ivan Tack et Vincent Minville. J'ai une pensée particulière pour toi, Ivan, car tu m'as accompagné de la Thèse de Médecine à celle de Sciences. Cette dernière clôture une première période d'intense collaboration pour laquelle je tiens à t'exprimer ma gratitude et mon amitié. Merci également à toi, Vincent, ton encadrement m'a permis de mieux te connaître ; je t'exprime ici mon souhait de pouvoir travailler, à tes côtés, au sein de l'équipe MATN ;

les Drs Joost Peter Schanstra et Jean-Loup Bascands pour leur accueil bienveillant au sein de l'efficace et agréable équipe 12 ! Je pense également au Pr Dominique Chauveau dont les conseils avisés m'ont permis d'obtenir une bourse de l'Académie Nationale de Médecine ;

l'ensemble des membres du Laboratoire de Physiologie Ranguel, et tout particulièrement la jeune retraitée « Maïté » Ranera et le Dr Marie Buléon sans lesquelles aucun de ces travaux n'aurait pu être réalisés. Ce travail est également le vôtre, merci. Merci au Dr Françoise Praddaude pour sa présence amicale et efficace ainsi qu'à Marie Pierre Groussous ;

Virginie Dupuy et le Dr Hélène Charbonneau d'avoir accepté de partager cette aventure à mes côtés !! Cette énergie incroyable que vous avez en commun est un moteur souvent, un plaisir toujours. Je pense également au Dr Stanislas Faguer, pour lequel mon amitié n'a d'égale que mon estime. Avec des amis comme vous, cette Thèse m'a semblé plus facile !!

Mes collègues, les Drs Marion Vallet et David Gasq avec qui j'ai partagé un petit bureau, des fuites d'eau (...), la chaleur estivale et de bons moments!!

Je dédie cette Thèse,

à Corinne, à notre petit ange et à ce nouveau bonheur qui se dessine...

à ma famille,

à tous ceux qui partagent ma vie...

SOMMAIRE/ LISTE DES ABREVIATIONS

Sommaire

<i>SOMMAIRE/ LISTE DES ABREVIATIONS</i>	5
<i>PREAMBULE : Modéliser l'agression rénale aiguë, facteur d'entrée dans la maladie rénale chronique</i>	9
<i>I. L'ETAT DE CHOC</i>	13
<i>II. L'INSUFFISANCE RENALE AIGUE EN REANIMATION</i>	35
<i>III. MODELES MURINS D'INSUFFISANCE RENALE AIGUE</i>	59
<i>IV. APPLICATION DU MODELE A UNE POPULATION PARTICULIERE</i>	83
<i>V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</i>	103
<i>VI. ANNEXES</i>	107
<i>TABLES DES MATIERES, FIGURES ET TABLEAUX</i>	155
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	159

Liste des abréviations

- ADH : hormone anti diurétique
- ADMCC : *Animal Models of Diabetic Complications Consortium*
- AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens
- AKIN : *Acute Kidney Injury Network*
- ARA : agression rénale aiguë
- ARNm: acide ribonucléique messenger
- CIVD : coagulation intra vasculaire disséminée
- CO₂: dioxyde de carbone
- Cr⁵¹ : chrome
- CRP : protéine C reactive
- CTGF : *Connective Tissue Growth Factor*
- DO₂ : apport tissulaire en oxygène
- DMO : défaillance multi organique
- EDTA : acide éthylène diamine tetra-acétique
- ELISA : *Enzyme Linked Immunoenzymatic Assay*
- IFCC : *International Federations of Clinical Chemists*
- HCO₃⁻ : ion hydrobcarbonate
- HPLC : chromatographie liquide à haute performance
- Ig: immunoglobuline
- IGF-1 : *Insuline Like Growth Factor-1*
- IRA : insuffisance rénale aiguë
- IRC : insuffisance rénale chronique
- IRCT : insuffisance rénale chronique terminale
- FDA : *Food and Drugs Administration*
- FGF : *Fibroblast Growth Factor*
- HIF : *Hypoxic Inducible Factor*
- kDa : kilo Dalton
- KIM-1 : *Kidney Inducible Molecule 1*
- M2R : master 2 recherche
- MDRD : *Modification of Diet in Renal Disease*
- mmHg : millimètres de mercure
- ND : néphropathie diabétique

eNOS : *endothelial NO Synthase*
iNOS : *inducible NO Synthase*
NO : monoxyde d'azote
NFkB : *Nuclear Factor K B*
NGAL : *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*
NTA : nécrose tubulaire aiguë
O₂ : oxygène
PAM : pression artérielle moyenne
PAS : pression artérielle systémique
PDGF : *Platelet Derived Growth Factor*
PENIA : *Particle-Enhanced Nephelemetry Immunoassay*
PETIA : *Particle-Enhanced Turbidimetric Immunoassay*
PM : poids moléculaire
PO₂ : pression en oxygène
RIFLE : *Risk Injury, Failure, Lesion, End stage renal failure*
RLO : radicaux libres oxygénés
SDMO : syndrome de défaillance multi-organique
SRA : système rénine angiotensine
TaO₂ : transport artériel en oxygène
Tc^{99m} : technétium marqué
TEM : transition épithélio mésenchymateuse
TGF-β : *Transforming Growth Factor β*
USA : Etats-Unis d'Amérique
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
VEGF-R : *Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor*
VO₂ : consommation en oxygène

PREAMBULE : Modéliser l'agression rénale aiguë, facteur d'entrée dans la maladie rénale chronique

L'équipe du Laboratoire de Physiologie Rénale de Ranguel qui m'a accueilli le temps d'un Master 2 et d'une Thèse de troisième cycle, a dévolu l'essentiel de son activité de recherche expérimentale à la modélisation animale de maladies à impact rénal (diabète, obésité, obstruction urétérale et lithiase rénale). Cette approche a pour objet de développer des modèles expérimentaux murins permettant, avec un niveau d'anthropomorphisme raisonnable, une approche physiopathologique orientée vers la néphroprotection. Si, jusqu'à présent les modèles mis en œuvre ont, la plupart du temps, ciblé directement la maladie rénale chronique, le présent travail a répondu à l'émergence récente, dans la littérature, du rôle important que joue l'agression rénale aiguë (ARA) dans l'apparition de dommages rénaux chroniques. Mon travail a donc été de développer, chez la souris, un modèle reproductible d'insuffisance rénale aiguë (IRA) par un mécanisme d'ARA purement hémodynamique et d'en vérifier l'applicabilité. Bien qu'intuitivement évident, la littérature semblait indiquer qu'un épisode isolé d'hypotension chez la souris ne provoque pas d'IRA. En effet, les travaux des années 1970 et 1980 ont montré l'incapacité à tenir un double objectif : 1) générer un impact rénal suffisamment sévère pour aboutir à une véritable IRA organique et, 2) permettre la survie de l'animal à distance de l'hypotension. Cet échec a été mis en avant dans de nombreuses revues de la littérature consacrées à ce sujet. Plusieurs auteurs ont remis en cause l'existence même d'une IRA d'origine exclusivement hémodynamique concluant en son caractère obligatoirement multi factoriel.

Plusieurs arguments laissaient néanmoins percevoir que cette modélisation était réalisable. En premier lieu, les études les moins optimistes chez le muridé avaient

utilisé le rat comme modèle, ce qui rendait possible un particularisme d'espèce. De plus, des études anciennes réalisées chez d'autres animaux (chien) mais aussi chez l'humain au cours des guerres de la première moitié du XX^{ème} siècle - sur lesquelles sont d'ailleurs basées en grande partie nos connaissances physiopathologiques de l'état de choc hypovolémique – laissaient supposer la possibilité d'un impact rénal. Parallèlement, on pouvait supposer que les progrès techniques constants en réanimation permettraient d'améliorer la survie des animaux dans les suites d'une hypotension prolongée. Enfin, quelques études récentes chez la souris ou chez le rat avaient mis en évidence, mais de manière fragmentaire, un impact rénal indéniable de l'hypotension. Nous nous sommes donc attachés à déterminer un niveau de pression artérielle et une durée de procédure qui permettent d'aboutir à une IRA organique. Puis, nous avons validé ce modèle en analysant les fonctions tubulaires et glomérulaires, mais aussi la morphologie et les réponses cellulaires en nous concentrant principalement sur l'hypoxie. L'hypoxie, est actuellement beaucoup étudiée du fait de l'existence des hypothèses soutenant qu'elle représente : 1) un mécanisme « clef » de l'aggravation de l'insuffisance rénale chronique (IRC), mais également 2) un lien physiopathologique entre l'IRA et l'IRC. La première partie du travail a fait l'objet d'une publication (**manuscrit n°1**), de deux posters (**annexes n°4 et n°5**) et d'une communication orale.

Pour compléter la compréhension de notre modèle, nous nous sommes ensuite attachés à analyser son impact sur une population d'animaux diabétiques. Dans une logique d'anthropomorphisme, nous avons choisi des souris db/db obèses et diabétiques (type II) dont les complications rénales sont proches de celles observées chez l'humain. L'hypoxie décrite à l'état basal dans le parenchyme rénal des animaux diabétiques fournissait un lien moléculaire qui nous est apparu pertinent. De plus, l'existence chez l'animal diabétique d'une prédisposition rénale à l'agression aiguë et le rôle potentiel

de l'hypoxie dans cette prédisposition sont encore débattus : certains auteurs considèrent que l'hypoxie chronique observée au sein du parenchyme diabétique est protectrice vis-à-vis des futures agressions rénales par un mécanisme de tolérance alors que d'autres soutiennent, au contraire, que chez les animaux diabétiques, une agression identique entraîne un impact rénal plus sévère du fait de l'hypoxie préalable. Cette partie du travail a fait l'objet d'une publication (**manuscrit n°2**) et d'un poster (**annexe n°6**).

Enfin, parce que la modélisation expérimentale implique aussi d'optimiser les méthodes d'évaluation biocliniques, nous nous sommes attachés à améliorer l'estimation du débit de filtration glomérulaire (DFG) chez la souris. En effet, les techniques de mesure du DFG sont complexes et les marqueurs d'estimation historiques du DFG, bien que fréquemment utilisés, présentent en fait, de sérieuses limitations. Nous avons donc étudié l'intérêt d'une protéine de bas poids moléculaire, la cystatine C, comme marqueur d'estimation du DFG chez la souris. En effet, cette protéine semble plus efficace que la créatinine pour évaluer le DFG chez l'humain, mais son intérêt, chez la souris, n'est pas connu. Nous avons ainsi réalisé chez 80 souris une comparaison entre la cystatine C plasmatique, la créatininémie (toutes les deux obtenues par deux techniques de dosage), l'urée et la clearance urinaire de l'inuline qui est une technique de référence pour la mesure du DFG. Nous avons choisi de présenter ces résultats sous la forme d'une note technique et, de ce fait, avons placé l'ensemble de la section en annexe (**annexe n°1/ manuscrit n°3, en cours de soumission**).

I. L'ETAT DE CHOC

L'état de choc peut être induit par différentes circonstances. Au cours de cette brève revue de la littérature, nous expliquerons : 1) pourquoi nous avons choisi un modèle d'hypotension par choc hémorragique à pression contrôlée ; 2) quels sont les mécanismes adaptatifs mis en œuvre par l'organisme en réponse à l'hypovolémie ; 3) l'importance de la composante systémique/multiorganique dans l'impact rénal du choc.

A. Définitions et classification des états de choc

1. Définitions de l'état de choc

Il existe de nombreuses définitions de l'état de choc. Certaines se basent sur des paramètres circulatoires et d'autres exclusivement sur la notion de défaillance métabolique. Une définition consensuelle pourrait être que « l'état de choc est la conséquence d'une insuffisance circulatoire aiguë qui altère de façon durable l'oxygénation et le métabolisme des différents tissus et organes »¹.

2. Classification des états de choc

L'état de choc circulatoire provient de quatre principales catégories d'anomalies hémodynamiques : l'hypovolémie, l'insuffisance cardiaque, les défauts de distribution de la circulation sanguine et l'obstruction vasculaire. Cette classification a été décrite par Weil en 1979² (**Tableau 1**).

(1) *Le choc hypovolémique*

Ce mécanisme est responsable de la majorité des états de choc et provient d'un déficit en volume intra-vasculaire. L'organisme peut s'adapter à une réduction importante de ce volume, néanmoins une réduction aiguë supérieure à 60% du volume

intra-vasculaire faisant suite à une perte (exogène ou endogène) de sang, de plasma et/ou de fluides riches en électrolytes, menace immédiatement le pronostic vital²⁻³.

(2) *Le choc cardiogénique*

Le choc cardiogénique représente une défaillance primaire de la pompe cardiaque. Le rythme, la conduction cardiaque, la contractilité ou la capacité de travail du myocarde sont suffisamment altérés pour que le débit cardiaque soit réduit de façon critique⁴.

(3) *Le choc distributif*

Le choc distributif représente la troisième catégorie d'anomalie hémodynamique potentiellement responsable d'un état de choc. Il diffère des autres catégories par un profil hémodynamique et métabolique particulier : le débit cardiaque est souvent normal, voire augmenté, mais les pressions de remplissage ainsi que les résistances vasculaires sont effondrées. De plus, la consommation en oxygène peut être augmentée mais l'extraction en oxygène est limitée en périphérie du fait de troubles microcirculatoires qui expliquent en partie l'inadéquation entre la consommation et l'apport réel en oxygène aux tissus. Cette partie de la classification historique de Weil est celle dont la pertinence clinique et physiopathologique paraît la plus éloignée des connaissances actuelles en matière de métabolisme cellulaire et de microcirculation⁵.

Néanmoins, deux grands sous-ensembles de défauts de distribution sont classiquement décrits : ceux à faible résistance et ceux à haute résistance. Dans l'anomalie de faible résistance, le sang est shunté de la circulation artérielle à la circulation veineuse sans échange métabolique au niveau cellulaire. Ce sous-ensemble était, par exemple, rattaché aux anomalies observées chez les patients en état de choc septique.

Le choc distributif à haute résistance est caractérisé par une séquestration vasculaire, en particulier dans le réseau de capacitance veineuse et représente une forme « d'hypovolémie relative ». Chez ces patients, le volume total intravasculaire peut être normal ou proche de la normale, mais la volémie circulante efficace est diminuée du fait d'une augmentation de la capacitance intra-vasculaire globale. Ce sous-ensemble décrivait, entre autres, les anomalies hémodynamiques des patients présentant certaines intoxications (barbituriques).

(4) *Le choc obstructif*

Ce dernier type de défaillance circulatoire à l'origine d'un état de choc provient d'une obstruction à l'éjection du flux sanguin. Cette dernière s'oppose à la perfusion tissulaire efficace. Ce mécanisme est caractéristique de pathologies comme l'embolie pulmonaire, la dissection aortique ou la tamponnade péricardique⁶⁻⁸.

Reclassification of Shock States

Type of shock	Cause
Hypovolemic shock	
Exogenous	Blood loss due to hemorrhage Plasma loss due to burn, inflammation Electrolyte loss due to diarrhea, dehydration
Endogenous	Extravasation due to inflammation, trauma, application of a tourniquet, anaphylaxis, and pheochromocytoma
Cardiogenic shock	Myocardial infarction Cardiac failure Arrhythmia
Distributive shock	
High or normal resistance (increased venous capacitance; selective or general)	Bacillary shock Barbiturate intoxication CNS injury Ganglionic blockade
Low resistance (arteriovenous shunt)	Inflammatory vasodilation due to pneumonia, peritonitis, abscess; reactive hyperemia
Obstructive shock (by anatomic site and mechanism)	
a. Vena cava	1. Compression
b. Pericardium	2. Tamponade
c. Cardiac chambers	3. Ball-valve thrombus
d. Pulmonary circuit	4. Embolism
e. Aorta	5. Dissecting aneurysm

Tableau 1 : Principaux types de choc selon Weil²

3. Perpétuation de l'état de choc

L'un des quatre mécanismes décrits ci-dessus peut individuellement être responsable d'un état de choc, mais cette définition est avant tout un outil pédagogique. La réalité est plus complexe, en particulier pour les chocs dits distributifs⁵, et la perpétuation de l'état de choc implique souvent plusieurs mécanismes. L'état de choc cardiogénique peut ainsi être associé à une anomalie distributive par vasoconstriction ou hypovolémique *via* une extravasation de fluide dans l'espace extra-vasculaire suite à l'augmentation de la pression hydrostatique. De même, au cours d'un choc

hypovolémique, la réduction de la perfusion coronaire, la susceptibilité aux infections ou une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) peuvent entretenir l'état de choc par des mécanismes respectivement cardiogéniques, distributifs ou obstructifs. Enfin, les chocs anaphylactiques sont à la fois distributifs et hypovolémiques et le choc septique combine fréquemment une part cardiogénique, hypovolémique et distributive^{1-5, 9-10}. Cette complexité physiopathologique est associée à une forte variabilité inter-individuelle : les données épidémiologiques et expérimentales soulignent ainsi que le terrain (sexe, âge, patrimoine génétique) joue un rôle important dans la réponse à l'hémorragie et à sa thérapie¹¹⁻¹².

L'intérêt principal du choc hémorragique, en comparaison aux autres mécanismes circulatoires à l'origine d'un état de choc, est de pouvoir être « standardisé ». En effet, les autres catégories de choc peuvent présenter de fortes variations inter-individuelles dans le délai d'apparition ou la sévérité de l'état de choc ainsi que dans la réponse à la réanimation. C'est pour cette raison que nous nous sommes basés sur le choc hémorragique pour mettre au point un modèle d'agression rénale aiguë (ARA) d'origine purement hémodynamique.

B. Particularités du choc hémorragique

1. Données générales chez l'Homme

Le traumatisme est la principale cause de décès dans le monde des personnes âgées entre 5 et 44 ans¹³. Jusqu'à 50% des décès prématurés sont dus à une hémorragie massive et cette dernière est le principal défi associé à une lésion traumatique¹⁴. Dans le domaine clinique, la question du choc hémorragique est devenue aiguë au cours de la seconde guerre mondiale, au moment où les possibilités techniques ont permis le remplissage vasculaire par des solutés¹⁵⁻¹⁶. Par la suite, ces injections de solutés de

remplissage ont été protocolisées au cours de la guerre de Corée¹⁷. En parallèle, des études se sont multipliées confirmant que le choc hémorragique est un facteur de mauvais pronostic chez le patient traumatisé. Il est désormais établi qu'une hypotension initiale post traumatique est associée à une mortalité plus importante mais également à des complications comme la défaillance multi-organique (DMO), le développement d'infections comme la pneumonie et la septicémie ou l'aggravation d'un traumatisme crânien¹⁸.

2. Le choc hémorragique est un choc hypovolémique

a) Définition de la volémie

La volémie, qui correspond au volume sanguin total circulant, est un élément essentiel de l'hémodynamique systémique. Elle conditionne le débit cardiaque. Cette relation capitale volémie/débit cardiaque est basée sur les travaux de Starling et de ses collègues (Patterson et Frank) réalisés il y a plus de 100 ans et qui ont abouti à la « loi du cœur »¹⁹ (**Figure 1**).

(1) L'hypovolémie

L'hypovolémie peut être définie comme une précontrainte pariétale cardiaque (précharge) insuffisante. Cela signifie que le volume d'éjection systolique (et donc le débit cardiaque) est dépendant des variations du volume sanguin central. En inversant la relation, on peut conclure qu'en situation d'hypovolémie, la variation du volume sanguin central induit une variation du volume d'éjection systolique²⁰. L'intérêt de cette lecture inversée provient du fait que le volume d'éjection systolique est facilement évaluable, contrairement au volume sanguin central. Ainsi, établir que le volume d'éjection augmente après une augmentation du volume sanguin circulant peut être une

définition, *a posteriori*, d'un état hypovolémique. C'est pour cette raison que l'hypovolémie est également nommée, par analogie, précharge-dépendance²¹.

(2) *L'hypervolémie*

A l'inverse de l'hypovolémie, le volume intra-vasculaire peut être augmenté au-delà du seuil de précharge optimal. Dans cette situation, toute augmentation du volume sanguin central peut être délétère : Bundgaard-Nielsen et al. ont montré qu'une augmentation de 16% du volume diastolique cardiaque pouvait réduire de 12% le volume d'éjection systolique, ce qui confirme l'existence d'une inversion de pente à l'extrémité droite de la courbe de Frank Starling et définit l'hypervolémie^{19, 22}.

(3) *L'euvolémie*

Par interpolation entre hypo et hypervolémie, l'euvolémie est le point de précharge cardiaque pour lequel le volume d'éjection systolique n'augmente plus dans les suites d'une expansion volémique²³. Une définition valable de l'euvolémie pourrait également être la capacité à fournir au cœur un volume sanguin central optimal, c'est à dire un volume pour lequel la capacité de la pompe cardiaque n'est pas limitée par sa précharge²⁴.

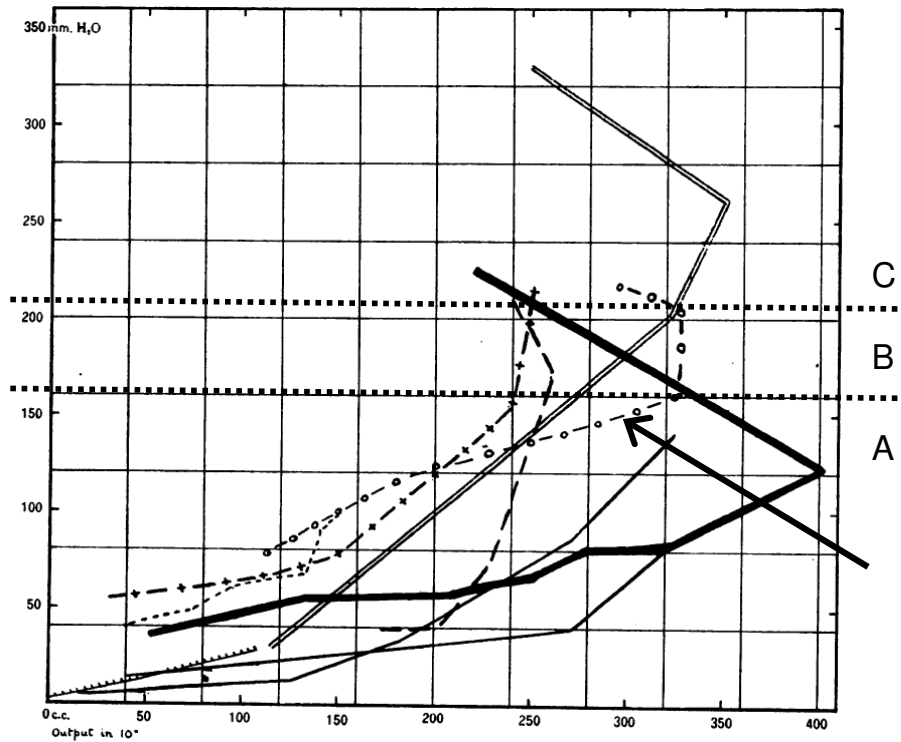


Figure 1: Variations du débit cardiaque en fonction de sa pression de remplissage. Chaque courbe représente des analyses successives sur un cœur de chien *ex vivo* pour différents volumes de remplissage des cavités cardiaques. Sur la courbe désignée par une flèche nous notons trois différentes phases : une phase d'hypovolémie pendant laquelle une augmentation du volume induit une augmentation du débit (A), une phase d'euvolémie durant laquelle les variations du volume ne modifient plus le débit cardiaque (B), et une phase d'hypervolémie durant laquelle une augmentation de volume supplémentaire diminue le débit cardiaque (C).

Patterson and Starling : « The optimum venous pressure is the amount necessary to produce "maximal" dilatation of the heart during the period of diastole »¹⁹.

b) Les différents modèles de choc hémorragique

Le choc hémorragique a d'abord été étudié par Cannon et Blalock²⁵. Quelques années plus tard, Wiggers et Guyton ont également développé une variété de modèles animaux de choc hémorragique contrôlé²⁶⁻²⁷. D'autres modèles ont par la suite été décrits selon des procédés ou des objectifs de déplétion sanguine variables^{3, 28-29}. Ces études ont permis de montrer que la gravité du choc est liée au degré et à la durée de l'hypovolémie. Récemment, Deitch a classé ces modèles en trois catégories générales : saignement incontrôlé, volume contrôlé et pression artérielle contrôlée³⁰.

(1) *Modèle à pression contrôlée*

Dans ce modèle décrit par Wiggers, une spoliation sanguine est effectuée afin de diminuer la pression artérielle moyenne (PAM) à une valeur cible. Cette pression est maintenue durant une période prolongée puis l'animal est réanimé en fin de choc avec restitution de son propre sang ainsi que, pour les modèles décrits plus tardivement, par un volume de soluté de remplissage variable. Ce type de modèle permet d'étudier différentes intensités et durées de choc chez un animal, ainsi que leurs impacts multi-organiques. Un deuxième intérêt de ce type de modèle est de pouvoir prolonger le choc jusqu'à une phase durant laquelle il devient « décompensé », c'est-à-dire jusqu'à un stade aboutissant à un échec de la réanimation et au décès de l'animal.

(2) *Modèle à volume contrôlé*

Dans un deuxième modèle, défini comme étant à volume contrôlé, la spoliation sanguine est prédéterminée et est réalisée progressivement, ce qui permet d'évaluer les mécanismes compensateurs mis en place par l'organisme³. Ce type de modèle a permis de définir les différentes phases de réponses neuro-hormonales à l'hypovolémie.

(3) *Modèle à saignement incontrôlé*

Ce dernier type de choc consiste à réaliser une spoliation incontrôlée par section d'un organe ou d'un vaisseau. Ce modèle est intéressant car c'est le mécanisme qui se rapproche le plus de ce que l'on peut observer en situation clinique humaine. En effet, chez l'humain, la perte sanguine n'est pas contrôlée. Elle est régulée par l'hémodynamique systémique et celle de la zone lésée. Néanmoins, le principal inconvénient de ce modèle est l'absence de standardisation et la forte variabilité inter-individuelle qui en résulte.

Nous avons décidé de baser notre modélisation sur un choc de type Wiggers afin de : 1) déterminer l'impact rénal pour différentes durées et différents niveaux de pression artérielle cible ; 2) définir la durée et la profondeur de l'hypotension aboutissant à un état de choc décompensé.

c) Impact hémodynamique de la spoliation sanguine

Les variations de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (FC) au cours d'une spoliation sanguine illustrent les difficultés, préalablement citées, à suivre précisément le volume sanguin central chez les humains³¹⁻³². Les premières observations documentées sont celles de la Seconde Guerre mondiale chez des victimes en état de choc hypovolémique au cours d'un raid aérien¹⁵⁻¹⁶ et chez des volontaires ayant « bénéficié » de prélèvements sanguins de grande quantité³³. Ces travaux ont souligné la corrélation entre la perte sanguine, la FC, la pression artérielle et le pronostic des patients en état de choc hypovolémique. Bien qu'observée dès les premiers travaux de Blalock et Wiggers, l'apparition d'une bradycardie paradoxale chez les patients en état de choc n'a été caractérisée que plus tardivement³⁴⁻³⁵.

(1) Réponse neuro-hormonale :

La régulation de la volémie est effectuée par les barorécepteurs centraux à basse et à haute pression. Nous n'allons pas décrire dans ce travail les voies du baroréflexe mais il convient de noter que de nombreuses réponses neuro-hormonales sont impliquées dans la réponse à l'hémorragie aiguë : les hormones cortico-surréaliennes³⁶ en premier lieu mais également les opioïdes endogènes³⁷, les systèmes sérotoninergiques³⁸, les hormones sexuelles³⁹ ou le NO⁴⁰ ...

L'objectif de cette réponse est de maintenir la perfusion tissulaire, toutefois elle induit systématiquement des variations importantes au sein des perfusions régionales.

Le modèle de choc hémorragique (avec les modèles basés sur les variations thermiques et l'effort physique) a d'ailleurs été essentiel dans l'analyse des débits régionaux et a permis la caractérisation des circulations, dites « vitales », qui alimentent des organes dits « nobles » : le cerveau, le myocarde et, à un moindre degré, le rein⁴¹⁻⁴⁴.

(2) Réponse hémodynamique systémique : différentes phases

*La description de l'évolution des principaux paramètres hémodynamiques au cours des différentes phases est schématisée sur la **Figure 2**.*

(a) Première phase

La première étape de la réponse à une hémorragie chez l'Homme est induite par une réduction du volume de sang d'environ 15%. Une augmentation modeste de la FC est notée (100 battements/min) mais l'augmentation des résistances vasculaires périphériques compense la perte volémique et permet le maintien d'une pression artérielle normale^{32, 45}. En effet, la boucle réflexe des barorécepteurs à haute et basse pressions ainsi que les chémorécepteurs aortiques sino carotidiens ou centraux (stimulés par les conséquences de l'ischémie tissulaire) augmentent le tonus sympathique périphérique artériel⁴⁵. Cette augmentation de tonus touche également le territoire veineux, à forte capacitance, et permet de mobiliser une réserve de sang (jusqu' à 80% du volume sanguin total). Cette vasoconstriction a pour conséquence d'optimiser le débit sanguin tissulaire en privilégiant les circulations « vitales » au détriment des autres territoires (musculo-cutané, splanchnique). Cette redistribution régionale permet d'optimiser la consommation en oxygène (VO_2) de l'organisme en abaissant le seuil de transport artériel en oxygène (TO_2) critique. Néanmoins, cette vasoconstriction régionale semble jouer un rôle, quand elle se prolonge, dans l'apparition du syndrome de défaillance multi-organique (SDMO). Elle induit en effet,

dans les territoires sacrifiés, une ischémie tissulaire importante dont le retentissement peut devenir systémique⁴⁶.

(b) Deuxième phase

La deuxième étape est marquée par une diminution de la résistance et de la pression artérielle attribuée principalement au réflexe de Bezold-Jarisch (sympatho-inhibition)⁴⁷⁻⁴⁹. Cette phase a été décrite comme intervenant au-delà d'une spoliation de 50% de la masse sanguine initiale. Sander-Jensen et al. ont ainsi observé chez des patients ayant présenté une déplétion sanguine importante que la FC était initialement faible et augmentait paradoxalement seulement après le début de la réanimation⁵⁰. Il a été proposé que cette sympatho-inhibition soit liée en partie à une boucle réflexe vago-vagale induite par les mécanorécepteurs intra-cardiaques et qu'elle permet d'optimiser le remplissage des cavités cardiaques. Néanmoins, cette inhibition du tonus sympathique induit une diminution de la pression artérielle et de la FC⁵¹.

La physiopathologie de cette observation n'est néanmoins pas parfaitement comprise. Il est important de noter que la diminution brutale de la pression artérielle est avant tout liée à un effondrement des résistances vasculaires périphériques⁵², car : 1) la réduction du débit cardiaque est plutôt linéaire au cours de la spoliation sanguine et peut même s'interrompre au début de cette phase ; 2) elle est indépendante de la FC et du tonus vagal puisque l'atropine permet, certes une accélération de la FC, mais ne modifie pas la pression artérielle, ce qui souligne le caractère réducteur du terme «sympatho-inhibition» utilisé pour décrire cette phase⁴⁶. En effet, plusieurs modifications neuro-hormonales associées à l'inhibition du tonus sympathique sont notées : une activation du système rénine angiotensine (SRA), de l'hormone anti diurétique (ADH) et une forte sécrétion médulo-surrénalienne de catécholamines⁵³. L'impact de cette dernière réponse n'est pas parfaitement compris mais elle pourrait

participer à une synthèse accrue de prostaglandine E2 (PGE2) provoquant une diminution de la libération de noradrénaline et donc, paradoxalement, une vasodilatation.

(c) Vers l'état de choc incontrôlé

Lorsque la perte de sang perdure, la pression artérielle diminue et une tachycardie plus importante se manifeste (120 battements/min). Cette troisième étape reflète probablement la transition vers l'état de choc décompensé ou irréversible^{32, 54}.

Ces observations remettent en question le dogme didactique qui veut que l'importance de l'hémorragie soit diagnostiquée facilement par une tachycardie réflexe et une faible pression artérielle. Néanmoins, les valeurs de pression artérielle et de FC sont faciles à obtenir et continuent à servir de moniteurs pour le traitement de l'hypotension et du choc. Cette approche a pour justification le fait que la pression artérielle est la principale variable cardio-vasculaire contrôlée par les barorécepteurs. Toutefois, son interprétation nécessite que les différentes phases de la réponse cardio-vasculaire à l'état de choc hypovolémique soient connues⁵⁵⁻⁵⁶. Il paraît néanmoins inadapté de baser l'évaluation volémique chez les personnes âgées sur ces paramètres, car les changements de FC post hypotension chez ces patients sont insignifiants⁵⁷. Il est donc nécessaire que la surveillance intègre le monitoring du débit cardiaque et du volume d'éjection systolique, car c'est bien d'un débit sanguin et pas seulement d'une pression dont les tissus ont besoin⁵⁸.

En conclusion, ces travaux ont mis en évidence que la description traditionnelle du choc hypovolémique contraste avec la relation non linéaire entre la pression artérielle ou la FC et le degré d'hypovolémie chez l'humain et chez les animaux⁵⁵.

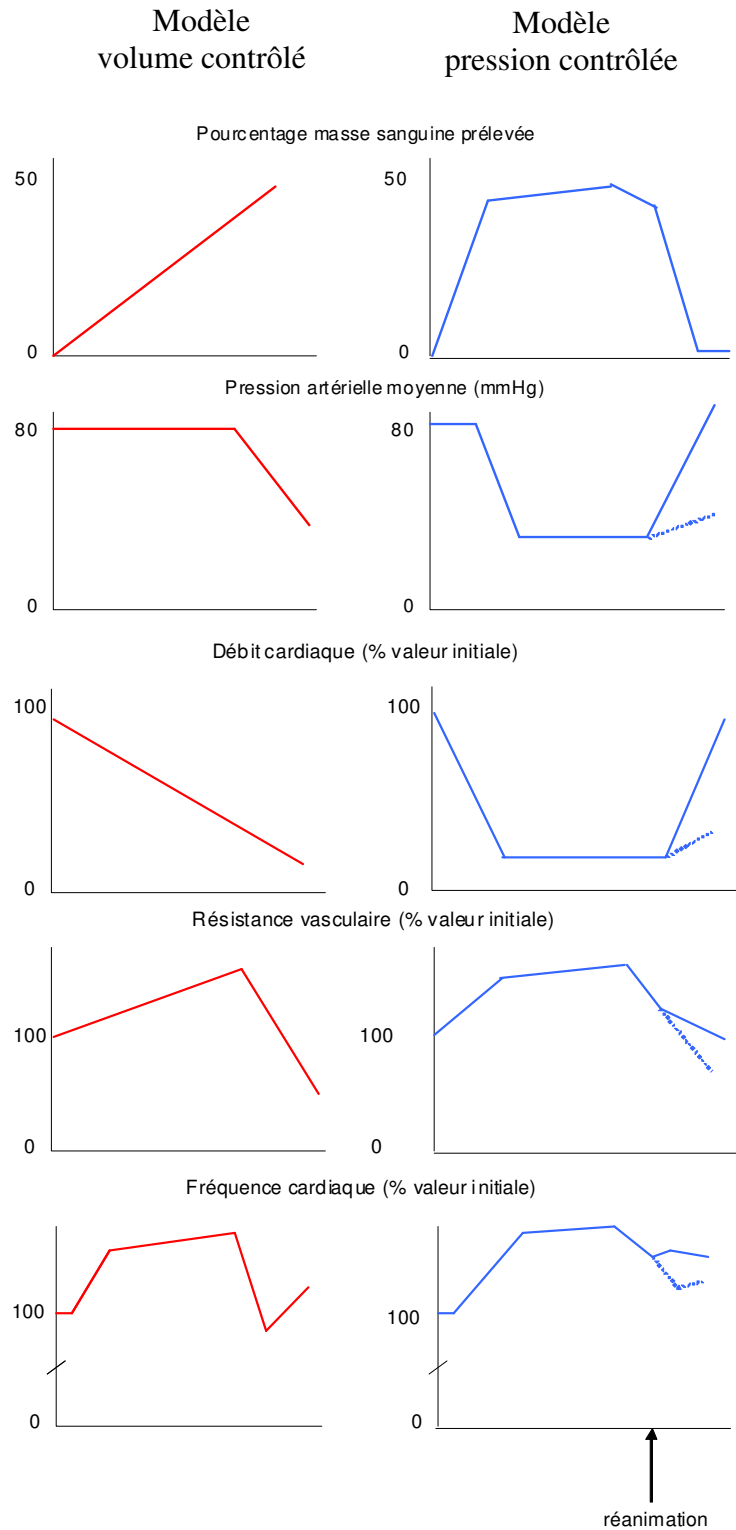


Figure 2: Schématisation des variations hémodynamiques dans les deux modèles les plus utilisés de choc hémorragique contrôlé. Les pointillés soulignent l'évolution en situation de choc hémorragique « décompensé » malgré une réanimation

d) L'anesthésie modifie la réponse hémodynamique à l'hypotension

Les médicaments hypnotiques utilisés pour l'anesthésie générale modifient l'homéostasie hémodynamique. En effet, plusieurs arguments sont en faveur d'une interaction entre l'anesthésie et la régulation ortho et parasympathique.

En premier lieu, l'anesthésie générale provoque une abolition des oscillations de la pression artérielle systolique et de la FC. Ces oscillations réapparaissent au réveil ce qui est en faveur d'une inhibition transitoire, concomitante à l'anesthésie, du système nerveux autonome⁵⁹⁻⁶⁰.

Plus précisément, la plupart des agents anesthésiants induisent une inhibition du tonus sympathique, alors que leur effet parasympathique est plutôt variable. Cette diminution d'activité du système sympathique induit une vasodilatation artérielle et veineuse, associée à une diminution de la commande sympathique cardiaque⁶¹⁻⁶³. En conséquence, le baroréflexe est modifié sous anesthésie générale.

Dans le cadre du choc hémorragique, il a été montré que la chute de pression artérielle au cours d'une hémorragie était identique chez les chiens dont les fibres participant au baroréflexe avaient été sectionnées à ceux sous anesthésie générale barbiturique⁶⁴. Ceci est globalement transposable à l'ensemble des produits anesthésiants, y compris ceux administrés par voie inhalée⁶¹. Seul l'étomidate préserve l'activité sympathique centrale et périphérique sans modifier l'équilibre sympatho-vagal cardiaque et le baroréflexe⁶⁵.

Cette observation souligne la nécessité d'un groupe « sham » en plus du groupe contrôle afin d'étudier efficacement l'impact rénal du choc hémorragique. En effet, l'anesthésie, par elle-même, peut induire des variations de pression artérielle source de

lésions tissulaires. Ceci est d'ailleurs observé dans notre travail : les groupes sham présentent également de discrètes anomalies fonctionnelles moléculaires et morphologiques rénales (manuscrit n°1).

e) Oxygène et choc

Nous nous sommes particulièrement intéressés au cours de ce travail à l'oxygénation tissulaire. Le choc hémorragique est en effet l'une des modalités d'obtention d'une hypoxie tissulaire, mais son impact tissulaire est bien plus complexe.

(1) Choc et désordres métaboliques

L'état de choc modifie le métabolisme énergétique et acido-basique aboutissant principalement à une hypoxie. Toutefois, d'autres anomalies sont présentes et participent à la physiopathologie de l'état de choc : une hypercapnie, une diminution de l'apport de substrat énergétique et une accumulation de produits du métabolisme sont également observées au cours d'un état de choc. L'hypoxie n'est donc pas la seule anomalie caractéristique, même si son rôle semble néanmoins essentiel⁶⁶.

(2) Notion de dette en oxygène

En situation physiologique, la VO_2 est un processus étroitement régulé car l'oxygène est l'accepteur final de l'ion H^+ dans la respiration cellulaire aérobie. L'hémorragie conduit à une hypovolémie (diminution du flux sanguin), et, par conséquent, à une diminution de l'apport d'oxygène vers les organes vitaux. Ainsi, Siegel et al. proposent, pour définir l'état de choc, que celui-ci se produit lorsque l'apport d'oxygène est suffisamment réduit pour diminuer la VO_2 en-dessous d'un seuil critique⁶⁷. Lorsque ce seuil critique de restriction en oxygène est atteint, une dette en oxygène (O_2D) se produit. L'existence et l'importance de l' O_2D sont mises en évidence par une augmentation des métabolites acides générés par les procédés anaérobies. Il a

été également montré qu'il existe un état hyperdynamique post-réanimatoire, durant lequel le débit cardiaque augmente afin de permettre une augmentation de la VO_2 supérieure à la VO_2 initiale⁶⁸. Ces données semblent valider chez l'humain le concept de « dette en oxygène » d'abord énoncé par Crowell et Smith sur la base des résultats expérimentaux⁶⁹.

La place essentielle des anomalies métaboliques a également été soulignée dans de nombreuses études cliniques. Shoemaker et al. ont ainsi montré que des patients hypovolémiques peuvent présenter un état de choc persistant (perfusion tissulaire inadéquate et acidose métabolique⁷⁰⁻⁷¹) bien que les principaux objectifs de réanimation macrocirculatoires aient été atteints. Cela confirme l'importance, pour la définition du choc, de l'existence d'une anomalie d'oxygénation tissulaire en plus des anomalies hémodynamiques systémiques⁷². Ceci est reflété dans la définition du choc proposée par l'*American College of Surgeons* : « Le choc est une anomalie du système circulatoire qui résulte en une perfusion et une oxygénation des organes insuffisantes »⁷³ ou dans celle proposée par Cairns et al. pour lesquels le « syndrome de choc » au cours de l'hémorragie massive reflète un déséquilibre entre « l'apport d'oxygène et la consommation d'oxygène »⁷⁴.

f) Physiopathologie du choc incontrôlé et de la défaillance multi-organique

(1) Généralités physiopathologiques

La perte de sang conduit, comme préalablement décrit, à une instabilité hémodynamique, une diminution de la TaO_2 , de la perfusion tissulaire et à une hypoxie cellulaire¹⁸. En plus de ces anomalies hémodynamiques et énergétiques, un état de choc induit des altérations de l'inflammation, de la microcirculation, de la coagulation, de l'immunité... Ces modifications contribuent à initier la défaillance multiorganique

(DMO), processus inflammatoire systémique qui décrit le dysfonctionnement des différents organes vitaux et qui compte parmi les pathologies dont le taux de mortalité est le plus élevé¹⁸.

(2) Impact sur la microcirculation, la coagulation, l'inflammation et l'immunité

Les rôles de l'inflammation et des modifications de la microcirculation au cours de l'état de choc prolongé sont probablement capitaux. Le choc prolongé aboutit ainsi à des obstructions capillaires irréversibles, à un œdème des cellules endothéliales et à l'adhésion endothéliale des polynucléaires⁷⁵. Ces modifications sont associées à une coagulopathie qui résulte de la perte de l'effet anticoagulant de l'endothélium et qui peut se compliquer d'un syndrome de CIVD aggravant l'obstruction microvasculaire⁷⁶. Ce cercle vicieux est essentiel pour la compréhension de la physiopathologie de la DMO. Enfin, à distance de l'épisode de choc il est noté une profonde dépression de l'ensemble des fonctions macrophagiques mais également une altération des fonctions lymphocytaires aboutissant à une immunodépression⁷⁷⁻⁷⁸.

(3) Rôle du territoire hépato-splanchnique

Le territoire hépato-splanchnique joue probablement un rôle important car il est sacrifié précocement et son ischémie semble faciliter la translocation bactérienne. Il participe peut-être également à l'intensité de la réaction inflammatoire^{42, 79}. La restauration de la perfusion hépato-splanchnique est ainsi fréquemment étudiée en tant qu'objectif complémentaire aux objectifs circulatoires systémiques lors de la réanimation de l'état de choc⁸⁰⁻⁸².

(4) *Impact cardio circulatoire*

La contractilité myocardique est également altérée lorsque le choc hémorragique se prolonge. Il semble que la principale altération soit, dans cette situation, une atteinte de la fonction diastolique⁸³.

En plus des impacts cardiaque et microcirculatoire, un impact vasculaire systémique apparait lorsque l'état de choc se prolonge. L'existence d'une vasodilatation proportionnelle à l'intensité du choc hémorragique a été bien illustrée dans le travail de Dalibon et al. (**Figure 3**)⁸⁴. Le choc prolongé peut ainsi déclencher une défaillance de la vasoconstriction sympathique. Après la réanimation d'un choc hémorragique contrôlé et le retour à une volémie normale, il persiste ainsi une hypovolémie efficace qui justifie un remplissage vasculaire plus important que le volume initialement prélevé et probablement également l'utilisation de vasoconstricteurs⁸⁵.

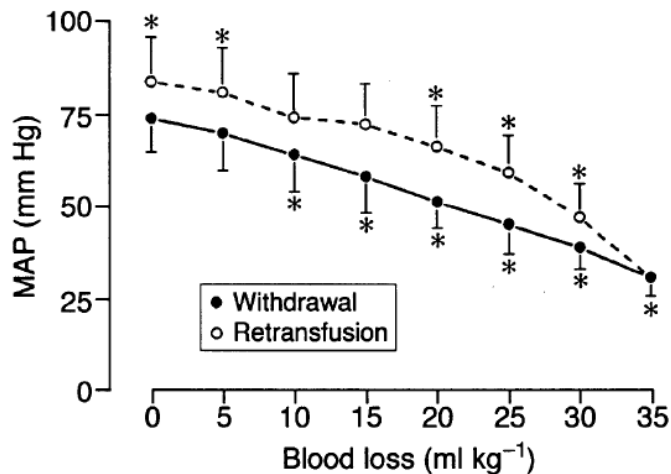


Figure 3 : vasodilatation progressive au cours de l'état de choc.

Pression artérielle moyenne pendant le choc (rond noir) et après la réanimation (rond blanc) en fonction de la sévérité du choc⁸⁴. Plus la perte sanguine est importante moins un remplissage vasculaire exclusif permet de restaurer une pression artérielle suffisante.

(5) *La DMO : un mécanisme adaptatif ?*

Depuis plusieurs années quelques auteurs réputés dans le domaine de la réanimation soutiennent l'idée que la DMO serait un mécanisme adaptatif⁸⁶⁻⁸⁷. Pour étayer cette théorie, ils mettent en avant qu'au cours d'une DMO, les organes impliqués présentent surtout des anomalies fonctionnelles potentiellement réversibles et peu de dégâts histologiques (*nous aborderons cette particularité dans le chapitre sur la modélisation de l'IRA*). Ils s'appuient également sur des travaux s'intéressant à l'oxygénation tissulaire au cours du choc septique : la conclusion de ces expérimentations est que plus l'état de choc se prolonge, plus la pression partielle en oxygène tissulaire augmente et plus la consommation en oxygène cellulaire diminue. Cette observation paradoxale tend à souligner que l'hypoxie cellulaire est sans doute davantage liée, à ce stade du choc, à une diminution de l'utilisation cellulaire en oxygène qu'à un déficit tissulaire en oxygène⁸⁸⁻⁸⁹. Marvyn Singer suggère que la DMO est une tentative d'adaptation de l'organisme qui déclencherait un état de sidération permettant d'augmenter les possibilités de survie cellulaire. Cette adaptation se ferait par une adaptation du métabolisme énergétique cellulaire médiée par deux principales voies de signalisation : endocrinienne et inflammatoire^{87, 90-91}.

Ce bref rappel souligne l'impact multiorganique d'une hypotension et donc l'importance d'un mécanisme systémique et non exclusivement régional dans la modélisation de l'insuffisance rénale aiguë ischémique.

3. Généralités sur la thérapeutique

Il est communément admis que le contrôle des saignements (*damage control*), le maintien de l'oxygénation tissulaire, le rétablissement d'une coagulation efficace et le maintien de la normothermie représentent les mesures thérapeutiques fondamentales

lors d'une hémorragie⁹². La réanimation d'un patient en état de choc hémorragique dans les pays développés s'appuie fortement sur la transfusion sanguine et le remplissage vasculaire afin de restaurer la perfusion tissulaire. Bien que ces stratégies de réanimation de patients gravement blessés aient grandement amélioré leur pronostic, ces transfusions sont elles-mêmes associées au développement de DMO, ainsi qu'à une augmentation des admissions en unité de soins intensifs (USI), de la durée de l'hospitalisation et de la mortalité⁹³. La transfusion sanguine n'est donc pas une solution idéale. De nouvelles technologies sont actuellement disponibles ou en cours de développement, en particulier le sérum salé hypertonique, les hémoglobines de synthèse, ou le facteur recombinant VIIa. De plus, des résultats prometteurs expérimentaux ont établi que l'administration de vasopressine, d'œstradiol, de métoprolol, de prolactine, de flutamide, ou de DHEA permettent de maintenir le débit cardiaque, la perfusion et/ou l'oxygénation tissulaire. Ces thérapeutiques pourraient ainsi être bénéfiques au cours d'un état de choc hémorragique. Enfin, la prévention de la fuite capillaire, en bloquant la formation de radicaux libres, pourrait maintenir la fonction de barrière endothéliale et atténuer la réaction immunologique *(une revue complète des nouvelles thérapeutiques a été récemment publiée)*⁹².

II. L'INSUFFISANCE RENALE AIGUE EN REANIMATION

L'objectif de chapitre est de caractériser l'IRA en réanimation et de souligner un des nouveaux défis qui lui sont associés : son pronostic à long terme. En second lieu nous essayerons de décrire la physiopathologie de l'IRA en nous concentrant sur une vision métabolique.

A. Définition de l'IRA, la vision de la réanimation

1. Un florilège de définitions

De nombreuses définitions de l'IRA ont été proposées au cours des cinquante dernières années. Kellum et al. ont ainsi noté au début des années 2000 que plus de trente cinq définitions différentes de l'IRA étaient utilisées⁹⁴. Ces différentes définitions ont rendu complexe toute tentative de comparaison ou de synthèse des travaux disponibles. Par exemple, chez les patients de réanimation, la mortalité attribuable à une IRA a été évaluée comme variant entre 15 et 60%⁹⁵⁻⁹⁷.

Au milieu des années 2000, un consensus international a adopté la classification RIFLE (**Figure 4**) qui permet de classer à la fois l'intensité de l'IRA (*Risk, Lesion, Failure*) et son pronostic (*Loss of function, End stage renal failure*)⁹⁸. La contribution de valeurs mesurées du DFG à la définition a été rapidement abandonnée faute de pouvoir l'estimer correctement dans ce contexte. Par la suite, le groupe de travail sur l'insuffisance rénale aiguë a proposé quelques modifications de la classification, afin principalement d'améliorer sa sensibilité : sont ainsi apparus 1) l'obligation d'un délai de 48h avant de classer la sévérité de l'IRA, 2) pour un classement au stade RIFLE-R une augmentation en valeur absolue de la créatininémie (0,3 mg/dl) et en dernier lieu, 3) le fait de considérer chaque patient dialysé comme étant au stade RIFLE-F. Ces

modifications n'entraînent un changement de classification que chez moins de 2% des patients. Elles ont finalement abouti à la classification nommée *Acute Kidney Injury Network* (AKIN) (**Figure 4**)⁹⁹. Ces deux classifications (RIFLE et AKIN) ont bénéficié d'une validation par de nombreux travaux ayant inclus plus de 500 000 patients¹⁰⁰.

2. Place des biomarqueurs

L'importance de l'IRA pour le pronostic global du patient et l'apport de la révolution biologique du syndrome coronarien aigu en cardiologie (troponine¹⁰¹ et peut-être bientôt copeptine¹⁰²) ont ouvert la voie à la recherche de marqueurs d'agression rénale devant permettre de diagnostiquer plus précocement celle-ci. Plusieurs biomarqueurs semblent prometteurs, par exemple les *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (NGAL) plasmatique et urinaire, ou les valeurs urinaires de cystatine C, *Kidney Inducible Molecule-1* (KIM-1) et Interleukine 18, etc...¹⁰³⁻¹⁰⁴. Nous nous sommes intéressés dans notre travail à KIM-1 car c'est un récepteur de type phosphatidyl sérine spécifiquement exprimé à la surface des cellules proximales tubulaires lorsqu'elles subissent une agression¹⁰⁵⁻¹⁰⁶. L'importance de son excrétion secondaire dans les urines pourrait ainsi être un marqueur spécifique de l'impact tubulaire de l'ARA. A ce jour, aucun des ces biomarqueurs n'est intégré dans une définition de l'insuffisance rénale aiguë et leur intérêt clinique et thérapeutique reste débattu¹⁰⁷.

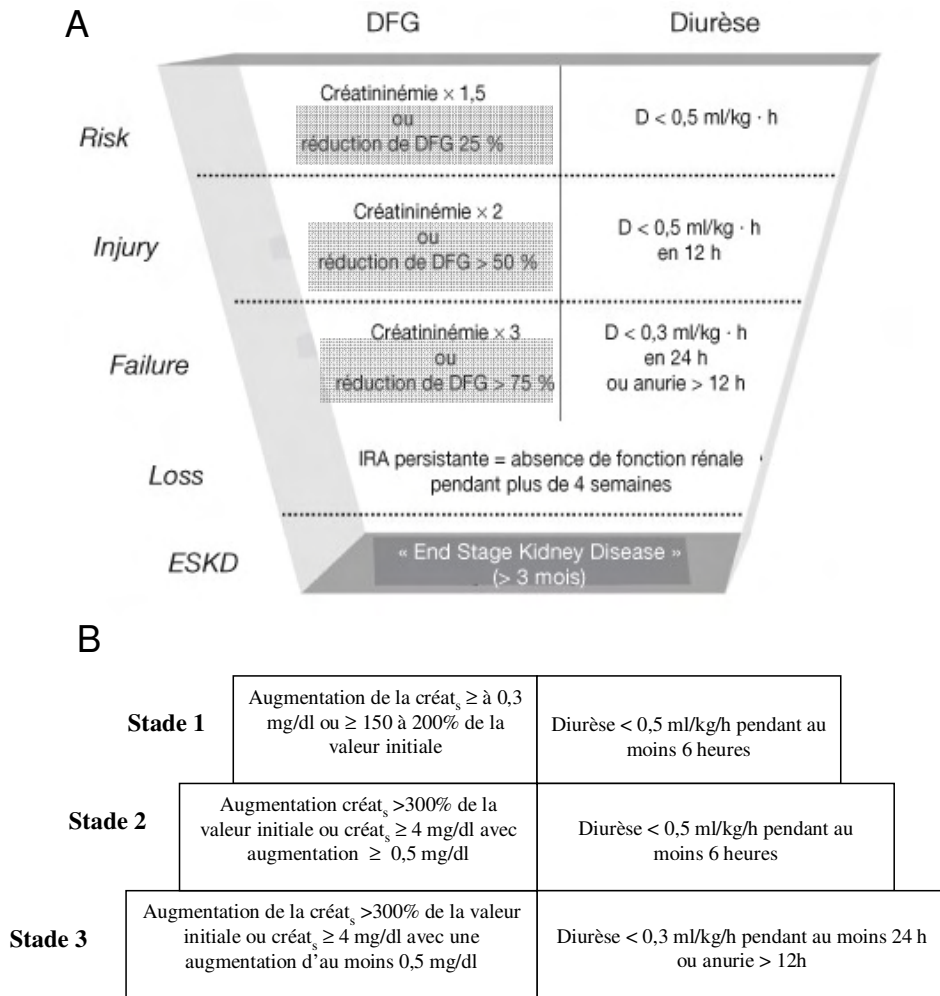


Figure 4 : classifications RIFLE et AKIN

(A) Classification RIFLE ; en gris les déterminants qui ont été supprimés

(B) Classification AKIN

3. Epidémiologie de l'IRA en réanimation

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est responsable d'environ 2 millions de décès chaque année dans le monde¹⁰⁸. De plus en plus de patients de réanimation présentent une IRA ; le sepsis est actuellement l'étiologie la plus fréquente d'IRA dans ce contexte¹⁰⁸. Parmi les études récentes de la littérature sur l'épidémiologie de l'IRA en réanimation, celle d'Uchino et al. est fréquemment citée car elle a analysé de manière prospective, multicentrique et internationale l'intérêt de la classification RIFLE chez près de 30 000 patients hospitalisés en soins intensifs. Dans cette étude, 10% des

patients présentaient un stade RIFLE-R, 5% un stade RIFLE-I et 3,5% un stade RIFLE-F. La mortalité était corrélée de manière quasi linéaire avec la gravité de l'insuffisance rénale aiguë puisque l'*odd ratio* était pour les stades cités ci-dessus respectivement de 2,5 fois, 5,4 fois et 10,1 fois⁹⁷.

D'autres études ont révélé que l'IRA, définie par les classifications RIFLE ou AKIN, était un facteur indépendant de surmortalité. L'une de ces études a été réalisée de façon rétrospective sur environ 120 000 patients et confirme la fréquence et l'impact pronostic d'une IRA dans ce contexte (**Figure 5**)¹⁰⁹. De nombreux autres travaux prospectifs ou non, dans différentes sous-populations (patients ventilés mécaniquement, brûlés, en post chirurgie cardiaque, de pédiatrie...) ont complété ces observations¹¹⁰⁻¹¹⁶. En synthèse, l'IRA est en réanimation un facteur indépendant de mortalité ; les patients de réanimation qui nécessitent une épuration extrarénale présentent un pronostic sombre (en moyenne ~40% de mortalité).

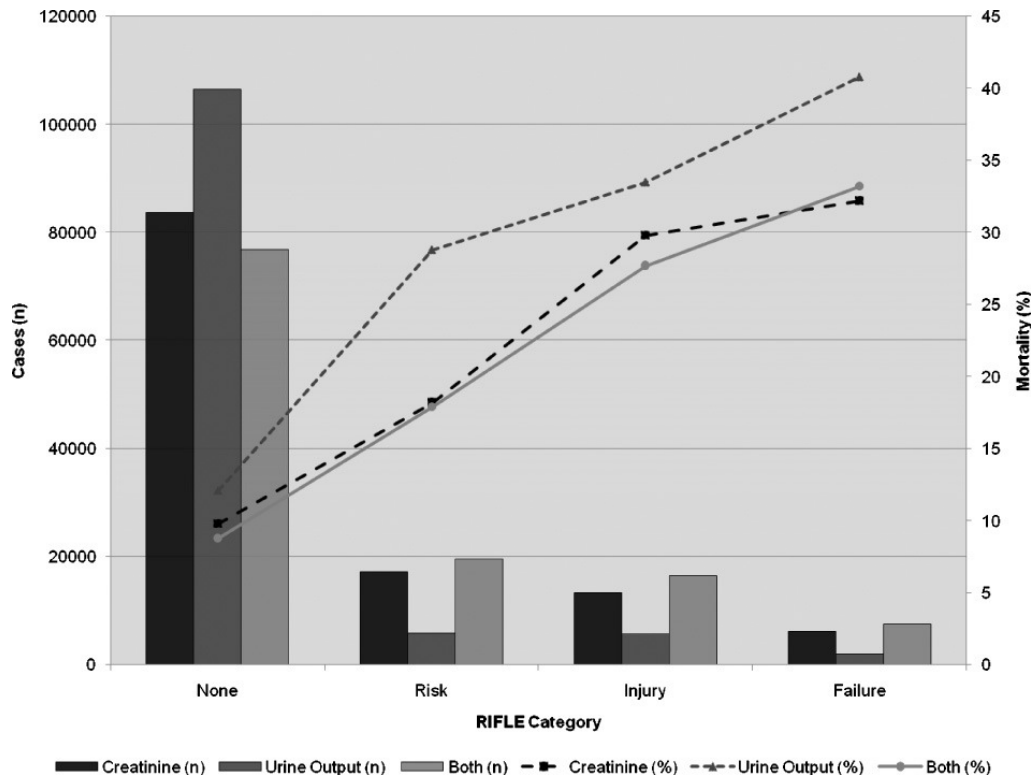


Figure 5 : Mortalité des patients en fonction de la classification RIFLE. Classification de la sévérité de l'IRA chez des patients de réanimation et mortalité en fonction de la sévérité et du déterminant de celle-ci (créatininémie, diurèse ou les deux)⁹⁹. Les colonnes représentent le nombre de patients pour chaque stade de gravité (axe Y gauche) et les lignes la mortalité en pourcentage pour chaque stade (axe Y droit).

4. Le nouveau défi de l'IRA : son impact à long terme

Depuis quelques années l'IRA fait l'objet d'un surcroît d'attention afin d'améliorer sa définition ou son diagnostic par le biais des biomarqueurs. Le pronostic à long terme de cet évènement a été également particulièrement étudié depuis un peu moins de dix ans. Il était classiquement enseigné que les patients présentant une IRA par nécrose tubulaire aiguë (NTA) ischémique ne montraient pas, s'ils survivaient, de séquelles rénales significatives¹¹⁷⁻¹¹⁸. Pourtant, il y a quelques décennies déjà, plusieurs auteurs avaient souligné le caractère inconstant de cette récupération : Lowe et al. avaient ainsi révélé que trois patients sur quatorze après NTA présentaient une insuffisance rénale chronique. Finkenstaedt et al. avaient réalisé des clearances de l'inuline chez seize

patients plus d'un an après un épisode de NTA et avaient révélé que six d'entre eux présentaient une altération persistante du DFG¹¹⁹⁻¹²⁰.

Enfin, depuis la fin des années 2000 plusieurs travaux épidémiologiques ont souligné l'intrication aussi bien physiopathologique qu'épidémiologique entre l'insuffisance rénale chronique (IRC) d'une part et l'IRA de l'autre¹²¹⁻¹²⁴.

a) L'IRA est elle un facteur de risque d'insuffisance rénale chronique ?

(1) Arguments épidémiologiques généraux associant l'IRA à l'apparition d'une maladie rénale chronique et à la mortalité

Plusieurs études fondées sur des données démographiques provenant de bases de données épidémiologiques de réseaux de santé ont souligné la possible corrélation entre la survenue d'une IRA et l'apparition, par la suite, d'une IRC. L'une des plus importantes a été réalisée aux Etats-Unis d'Amérique (USA) en utilisant un échantillon de 5% des patients du réseau Medicare™ qui a été comparé avec les données du registre national des patients dialysés chroniques. Dans ce travail, un antécédent d'IRA est associé à une augmentation du risque d'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) de 8,5 et de mortalité de 2,4¹²³. D'autres études épidémiologiques ont confirmé ces informations : l'étude de Lo est intéressante car elle propose une analyse rétrospective de 556 090 patients ayant nécessité une épuration extrarénale et ayant récupéré de cette dépendance avant la sortie de l'hôpital. Les patients présentant un GFR < 45 ml/min/m² avant l'épisode ont été exclus de l'analyse. Les auteurs concluent que les patients inclus présentent un risque 28 fois plus élevé de développer une IRC et deux fois plus élevé de décéder. Chawla et al. ont également noté une augmentation du risque d'IRC chez des patients dont le DFG préalable à l'IRA était supérieur à 60 ml/min/1,73m²¹²⁵. Les principaux facteurs de risque d'IRC retrouvés dans ces travaux

sont l'âge élevé, l'existence d'un diabète, une insuffisance rénale chronique préalable, une protéinurie et une albuminémie diminuée¹²⁴.

(2) *Relation entre l'intensité de l'IRA et l'apparition de l'IRC*

Il est intéressant de noter que l'intensité de l'IRA détermine directement la prévalence de l'atteinte rénale chronique. James et al. ont montré que les patients présentant une IRA au décours d'une revascularisation percutanée coronarienne ont un risque plus élevé de développer une IRC. Ils ont également révélé que les patients classés AKIN 1 et AKIN 2/3 ont respectivement quatre et onze fois plus de risques de développer une IRC¹²⁶. Ishani et al ont observé que le taux de créatininémie en post opératoire de chirurgie cardiaque était corrélé de manière proportionnelle avec l'apparition d'une IRC au décours de l'hospitalisation¹²⁷. Une autre étude a souligné cette particularité¹²⁵. Une dernière étude s'est spécifiquement intéressée aux malades ayant présenté une IRA intégralement réversible (DFGe > 90% valeur initiale). Dans cette analyse de cohorte, 1610 patients ayant présenté une IRA ont été comparés à un groupe de 3562 patients contrôles par un score de propensité. Après un suivi moyen de plus de 3 ans, la mortalité chez les patients ayant présenté une IRA était plus élevée de 50 %, et le risque de développer une IRC plus élevé de 100%. De plus la mortalité n'était augmentée que chez les patients développant une IRC, laissant penser aux auteurs que l'impact pronostic de l'insuffisance rénale aiguë au décours de l'épisode initial est avant tout lié au développement ou à l'absence d'IRC¹²⁸.

(3) *Relation entre la durée et la fréquence de l'IRA et l'apparition de l'IRC*

La durée de l'IRA a été pour l'instant exclusivement corrélée à la mortalité dans plusieurs travaux. Elle ne paraît pas liée à l'apparition plus fréquente d'une IRC¹²⁹⁻¹³⁰.

Par contre le nombre d'épisodes d'IRA est clairement corrélé à l'apparition d'une IRC¹³¹.

(4) *Limites de cette hypothèse*

Ces études observationnelles sont néanmoins relativement récentes et, pour l'instant, l'ensemble des critères énumérés par Sir Bradford Hill permettant de transformer une simple association en un lien de causalité ne sont pas remplis (**Tableau 2**)¹³².

Il persiste en effet encore certains facteurs confondants : certains facteurs de risque d'IRA et de maladie rénale chronique (MRC) sont en effet partagés (par exemple, le diabète). De plus, il existe encore une variabilité de la définition de l'IRA et il est par ailleurs difficile de différencier une IRC *de novo* d'une accélération de la progression d'une MRC¹³³. Ainsi il sera nécessaire de réaliser des études définissant rigoureusement la fonction rénale préalable à l'ARA.

Il paraît néanmoins désormais raisonnable de proposer un suivi fonctionnel rénal/néphrologique aux patients ayant présenté une IRA sévère ou lorsqu'il existe des facteurs de risque de MRC préalables. Cette prise en charge comporte l'évaluation de la fonction résiduelle au moins un an après l'épisode aigu¹³⁴.

CRITERES DE L'ASSOCIATION	SIGNIFICATION
La stabilité	sa répétition dans le temps et l'espace
La spécificité	jusqu'à l'exclusivité du lien exposition-maladie
La temporalité	l'exposition doit précéder l'effet
Le gradient biologique	relation dose effet
La plausibilité	en fonction des connaissances biologiques ou mécanistiques acquises
La cohérence	avec les connaissances générales déjà disponibles
Les résultats expérimentaux	peuvent être de nature à établir définitivement la causalité
L'analogie	par exemple entre des molécules de même famille (moins applicable dans ce contexte)

Tableau 2 : Critères de Bradford Hill

b) L'IRA : un facteur de progression de l'IRC

Parallèlement à la relation entre l'IRA et le risque de développer une IRC au décours de l'épisode aigu, la relation liant l'effet de l'IRA à la progression d'une MRC préexistante a été décrite. Plusieurs études, dans différentes circonstances, ont montré que l'intensité de l'IRA chez des patients présentant une IRC induisait une progression de celle-ci (voir infra).

(1) *L'IRC est elle un facteur de risque d'IRA ?*

Plusieurs travaux étayent l'hypothèse que l'IRC est probablement un facteur de risque d'IRA. Cette relation est néanmoins discutée, en particulier, nous le verrons, au

cours du diabète¹³⁵⁻¹³⁸. Les anomalies hémodynamiques régionales sous-jacentes des MRC (perte de l'auto régulation) semblent jouer un rôle important dans ce risque¹³⁹.

(2) L'IRA induit elle une aggravation de l'IRC ?

A l'inverse, il semble que l'IRA constitue un facteur d'aggravation de la MRC. Dans l'étude, déjà citée, portant sur l'inclusion randomisée de 5% des patients bénéficiant de l'assistance Medicare™, Ishani et al. ont montré qu'un patient insuffisant rénal chronique âgé de plus de soixante sept ans qui développe une IRA présente 41 fois plus de risques de développer une IRCT contre 13,4 fois plus pour un patient présentant une IRA *de novo*¹²³ en comparaison à un patient sain du même âge.

Sur des données cliniques plus précises, Hsu et al. ont montré, au sein d'une cohorte de 39 805 patients IRC qu'un patient dont le DFG initial est inférieur à 45 ml/min /1,73 m² et qui présente une IRA (définie par une augmentation $\geq 50\%$ de la créatinine sérique de base ou une nécessité de dialyse) est à très haut risque de développer une IRCT. De plus, ces auteurs notent une prévalence de 49% d'IRCT chez les patients ayant présenté un épisode d'IRA comparativement à seulement 1,5% chez les patients atteints d'une MRC qui n'ont pas connu d'IRA¹⁴⁰. Dans un autre travail, Ali et al. ont calculé que seulement 64% des patients présentant un épisode d'IRA sur IRC récupéraient un niveau de fonction rénale préalable à l'agression. Menon et al. ont souligné que l'IRCT chez les personnes âgées est souvent précipité par un épisode d'IRA¹⁴¹ et Levey et al. ont montré que 31% des patients atteints de MRC présentaient des cassures évocatrices d'IRA dans leurs courbes de fonction rénale¹⁴². Ces résultats amènent à reconsidérer l'ancien paradigme d'une diminution progressive et régulière de la fonction rénale au cours de la MRC (**Figure 6**)¹⁴³. Le pronostic de ces atteintes apparait lié à la fois à leur intensité et à la qualité de la réparation rénale.

Ainsi, un modèle pertinent d'ARA doit être basé sur un mécanisme qui peut à la fois générer une défaillance rénale initiale (IRA) mais également permettre la survie de l'animal afin d'étudier le pronostic à long terme de cet événement.

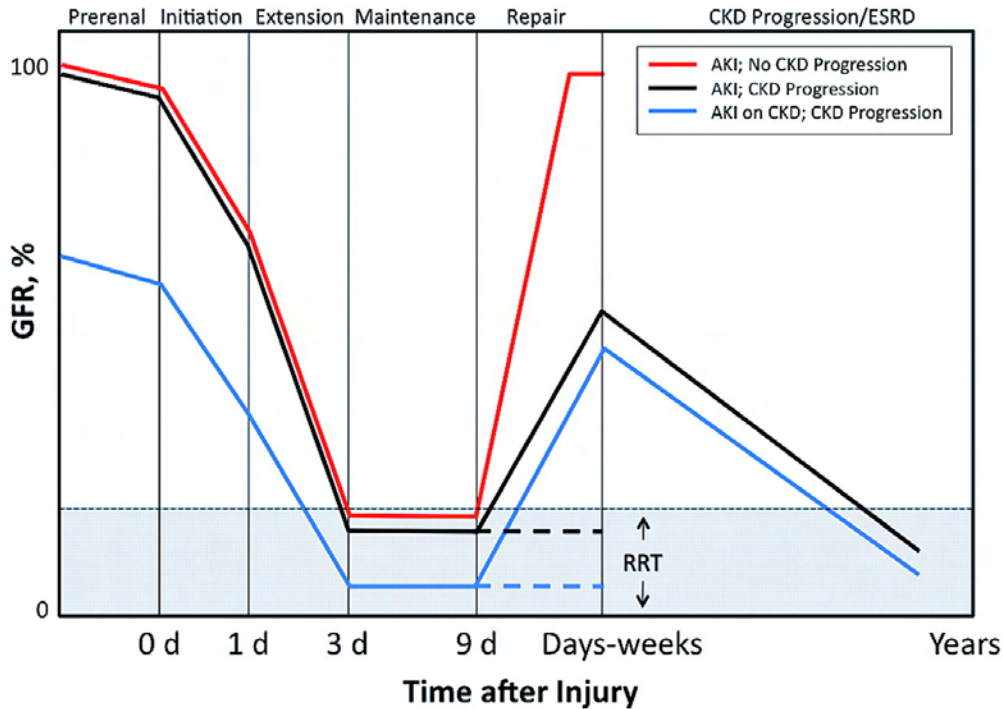


Figure 6 : Evolution naturelle de l'IRA selon Okusa et al.¹⁴³.

Les patients survivant à une IRA présentent des devenir différents : une récupération *ad integrum* (rouge), le développement d'une IRC (noir), l'aggravation d'une MRC préalable (bleu) et l'absence de récupération après l'IRA quelque soit le statut rénal préalable (pointillé).

B. Physiopathologie de l'IRA : une vision métabolique

Le rein est un organe de structure complexe qui remplit de multiples fonctions homéostasiques. Nous avons choisi de limiter ce rappel physiopathologique aux notions de perfusion, d'oxygénation, de consommation énergétique et à leur importance dans l'IRA et la MRC.

1. Données physiologiques hémodynamiques rénales

Le poids des reins représente 0,5% en moyenne du poids du corps mais représente 25% du débit cardiaque. Cette perfusion sanguine surabondante permet de maintenir le DFG constant malgré les changements de pression artérielle. La vascularisation rénale est complexe : elle comporte deux principaux réseaux capillaires en série. Le premier, exclusivement cortical et artério-artériel et correspondant aux capillaires glomérulaires, représente 95% du débit sanguin rénal initial et joue un rôle fonctionnel essentiel pour la filtration glomérulaire. Le second, artério-veineux, constitue, pour l'essentiel, un réseau péri-tubulaire cortical mais donne également naissance à un troisième réseau, la *vasa recta*, qui nourrit la médullaire avec moins de 10% du débit sanguin initial (**Figure 7**). Il existe une autorégulation rénale permettant de maintenir un débit sanguin glomérulaire relativement constant pour des valeurs de pression artérielle comprise entre 80 et 200 mmHg¹⁴⁴. Cette régulation est locale, comme l'illustre le fait qu'elle persiste malgré la dénervation du rein¹⁴⁵. C'est principalement par le biais de l'artère afférente glomérulaire que cette adaptation est effectuée et deux mécanismes sont mis en jeu : le réflexe myogène et le rétrocontrôle tubulo-glomérulaire.

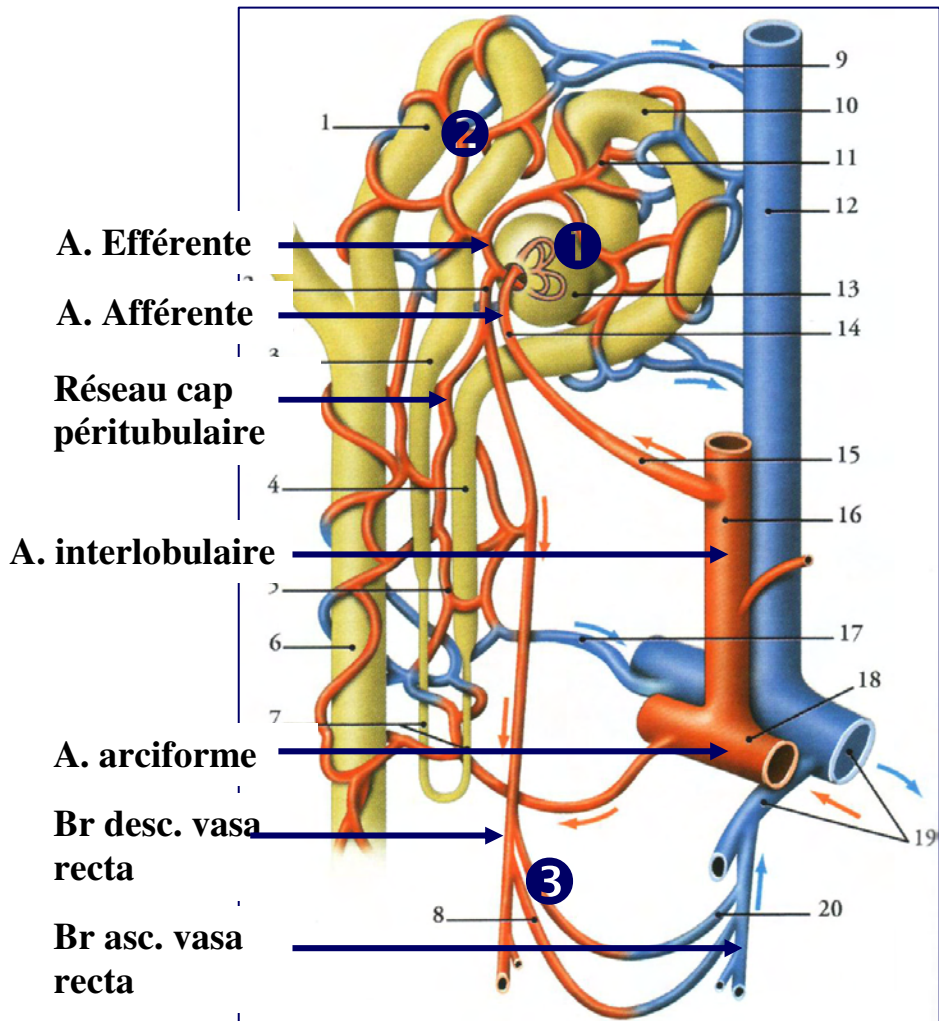


Figure 7 : schématisation de la vascularisation rénale.

Il existe trois réseaux : (1) glomérulaire, (2) péritubulaire cortical et (3) la vasa recta
A. artère ; asc. ascendante ; desc. descendante ; Br. branche ; cap. capillaire
Adapté de P. Kamina, précis d'anatomie, Maloine 2005

a) Réflexe local myogène

Sa mise en jeu est déclenchée par la contrainte mécanique d'étirement de la paroi artérielle liée au pic de pression systolique¹⁴⁶. Cette réaction (inhibée par l'utilisation de papavérine ou d'inhibiteurs des canaux calciques voltage-dépendants) implique les cellules musculaires lisses et permet, dans un délai de quelques secondes, de modifier le

tonus vasculaire de l'artériole afférente glomérulaire et, ainsi, de moduler le débit glomérulaire et de l'ensemble du territoire vasculaire d'aval¹⁴⁷⁻¹⁴⁸.

b) Rétrocontrôle tubulo-glomérulaire

Ce mécanisme adaptatif est fortement lié à la conformation anatomique particulière des vaisseaux glomérulaires et du tubule distal. Il est médié par une zone particulière de la partie distale de la branche ascendante large de Henlé (BALH) appelée *macula densa*. Cette zone qui se situe donc au contact des artérioles glomérulaires (l'ensemble formant l'appareil juxta-glomérulaire) est sensible aux variations de concentration en chlore. Ainsi une variation du débit de ces ions module de façon inverse le DFG en modifiant le tonus musculaire de l'artériole afférente et en modifiant un peu la surface de filtration glomérulaire par des variations de tonus des cellules mésangiales autour desquelles s'enroulent les capillaires glomérulaires. Ce mécanisme est plus lent (15-20s)¹⁴⁹.

c) Autres mécanismes de régulation

(1) Régulation nerveuse

Les vaisseaux corticaux bénéficient d'une innervation sympathique qui semble exclusive. L'activation sympathique modifie le tonus vasculaire par un effet α -adrénergique direct et par un effet β -adrénergique sur les cellules juxta-glomérulaires. Ces cellules juxta-glomérulaires sont situées dans une zone de l'artère afférente pré-glomérulaire et présentent une métaplasie fonctionnelle endocrine leur procurant la capacité de synthétiser la rénine, en réponse, en outre, à une stimulation β -adrénergique¹⁵⁰⁻¹⁵¹.

L'ensemble de ces stimulations adrénériques permet, en situation d'hypovolémie, d'induire une vasoconstriction artérielle glomérulaire maintenant partiellement la

pression de perfusion glomérulaire. De manière intéressante, cette vasoconstriction touche à la fois les vaisseaux pré et post-glomérulaires, avec une prédominance pour ce dernier, ce qui explique que le DFG soit moins diminué que le débit de perfusion rénal¹⁵².

(2) Régulation paracrine et endocrine du DFG.

Cette régulation est possiblement médiée par de nombreuses molécules. Parmi les substances vasodilatatrices, les principales sont le monoxyde d'azote et les prostaglandines. Parmi les substances vasoconstrictrices, l'angiotensine II joue un rôle essentiel¹⁵³⁻¹⁵⁴.

Le rein présente donc une vascularisation surtout fonctionnelle et particulièrement résistante aux variations de débit sanguin rénal. Cette assertion concerne moins la médullaire dont l'essentiel du débit sanguin est davantage nourricier que fonctionnel en situation physiologique.

2. Physiopathologie : IRA et hémodynamique rénale

Nous avons souligné que le cortex contient les glomérules et reçoit en situation physiologique la majorité du débit sanguin alors que la médullaire n'en reçoit que 10%¹⁵⁵. Il est important de noter également que tout au long du parcours sanguin rénal, il existe des shunts artério-veineux qui aboutissent à une pression partielle en oxygène tissulaire plutôt basse malgré un débit sanguin élevé. Ainsi, dans la médullaire, la pression partielle en oxygène est constamment inférieure à 10 mmHg et celle du cortex est en moyenne de 30 mmHg. L'ischémie relative de la partie médullaire du néphron est contrebalancée par une extraction élevée en oxygène (80%)¹⁵⁶⁻¹⁵⁷. L'hypoxie de cette zone provient également de la haute contrainte métabolique liée aux nombreux

mécanismes actifs de réabsorption ou de sécrétion. Le transport tubulaire dans la BALH et le segment S3 du tube proximal nécessitent une forte consommation en oxygène¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. En situation d'ischémie, la balance en oxygène est maintenue au prix d'une diminution du DFG ce qui réduit le débit d'osmoles à réabsorber dans ces segments. De plus, il existe probablement une redistribution du débit sanguin cortical vers les couches médullaires superficielles en cas d'hypotension¹⁴⁴. Ce mécanisme protecteur est néanmoins perturbé par la production de radicaux libres de l'oxygène qui aggrave l'impact de l'hypoperfusion rénale pendant la phase de reperfusion, durant laquelle la consommation d'oxygène est fortement augmentée du fait d'une réaugmentation du transport tubulaire¹⁵⁹⁻¹⁶⁰. L'ensemble de ces paramètres explique le fait que la jonction cortico médullaire est la plus sensible à l'ischémie rénale.

3. Concept de lésions « subléthales »

Ce concept important et relativement récent a grandement amélioré la compréhension de la physiopathologie de l'IRA : une blessure subléthale et réversible des cellules tubulaires peut contribuer substantiellement à un dysfonctionnement tubulaire fonctionnel. Avant l'élaboration de cette hypothèse, on considérait généralement que la dysfonction tubulaire était principalement le résultat de la nécrose des cellules tubulaires. Ces altérations subléthales peuvent conduire à des anomalies de transport à travers l'épithélium tubulaire. En transplantation humaine, certains auteurs ont souligné le rôle pathogénique joué par les lésions tubulaires subléthales qui provoquent une vasoconstriction pré-glomérulaire importante et une réduction résultante de la filtration¹⁶¹.

Un des mécanismes par lesquels une lésion tubulaire provoque une réduction du taux de filtration glomérulaire (DFG) est le reflux de filtrat glomérulaire vers l'interstitium rénal et son drainage veineux (par majoration du phénomène de *back-leak*

physiologique). Le rôle de ce reflux dans les anomalies fonctionnelles de l'IRA a d'abord été démontré dans des modèles animaux¹⁶². Cette idée a ensuite été évaluée par Myers et ses collègues¹⁶³⁻¹⁶⁴ chez les humains en situation aiguë. En plus de ce phénomène, lorsque la durée de l'ischémie est insuffisante pour provoquer une nécrose rénale en période de reperfusion, une variété d'autres modifications sublétales possiblement structurelles peuvent effectivement être observées (anomalies du cytosquelette, trouble de la polarité cellulaire)¹⁶⁵⁻¹⁶⁶.

4. Hypothèse physiopathologique de la progression de l'IRA vers la MRC

Il a été observé depuis longtemps que l'aggravation de la fonction rénale peut être indépendante de l'évolutivité de la pathologie à l'origine de l'IRC¹⁶⁷⁻¹⁶⁸.

Deux principales hypothèses pour expliquer cette évolution autonome ont été proposées :

a) Réduction néphronique

La réduction néphronique ferait suite à l'hypertrophie tubulo-glomérulaire (théorie de Brenner¹⁶⁹) et à l'hyperfiltration des néphrons restant fonctionnels après un épisode d'IRA¹⁷⁰⁻¹⁷². Cette hyperfiltration, aggravée par un régime alimentaire inadapté riche en protéines animales augmenterait le travail tubulaire à un niveau délétère.

b) La fibrose tubulo-interstitielle

L'inflammation et la fibrose interstitielle prédominent sur l'atteinte glomérulaire chez les patients présentant une IRC¹⁷³⁻¹⁷⁵. La fibrose tubulo-interstitielle est ainsi paradoxalement mieux corrélée au déclin de la fonction rénale que l'atteinte glomérulaire^{174, 176}. De plus, l'intensité de la fibrose interstitielle est supérieure quand une réduction néphronique a été réalisée préalablement à une agression rénale par

ischémie reperfusion¹⁷⁷⁻¹⁷⁸. Ces observations ont augmenté fortement l'intérêt porté aux anomalies tubulaires au cours de la MRC.

(1) Relation entre la fibrose interstitielle et la diminution DFG

La réduction du DFG étant une constante lors d'une MRC évoluée, les anomalies tubulaires doivent donc avoir pour conséquence une réduction du DFG. En effet, ces dommages tubulo-interstitiels peuvent aboutir à une diminution du DFG par plusieurs mécanismes : 1) l'atrophie tubulaire diminue la quantité de fluide réabsorbée en amont de la *macula densa* et provoque une diminution du DFG par le biais du rétrocontrôle tubulo-glomérulaire, 2) il existe une augmentation du nombre de glomérules atubulaires et, 3) le débit sanguin rénal est réduit du fait des anomalies de vascularisation engendrées par les anomalies tubulaires¹⁷⁹.

(2) Origine de la fibrose tubulo-interstitielle

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'apparition de cette fibrose également observée dans les pathologies à l'origine purement glomérulaire :

- 1) des lésions tubulaires proximales induites par la protéinurie¹⁸⁰.
- 2) des lésions tubulo-interstitielles par la diffusion du filtrat dans l'espace interstitiel aboutissant à une réponse inflammatoire fibrosante (rôle du *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β))¹⁸¹.
- 3) une diminution de la perfusion tubulaire et une hypoxie secondaire à l'impact sur les vaisseaux post glomérulaires¹⁸².

En fait, tous ces mécanismes sont possiblement associés : l'augmentation de la protéinurie participe probablement à l'évolution défavorable¹⁸³⁻¹⁸⁴. Néanmoins l'existence de pathologie sans protéinurie (par exemple la néphrocalcinose) et le caractère non exclusif de l'effet sur la pression artérielle systémique et la protéinurie

dans le caractère protecteur des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) permettent d'envisager l'existence de mécanismes physiopathologiques associés¹⁸⁵.

L'inflammation est présente et peut elle aussi favoriser l'existence d'une fibrose¹⁸⁶⁻¹⁸⁷. Le rôle de la voie alterne du complément à la membrane apicale a été ainsi particulièrement soulevé¹⁸⁸.

Des anomalies de réparation cellulaire sont également impliquées. La réparation normale nécessite un fonctionnement adapté du cycle cellulaire ; ainsi l'inhibition de p21, une protéine régulatrice essentielle du cycle cellulaire, aggrave l'IRA¹⁸⁹ alors que son induction semble améliorer son pronostic¹⁹⁰. Les cellules tubulaires bloquées en phase G2/M produisent du TGF- β et du *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) stimulant une cicatrisation pathologique fibrosante¹⁹¹⁻¹⁹².

La raréfaction vasculaire et l'atteinte endothéliale sont peut-être également cruciales dans l'évolution vers la fibrose et la sensibilité à l'IRA. Plusieurs modèles ont mis en évidence cette raréfaction¹⁹³⁻¹⁹⁴. Ainsi, le traitement précoce, et non pas tardif, par du *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) semble protéger de ces dégâts vasculaires¹⁶⁸. Le rôle d'autres facteurs de croissance a également été mis évidence¹⁹⁵.

5. Hypoxie et IRC

En plus des hypothèses physiopathologiques citées ci-dessus, celle d'une participation de l'hypoxie chronique à l'évolution de l'IRC vers la fibrose a été formulée dès 1998 par Fine et al.¹⁸². Depuis cette formulation, plusieurs auteurs se sont intéressés à ce concept¹⁹⁶⁻²⁰⁰ et présentent l'hypoxie rénale comme un mécanisme central à la fois dans les conséquences d'une IRA et dans l'évolutivité de la MRC.

a) Mécanismes physiopathologiques de l'hypoxie au cours de l'IRC

(1) *Perte des capillaires péri-tubulaires et fibrose*

Il a bien été montré que l'IRC était associée à une réduction de la densité capillaire^{194, 201-203}.

Futakrul et al. ont mis en évidence, chez des patients présentant une glomérulonéphrite aiguë ou un diabète de type II sans IRC ni micro-albuminurie, une réduction du débit capillaire péri-tubulaire et une augmentation des résistances vasculaires en l'absence de toute lésion histologique patente^{201, 204}. Même en présence de tubules intacts, la fibrose interstitielle peut aboutir à l'hypoxie en modifiant la diffusion péri-tubulaire de l'O₂.

(2) *L'impact glomérulaire favorise l'hypoxie tubulo-interstitielle*

La perfusion tubulaire étant placée en série après celle des glomérules, des anomalies de la vascularisation glomérulaire aboutissent fréquemment à un défaut de la perfusion tubulaire en aval. Ceci a été mis en évidence dans un modèle de glomérulonéphrite au cours duquel la lésion glomérulaire entraînait une stagnation et une réduction du flux sanguin péri-tubulaire aboutissant à une hypoxie. De façon intéressante, cette hypoxie était observable avant l'apparition de la fibrose²⁰⁵.

(3) *Anomalies de la vasomotricité rénale.*

Des études de microperfusion chez l'humain et des travaux expérimentaux ont mis en évidence le rôle de l'altération de la vasomotricité rénale, en l'absence de lésion glomérulaire, dans la genèse des anomalies de perfusion tubulaire²⁰¹. L'angiotensine II semble jouer un rôle important car elle est capable d'induire une hypoxie tubulo-interstitielle par des mécanismes hémodynamiques mais aussi non hémodynamiques²⁰⁶⁻

²⁰⁸. De fait, le blocage du système rénine angiotensine (SRA) exerce un effet positif, à la fois sur le plan métabolique et hémodynamique^{206, 209-210} (*non détaillé dans le cadre de cette revue générale*).

(4) Rôle du stress oxydant et de la respiration cellulaire

Le stress oxydant favorisé par l'angiotensine II et l'anémie exercerait un effet hypoxique indépendamment des effets sur la fibrose par un découplage mitochondrial secondaire à une stimulation de la production de radicaux peroxy-nitrés²¹¹. Cette relation entre stress oxydant et hypoxie est néanmoins encore débattue.

(5) Rôle de l'anémie

Iseki et al. ont révélé que l'anémie est un facteur de risque indépendant de l'IRC par une analyse *post hoc*. Ce risque relatif est, dans ce travail, évalué à + 11% par g/dl de diminution de l'hémoglobine²¹²⁻²¹³. La respiration cellulaire semble elle-même dégradée dans les situations d'IRC : Adler et al. ont montré que la déplétion en NO provoquée par le stress oxydant (stimulation NADPH par angiotensine II) stimule la respiration mitochondriale et provoque un découplage métabolique qui entraîne une hypoxie. Ce phénomène est sans doute favorisé par une augmentation de la demande locale liée à l'hyperfiltration glomérulaire des néphrons restants et à la majoration du travail tubulaire de réabsorption du sodium²¹⁴. Plusieurs traitements ciblant l'anémie ont ainsi montré leur intérêt en tant que thérapeutique de l'insuffisance rénale chronique chez l'animal. Toutefois l'utilisation de l'érythropoïétine (EPO) a montré des résultats divergents²¹⁵.

Une dernière étiologie à cette hypoxie pourrait être une augmentation de la consommation en oxygène. Nous étudierons cette hypothèse plus en détail dans le chapitre décrivant la physiopathologie de l'hypoxie tissulaire au cours du diabète.

b) Hypoxie chronique et fibrose

Après avoir décrit les anomalies à l'origine de l'hypoxie au cours de l'IRC, nous allons analyser les mécanismes à l'origine de l'impact tubulo-interstitiel délétère de cette hypoxie (Figure 8).

(1) Données physiopathologiques

L'effet *in vitro* de l'hypoxie sur des cellules tubulo-interstitielles semble en faveur d'un rôle important de celle-ci dans l'évolutivité de la fibrose rénale et ce par de nombreux mécanismes. Il faut noter que si les protéines *Hypoxic Inducible Factor* (HIF) sont les médiateurs clefs de l'hypoxie, d'autres facteurs de transcription comme le *Nuclear Factor K B* (NFKB) ou SP1 semblent également jouer un rôle. En résumé, l'hypoxie pourrait stimuler une évolution fibrosante par différentes modalités :

- 1) une stimulation de facteur profibrosant comme TGF Beta²¹⁶⁻²¹⁸,
- 2) une apoptose des cellules tubulaires par des anomalies persistantes mitochondriales²¹⁹,
- 3) une modification de l'équilibre de la matrice extracellulaire et des fibroblastes en faveur d'une synthèse de collagène et une diminution de sa dégradation²²⁰,
- 4) une modification du statut immunologique local avec une augmentation de l'inflammation²²¹⁻²²²,
- 5) une possible transition endothéliale myofibroblastique²²³⁻²²⁴. En effet, l'origine des fibroblastes et la modalité par laquelle ils atteignent l'interstitium péri-tubulaire reste un motif intense de débat. Plusieurs hypothèses ont été soulevées : l'activation de fibroblastes résidents, une origine adventitielle, le passage de fibroblastes circulants et une transition endothélio-mésenchymateuse et surtout épithélio-mésenchymateuse (TEM). Pour soutenir cette dernière hypothèse, plusieurs travaux ont souligné le fait que des cellules tubulaires rénales soumises à une hypoxie pouvaient présenter une

trans-différentiation épithéliale mésenchymateuse²²⁵⁻²²⁸. De très nombreux travaux ont étayé cette thématique, toutefois des études récentes contestent l'existence même du concept de TME dans un processus de fibrose non tumoral²²⁹⁻²³⁰.

(2) Données thérapeutiques sur le ciblage du gène Hypoxic Inducible Factor

La signalisation cellulaire en réponse à l'hypoxie rénale implique principalement, comme pour de nombreux tissus, le facteur de transcription HIF²³¹. Les principales études expérimentales concernant l'intérêt de thérapeutiques ciblant HIF apportent des résultats contradictoires. Celles qui ont choisi une manipulation génétique, que ce soit pour une augmentation ou une diminution d'HIF, ont montré que HIF jouerait un rôle délétère. Par contre, les travaux qui se sont attachés à induire une modification pharmacologique destinée à augmenter le taux cellulaire de HIF plaident en faveur du caractère plutôt protecteur de HIF. En fait, le délai de recrutement semble jouer un rôle essentiel dans l'impact rénal de HIF²³²⁻²³⁸.

L'hypothèse d'un rôle capital de l'hypoxie tissulaire dans l'évolutivité de la MRC ou dans la physiopathologie de l'IRA est actuellement intensément débattue. Nous nous sommes donc attachés à étudier l'oxygénation tissulaire rénale au cours de nos différents travaux.

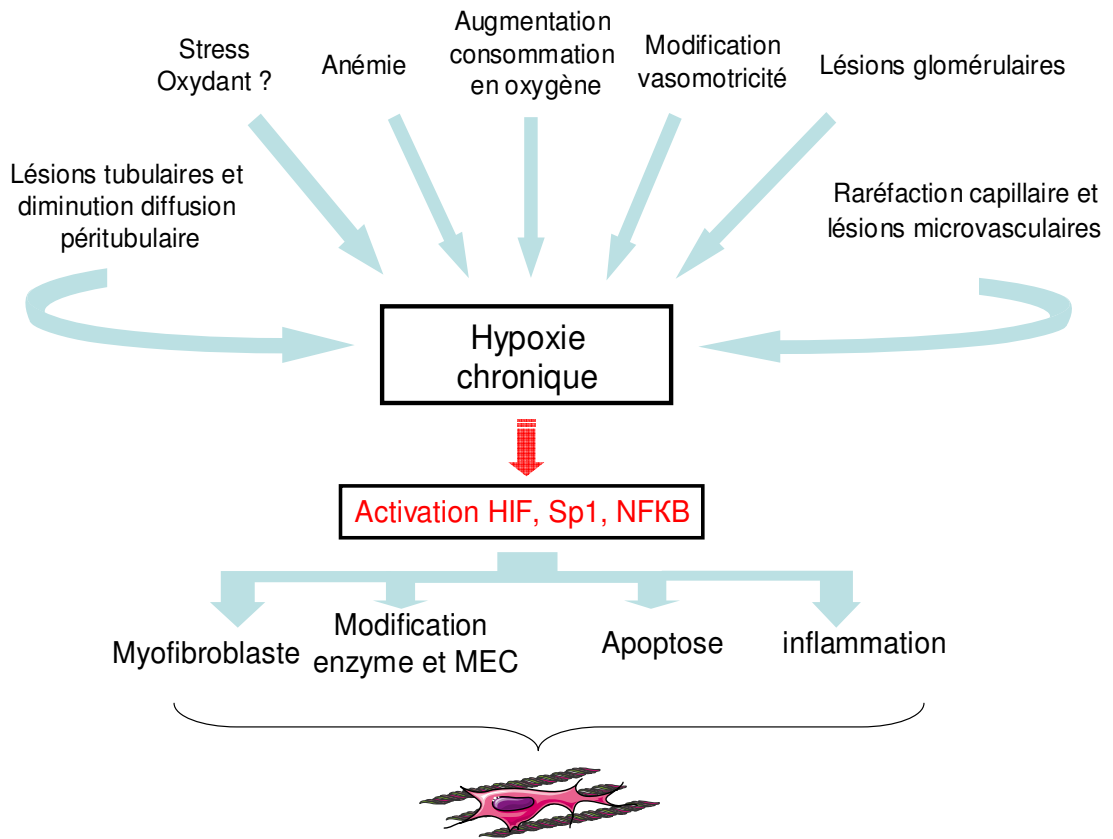


Figure 8 : schéma intégratif expliquant le lien entre l'hypoxie, la fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire au cours de l'IRC

III. MODELES MURINS D'INSUFFISANCE RENALE AIGUE

Les premiers travaux de modélisation ont été réalisés chez les gros mammifères : léporidés, primates et surtout canidés. Ces travaux se sont principalement intéressés à décrire l'impact vasculaire, fonctionnel et morphologique rénal de trois différents modèles d'IRA (toxicité et ischémie par clampage ou hypotension²³⁹⁻²⁵⁵. L'apparition des techniques de biologie moléculaire et d'inactivations géniques ont rendu néanmoins essentielle la modélisation chez le rat ou la souris. Notre revue de la littérature se concentrera donc sur la modélisation de l'IRA chez le muridé.

A. Les différents modèles

1. Modèles par clampage du pédicule rénal

a) Caractéristiques générales

Le modèle de clampage du pédicule rénal, de l'artère ou récemment exclusivement de la veine rénale est le modèle le plus fréquemment utilisé pour simuler l'IRA ischémique. De nombreux travaux sont disponibles avec des durées de clampage allant de 20 à 90 min provoquant essentiellement des différences dans l'intensité des lésions tubulaires proximales. Ce modèle induit des lésions à la cinétique assez standardisée : durant la période de clampage, le rein est totalement anoxique et non fonctionnel. Une nécrose tubulaire se développe durant la période de reperfusion avec une intensité et une étendue qui sont corrélées à la durée du clampage. Pour les durées les plus courtes, les lésions prédominent au niveau S3 du tubule proximal ; puis un clampage plus long impacte la médullaire externe et, en dernier, le cortex en touchant principalement le reste du tubule contourné proximal. Les lésions endothéliales associées aboutissent à un

œdème médullaire et une inflammation. La fonction rénale se restaure de manière inconstante et l'impact rénal peut aboutir à une pathologie tubulo-interstitielle chronique^{193, 256-257}.

b) Faiblesses du modèle

Ce modèle se différencie de la majorité des insuffisances rénales aiguës chez l'Homme par son mécanisme physiopathologique et sa distribution morphologique. En effet, chez l'humain, la cessation complète du flux sanguin n'est observée que dans la situation d'un prélèvement d'organe ou durant la chirurgie aortique avec clampage. Dans la plupart des cas, le mécanisme est une diminution de la perfusion rénale aboutissant à une hypoxie (et non une anoxie) associée possiblement à l'utilisation de néphrotoxiques (AINS, produit de contraste hyperosmolaire). Ainsi la perfusion rénale, bien que diminuée, persiste et ceci aboutit à plusieurs différences capitales.

(1) *Défaut de modélisation de l'hypoxie et de sa tolérance*

En premier lieu, les segments du néphron n'ont pas tous la même tolérance à l'anoxie : le tubule proximal est davantage dépendant de la respiration cellulaire aérobie que la branche ascendante large de Henlé (BALH) et le canal collecteur qui semblent être aptes à utiliser en partie le métabolisme anaérobie²⁰⁰, pour peu que leurs activités de transports soient suspendues¹⁵⁷. En effet, ces segments tubulaires sont, en situation physiologique, à la limite de l'hypoxie. Il faut néanmoins noter que la consommation en oxygène est le principal déterminant de leur balance O_2/VO_2 ²⁵⁸, aboutissant en cas d'hypoxie à une diminution de la réserve en oxygène.

Ainsi, en situation de cessation totale du flux sanguin, les tubules proximaux sont rapidement atteints alors que les BALH, non fonctionnelles, peuvent survivre plus longtemps.

(2) Absence d'équivalence thermique

La température est un déterminant essentiel du développement des lésions dans ce modèle²⁵⁹⁻²⁶⁰. Ainsi, les situations de cessation complète du flux sanguin chez l'humain, bien que théoriquement les plus semblables à ce modèle, peuvent présenter d'importantes variations du fait de ce paramètre. L'impact rénal de la durée d'ischémie ne sera pas identique entre l'ischémie froide d'un greffon rénal et l'ischémie chaude d'un clampage aortique de chirurgie vasculaire. En situation expérimentale, la température de l'animal et la technique de réimplantation du rein dans la cavité abdominale durant la période de clampage doivent donc être contrôlées.

(3) Différences histologiques

Au niveau histologique, certaines lésions sont communes à l'humain et au modèle de clampage du pédicule (perte de la bordure en brosse, présence de dépôt intratubulaire) mais le clampage induit une nécrose extensive des tubules proximaux et des lésions distales moindres (BALH, tube contourné distal (TCD) et canal collecteur)^{256, 261-266}. En revanche, chez l'Homme, ces lésions sont plus subtiles et focales, affectant les tubules proximaux et distaux²⁶⁷⁻²⁷¹.

(4) L'ischémie totale empêche les interactions systémiques.

L'interruption complète du flux sanguin empêche la circulation rénale de facteurs humoraux impliqués dans la lésion tissulaire (par exemple, le couple acido-basique $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, l'adénosine, et les substrats nécessaires à la génération de radicaux libres oxygénés tel que l'hypoxanthine/xanthine²⁷²). Cette absence d'interaction entre le rein et le reste de l'organisme au cours de ce type d'IRA inhibe ainsi toute participation systémique²⁷³ à l'agression rénale.

(5) *Lésions microcirculatoires*

L'interruption totale du flux provoque des lésions de la microcirculation plus sévères qu'une hypotension isolée²⁷². Ceci peut aboutir à la persistance d'une vasoconstriction et au développement d'un important œdème cellulaire qui empêche une perfusion vasculaire efficace du cortex profond et de la zone cortico-médullaire. Ceci participe probablement à aggraver les lésions initiales par le biais d'une hypoperfusion persistante^{239, 274-277}.

(6) *Conséquence des ces disparités physiopathologiques sur les essais thérapeutiques*

Il est intéressant de noter que beaucoup de thérapeutiques, testées avec succès chez l'animal dans le modèle de clampage du pédicule rénal, permettent avant tout une amélioration de la perfusion rénale : hémodilution, antagoniste de l'endothéline, agents anti-inflammatoires. En effet, l'amélioration de la perfusion par augmentation de la pression de perfusion, la réduction de l'hématocrite, l'expansion du volume intravasculaire avec du sérum physiologique ou la néphrectomie controlatérale diminue de façon spectaculaire les lésions et accélère la récupération chez le rat^{239, 262, 276-284}. De même, l'effet d'autres thérapeutiques ciblant originellement un effet trophique, tels que les facteurs de croissance, peuvent également agir via un effet de vasodilatation intrarénale²⁸⁵⁻²⁸⁶. Il est ainsi possible qu'une grande partie de l'amélioration du pronostic observée dans les essais thérapeutiques positifs chez l'animal utilisant le modèle de clampage du pédicule rénal soit liée aux particularités mêmes du modèle. Ceci expliquerait l'échec actuel du transfert de la majorité de ces thérapeutiques chez l'Homme.

2. Modèles toxiques

a) Les modèles de néphrotoxicité

Le cisplatine ou la gentamycine ont été fréquemment utilisés car ils sont néphrotoxiques chez l'animal. Néanmoins, ces médicaments ont un effet beaucoup plus modéré chez l'humain. Ceci résulte, en particulier, de l'usage de posologies très élevées chez l'animal afin d'obtenir un effet constant. La gentamycine est un exemple de cette dissociation car les lésions observables chez la souris ne sont pas les mêmes que celles chez l'humain²⁸⁷. Il semble en fait préférable, dans le cadre des modèles par toxicité, de réaliser des agressions multiples aux effets synergiques. Par exemple, en associant une bactériémie à bacille gram négatif à l'injection de gentamycine²⁸⁸ ou une hypovolémie à une exposition à un produit de contraste iodé²⁸⁹. De plus, la simplification physiopathologique suscitée par une origine exclusivement tubulotoxique de l'IRA est probablement faussement réductrice. Certains néphrotoxiques (cyclosporine A) devraient plutôt être décrits comme des agents hypoxémiants. A l'inverse, certains néphrotoxiques considérés comme principalement hypoxémiants (amphotéricine, agents de radio-contraste) ont probablement également un effet tubulo-toxique direct²⁸⁷. Finalement, mis à part les inhibiteurs de la calcineurine, la corrélation entre les lésions expérimentales induites par les modèles de néphrotoxicité chimio-induite et celles observables chez l'humain est souvent mauvaise²⁹⁰.

b) Le modèle de rhabdomyolyse

Un modèle relativement comparable à la situation clinique équivalente chez l'humain est le déclenchement d'une rhabdomyolyse par injection de glycérol²⁹¹⁻²⁹². La lésion tubulaire qui en résulte est causée par la toxicité de l'hème et résulte d'une combinaison de facteurs comprenant une vasoconstriction intra-rénale, une tubulo-

toxicité directe de l'hème et l'obstruction des tubules distaux par des dépôts hématiques^{291, 293}. Ainsi, ce succès relatif du modèle peut en partie être lié au fait qu'il est basé sur des mécanismes multiples de lésions rénales : ischémique, toxique, et obstructive²⁹³.

3. Particularités du modèle de choc septique.

Le sepsis est une pathologie fréquente qui se révèle être la première cause d'IRA en réanimation. Néanmoins, en plus de sa composante hypotensive, l'IRA septique semble associer plusieurs mécanismes physiopathologiques la différenciant des autres atteintes rénales ischémiques. La physiopathologie de l'IRA au cours du sepsis est complexe et mal comprise. Elle associe de l'apoptose, des modifications hémodynamiques locales, une infiltration parenchymateuse par des cellules inflammatoires, une dysfonction endothéliale et des thromboses intra-glomérulaires. L'intensité de l'apoptose et de l'inflammation semble particulièrement prédominer en comparaison aux autres atteintes rénales ischémiques²⁹⁴⁻²⁹⁵ et rend difficile l'extrapolation des résultats générés par cette modélisation aux autres situations cliniques d'IRA.

4. Modèles intracellulaires et *ex vivo*

a) Modèles *in vitro*

Le principal intérêt de ces modèles de culture cellulaire est de permettre l'isolement, le contrôle et l'analyse des effets d'un stimulus donné. Néanmoins l'ischémie est associée à une hypoxie mais également à une hypercapnie, une acidose, un déficit énergétique et à l'accumulation de produits du métabolisme anaérobie (acide lactique). Il n'est pas possible de reproduire efficacement l'ensemble des anomalies tissulaires d'un organe *in vitro*. Les études *in vitro* sont essentielles mais ne peuvent se substituer, *in fine*, à une analyse *in vivo* (**Figure 9**)^{66, 296-297}.

b) Modèles *ex vivo*

Les études de tubules *ex vivo* ou de rein isolés perfusés représentent également une étape expérimentale intéressante pour étudier l'impact d'un état de choc sur cet organe ou une de ses structures. Ce type de travaux est essentiel dans l'analyse des transports transtubulaires ou de la consommation en oxygène^{66, 298-299}. Néanmoins, un nombre croissant de travaux met en évidence une composante systémique dans les défaillances organiques sévères, or cette composante échappe également à ce type de modélisation²⁷³.

5. Autres modèles

a) Modèles par néphrectomie

Les néphrectomies unilatérales et bilatérales sont intéressantes car elles permettent de s'intéresser à l'impact d'une réduction néphrogénique pure. Ils permettent d'étudier les effets de la diminution de la fonction rénale qui est une caractéristique fondamentale de l'IRA³⁰⁰⁻³⁰¹. Leur principal défaut est de ne pas reproduire la composante ischémie-reperfusion. Ce processus est pourtant capital dans l'impact tissulaire d'une agression ischémique³⁰².

b) Modèle d'ischémie reperfusion par arrêt cardiaque

Ce modèle a été développé par plusieurs équipes mais pose le problème d'un arrêt circulatoire complet prolongé³⁰³ et celui d'une forte mortalité. Finalement, l'arrêt circulatoire complet est source des mêmes limitations (anoxie *versus* hypoxie) que le clampage du pédicule rénal, même si la composante systémique est cette fois présente.

c) Modèles transgéniques

La possibilité d'utiliser des modèles transgéniques est un intérêt essentiel de l'expérimentation chez les muridés. Deux travaux d'inactivation génique ont été réalisés chez la souris pour induire une IRA et ont montré l'importance des structures tubulaires proximale S3 et BALH. Sekine et al. ont mis au point un modèle d'expression du récepteur de la toxine diphtérique localisée au segment S3 confirmant son importance fonctionnelle dans l'IRA³⁰⁴. De même, Srichai et al. ont introduit le gène de la thymidine kinase sous le contrôle du promoteur de la protéine de Tamm-Horsfal, spécifique à la BALH, permettant une sensibilité exclusive de ces cellules à l'acyclovir³⁰⁵.

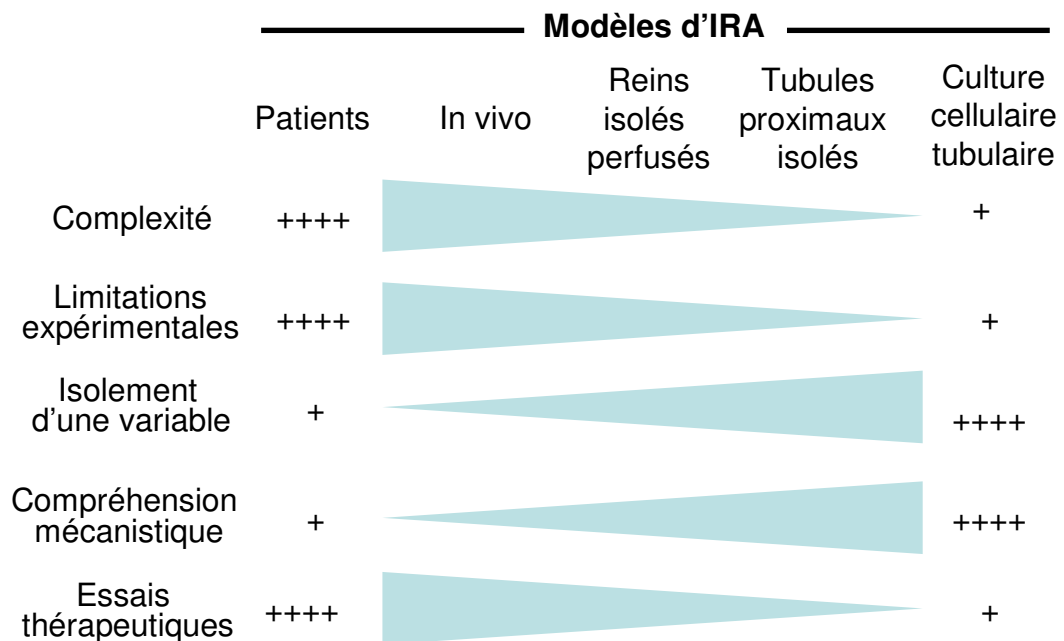


Figure 9 : Intérêts et inconvénients respectifs des différents modèles d'IRA disponibles en expérimentation animale ou *in vitro*³⁰⁶.

B. Modélisation par hypotension

1. Modèle du choc hémorragique

De nombreux modèles de choc hémorragique contrôlé chez la souris avec ou sans survie supérieure à 24 heures ont été décrits^{12, 307-312}. Ces modèles ont montré leur intérêt dans des domaines tels que l'immunologie, la pneumologie, la traumatologie ou la neuro-traumatologie. Différentes techniques ont été mises en œuvre pour optimiser ce modèle : avec ou sans ventilation artificielle, avec ou sans voie veineuse centrale. La seule constante est la mise en place d'un cathéter artériel. Curieusement le rein a bénéficié de peu d'attention dans ces études.

a) Modélisation de l'ARA par choc hémorragique chez le muridé

(1) Quarante ans de doute

L'hypovolémie en tant que modèle d'ARA chez le muridé a été, dans un premier temps, étudiée chez le rat. Les études cliniques humaines définissent l'IRA ischémique comme un évènement rénal suivant une hypotension artérielle transitoire (PAS 80-100 mmHg). Néanmoins, des formes prolongées (2 à 3 heures) et relativement profondes (50 mmHg) d'hypotension chez le rat n'ont pas permis de mettre en évidence un impact rénal conséquent²⁵⁴⁻²⁵⁵. Par la suite, Dobyán et al. ont montré, également chez le rat, qu'après 90 minutes de choc à une PAM de 40 mmHg, des lésions évocatrices d'agression tubulaire rénale apparaissent principalement au sein de la pars recta avec un trouble de la capacité de concentration des urines mais sans insuffisance rénale évaluée par l'augmentation de l'urée sanguine³¹³. Une observation identique a été faite pour une durée de choc de 2 heures à une pression de 40 mmHg³¹⁴. Néanmoins, une étude importante réalisée par Zager et al. a révélé qu'il est nécessaire de diminuer la pression de perfusion rénale par clampage partiel aortique à moins de 20 mmHg pour obtenir des

lésions tubulaires, ce qui n'est pas compatible avec la survie du rat²⁷². Chez la souris, il a longtemps été considéré, par analogie, que l'hypovolémie isolée ne pouvait pas, à elle seule, être une cause d'IRA par nécrose tubulaire³¹⁵. Cette affirmation était, et est encore, fréquemment reprise dans de nombreuses revues de la littérature s'intéressant à la modélisation de l'IRA²⁷³.

(2) Premières preuves

Pourtant, chez la souris, Mees et al. ont mis en évidence des lésions histologiques de différents organes avec une gravité variable en fonction du genre et de l'âge. Dans cette étude, après 90 minutes de choc à 35 ± 5 mmHg, des lésions histologiques évocatrices d'agression tubulaire rénale aiguë ont été visualisées¹². Aucune analyse de la fonction rénale n'a été néanmoins effectuée. Van Meurs et al. ont noté l'annulation de l'expression rénale de Tie 2 (un récepteur de la tyrosine kinase spécifique à l'endothélium) après un choc hémorragique. Legrand et al. ont mis en évidence dans les suites d'un choc hémorragique, chez le rat, une chute du débit sanguin rénal, de la PO_2 microvasculaire rénale et des deux paramètres DO_2 et VO_2 . Efrati et al. ont, par la suite, révélé qu'une procédure de choc hémorragique de 90 minutes chez le rat peut aboutir à des lésions histologiques et une altération du DFG estimé³¹⁶.

C. Travail personnel

Introduction au travail

Nous avons donc souligné que l'existence d'une IRA est un facteur majeur et indépendant de surmortalité dans de nombreuses pathologies médicochirurgicales^{97, 317-318}. Nous avons également noté que, dans les principaux modèles animaux connus, la nécrose est massive et diffuse du fait de la brutalité et de l'intensité des agressions mises en œuvre, ce qui explique l'absence d'adaptation physiologique, contrairement à

ce que l'on observe en situation clinique. En effet, chez l'Homme, l'histologie des IRA ischémiques montre principalement des zones de nécrose ou de souffrance cellulaires limitées, prédominant à la jonction cortico-médullaire. Certains auteurs ont ainsi récemment suggéré de remplacer le terme de « nécrose » par celui d'« agression » tubulaire²⁹⁰. Il est donc possible que l'absence de progrès décisif récent dans l'amélioration du pronostic de l'IRA succédant à une hypovolémie isolée tient, en partie, aux lacunes des modèles expérimentaux actuellement disponibles. Nous avons donc décidé de mettre au point un modèle basé sur un mécanisme d'agression rénale isolé : l'hypotension. Pour cela nous nous sommes appropriés le modèle de choc hémorragique afin de l'adapter à notre objectif. En effet, nous avons associé au cathéter artériel fémoral une voie veineuse centrale jugulaire, une anesthésie générale, une ventilation artificielle à faible volume courant (ventilation « protectrice ») et une normothermie, afin de reproduire le plus fidèlement possible les conditions actuelles de prise en charge des patients en choc hémorragique. L'objectif secondaire de ces améliorations était d'optimiser la survie de l'animal.

Par la suite nous avons déterminé la profondeur (35 mmHg) et la durée (2 heures) pour lesquelles des altérations morphologiques et fonctionnelles rénales sont systématiquement observées. Nous avons également conclu qu'au delà d'une durée de 2 heures, ou en deçà d'une profondeur d'hypotension de 30 mmHg, les souris présentent un choc hémorragique décompensé incompatible avec la survie.

Nous avons ensuite validé le modèle en analysant l'impact rénal fonctionnel, moléculaire et morphologique de ces conditions expérimentales sur une durée totale de vingt et un jours. Nous avons ainsi observé qu'un mécanisme hypotensif isolé chez la souris peut induire une IRA organique associée à une hypoxie et à des anomalies fonctionnelles tubulaires et morphologiques prédominant de J2 à J6. Certaines de ces

anomalies fonctionnelles tubulaires ainsi qu'une fibrose interstitielle sont visibles vingt et un jours après l'agression malgré une reconstruction épithéliale *ad integrum* et une restauration du DFG mesuré par la clearance de l'inuline. Ce modèle semble ainsi induire une ARA aux conséquences assez proches de celles notées dans les suites d'une ischémie chez l'humain.

Publications et travaux

Manuscrit n°1

Mayeur N, 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.

Cette publication a été soulignée par un éditorial lors de sa parution (**annexe n°2**) et a fait l'objet d'un échange de correspondance dans la revue *Anesthesiology (in press)*

Ce travail a également donné lieu à deux abstracts (**annexes n°3 et n°4**) ainsi qu'à une communication orale : « *Acute tubular injury in mice: a new model based on hemorrhagic shock* » N Mayeur, Congrès de la Société Française de Physiologie 2010, Bordeaux. France. 23-25 mars

Cette partie du travail a été soutenue financièrement par l'**Académie Nationale de Médecine**.

Morphologic and functional renal impact of acute kidney injury after prolonged hemorrhagic shock in mice*

Nicolas Mayeur, MD; Vincent Minville, MD, PhD; Acil Jaafar, MD; Julien Allard, MD; Talal al Saati, PhD; Céline Guilbeau-Frugier, MD; Olivier Fourcade, MD, PhD; Jean Pierre Girolami, PhD; Stéphane Schaak, PhD; Ivan Tack, MD, PhD

Objective: Sparse data are available on renal consequences of hemorrhagic shock in mice. This study aimed to extend the current knowledge on functional and morphologic renal impact of hemorrhagic shock in mice and to determine its ability to stand as an accurate model of acute kidney injury.

Design: *In vivo* study.

Setting: University research unit.

Subjects: C57/BL6 mice.

Interventions: A model of controlled hemorrhagic shock was adapted to determine the renal impact of hemorrhagic shock in mice.

Measurements and Main Results: Renal functions and kidney morphology were followed up from 3 hrs to 21 days after hemorrhagic shock. When prolonged up to 2 hrs, hypotension (35 mm Hg mean arterial blood pressure) induced by temporary blood removal was responsible for an early and lasting increase in hypoxia-inducible factor-1 α and kidney-inducible molecule-1 gene expression that paralleled acute tubular necrosis and renal failure. Two-hr hypotension induced an important but reversible

decrease in glomerular filtration rate up to 6 days after hemorrhagic shock. Other renal dysfunctions included a renal loss of sodium, assessed by the increase in sodium excretion, and a decrease in urine concentration that persists up to day 21. Tis-sular damages prevailed in the outer medulla 2 days after hemorrhagic shock, being maximal at day 6. At day 21, renal healing was associated with epithelial recovery and a significant interstitial fibrosis.

Conclusions: Our data indicate that apparent recovery of renal function after acute kidney injury can mask persisting dysfunc-tions and tissular damages that could predispose to chronic kidney disease. Prolonged hemorrhagic shock in mice closely mimics renal effects induced by similar situation in humans, thus providing a useful tool to investigate pathophysiological mecha-nisms and protection strategies against acute kidney injury in situations such as hemorrhagic shock. (*Crit Care Med* 2011; 39: 2131–2138)

KEY WORDS: acute kidney injury; hypotension; mice; hemor-rhagic shock; fibrosis

Acute kidney injury (AKI) is one of the most important compli-cations among hospitalized pa-tients and is associated with considerable mortality and morbidity (1, 2). Public health importance of AKI is confirmed by reports indicating its in-creasing incidence and that some survi-

vors of AKI may present irreversible decline in kidney function, potentially leading to chronic kidney disease and to a decrease in survival (3–6). Ischemic acute tubular necrosis (ATN) appears as the most common cause of AKI (7). Ischemia–reperfusion induced by short-term (30–90 mins) clamping of the renal artery is the most commonly used animal model of ischemic AKI because of its feasibility and reproducibility. Other models such as cold ischemia, global ischemia by circulatory arrest, or injection of tubulotoxins (folate/aminosides) have also been used (8). However, because the most common cause of ischemic ATN in humans is hypovolemia and hypotension (9–11), these models are not completely adapted to an anthropomorphic analysis of pathophysiological mechanisms involved in AKI. Based on this feature, several groups have recently focused on a model of controlled hemorrhagic shock in rodents (12, 13). New data obtained with this model indicate that hemor-rhagic shock in mice has a very early

impact on renal endothelial integrity with a loss of the microvascular endothe-lial Tie2 receptor that leads to endothelial dysfunction and hyperpermeability (12). However, the late functional and histo-logic impact of the sequence bleeding—hemorrhagic shock—resuscitation on the kidney has not yet been investigated in mice and its capacity to reproduce the sequential renal changes observed during human AKI remains to be evaluated.

Therefore, the goal of the present work was to extend the current knowl-edge on the chronology of the functional and morphologic renal impact during AKI induced by hemorrhagic shock in mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals. C57/BL6 wild-type mice were obtained from Harlan (Harlan France, Gannat, France). Animal experimentations were performed according to national and institutional animal care and ethical guidelines and were approved by local board. Mice were shocked or sham-operated and euthanized at different

*See also p. 2196.

Département d'Anesthésie Réanimation (NM,VM, OF, SC), Equipe Accueil Inserm 4564 Université Paul Sabatier Toulouse III, CHU Purpan, Toulouse, France; Laboratoire de physiologie and Inserm U858 (NM, VM, AJ, JA, JPG, SS, IT), CHU Rangueil Université toulouse III, Toulouse, France; Unité Inserm 563 (TAS), CHU Purpan, Toulouse, France; and Service d'anatomopathologie (CGF), CHU Rangueil, Toulouse, France.

This work was supported by a grant from the Académie Nationale de Médecine to Dr. Mayeur.

The authors have not disclosed any potential conflicts of interest.

For information regarding this article, E-mail: nicolas.mayeur@inserm.fr

Copyright © 2011 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/CCM.0b013e31821f04f0

times after surgery. Experimental groups were as follows: 3 hrs (H3; n = 10), 12 hrs (H12; n = 6); 2 days (D2; n = 10), 6 days (D6; n = 10), and 21 days (D21; n = 10) after shock (n for sham and shock mice).

Protocol Design. We adapted the recently published hemorrhagic shock model of AKI (12, 13). The main criteria for AKI diagnosis of AKI were prolonged decrease in glomerular filtration rate (GFR) and typical renal lesions. GFR changes were diagnosed by plasma cystatin C concentration and confirmed by inulin clearance. Shock duration was determined as the shortest time able to induce both AKI and ATN in all mice. Resuscitation modalities were adjusted to restore initial hematocrit, mean arterial pressure, and to optimize survival. Adequate mechanical ventilation modalities were adjusted to body weight based on the literature, and the lack of hypoventilation during the procedure was controlled by initial blood oxygenation samples on control mice.

Hemorrhagic Shock Protocol. Hemorrhagic shock was induced as follows. Briefly, animals were anesthetized with ketamine and xylazine (250 mg/kg and 10 mg/kg, respectively) and intubated using an intratracheal canula. Mechanical ventilation (9 mL/kg, 150 min⁻¹) was carried out with a specific ventilator Minivent 845 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany). The left jugular vein and femoral artery were catheterized and anesthesia was maintained with ketamine (20 mg/kg/hr) until the end of shock. Animal body temperature was continuously monitored and maintained to 37°C. Blood was withdrawn through the femoral arterial line until the mean arterial blood pressure reached 35 mm Hg. Blood was stored in 0.2 mL of heparinized serum. All along the procedure, femoral arterial blood pressure was monitored using a blood pressure analyzer (TA 4000; Gould, Eichstetten, Germany) and mean arterial blood pressure maintained to 35 ± 5 mm Hg for 2 hrs by successive blood withdrawal or replacement (by steps of 0.01 mL). At the end of that period, the blood previously stored and a lactated Ringer's solution (twice the initial blood volume) was infused to provide appropriate fluid resuscitation. Sham-operated animals underwent the same anesthetic and surgical procedures, but neither hemorrhage nor fluid resuscitation was performed. Renal function was investigated at D2, D6, and D21 and kidneys were removed at each time point (H3, H12, D1, D2, D6, and D21) to perform real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction and histologic analysis. A catheter was introduced into the abdominal aorta. The left kidney was excised, quickly sliced, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C in RNA later (Qiagen, Hilden, Germany) until RNA extraction. The right kidney was washed with 10 mL of phosphate NaCl buffer (phosphate-buffered saline, pH: 7.4; Sigma Chemical, Mumbai, India) and perfused with 10 mL of 10% formalin (pH 7.4) through the abdominal aorta, removed,

quickly sliced, and stored for 48 hrs in 10% buffered formalin.

Renal Function Studies. Mice were anesthetized with a single intraperitoneal injection of 150 mg/kg sodium thiobutobarbital (Inactine; Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) and anesthesia was maintained using intravenous infusion (0.83 mg/kg/min) of sodic thiopental (pentothal; Mayne Pharma, Salisbury South, Australia). After tracheotomy, the right jugular vein was cannulated to perfuse inulin and the right femoral artery was cannulated to monitor arterial blood pressure and to obtain blood samples. Urine was collected through an intravesical catheter inserted after a minimal laparotomy incision. After surgery, mice were allowed to recover for 30 mins. Renal function was determined over a 60-min clearance period. GFR was assessed by inulin clearance.

Histologic Analysis. Kidney samples, preserved in 10% buffered formalin, were dehydrated and embedded in paraffin. Four-micrometer sections were stained with periodic acid-Schiff, hematoxylin-eosin, and Masson trichrome. Sections were then evaluated for signs of ATN by two nephrology experimented pathologists in a blinded fashion. To objectively assess the presence of tubular injury, sections were graded according to previous described scores on medulla, outer medulla, and cortex (14). Ten fields (400×) were reviewed for each coloration. Histologic changes were evaluated by counting the percent of tubules that displayed cell necrosis, loss of brush border, cast formation, and tubule dilation as follows: 0, none; 1, <10%; 2, 11% to 25%; 3, 26% to 45%; 4, 46% to 75%; and 5, >76%. After this gradation, quantification was performed to specify the kind of lesions present at D2 and D6: desquamation, cellular vacuolization, and casts were quantified in every segmentation and the number of tubules showing one of these injuries was expressed as a rate (percent) of all the pathologic tubules. Fibrosis was detected at D21 using Masson trichrome coloration and quantified by morphologic analysis based on color recognition in Photoshop Cs4 software (Adobe Systems

Incorporated, San Jose, CA) using Sirius red-colored slides.

Immunohistochemical Procedures. Immunohistochemical staining was performed on paraffin-embedded tissue sections using Hydroxy-probe-1 monoclonal antibody Chemicon International, Temecula, CA; 1:50) according to the manufacturer's instructions. The immunostaining was preceded by a pretreatment using trypsin proteolytic digestion. After incubation with the antibody for 40 mins at room temperature, sections were incubated with biotin-conjugated polyclonal F(ab')₂ antimouse IgG secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA; 1:500) followed by the streptavidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Slides were then counterstained with hematoxylin. Negative controls were incubated in buffered solution without the primary antibody.

Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. Mouse kidney slices were stored at -80°C in RNA later (Qiagen) until analysis. Total RNA was isolated using RNeasy Plus Mini kit (Qiagen). RNA quality and integrity were checked by microfluidic capillary electrophoresis on an Experion (BioRad, Hercules, CA) and its concentration determined spectrophotometrically on an ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE). Reverse transcription was performed on 1 g RNA using Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 200 ng random hexamers (Fermentas GmbH France, Villebon sur Yvette, France). Real-time quantitative polymerase chain reaction was performed on a Taqman 7900HT device (Applied Biosystems, Foster City, CA) using cDNA corresponding to 5 ng of total RNA and quantitative polymerase chain reaction MasterMix Plus for SYBR Green I (Eurogentec, Liège, Belgium). All samples were run in duplicate and results were analyzed using SDS 2.3 software (Applied Biosystems). Relative mRNA expression levels were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method, normalized to glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (for kidney-inducible molecule-1 [KIM-1]

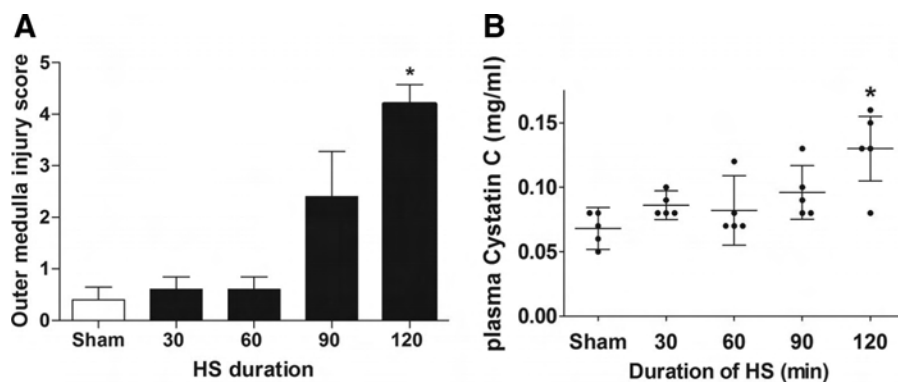


Figure 1. Duration-dependent impact of hemorrhagic shock (HS) on renal function and histology. *A*, Glomerular filtration rate estimated by plasma cystatin C collected on aortic blood 6 days after HS duration of 30, 60, 90, and 120 mins. *B*, Outer medulla injury score 6 days after HS duration of 30, 60, 90, and 120 mins (n = 5); **p* < .05 vs. sham.

and hypoxia-inducible factors (HIFs) or glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and β -actin levels for collagens, and expressed as fold increases relative to the sham animals.

The following primer pairs (forward and reverse) were used to quantify messenger RNA (mRNA) expression levels: KIM-1, 5'-CAAGCAACCGCTACCAGATAAA-3' and 5'-GATTGTCAAGGACGCATTTC-3'; HIF-1 α , 5'-CACCGATTGCGCATGGA-3' and 5'-ACGTTCCAGAACTCATCTTTTCTCTCTC-3'; HIF-2 α , 5'-GCCGACCAGAAATGGATA-3' and 5'-GGT-CACCACAGCAATGAAACC-3'; collagen I, 5'-TGTTG-CGCATGACGTGCAAT-3' and 5'-GGGTCCC-TCCACTCCTACA-3'; collagen III, 5'-ACGTAG-ATGAATTGGGATGCAG-3' and 5'-GGGTTGGG-CAGTCTAGTG-3'; collagen IV, 5'-CCGGGATT-TACTGGACCACC-3' and 5'-CCCTTGCTCTCCCTT-GTCA-3'; glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, 5'-AGTCCGTGTGAACGGATTG-3' and 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAAGGTCA-3'; β -actin, 5'-GGCTGTATCCCTCCATCG-3' and 5'-CCAGT-TGGTAACAATGCCATGT-3'.

Statistical Methods. Data are provided as means \pm SEM. Comparisons between groups were performed using the nonparametric Kruskal-Wallis one-way analysis of variance followed by a *post hoc* Dunn's test. Results with $p < .05$ were considered as statistically significant. Analyses were performed using GraphPad Prism 4 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA).

RESULTS

A 2-Hhr Hemorrhagic Shock Is Sufficient to Induce AKI. The targeted arterial pressure of 35 ± 5 mm Hg was chosen based on the literature concerning hemorrhagic shock (10, 12). Plasma cystatin C was used as an early biomarker of AKI as recently validated (15). Whereas cystatin C did not change when hemorrhagic shock (HS) did not exceed 60 mins, increasing shock duration to 90 mins and up to 120 mins resulted in a significant increase in plasma cystatin C in all mice (Fig. 1). After a 2-hrs HS, mean cystatin C significantly rose 6 days after shock and both renal function studies and histology revealed that acute renal failure and tubular necrosis were present (Fig. 1). Global mortality during protocol was 15%. Mortality increased dramatically if deeper hypotension or longer shock were performed (data not shown).

Hemorrhagic Shock Induced Increase in mRNA HIF-1 α and KIM-1 Expression. To further document the impact of HS on tubular cells, we analyzed mRNA expression of HIF-1 α , HIF-2 α , and KIM-1 using real-time polymerase chain reaction at 3 hrs, 12 hrs, 1 day, 2 days, 6 days, and 21 days (H3, H12, D1, D2, D6, and D21, respectively) after HS. HIF-1 α mRNA was significantly increased from H3 to D6 in

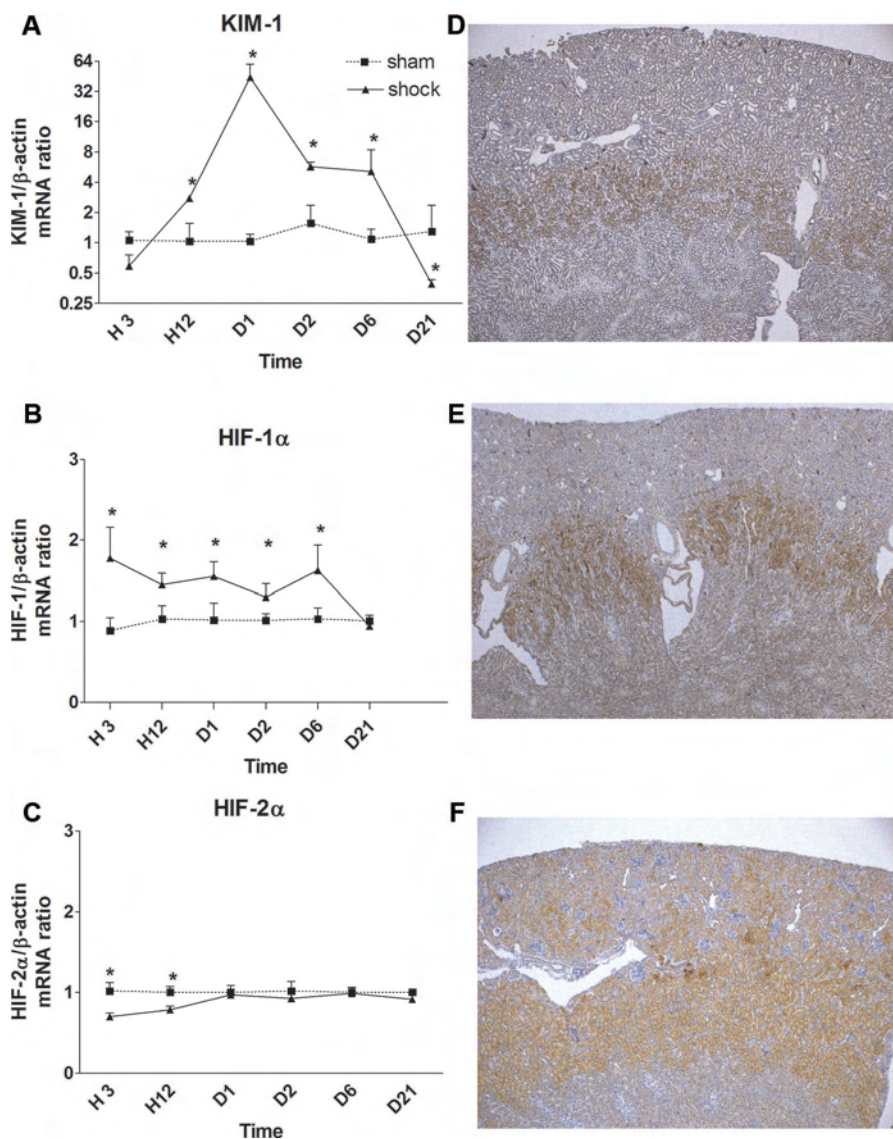


Figure 2. Sequential whole kidney messenger RNA (mRNA) expression of kidney-inducible molecule-1 (KIM-1), hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α , and HIF-2 α by real-time polymerase chain reaction 3 hrs, 12 hrs, 1 day, 2 days, 6 days, and 21 days (H3, H12, D1, D2, D6, and D21, respectively) after hemorrhagic shock. A, mRNA of KIM-1 is highly upregulated (from H12 to D6) in the kidney after hemorrhagic shock when compared with sham. B, mRNA of HIF-1 α is increased in the shock group when compared with sham, whereas nonmodification in HIF-2 α was shown. Immunohistochemical staining with pimonidazole in control (D), sham (E), and shock (F) mice. Shock mice showed more pronounced and diffuse hypoxia when compared with sham and control (n = 3 to 5) * $p < .05$ shock vs. sham.

the shock group when compared with sham and returned to baseline at D21. No significant increase in HIF-2 α was observed at any time. Conversely, from H3 to H12, HIF-2 α was underexpressed in the shock group when compared with sham and normalized thereafter. KIM-1 mRNA was precociously (from H12 to D6) and highly expressed in kidney, indicating tubular cell injury (Fig. 2).

HS Induces Prolonged Organic Renal Failure. We next investigated the consequences of 2-hr HS on GFR at D2, D6,

and D21. At D2, GFR was noticeably and significantly decreased when compared with both control and sham groups ($p < .05$ vs. sham and $p < .01$ vs. control); this decrease persisted up to D6. Finally, GFR totally recovered at D21. Renal function study in the sham group showed slight functional alterations when compared with the control, but the light tubular dysfunction was transitory (D2, D6) and was not associated with a significant decrease in GFR (Fig. 3). The acute renal failure in the shock group did not only

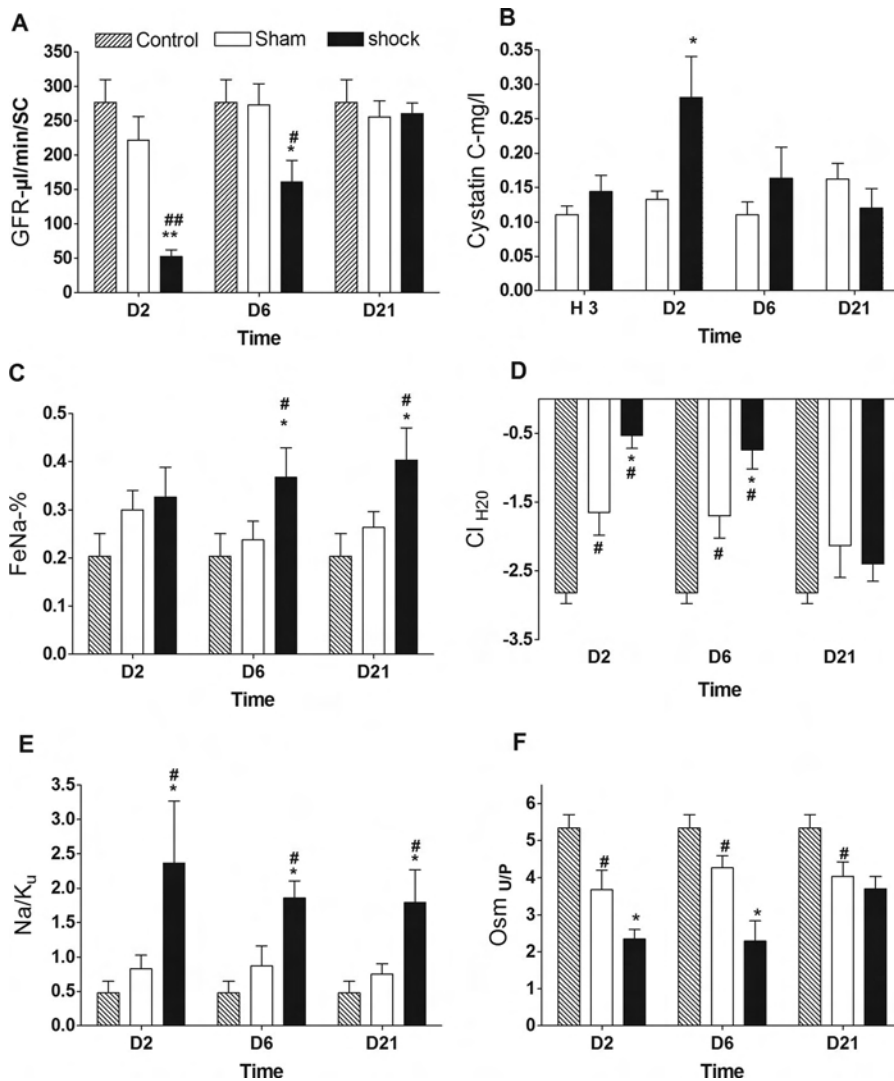


Figure 3. Effect of hemorrhagic shock (HS) on glomerular and tubular functions and plasma cystatin C. Renal function studies after HS showed intrinsic renal failure with tubular dysfunctions. A, At day (D) 2 and D6, the HS group showed significant decrease in glomerular filtration rate (GFR) when compared with sham mice. Furthermore, plasma cystatin C increased at D6 vs. the sham group (B). Tubular dysfunction was showed in the sham group in comparison to the control group but without renal failure as suggested by the lack of GFR decrease. Tubular dysfunction was illustrated by the increase in urinary FeNa (C), by the decrease in water clearance (D), by the increase in Na/K urinary ratio (E), and by the decrease in urinary/plamatic osmolality ratio (F). (n = 5); *p < .05 vs. control. **p < .01 vs. control. #p < .05 sham vs. control. ##p < .01 sham vs. control; §p < .05 vs. D0; §§p < .01 vs. D0.

Table 1. Sham and shock groups at day 2, day 6, and day 21

Characteristics	Control	Day 2		Day 6		Day 21	
		Sham	Shock	Sham	Shock	Sham	Shock
Age, wks	26.2 ± 1.3	26.8 ± 1.3	26.7 ± 2.3	27.4 ± 0.7	27.1 ± 1.5	26.3 ± 1	26.8 ± 1.1
Blood osmolality, mOsm/kg of H ₂ O	317.4 ± 4.5	322 ± 5.4	332.4 ± 6.7 ^b	324 ± 4.4	318 ± 5.16	324 ± 4	320.7 ± 3.05
Urinary sodium extraction fraction, %	0.2 ± 0.11	0.3 ± 0.07	0.33 ± 0.1	0.23 ± 0.07	0.43 ± 0.05 ^{a,b}	0.28 ± 0.09	0.34 ± 0.13 ^b
Urinary output, µL/min	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1 ^c	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2
Ratio between urinary osmolality and blood osmolality	5.3 ± 0.8	3.7 ± 0.8 ^b	2.4 ± 0.5 ^{a,b}	4.3 ± 0.6 ^b	2.3 ± 1.2 ^{a,b}	4 ± 0.7 ^b	3.7 ± 0.6 ^b
Water clearance, µL/min	-2.8 ± 0.3	-1.6 ± 0.6 ^b	-0.5 ± 0.3 ^c	-1.7 ± 0.7 ^b	-0.9 ± 0.5 ^c	-2.1 ± 0.8	-2.4 ± 0.4
Hematocrit, %	41.7 ± 2.8	40.3 ± 2.5	35.2 ± 3.5 ^b	38.5 ± 1.9	36.8 ± 2.4 ^b	41.3 ± 1.5	40.7 ± 2.5
Mean arterial pressure, mm Hg	80.4 ± 5.8	78.8 ± 4.6	72.2 ± 10.6	77.9 ± 17.4	81.7 ± 11.3	77.7 ± 7.5	72.3 ± 7.4

^ap < .05 vs. sham; ^bp < .05 vs. control; Mann-Whitney test.

result from a prerenal mechanism as shown by the renal function study. Indeed, urinary Na/K was increased after shock (p < .05 vs. sham). Furthermore, urine concentration ability was reduced as shown by the increase in water clearance and the decrease in urine to plasma osmolality ratio (Fig. 3). Unlike GFR, mild tubular dysfunction was still present at D21 because both urinary FeNa and urine concentration ability remained altered. No significant difference was observed between sham and shock groups regarding hematocrit and arterial blood pressure at D2 and D6 (Table 1).

Acute Renal Failure Is Associated With Acute Tubular Injury. HS induces histologic lesions corresponding to acute tubular necrosis (Fig. 4). Almost no lesions were observed at H3 with only sparse tubular vacuolization in the outer medulla observed in one mice (data not showed). By contrast, at D2, cell vacuolization and patchy loss of brush border were present in the cortex and in the outer medulla of all mice. Six days after shock, typical lesions of acute tubular aggressions were observed: tubular cell loss with flattered and paucicellular tubular epithelium with vacuolated cells and sloughed off tubular cells in tubular lumen and intratubular casts. These lesions prevailed in outer medulla and cortex, whereas inner medulla showed only few casts prevailing at D6. Sham-operated mice exhibited an ATN score <1, representing significantly less tubular aggression in contrast with shock mice (Fig. 5). Twenty-one days after shock, histologic repair was almost complete, but significant peritubular fibrosis was then present in shock mice when compared with sham as shown by red Sirius coloration and the increase in collagen 1 and 3 (Fig. 6).

DISCUSSION

The present study reports that a 2-hr HS in mice is viable after resuscitation but leads to transient acute tubular injury and renal failure. This transient acute renal failure is severe and is sufficient to induce persistent renal damages. As described in humans, restoration of GFR should not be considered as a reliable index of recovery because some tubular dysfunctions remained present at D21 as supported by reduced urine concentration ability and increased renal loss of sodium. More importantly and despite GFR normalization, histologic recovery is not achieved *ad integrum* because a slight but significant peritubular fibrosis was observed predominantly in the outer medulla.

The onset of AKI is a risk factor of mortality during many medical or surgical diseases (16). Older publications suggested that, after AKI, renal function recovers spontaneously and almost completely, rendering long-term follow-up unnecessary (17, 18). In fact, a recent report points out that AKI does not always recover, especially inpatient exhibiting chronic kidney disease (4). Hypotension is a common adverse event during anesthesia or in critically ill patients. It is the cornerstone of numerous diseases leading to AKI (7, 19). After preliminary experiments, we established that a controlled HS of 2 hrs was able to induce both AKI and histologic lesions of ATN in mice. Indeed, previous works have reported the effects of hypotension on renal function using different models, mostly in rats (20–22). A study by Dobyán et al (23) showed that a 90-min duration of HS is able to induce histologic lesions of ATN mainly in pars recta. The functional impact was slight with a moderate decrease in urine concentration capacity but no decrease in GFR as estimated by blood urea nitrogen. Later, a study by Zager et al (20) showed that it is necessary to decrease renal artery pressure by partial aortic clamping down to 20 mm Hg to obtain tubular lesions in the rat. In mice, by analogy, it has been believed for a long time that hypovolemia itself could not induce ATN (20–22, 24). Nevertheless, in a study screening for multiorgan histologic injuries in mice, Mees et al recently described some histologic lesions suggestive of ATN after 90 mins at 35 ± 5 mm Hg arterial blood pressure during HS. A study by Van Meurs et al detected renal endothelial im-

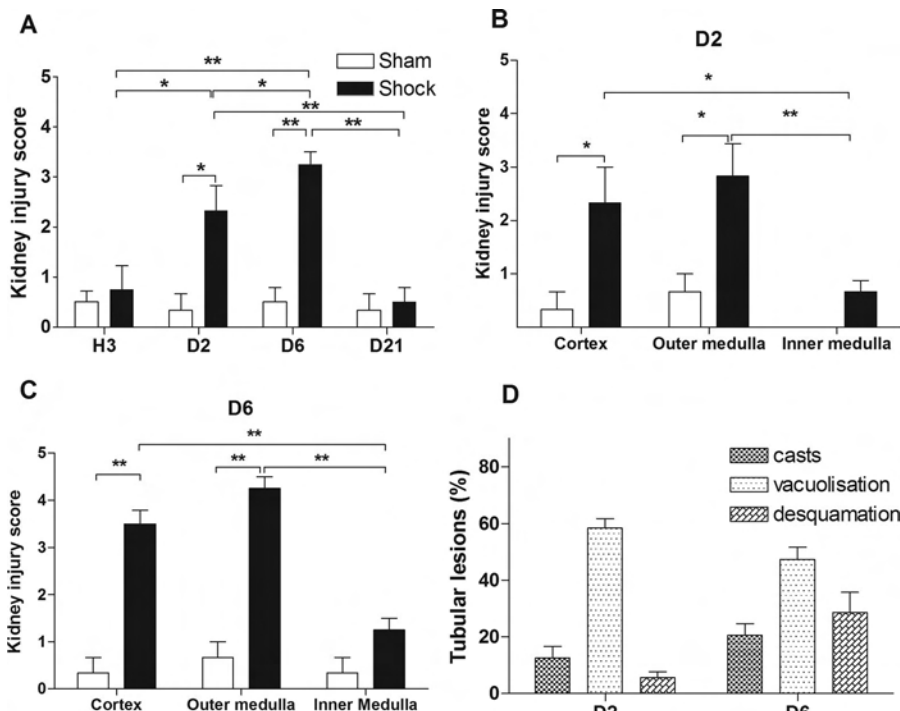


Figure 4. Histologic injury after hemorrhagic shock. A, Acute tubular injury was significantly present at day (D) 2 and D6. B, At D2, lesions were localized in the cortex and in the outer medulla. C, At D6, injury was maximal and lesions were predominantly localized in the outer medulla. D, Histologic damage was different between D2 and D6, cell vacuolization was predominant at D2, whereas casts and desquamation became more important at D6; n = 5; #p < .05 and ##p < .01 vs. sham. *p < .05, **p < .01.

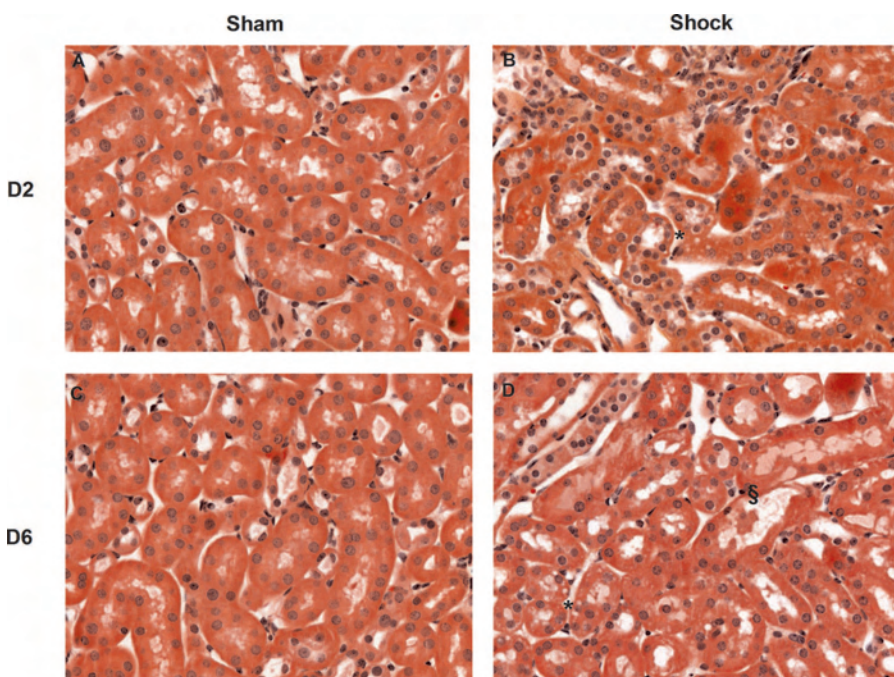


Figure 5. Outer medulla injury after hemorrhagic shock. Sham mice (A, C) and shock mice (B, D). At day (D) 2, cellular vacuolization (*) was predominant (hematoxylin–eosin coloration ×400 at D2; [C] sham, [D] shock). At D6, tubular necrosis was present and associated with vacuolization, desquamation (§), and casts (HE coloration ×400 at D6; [C] sham, [D] shock).

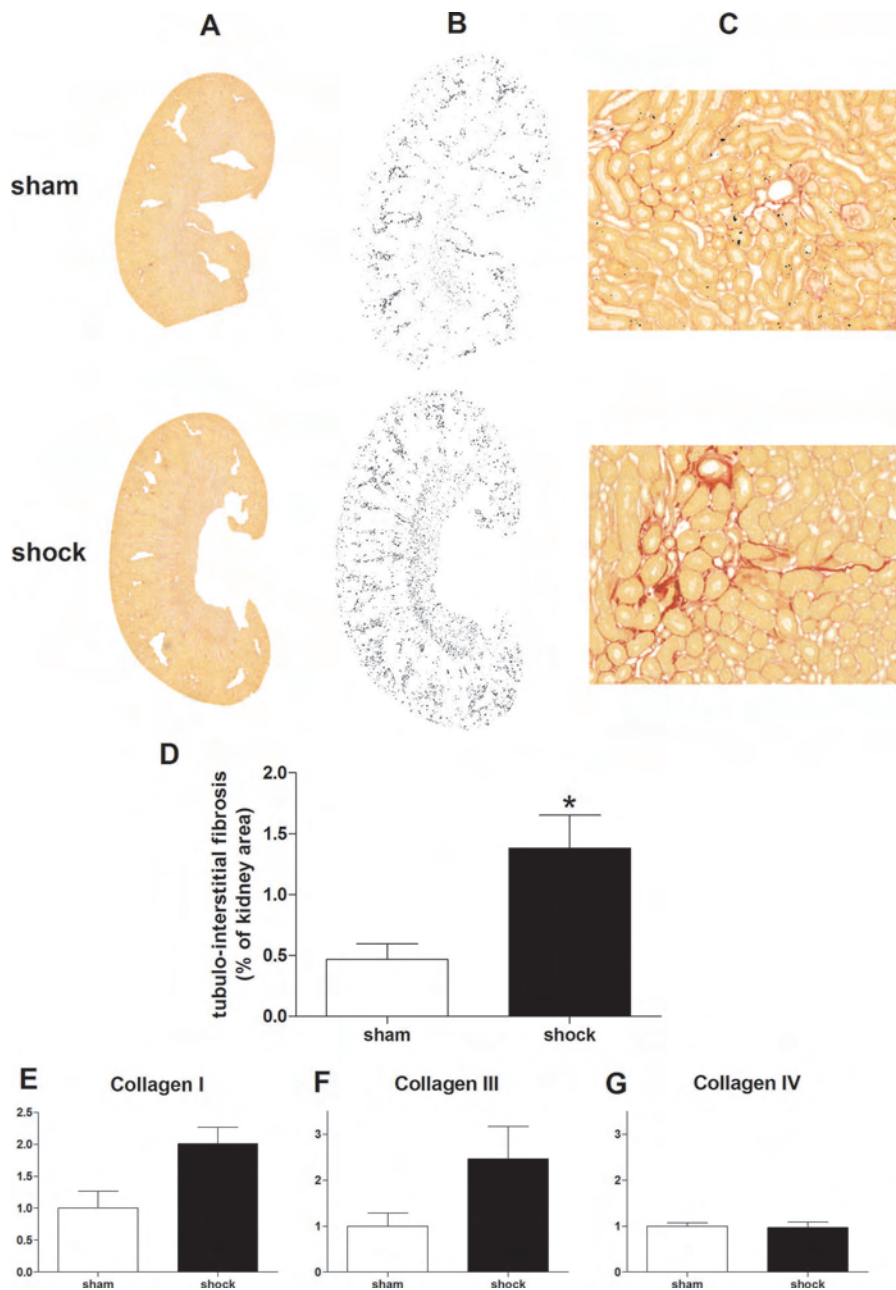


Figure 6. Hemorrhagic shock induces renal interstitial fibrosis at day (D) 21. *A–B*, Representative image of the reconstructed renal section of sham and shock mice obtained by assembling around 40 lap-joined images (100 \times). Elective selection of fibrosis was done using color recognition on the same sections. *C*, Histology of the outer medulla ($\times 400$, red Sirius) in shock and sham mice. *D*, Quantification of interstitial fibrosis on renal cross-sections in mice from the shock and sham groups. Fibrosis was measured using Adobe Photoshop Cs4 software ($n = 4$ in each group, $*p < .05$ shock vs. sham). *E–G*, Whole kidney messenger RNA expression of collagen I, collagen III, and collagen IV by real-time polymerase chain reaction at D21 (fold increase vs. sham). mRNA of collagen I (*E*) and III (*F*) are upregulated in kidney after hemorrhagic shock when compared with sham ($n = 3$).

pact of HS (12, 13). No information regarding renal GFR, tubular function, or recovery was available in this study. The present work established that, after 2-hr HS in mice, the renal impact is very similar to that observed during hypotension-induced AKI in humans. Interestingly, renal histologic damage that we observed

was different from that provoked by a complete ligation of the renal artery but was close to that observed in humans (25, 26). As suggested in a study by Rosen et al, complete ischemic models are probably not the most relevant to study renal modifications and damages induced by prolonged hypotension during shock (20,

27). In humans, pathology of ATN is poorly documented (24, 26). Although fragmented, these data indicate that renal damage is sparse and limited in its intensity and localization and that it is prone to marked interindividual variability. In our model, lesions are constant and reproducible, which is likely the result of the standardization of hemodynamic alteration and to the use of a single strain of mice (26, 28).

A marked decrease in GFR is the main criteria to define AKI. In our model, AKI in the shock group is characterized by the following points: 1) a decrease in GFR from D2 to D6 in renal function; and 2) a decrease in urine concentration ability indicating intrinsic tubular dysfunction. This later dysfunction is illustrated by the decrease in free water clearance and in urine-to-plasma osmolarity ratio (29, 30). Sham-operated mice also showed a slight tubular dysfunction (temporary decrease in urinary concentration ability) and hypoxemia, but they did not exhibit a decrease in GFR or histologic injuries. It is known that prolonged anesthesia and surgical procedures themselves could lead to sublethal tubular injuries (31, 32). Shock mice showed a lower hematocrit than sham mice at D2 and D6 but, in our opinion, this mild decrease cannot explain functional and histologic differences in comparison to sham-operated mice. Altogether, our results strongly suggest that 2-hr HS in mice induces tubular injury and functional abnormalities that closely mimics human AKI associated with ATN. Long-term renal damage of ATN in humans is poorly known. According to the observation that AKI could lead to definitive renal damages, the possibility of fibrotic repair in humans is conceivable. Despite the difference of kinetic with anoxic models, both red Sirius staining and the increase in mRNA of collagen I and III (but not in collagen IV) indicate that animals also developed a delayed tubulointerstitial fibrosis (33). This could provide a useful model for pharmacologic targeting of post-AKI renal fibrosis.

The attempt to detect renal tubular damage as soon as possible has led to the recognition of early markers of tubular injury. KIM-1 is an emerging urinary biomarker of AKI. Numerous studies have shown its interest in different models of AKI (34). KIM-1 is a phosphatidylserine receptor and its expression on epithelial cell surface is markedly upregulated during tubular injury (35). In our study,

KIM-1 mRNA was highly expressed in the kidney of shock mice when compared with sham animals as early as H12. Although mRNA expression should be completed by protein quantification of KIM-1 in urine, the marked and transient increase in mRNA expression is consistent with an early deleterious impact on tubular cells.

Detection of cellular hypoxemia is another way to detect early renal impact of shock. Hypoxia is a state of decreased oxygen pressure, which, below a critical threshold, reduces the cell function (36). Furthermore, HIFs, especially HIF-1 and HIF-2, are recognized as key regulators of the hypoxic response. Their recruitment is responsible for the transcription of >100 genes that appear essential for adaptation to hypoxia (37). Although HIFs regulation is mainly based on translation and protein degradation, HIF-1 α mRNA increased transiently from H3 to D6 when compared with sham in our study (38). Conversely, HIF-2 α mRNA expression decreased from H3 to H12, returning to baseline thereafter. The strength of this observation is limited by the lack of direct protein detection, but renal parenchymal hypoxia is clearly present as indicated by pimonidazole immunostaining (Fig. 2). The difference of kinetic between HIF-1 α and HIF-2 α mRNA expression could be explained by specific patterns of expression in each organ and cell types as previously reported (39). In the kidney, HIF-1 α is induced mainly in the glomerulus and in epithelial cells, whereas HIF-2 α is localized in the glomerulus but also in endothelial cells and fibroblasts (40). The difference of kinetic between HIF-1 α and HIF-2 α also highlights their divergent physiologic role in the ischemic kidney. Interestingly, HIF-1 α in mice appears to be related with interstitial collagen accumulation (41). Thus, the prolonged over expression of HIF-1 α could have contributed to the delayed fibrosis that we observed at D21.

Whereas it is known that, in humans, prolonged hypotension is responsible for AKI, such a phenomenon has never been demonstrated in mice. In the present article, we clearly establish that a transient hypovolemia provoked by bleeding induces AKI in mice. In many respects and despite the limits of such anthropomorphism, this model, free from exposure to nephrotoxic drugs or anoxia (i.e., renal artery clamp), reproduces more closely both functional and histologic

features of human AKI in such circumstances. By allowing the use of various transgenic strains of mice, this model of HS provides a new tool to study the pathophysiological mechanisms of AKI and to develop new strategies for nephroprotection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marie Ranera for her contribution and support.

REFERENCES

- Barrantes F, Tian J, Vazquez R, Amoateng-Adjepong Y, et al: Acute kidney injury criteria predict outcomes of critically ill patients. *Crit Care Med* 2008; 36:1397–1403
- Vieira JM Jr, Castro I, Curvello-Neto A, et al: Effect of acute kidney injury on weaning from mechanical ventilation in critically ill patients. *Crit Care Med* 2007; 35:184–191
- Jones CA, Krolewski AS, Rogus J, et al: Epidemic of end-stage renal disease in people with diabetes in the United States population: Do we know the cause? *Kidney Int* 2005; 67:1684–1691
- Okusa MD, Chertow GM, Portilla D: The nexus of acute kidney injury, chronic kidney disease, and World Kidney Day 2009. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4:520–522
- Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, et al: Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:223–228
- Coca SG, Yusuf B, Shlipak MG, et al: Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2009; 53:961–973
- Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, et al: Acute renal failure in critically ill patients: A multinational, multicenter study. *JAMA* 2005; 294:813–818
- Heyman SN, Lieberthal W, Rogiers P, et al: Animal models of acute tubular necrosis. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8:526–534
- Lv T, Shen X, Shi Y, et al: TLR4 is essential in acute lung injury induced by unresuscitated hemorrhagic shock. *J Trauma* 2009; 66:124–131
- Wichmann MW, Ayala A, Chaudry IH: Severe depression of host immune functions following closed-bone fracture, soft-tissue trauma, and hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 1998; 26:1372–1378
- Matsutani T, Kang SC, Miyashita M, et al: Liver cytokine production and ICAM-1 expression following bone fracture, tissue trauma, and hemorrhage in middle-aged mice. *Am J Physiol* 2007; 292:G268–G274
- van Meurs M, Kurniati NF, Wulfert FM, et al: Shock-induced stress induces loss of microvascular endothelial Tie2 in the kidney which is not associated with reduced

glomerular barrier function. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297:F272–F281

- Mees ST, Gwinner M, Marx K, et al: Influence of sex and age on morphological organ damage after hemorrhagic shock. *Shock (Augusta, GA)* 2008; 29:670–674
- Melnikov VY, Faubel S, Siegmund B, et al: Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice. *J Clin Invest* 2002; 110:1083–1091
- Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Husing J, et al: Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int* 2004; 66:1115–1122
- Prakash J, Sen D, Kumar NS, et al: Acute renal failure due to intrinsic renal diseases: Review of 1122 cases. *Renal failure* 2003; 25:225–233
- Finkenstaedt JT, Merrill JP: Renal function after recovery from acute renal failure. *N Engl J Med* 1956; 254:1023–1026
- Briggs JD, Kennedy AC, Young LN, et al: Renal function after acute tubular necrosis. *BMJ* 1967; 3:513–516
- Kheterpal S, Tremper KK, Heung M, et al: Development and validation of an acute kidney injury risk index for patients undergoing general surgery: Results from a national data set. *Anesthesiology* 2009; 110:505–515
- Zager RA: Partial aortic ligation: A hypoperfusion model of ischemic acute renal failure and a comparison with renal artery occlusion. *J Lab Clin Med* 1987; 110:396–405
- Dobyan DC, Nagle RB, Bulger RE: Acute tubular necrosis in the rat kidney following sustained hypotension: Physiologic and morphologic observations. *Lab Invest* 1977; 37:411–422
- Kreisberg JI, Bulger RE, Trump BF, et al: Effects of transient hypotension on the structure and function of rat kidney. *Virchows Arch* 1976; 22:121–133
- Dobyan DC, Nagle RB, Bulger RE: Hypovolemic models of acute tubular necrosis in the rat kidney. *Virchows Arch* 1977; 25:271–280
- Rosen S, Heyman SN: Difficulties in understanding human 'acute tubular necrosis': Limited data and flawed animal models. *Kidney Int* 2001; 60:1220–1224
- Olsen S, Burdick JF, Keown PA, et al: Primary acute renal failure ('acute tubular necrosis') in the transplanted kidney: Morphology and pathogenesis. *Medicine* 1989; 68:173–187
- Olsen TS, Olsen HS, Hansen HE: Tubular ultrastructure in acute renal failure in man: Epithelial necrosis and regeneration. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985; 406:75–89
- Rosen S, Stillman IE: Acute tubular necrosis is a syndrome of physiologic and pathologic dissociation. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19:871–875
- Solez K, Morel-Maroger L, Sraer JD: The

- morphology of 'acute tubular necrosis' in man: Analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model. *Medicine* 1979; 58:362–376
29. Miller TR, Anderson RJ, Linas SL, et al: Urinary diagnostic indices in acute renal failure: A prospective study. *Ann Intern Med* 1978; 89:47–50
 30. Espinel CH: The FENa test. Use in the differential diagnosis of acute renal failure. *JAMA* 1976; 236:579–581
 31. Kwon O, Nelson WJ, Sibley R, et al: Backleak, tight junctions, and cell–cell adhesion in posts ischemic injury to the renal allograft. *J Clin Invest* 1998; 101:2054–2064
 32. Molitoris BA: Na(+)-K(+)-ATPase that redistributes to apical membrane during ATP depletion remains functional. *Am J Physiol* 1993; 265:F693–697
 33. Eddy AA: Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:2495–2508
 34. Vaidya VS, Ford GM, Waikar SS, et al: A rapid urine test for early detection of kidney injury. *Kidney Int* 2009; 76:108–114
 35. Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD, et al: Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest* 2008; 118:1657–1668
 36. Hockel M, Vaupel P: Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:266–276
 37. Haase VH: Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291:F271–F281
 38. Yee Koh M, Spivak-Kroizman TR, Powis G: HIF-1 regulation: Not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci* 2008; 33:526–534
 39. Gunaratnam L, Bonventre JV: HIF in kidney disease and development. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:1877–1887
 40. Rosenberger C, Mandriota S, Jurgensen JS, et al: Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:1721–1732
 41. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, et al: Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2007; 117:3810–3820

IV. APPLICATION DU MODELE A UNE POPULATION PARTICULIERE

Après avoir validé la capacité de notre modèle à reproduire, chez la souris saine, l'impact rénal supposé d'une hypotension prolongée chez l'humain, nous nous sommes attachés à en évaluer les conséquences dans une population murine non saine. Nous avons choisi de nous intéresser au diabète en utilisant une population de souris présentant un diabète de type II qui présente une invalidation spontanée du gène du récepteur de la leptine (modèle db/db). La relation entre l'hypoxie tissulaire observée dans notre modèle et celle décrite au cours de la néphropathie diabétique ainsi que la reconnaissance grandissante du rôle de cette hypoxie dans l'évolutivité des maladies rénales chroniques nous a convaincus que le diabète pouvait être un modèle pertinent de ce qui est dénommé « acute on chronic kidney injury ».

A. Rappels généraux sur le diabète

Le diabète de type II est la pathologie endocrinienne la plus fréquente dans le monde et toucherait environ 250 millions de personnes³¹⁹. L'obésité a été identifiée comme le principal facteur de risque associé à une augmentation du taux de diabète de type 2³²⁰. La prévalence d'une atteinte rénale au cours du diabète est estimée à 15%³²¹. La néphropathie associée au diabète de type II est actuellement l'une des premières causes d'IRCT en Europe. Chez l'humain, la préexistence d'une néphropathie diabétique (ND) est un des facteurs prédictifs supposés de survenue d'une IRA³²². Chaque épisode d'ARA semble détériorer irréversiblement la fonction rénale chez certains patients¹⁴³. Thakar et al. ont ainsi observé que 30% des patients diabétiques ayant présenté une IRA présenteront une récurrence de celle-ci. De plus, au sein de leur

cohorte, l'IRA est un facteur de risque indépendant d'IRC préterminale et de mortalité

(Figure 10) : chaque épisode d'IRA double le risque d'IRC ¹³¹.

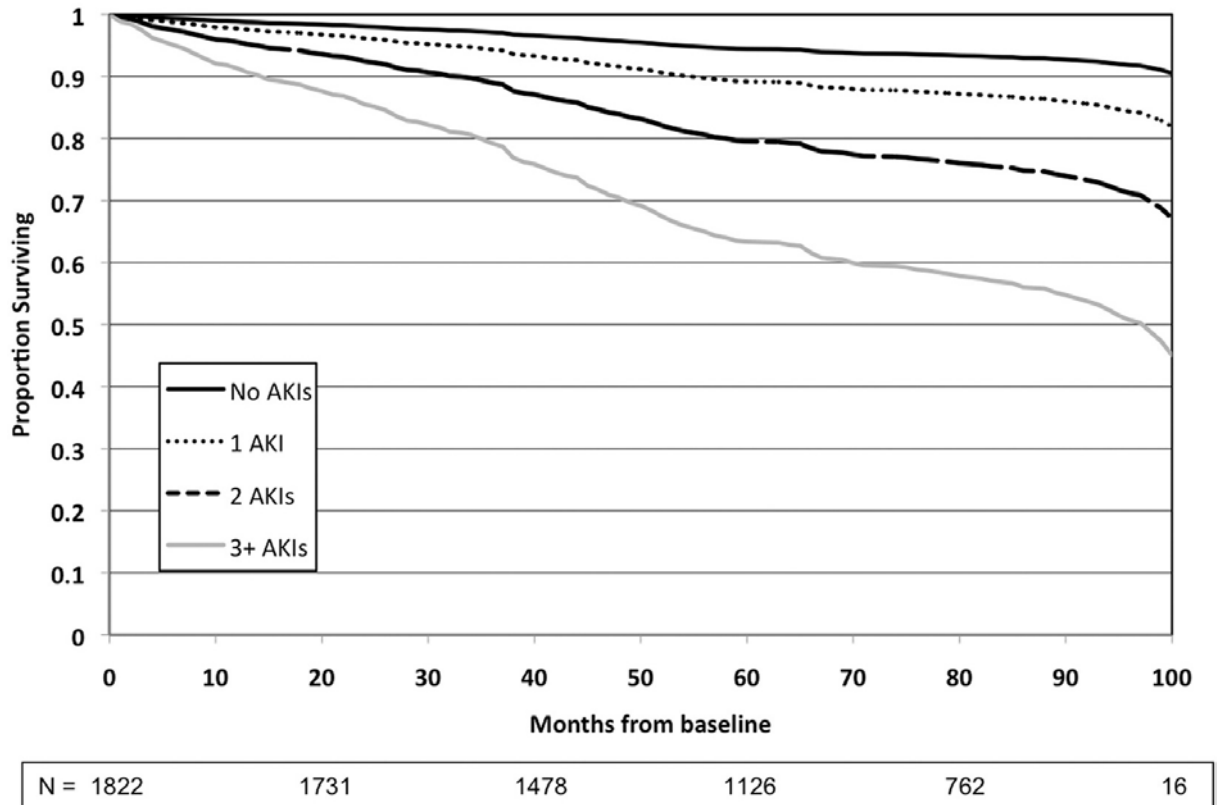


Figure 10 : conséquences des épisodes successifs d'IRA sur la survie du patient diabétique ¹³¹.

B. Physiopathologie de la néphropathie diabétique

1. Une complication hémodynamique

Depuis de nombreuses années, des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension de la physiopathologie de la ND. Plusieurs hypothèses considérées en leur temps comme capitales ont été successivement confirmées. L'une des premières avancées dans la compréhension de la ND a été la mise en évidence du rôle de l'hémodynamique rénale et systémique. Deux anomalies aboutissant à l'hyperfiltration glomérulaire, observée précocement au cours de la ND, ont été décrites : 1)

l'augmentation primitive ou secondaire de la pression artérielle systémique ; 2) les modifications de la microcirculation intrarénale associant l'augmentation du débit capillaire et l'augmentation de la pression de filtration intra-glomérulaire. Ces variations hémodynamiques systémiques et rénales déterminent une augmentation de la pression capillaire glomérulaire potentiellement destructrice³²³⁻³²⁵.

2. Rôle de l'hyperglycémie et des produits avancés de glycation

Dans un deuxième temps, un rôle physiopathologique a été attribué à l'hyperglycémie chronique qui est la complication métabolique la plus fréquente au cours du diabète. Celle-ci induit des modifications protéiques, lipidiques et nucléiques impliquées dans la maladie rénale du diabétique. En effet, l'hyperglycémie chronique provoque la formation de produits avancés de glycation ou *Advanced Glycation end products* (AGE) par une réaction de couplage non enzymatique du glucose aux protéines. Les produits ainsi générés interagissent avec des récepteurs aux AGE dénommés RAGE et induisent une cascade d'effets nocifs, en particulier l'augmentation de la production intracellulaire de radicaux libres oxygénés (RLO) qui stimulent différentes voies de signalisation (*via* des facteurs de transcription, des cytokines ou des facteurs de croissance) et provoquent une prolifération mésangiale et une évolution profibrosante³²⁶⁻³²⁸. L'hyperglycémie joue également un rôle intracellulaire direct en intégrant la cellule par les transporteurs du glucose (GLUT) et en activant la voie de l'aldose réductase, celle des hexosamines et en activant la protéine kinase C³²⁹.

3. Rôle du stress oxydant

Le stress oxydant joue également un rôle probablement important dans la physiopathologie de l'atteinte tissulaire diabétique, en particulier dans celle de

l'expansion mésangiale³³⁰. Les résultats expérimentaux animaux utilisant des antioxydants montrent d'ailleurs des résultats fortement bénéfiques³³¹⁻³³², qui n'ont toutefois pas été, pour l'instant, retrouvés chez l'humain³³³.

4. Implication des facteurs de croissance

Les AGE et le stress oxydant modifient les signalisations intracellulaires et peuvent aboutir à la synthèse de cytokines et de facteurs de croissance. Plusieurs d'entre eux sont impliqués dans l'évolution rénale défavorable au cours du diabète.

Le TGF- β est considéré comme un facteur délétère capital par son action pro-fibrosante³³⁴⁻³³⁵. De même, l'hormone *Insulin Like Growth Factor-1* (IGF-1) est exprimée principalement par les cellules mésangiales. Elle stimule l'expression du transporteur GLUT-1 par les cellules mésangiales augmentant ainsi la concentration intracellulaire de glucose et, en réponse, la synthèse de matrice extracellulaire³³⁶⁻³³⁸. Les *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) et *Fibroblast Growth Factor* (FGF) ont également été impliqués dans l'évolution de la ND³³⁹⁻³⁴¹.

C. Hypoxie et progression de maladie rénale diabétique

Au-delà des facteurs classiquement incriminés décrits ci-dessus³⁴², la physiopathologie de la ND n'est encore que partiellement connue. De nouvelles voies métaboliques sont encore actuellement étudiées afin d'en comprendre l'évolutivité. L'hypoxie semble ainsi jouer un rôle important dans la physiopathologie et la progression de la ND. Palm et al. ont montré que la pO₂ tissulaire rénale est sensiblement plus faible chez les rats diabétiques que chez les animaux sains³⁴³. Inoue et al. ont confirmé l'existence d'une telle hypoxie chez l'humain par l'utilisation d'une imagerie par résonance magnétique (IRM) métabolique³⁴⁴. Ries et al. ont montré une

majoration de l'hypoxie chez les animaux diabétiques dans la région médullaire externe²¹⁴ et il a été montré dans la ND que la concentration tissulaire en facteur HIF est augmentée, témoignant bien de l'existence d'une hypoxie chronique³⁴⁵. Cette hypoxie ne semble pas induite par une variation du flux sanguin mais par une augmentation locale de la consommation d'O₂.

1. Origine de l'hypoxie rénale au cours du diabète : rôle du stress oxydant et de l'inflammation

Le stress oxydant serait, intuitivement, une explication intéressante à l'apparition d'une hypoxie au cours de la ND. En effet, l'hyperglycémie est responsable d'une instabilité des systèmes oxydants/antioxydants qui aboutit à un stress oxydant capable de provoquer une vasoconstriction rénale médullaire et d'augmenter l'activité de réabsorption tubulaire³⁴⁶⁻³⁴⁷. De plus, une augmentation du stress oxydant et une hypoxie ont été mises en évidence au cours de la ND³⁴³ et certains auteurs ont proposé que l'hyperglycémie majore l'inflammation et stimule l'expression de HIF-1 α , l'un des facteurs HIF³⁴⁸. Cette explication n'est néanmoins pas consensuelle car d'autres travaux ont souligné que le stress oxydant aboutit à une diminution de l'expression de HIF-1 α secondaire à une dégradation de celui-ci par le protéasome³⁴⁹.

2. Augmentation de la consommation en oxygène

a) Découplage mitochondrial

Un découplage mitochondrial pourrait être en partie responsable de l'augmentation de la consommation en oxygène et, par conséquent, de l'hypoxie³⁵⁰. Ce découplage mitochondrial induirait une consommation en oxygène supérieure à celle réellement nécessaire. Un argument supplémentaire soutenant cette hypothèse provient des résultats de protocoles thérapeutiques impliquant la coenzyme Q10. L'administration

de celle-ci prévient le découplage mitochondrial. Or, la coenzyme Q10 semble réduire l'évolutivité de l'IRC liée au diabète³⁵¹.

b) Activité métabolique de la BALH

L'activité de la BALH semble également contribuer à l'apparition de cette hypoxie tissulaire. La BALH est responsable d'une part notable de la consommation en oxygène du parenchyme rénal¹⁵⁸. Or, au cours du diabète, la BALH est en condition hypoxique. De manière intéressante, le traitement par insuline permet de réduire cette hypoxie³⁴⁵. L'effet bénéfique de l'insuline sur la consommation en oxygène de la BALH (et donc de sa condition hypoxique) pourrait être lié à la fois à une diminution du DFG et à une diminution du volume de la diurèse osmotique³⁵². En effet la diurèse osmotique semble provoquer une augmentation de l'absorption rénale de sodium au sein des portions tubulaires proximales et de la BALH³⁵³, induisant donc une majoration de leur consommation en oxygène.

c) Autres facteurs

Des modifications du tonus vasculaire³⁵⁴ et une raréfaction vasculaire induisant par synergie une réduction du flux sanguin tubulaire peuvent également être responsables d'une hypoxie (cf. rôle de l'hypoxie dans l'IRC). Le rein diabétique semble donc être le site d'un préconditionnement hypoxique qui peut non seulement contribuer à la progression de l'IRC, mais aussi faire le terrain d'ARA (**Figure 11**).

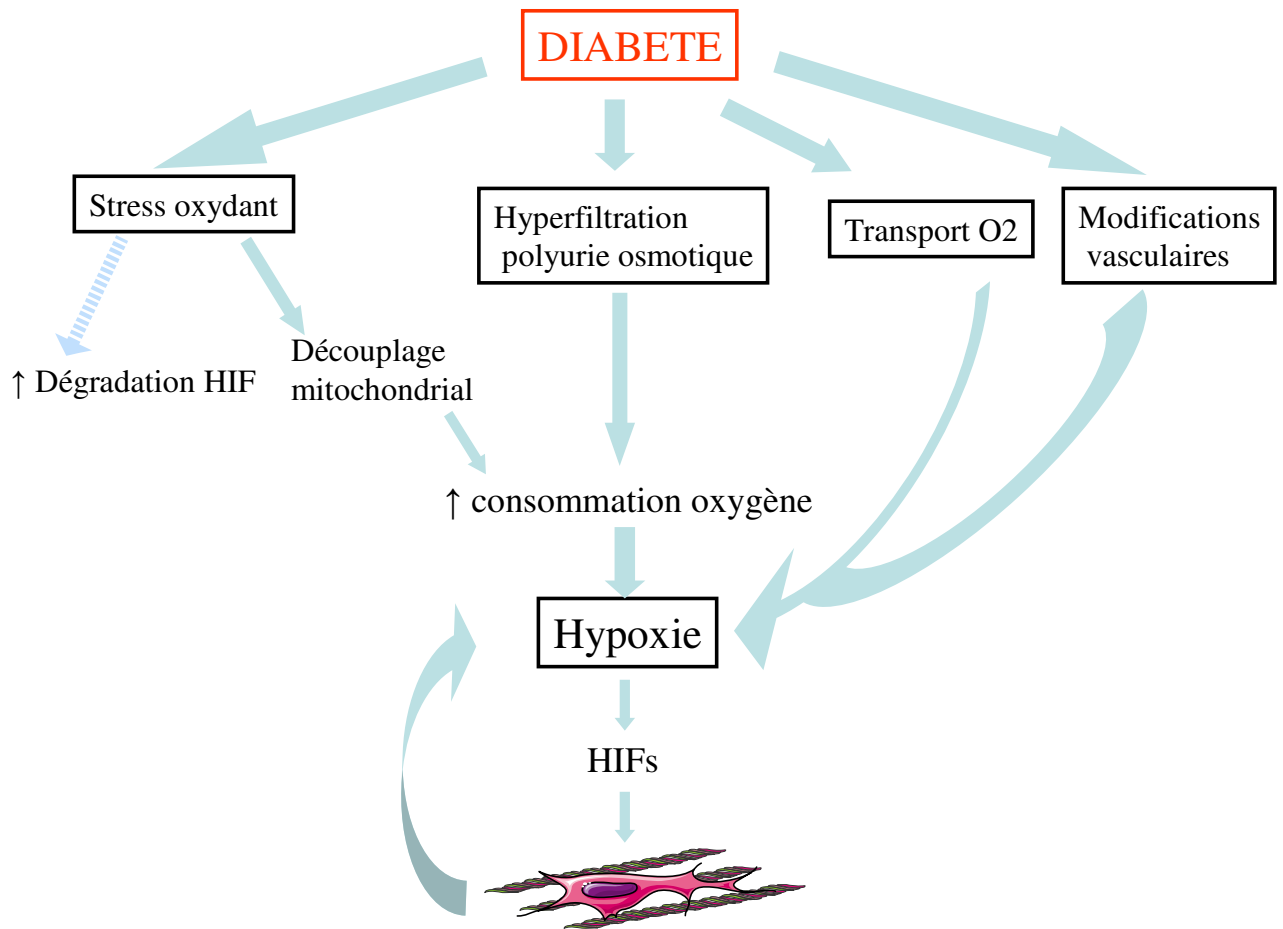


Figure 11 : Origine de l'hypoxie dans la néphropathie diabétique

D. Modélisation diabétique chez la souris

1. Différents modèles de diabète

MODELE MURIN	TYPE DE DIABETE	AVANTAGES	DESAVANTAGES
Streptozotocine ³⁵⁵	1	Tempo connu Validé +++	Toxicité tubulaire propre PK/Pd variable en fonction des souches
Variant virus D ³⁵⁶	1	Possible reproduction cause virale au diabète de type 1	Effets rénaux peu connus Modèle rarement utilisé Impact fonctionnel inconnu
Ins 2 Akita ³⁵⁷	1	Mutation autosomique dominante Disponibilité	Principalement chez C57Bl/6 Relative résistance à la néphropathie et hyperglycémie modérée
NOD ³⁵⁸	1	Disponibilité Reproduit défaillance cellules β des ilots de Langerhans	Développement diabète non permanent Nécessite un apport d'insuline Pas de groupe contrôle
eNOS-/- + STZ ³⁵⁹	1	Doute sur effet toxique	Pas d'hyperfiltration
KOB2R+Ins ^{2AKITA/360}	1	Reproductibilité Complexité	Néphropathie majorée
FVB-OVE26 ³⁶¹	1	Mortalité élevée	Diminution cellules B
Sur expression rénine + STZ ou AKIta ³⁶²	1	Protéinurie élevée HTA	Nécessité STZ
Db/Db	2	Disponibilité	Mutation récepteur de la leptine cause très rare diabète. homozygotes stériles
Ob/ob ³⁶³	2	Disponibilité Néphropathie peu décrite	Mutation leptine cause très rare diabète. Souris stériles
Agouti ³⁶⁴	2	Disponibilité Albuminurie	Surtout pertinent sur souches KK Début diabète mal identifié
Régime riche en graisse et en sucre ³⁶⁵⁻³⁶⁶	2	Début diabète au choix	Valable uniquement chez le C57Bl/6 Hyperglycémie modérée
NONcNZO10/LtJ ³⁶⁷	2	Obésité modérée Syndrome métabolique	Diabète polygénique Lésions rénales semblent indépendantes du diabète

Tableau 3 : modèles murins de diabète

Un institut américain nommé *Animal Models of Diabetic Complications Consortium* (ADMCC) a défini les critères d'un modèle idéal de souris diabétique³⁶⁸.

Les souris doivent présenter :

- 1) une diminution de 50% du DFG au cours de la vie de l'animal
- 2) une augmentation d'un facteur 10 de l'albuminurie en comparaison avec des souris non diabétiques.
- 3) des anomalies histologiques comprenant une prolifération mésangiale avec idéalement des images de sclérose nodulaire, de fibrose tubulo-interstitielle et vasculaire et un épaississement de la membrane basale glomérulaire > 50%.

Idéalement ces anomalies histologiques devraient être confirmées par différentes analyses :

- une quantification de la matrice mésangiale
- une confirmation de l'absence de dépôts immuns IgG, IgM et IgA
- une quantification de la membrane basale par microscopie électronique
- une démonstration de la perte en podocytes.

Aucun modèle de ND disponible actuellement n'est parfaitement idéal (**Tableau 3**).

2. Modèle db/db

Les souris db/db, spontanément déficientes en récepteurs B de la leptine présentent les anomalies métaboliques du diabète de type II ainsi qu'une obésité faisant de ces souris invalidées un modèle reconnu et validé de diabète de type II³⁶⁸⁻³⁶⁹. En effet, l'absence du gène codant pour le récepteur à la leptine aboutit à une absence de satiété et à une obésité morbide. En conséquence, les souris db/db présentent une hyperleptinémie, un hyperinsulinisme et une hyperglycémie en rapport avec une insulino-résistance marquée. Ce modèle, caractérisé par une albuminurie, développe de plus, une hypertrophie rénale et glomérulaire, un épaississement de la membrane basale

glomérulaire, une glomérulosclérose focale et une accumulation tubulo-interstitielle de protéines de la matrice extra-cellulaire avec prolifération mésangiale. Toutes ces anomalies sont amplement décrites au cours de la ND chez l'humain (références dans revues suivantes³⁷⁰⁻³⁷¹). Ce modèle, qui est largement utilisé dans les travaux sur la ND présente néanmoins des inconvénients : 1) les animaux homozygotes sont stériles ; 2) chez l'humain, la mutation du gène du récepteur de la leptine est une circonstance extrêmement rare, et 3) il ne reproduit pas toutes les anomalies tardives de la ND (sclérose mésangiale et altération sévère de la fonction rénale).

3. Données contradictoires des conséquences du diabète sur l'impact d'une IRA

Chez l'humain, la préexistence d'une ND semble fragiliser le rein face aux agressions toxiques, médicamenteuses ou hémodynamiques³⁷².

La susceptibilité du rein du muridé diabétique à l'agression rénale a été partiellement étudiée mais jamais au cours d'un état de choc. Rosenberg et al. ont montré que le diabète de type I induit une hypoxie rénale prédominant dans la zone médullaire externe (zone de la BALH) et que l'injection d'un produit de contraste majore fortement cette hypoxie. Cette majoration pourrait expliquer la susceptibilité rénale particulière du rein diabétique au produit de contraste iodé³⁴⁵. Pourtant les données expérimentales sur les conséquences de cette hypoxie et sur les particularités d'une IRA au cours du diabète semblent contradictoires. En utilisant un modèle de rein perfusé isolé, Rosenberger et al. ont montré que l'impact fonctionnel rénal d'une hypoxie est bien plus sévère en cas de diabète. Dans cette étude, l'aggravation du pronostic rénal est associée à une réponse vasculaire altérée³⁷³. *A contrario*, plusieurs travaux *in vivo* ont suggéré l'existence d'une relative tolérance rénale à un épisode hypoxique au cours du diabète. Ces auteurs soulevaient l'hypothèse d'une possible adaptation préalable à

l'hypoxie prolongée^{138, 373-374}. Néanmoins, ces contradictions sont peut-être liées à l'intensité du mécanisme hypoxique utilisé dans les différentes études, mais également au stade de la maladie rénale préalable.

E. Travail personnel

Introduction au travail

Nous avons pu induire, chez des souris non diabétiques, une IRA réversible caractérisée par des lésions histologiques prédominant au sein de la médullaire externe. Cet impact rénal est associé à une hypoxie significative.

Nous avons souligné que peu d'informations sont disponibles concernant l'impact rénal d'un épisode d'ARA chez les animaux présentant un diabète de type II et que les informations disponibles (principalement dans des modèles de diabète de type I) sont, de plus, contradictoires. L'objectif de notre travail était de conclure sur le caractère délétère ou non de l'existence d'un diabète sur le pronostic d'une ARA chez la souris en utilisant le modèle de choc hémorragique. L'objectif secondaire était d'analyser, à l'échelon cellulaire, un possible particularisme de la signalisation hypoxique au cours d'une ARA chez l'animal diabétique. Une partie de ce travail a été effectué en collaboration avec M^{me} Virginie Dupuy, que j'ai encadrée dans le cadre de son Master 2 Recherche (M2R) *Physiopathologie*, au sein de notre équipe.

Nous avons pu mettre en évidence que les souris diabétiques de type II présentent une hypoxie tissulaire rénale préalable en dehors de toute ARA. De plus, le pronostic rénal (intensité de l'IRA) et général de la souris diabétique est plus sévère dans les suites d'une ARA. L'hypoxie rénale préalable induite par le diabète ne semble donc pas avoir un effet protecteur en situation d'ARA. Néanmoins, il existe des réponses vasculaires et cellulaires à l'hypoxie différentes au cours d'une ARA chez la souris

diabétique.

Par ailleurs, nous avons été confrontés à une fragilité métabolique et cardiovasculaire particulière des souris db/db. Elles tolèrent difficilement la privation en eau induite par l'anesthésie du fait de leur morphotype particulier (**Figure 12**) et de la polyurie osmotique induite par le diabète. Nous avons donc également conclu que la poursuite de ce travail nécessiterait l'utilisation d'un autre modèle de diabète.

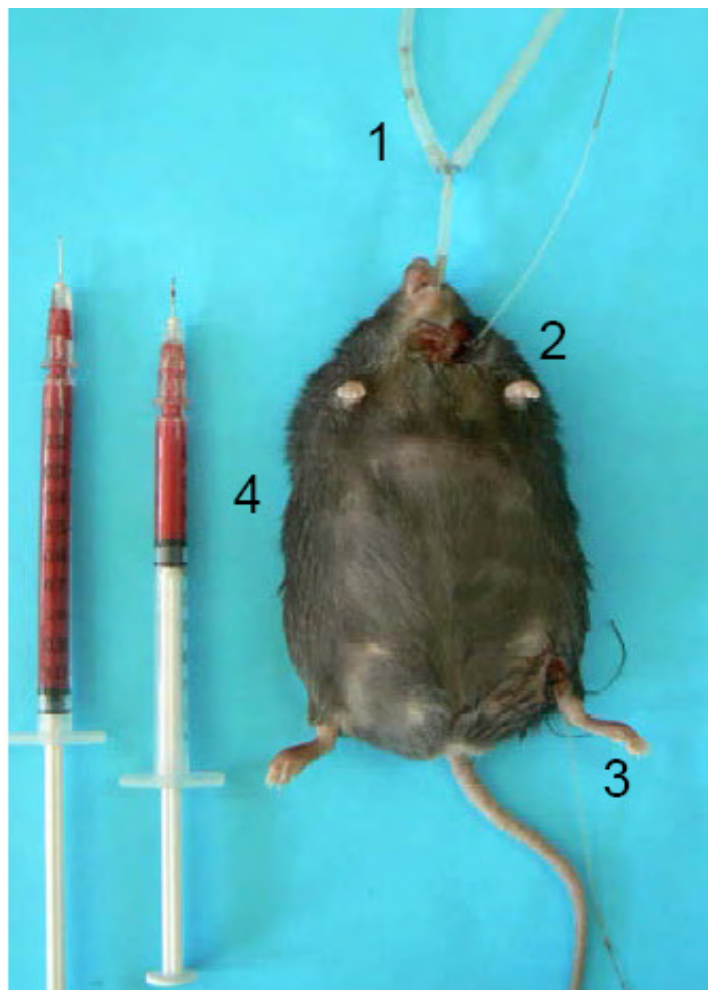


Figure 12 : souris db/db choquée
(1) sonde d'intubation, (2) voie veineuse centrale jugulaire, (3) cathéter artériel fémoral, (4) sang prélevé.

Publications et travaux

Manuscrit n°2

Dupuy V, Mayeur N et al. « Type 2 Diabetes Mellitus in Mice Aggravates the Renal Impact of Hemorrhagic Shock». Shock . 2012 Jul 18. [Epub ahead of print]

Cette étude a également fait l'objet d'un abstract (**annexe n°5**)

Cette partie du travail a été soutenue financièrement par le **CHU de Toulouse**

TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN MICE AGGRAVATES THE RENAL IMPACT OF HEMORRHAGIC SHOCK

Virginie Dupuy^{*†}, Nicolas Mayeur^{*†‡§}, Marie Buléon^{†§}, Acil Jaafar[§], Talal Al Saati^{||}, Stéphane Schaak[‡], Françoise Pradaude^{†§}, Vincent Minville^{*†}, and Ivan Tack^{†§}

^{*}Département d'anesthésie réanimation and [†]INSERM U1048 équipe 12, Université Paul Sabatier Toulouse III, CHU Rangueil; [‡]Equipe Accueil INSERM 4564, Université Paul Sabatier Toulouse III, CHU Purpan,

[§]Service des explorations fonctionnelles physiologiques et laboratoire de physiologie, CHU Rangueil; and

^{||}INSERM-US006 ANEXPLO/CREFRE—Service d'Histopathologie, CHU Purpan, Toulouse, France

Received 15 May 2012; first review completed 6 Jun 2012; accepted in final form 6 Jul 2012

ABSTRACT—The objectives of this study were to determine whether type 2 diabetic mice would exhibit a more severe renal impact of hemorrhagic shock (HS) based on a recently described model of acute kidney injury and to determine the impact of HS on renal responses to hypoxia. We induced HS or sham procedure in type 2 diabetic and obese db/db mice. Creatinemia, glomerular filtration rate, urine output, histologic injury score, and kidney inductible molecule 1 mRNA were used to investigate the renal impact of HS. Tissue hypoxia and its impact were quantified using pimonidazole immunostaining and mRNA of hypoxic inducible factor, vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2, Tie-2, endothelial nitric oxide synthase, and inducible nitric oxide synthase. Diabetic mice exhibiting mild diabetic nephropathy express hypoxic signals at baseline. The renal impact of HS was more severe in diabetic mice, with a worsening of tissue hypoxia and an altered response to hypoxia. Furthermore, endothelial nitric oxide synthase was highly overexpressed in diabetic shocked mice when compared with nondiabetic shocked mice. Renal impact of HS in type 2 diabetic mice is more intense than in nondiabetic ones. Preexisting hypoxia during diabetes could result in a renal preconditioning that modifies endothelial and tissue responses to acute kidney injury.

KEYWORDS—Hypotension, acute kidney injury, chronic kidney disease, hypoxic preconditioning

INTRODUCTION

The prevalence of chronic kidney disease (CKD) during diabetes mellitus is estimated at 15% (1), and type 2 diabetes-associated kidney disease is the No. 1 etiology of end-stage renal disease in Europe. Acute kidney injury (AKI) is an independent marker of morbidity and mortality in numerous medical and surgical diseases managed by intensive care physicians and is thought to be associated with deleterious progression of CKD (2–4). However, whether AKI prevalence and severity are increased in preexisting CKD patients remains controversial (5). We have recently developed a new model of AKI based on hemorrhagic shock (HS) in mice. In this model, we were able to induce in nondiabetic mice reversible acute renal failure with histological lesions prevailing in the outer medulla, and renal impact was associated with significant hypoxia (6). Little is known about the renal impact of AKI in experimental type 2 diabetes. Recently, hypoxia has emerged as an important determinant in the pathophysiology of diabetic CKD progression. Palm et al. (7) have shown that renal tissue P_{O_2} is appreciably lower in diabetic rats than in healthy animals. Moreover, hypoxic inducible factors (HIFs) are increased in diabetic kidneys (8). Hypoxic inducible factors are key regulators of the response to hypoxia, enhancing the transcription of numerous genes that improve the bioavailability and use of O_2 . As a consequence, this hypoxic renal

preconditioning could contribute to the progression of CKD as well as to sensitivity to AKI during diabetes (4). Our working hypothesis was that type 2 diabetic mice would present a more severe AKI following HS, which may be at least partly related to a different impact on kidney oxygenation than in nondiabetic mice.

MATERIALS AND METHODS

C57BLKs db/db female mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) were placed in a thermoregulated (20°C) room with occasional lighting (7–19 h). Mice received standard food (UAR AO4) and water *ad libitum*. Db/db mice developed obesity and type 2 diabetes from the fifth to sixth week of life, along with renal impairment as early as week 10 (9). Nondiabetic mice were studied as a control. Animal experimentations were performed according to national and institutional animal care and ethics guidelines and were approved by the local institutional board. Shocked mice, respectively, diabetic (db_{shock}) and control (C_{shock}), underwent controlled HS for 90 min (target mean blood pressure, 35 ± 5 mmHg) under general anesthesia (db_{shock}, n = 12; C_{shock}, n = 12). Diabetic and nondiabetic sham mice, respectively, db_{sham} and C_{sham}, underwent the same surgical procedure without blood spoliation (db_{sham}, n = 7; C_{sham}, n = 7).

Hemorrhagic shock procedure

Hemorrhagic shock was induced as previously described (6). In short, animals were anesthetized using ketamine and xylazine and intubated via an intratracheal cannula. Mechanical ventilation was carried out with a specific Minivent 845 ventilator (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany). The left jugular vein and femoral artery were catheterized, and anesthesia was maintained with ketamine until the end of shock. Animal body temperature was continuously monitored and maintained at 37°C. Blood was withdrawn through the femoral arterial line until the mean arterial blood pressure (MAP) reached 35 mmHg. Throughout the procedure, femoral arterial blood pressure was monitored using a blood pressure analyzer (TA 4000; GOULD Electronics, Eichstetten, Germany), and MAP was maintained at 35 ± 5 mmHg for 90 min by successive blood withdrawal or replacement. At the end of this period, the previously stored blood and lactated Ringer's solution (twice the initial blood volume) were infused to provide appropriate fluid resuscitation. Sham-operated animals underwent the same anesthetic and surgical procedures, but neither hemorrhage nor fluid resuscitation was performed. At hour (H) 6, kidneys were

Address reprint requests to Nicolas Mayeur, MD, Equipe Accueil INSERM 4564, CHU Purpan, place Baylac 31059, Toulouse, France. E-mail: nicolas.mayeur@inserm.fr. V.D. and N.M. contributed equally to this article.

This study was sponsored by a grant from the University Hospital of Toulouse to V.D.
DOI: 10.1097/SHK.0b013e318268810f
Copyright © 2012 by the Shock Society

removed to perform real-time quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction (PCR) and histological analysis. A catheter was introduced into the abdominal aorta. The left kidney was excised, quickly sliced, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C in RNA (Qiagen, Hilden, Germany) until RNA extraction. The right kidney was washed with 10 mL of phosphate NaCl buffer (phosphate-buffered saline, pH 7.4; Sigma Chemical, Mumbai, India) and perfused with 10 mL of 10% formalin (pH 7.4) through the abdominal aorta, then removed, quickly sliced, and stored for 48 h in 10% buffered formalin.

Renal function

An estimation of glomerular filtration rate (GFR) (plasma inulin clearance) was performed in 10 mice (five db_{shock} and five db_{sham}). Mice were anesthetized using a single intraperitoneal injection of 150 mg/kg sodium thiobarbital (Inactine; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo). Mechanical ventilation was carried out with a specific Minivent 845 ventilator (Hugo Sachs Elektronik). The left jugular vein and femoral artery were catheterized, and anesthesia was maintained with ketamine (20 mg/kg per hour) until the end of the experiment. Urine was collected through an intravesical catheter inserted after a minimal laparotomy incision. After a stabilization period of 45 min, plasma inulin clearance was determined using six successive blood samples before shock and after resuscitation. Urine excretion output was determined using three urine collections (before, during, and after shock). Glomerular filtration rate was estimated following the model of Brochner-Mortensen et al (10) corrected by Peters et al (11). Inulin distribution volume was considered equal to the extracellular volume.

Biological samples

Arterial lactates, creatinemia, glycemia, and fructosamine were performed with Cobas Mira Plus (Roche, Mannheim, Germany) in the Anexplo platform in Toulouse.

Reverse transcriptase–PCR

The expressions of HIF-1 α , kidney inducible molecule 1 (KIM-1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), Tie-2, and vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 (VEGFR-1 and VEGFR-2) were studied in the whole kidney. Total RNA was isolated using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen); RNA quality and integrity were checked by microfluidic capillary electrophoresis on an Experion (Bio-Rad, Hercules, Calif), and its concentration was determined using UV spectrophotometry on an ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, Del). One microgram of total RNA was engaged in a reaction of reverse transcriptase–PCR using Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen Co, Carlsbad, Calif) and 200 ng random hexamers (Fermentas France, Villebon sur Yvette, France). Real-time PCR was performed using 250 ng of cDNA on a Taqman 7900 device (Applied Biosystems, Foster City, Calif) adapted to the thermocyclase FastBy using a chemistry SYBR Green (DYNAMO Flash SYBR Green qPCR Kit, Finnzymes; Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Mass). All samples were run in duplicate, and results analyzed using SDS 2.3 software (Applied Biosystems). Relative mRNA expression levels were calculated using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method and normalized to GAPDH. The following primer pairs (forward and reverse) were used to quantify mRNA expression levels: KIM-1, 5'-CAAGCAACCGCTACCAGATAAA-3' and 5'-GATTGTCAAGGACGCATTTCC-3'; HIF-1 α , 5'-CACCGATTCCGCATGGA-3' and 5'-ACGTTCCAGAACTCATCTTTTCTTCTC-3; GAPDH, 5'-AGTCCGGTGTGAACGGATTGTG-3' and 5'-TGTA GACCATGTAGTTGAAGGTCA-3'; β -actin, 5'-GGCTGTATTCCCCTCCATC G-3' and 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3' iNOS 5'-GTGTTCCACCA GGAGATGTTG-3' and 3'-CTCCTGCCACTGAGTTCGTC-5', eNOS 5'-TACG GAGCAGCAAATCCAC-3' and 3'-CAGGCTGAGTCCTTTGATC-5', VEGFR-1 were 5'-CAAGTGCCAGAGGCATGGAGTT-3' and 3'-GATGTAGTCTT TACCATCCTGTTG-5' and VEGFR-2 5'-GAGGGCCACTCATGGTGATTG-3' and 3'-TGCCAGCAGTCCAGCATGGTCTG-5', Tie-2 5'-ATGTGGAAGTCCA GAGGCGAT-3', and 5'-CCCTGAACCTTATACCGGATGA-3'.

Histological analysis

Kidney samples, preserved in 10% buffered formalin, were dehydrated and embedded in paraffin. Four-micrometer sections were stained with periodic acid–Schiff, hematoxylin–eosin, and Masson trichrome. Sections were evaluated to quantify acute tubular injury as previously described (6). In short, histological changes were evaluated by counting the percentage of tubules that displayed cell necrosis, loss of brush border, cast formation, and tubule dilatation as follows: 0, none; 1, <10%; 2, 11% to 25%; 3, 26% to 45%; 4, 46% to 75%; and 5, >76%. Images were captured by means of a Nikon D1 digital camera on a photonic microscope (Laborlux D, Leitz, Germany) ($\times 400$ magnification).

Immunohistochemistry for pimonidazole

Pimonidazole (Hydroxyprobe; Pharmacia International, Belmont, Mass) was injected into the mice (60 mg/kg) 1 hour before they were killed and kidney

fixation. Samples were incubated with monoclonal hydroxyprobe 1 antibody, directed against pimonidazole and conjugated to fluorescein 1H/RT (Hypoxyprobe; Natural Pharmacia International, Burlington, Mass; 1:500). Sections were made in association with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, Calif). Images were captured with an LSM 510 confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany).

Statistical analysis

Because the sample size was small, and most of the distributions were non-Gaussian with unequal variances, rank tests were most appropriate than Student *t* tests for bivariate comparisons: rank-sum tests were computed to compare the distributions of baseline characteristics (Mann-Whitney test). For these comparisons, the differences were considered to be significant if $P < 0.05$.

For the same reasons, it was not possible to compute a two-way analysis of variance to test the interaction between HS and diabetes. Consequently, the outcomes have been compared using several rank-sum tests (Mann-Whitney tests). Four comparisons have been computed for each outcome (C_{sham} vs. C_{shock} , db_{sham} vs. db_{shock}, C_{sham} vs. db_{sham} and C_{shock} vs. db_{shock}). To avoid inflation of type I error resulting from these multiples comparisons, a Bonferroni correction has been applied ($\alpha/4$). Differences between the outcome distributions were considered to be statistically significant if $P < 0.0125$.

RESULTS

General characteristics

At 20 weeks, the db/db mice were obese and hyperglycemic (7.55 ± 0.68 vs. 1.61 ± 2.7 g/L, $P < 0.0001$). Fructosamine and glycated proteins were significantly higher in db/db mice than in control (Table 1). No difference was observed between C_{sham} and db_{sham} in terms of creatinemia (Fig. 1). However, renal pathological analysis of db_{sham} revealed mild diabetic nephropathy lesions with thickening of the Bowman capsule and mesangial proliferation (Fig. 2). The proximal tubules showed a rarefaction of the brush border and slight dilation. No fibrosis was

TABLE 1. Characteristics of control and diabetic mice

	Control (mean, SEM)	db/db (mean, SEM)	Statistical significance (<i>P</i>)
Glycemia, g/L	1.61 \pm 2.7	7.55 \pm 0.68	<0.0001
Fructosamine, $\mu\text{mol/L}$	166 \pm 51	264 \pm 64	<0.0001
Body weight, g	20.8 \pm 2.0	49.5 \pm 4.7	<0.0001
Kidney weight, mg	139 \pm 13	195 \pm 22	<0.01
Volume withdrawn, mL	0.64 (0.57–0.69)	0.91 (0.83–0.99)	<0.001
MAP, mmHg	78 (66–83)	72 (69–74)	NS
Shock MAP, mmHg	34 (33–36)	36 (34–36)	NS
Postresuscitation MAP, mmHg	73 (67–76)	75 (70–77)	NS
Preshock urine output, $\mu\text{L/min}$	0.68 (0.64–0.89)	1.3 (1.11–1.47)	<0.01
Shock urine output, $\mu\text{L/min}$	0.01 (0–0.03)	0.09 (0.08–0.21)	<0.01
Postshock urine output, $\mu\text{L/min}$	1.95 (1.34–3.58)	0.75 (0.17–1.06)	<0.02
GFR preshock, mL/ min	147.5		(127.3–204.9)
	167.2 (100.1–190.5)	NS	
GFR postshock, mL/ min	48.9 (26.4–67.7)	12.3 (6.9–17.7)	<0.01

Data are expressed as median (25%–75% interquartile). Mann-Whitney test. Glomerular filtration rate was calculated by plasma inulin clearance. NS indicates not statistically significant.

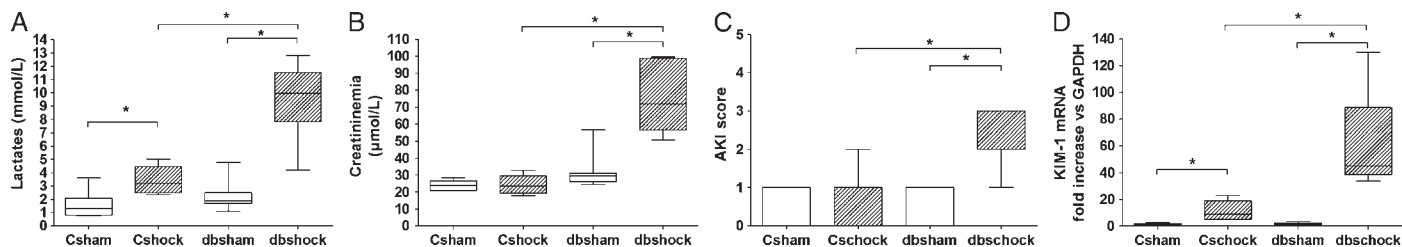


FIG. 1. **A**, H6 lactates in db_{shock} and C_{shock} and in their respective shams. **B**, H6 creatininemia was rapidly and significantly increased in db_{shock} . C_{shock} mice did not show significant increase in creatininemia. **C**, Renal medulla AKI score. **D**, Kidney-inductible molecule 1 mRNA. All data are expressed as box plot. * $P < 0.0125$, Mann-Whitney test.

observed on Masson coloration (data not shown). Both body and kidney weights were significantly increased in db/db mice.

Renal and systemic impact in diabetic mice

To estimate the systemic impact of HS, arterial lactates were measured. Lactates in db_{shock} and C_{shock} mice were higher than in respective shams ($P < 0.05$). Furthermore, lactates were increased significantly more in db_{shock} when compared with C_{shock} . Creatininemia rapidly and significantly increased in db_{shock} . By contrast, C_{shock} mice showed no significant increase in creatininemia (Fig. 2). In db_{shock} , urine output was lower after shock, and inulin clearance revealed a lower GFR when compared with C_{shock} (Table 1). At H6, KIM-1 mRNA was significantly increased ($P < 0.05$) in both shocked populations when compared with their respective sham. Moreover, KIM-1 was significantly higher in db_{shock} mice than C_{shock} mice. The db_{shock} mice displayed AKI lesions: vacuolization, cellular fragments, and intratubular casts. These lesions prevailed in the outer medulla (Figs. 1 and 3). On the contrary, no lesions were observed in C_{shock} mice.

Renal hypoxia in diabetic mice at baseline and post-HS

Before shock, an increase in HIF-1 α mRNA expression was observed in kidneys from diabetic mice when compared with C_{sham} ($P < 0.05$). At H6, this overexpression was increased in both shock groups when compared with their respective shams ($P < 0.05$) (Fig. 3). Vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 mRNAs were increased in db_{sham} compared with C_{sham} . Shock induced both VEGFR-1 and VEGFR-2 mRNA underexpression 6 h after HS. In db_{shock} , both VEGFR-1 and VEGFR-2 were decreased to a lesser extent than in C_{shock} (Fig. 4).

iNOS and eNOS mRNA expression in diabetic shock mice

At baseline, no significant difference was observed in eNOS mRNA expression between control, C_{sham} , and db_{sham} . In db_{shock} , there was a major overexpression of eNOS mRNA compared with C_{shock} ($P < 0.01$) and db_{sham} mice ($P < 0.05$). The expression of iNOS mRNA was significantly increased in C_{shock} and db_{shock} mice ($P < 0.01$). Moreover, iNOS mRNA overexpression was five times higher in db_{shock} than in C_{shock} ($P < 0.05$) (Fig. 4).

DISCUSSION

The ever-increasing prevalence of type 2 diabetes has increased the scientific and medical interest in this disease and its numerous complications. Diabetic nephropathy affects 20% of dialysis patients (1, 12). Diabetic patients are believed to be more prone to kidney aggressions. Using a model of AKI based on hypotension, our main objective was to determine whether type 2 diabetes was associated with aggravated renal impact. The early decrease in GFR, along with the increase in creatinemia and histological findings (de-epithelialization, intratubular casts in outer medulla, etc.), underlined the severity of AKI in diabetic mice. Urine output, which was lower after shock, was also lower in diabetic mice. Kidney inducible molecule 1 is a phosphatidylserine receptor, and its expression on epithelial cell surfaces was shown to be markedly upregulated during tubular injury (13). In our study, KIM-1 was markedly upregulated during tubular injury in both shocked groups, as previously shown. However, diabetic shocked mice exhibited overexpression of KIM-1 in comparison with control shocked mice. Taken together, these observations demonstrated that the impact of AKI following HS in type 2 diabetic mice was more severe.

The role of hypoxia in the development of diabetic CKD appears critical and constitutes a subject of increasing interest

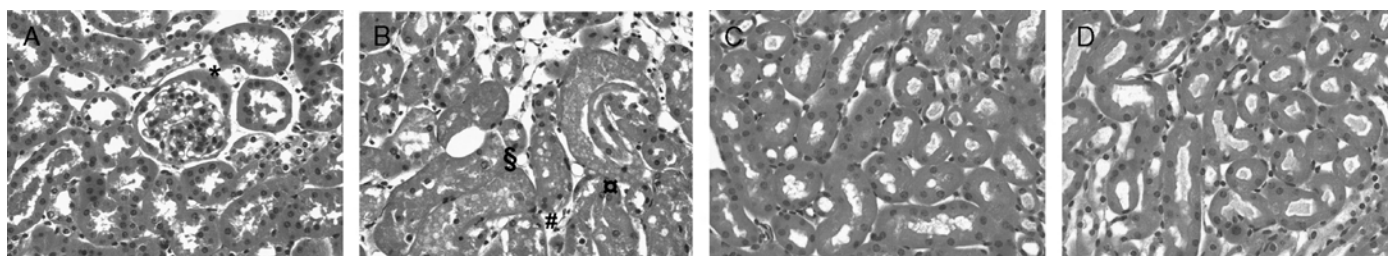


FIG. 2. Hematoxylin-eosin coloration of kidney sections ($\times 400$) of (A) db_{sham} , (B) db_{shock} , (C) C_{sham} , and (D) C_{shock} mice. *Mesangial proliferation, §intratubular casts, #cell vacuolizations, ∩desepithelialization.

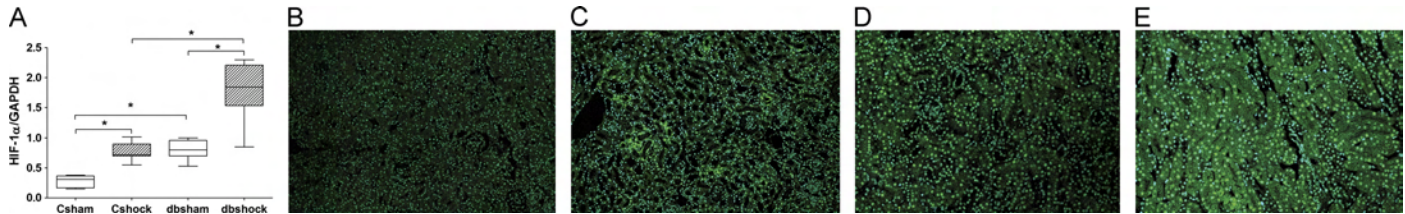


FIG. 3. **A, At H6, HIF-1 α mRNA expression.** Hypoxic exogenous marker pimonidazole immunostaining in (B) C_{sham}, (C) C_{shock}, (D) db_{sham}, and (E) db_{shock} mice. Data are expressed as box plot. **P* < 0.0125, Mann-Whitney test.

(8, 14). Hypoxic inducible factor 1 α is a recognized marker of tissular hypoxia and has already been used to evaluate renal hypoxia (8, 15). As a transcription factor, HIF-1 α is involved in the expression of genes implicated in hypoxia and adaptation (VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, heme oxygenase 1, and erythropoietin) (16, 17). The injection of iodine-based contrast products has been shown to provoke an early rise (1 hour after injection) in HIF-1 α expression and pimonidazole immunostaining in diabetic rats (streptozotocin) (8). In our work, db_{sham} mice exhibited an increase in renal expression of mRNA of HIF-1 α and pimonidazole staining, confirming the hypoxic impact of diabetes mellitus in diabetic mouse kidneys, even in the absence of any acute injury. Moreover, in db_{shock} mice, hypoxia was more severe than in C_{shock} ones, as reflected by an increase in blood lactates, pimonidazole staining, and HIF-1 α quantification.

Among the molecular systems involved in hypoxia adaptation, VEGF is a growth factor and major regulator of angiogenesis. It binds to two tyrosine-kinase receptors: VEGFR-1 and VEGFR-2. Vascular endothelial growth factor receptor 2 is responsible for the transduction of the majority of the signals related to vascular angiogenesis and permeability. Kidney overexpression of VEGF and VEGFR-2 has been reported to occur some weeks after diabetes induction (18). Another tyrosine kinase receptor, Tie-2, has been shown to be highly expressed in endothelial cells and is crucial to angiogenesis and vascular maintenance (19, 20). In this investigation, VEGFR-1, whose expression is regulated by HIF, was increased in diabetic mice (db_{sham}) independently of HS, whereas VEGFR-2 was not altered. In db_{shock} mice, renal expression of VEGFR-1, VEGFR-2, and Tie-2 was decreased to a lesser extent than in C_{shock} mice. Such a decrease following AKI has been described in recent works and could be critical to the mechanism leading to reduction in vascular density following AKI (21, 22). We suggest that the slightest decrease in expression of VEGFR and Tie-2 in diabetic mice could be the consequence of hypoxic preconditioning. In our opinion, this finding should motivate researchers to investigate the long-term consequences of HS-based AKI on tubulointerstitial capillary rarefaction (23).

Given that hypoxia directly interferes with the endothelial regulation of renal hemodynamics, we have effectively studied NOS expression (24). Three NOS isoforms are expressed in the kidney, namely, eNOS, neuronal NOS, and calcium-independent iNOS. We focused on renal expression of eNOS and iNOS. Invalidation of eNOS in mice has been reported in association with a worsening of diabetic kidney disease (25). In our work, we observed no significant difference in baseline NOS expression between diabetic and nondiabetic mice. Nevertheless, during statistical analysis, a minimal difference between sham groups may have been overwhelmed by the order of magnitude of changes following shock. Indeed, mRNA expression of these two enzymes was considerably increased in db_{shock} mice. A model of ischemia-reperfusion in rats has shown endothelial dysfunction to play a significant role in ischemic AKI (26). The iNOS enzyme, overexpressed during tissular aggression, may be increased in hypoxia conditions. This results in a poorly regulated overproduction of nitric oxide for a prolonged period. Previous studies have shown that HS is associated with an overexpression of iNOS, contributing to this potentially deleterious prolonged nitric oxide production (27–29). This overexpression of eNOS and iNOS mRNA in db_{shock} could thus be a marker of the severity of endothelial dysfunction.

The point of this study is to provide a first assessment of the role of preexisting type 2 diabetes in the renal impact of experimental AKI. This work presents several limitations. First, we did not perform multiorgan analysis to account for variability in organ-specific endothelial responses to HS (24) and determine specific renal impact. However, kidney failure remains a key prognostic marker in shock of any type. Moreover, the lack of a treated diabetic group, using insulin, for example, is notable. This was due to the impossibility of efficiently and safely correcting glycemia in db/db mice during and after the procedure. Nevertheless, we have chosen this model of diabetes for two reasons: (a) type 2 diabetes is the most prevalent in humans, and (b) distinguishing between the impact of AKI and direct streptozotocin tubular toxicity would have been difficult when using the standard model of chemically induced type 1 diabetes in

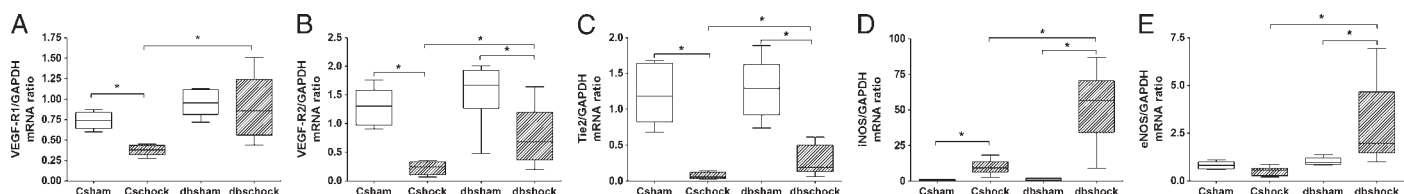


FIG. 4. **mRNA quantification of (A) VEGFR-1, (B) VEGFR-2 mRNA, (C) Tie-2, (E) iNOS, and (F) eNOS.** Data are expressed as box plot. **P* < 0.0125, Mann-Whitney test.

mice (30). According to recent literature, one might hypothesize that preexisting hypoxia could contribute to the modification of endothelial and tissular responses to AKI. Such a hypothesis remains to be confirmed.

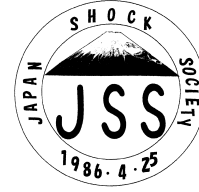
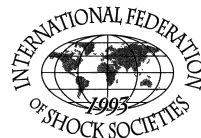
In conclusion, this study indicates that the renal impact of HS is more severe in type 2 diabetic mice than in nondiabetic ones. This worsening of AKI was associated with preexisting hypoxic signaling and differential hypoxic responses in diabetic mice.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Christiane Pecher for her help in the experiment and Dr. Benoit Lepage for statistical analysis.

REFERENCES

1. Parving HH: Diabetic nephropathy: prevention and treatment. *Kidney Int* 60(5):2041–2055, 2001.
2. Chronopoulos A, Rosner MH, Cruz DN, Ronco C: Acute kidney injury in elderly intensive care patients: a review. *Intensive Care Med* 36(9):1454–1464, 2010.
3. Delannoy B, Floccard B, Thiolliere F, Kaaki M, Badet M, Rosselli S, Ber CE, Saez A, Flandreau G, Guerin C: Six-month outcome in acute kidney injury requiring renal replacement therapy in the ICU: a multicentre prospective study. *Intensive Care Med* 35(11):1907–1915, 2009.
4. Hsu CY, Ordonez JD, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Go AS: The risk of acute renal failure in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 74(1):101–107, 2008.
5. Singh P, Rifkin DE, Blantz RC: Chronic kidney disease: an inherent risk factor for acute kidney injury? *Clin J Am Soc Nephrol* 5(9):1690–1695, 2010.
6. Mayeur N, Minville V, Jaafar A, Allard J, Al Saati T, Guilbeau-Frugier C, Fourcade O, Girolami JP, Schaak S, Tack I: Morphologic and functional renal impact of acute kidney injury after prolonged hemorrhagic shock in mice. *Crit Care Med* 39(9):2131–2138, 2011.
7. Palm F, Cederberg J, Hansell P, Liss P, Carlsson PO: Reactive oxygen species cause diabetes-induced decrease in renal oxygen tension. *Diabetologia* 46(8):1153–1160, 2003.
8. Rosenberger C, Khamaisi M, Abassi Z, Shilo V, Weksler-Zangen S, Goldfarb M, Shina A, Zibertrest F, Eckardt KU, Rosen S, et al.: Adaptation to hypoxia in the diabetic rat kidney. *Kidney Int* 73(1):34–42, 2008.
9. Sharma K, McCue P, Dunn SR: Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(6):F1138–F1144, 2003.
10. Brochner-Mortensen J, Giese J, Rossing N: Renal inulin clearance versus total plasma clearance of ⁵¹Cr-EDTA. *Scand J Clin Lab Invest* 23(4):301–305, 1969.
11. Peters AM, Henderson BL, Lui D, Blunkett M, Cosgriff PS, Myers MJ: Appropriate corrections to glomerular filtration rate and volume of distribution based on the bolus injection and single-compartment technique. *Physiol Meas* 20(3):313–327, 1999.
12. Foley RN, Collins AJ: End-stage renal disease in the United States: an update from the United States Renal Data System. *J Am Soc Nephrol* 18(10):2644–2648, 2007.
13. Ichimura T, Asselton EJ, Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, Bonventre JV: Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest* 118(5):1657–1668, 2008.
14. Inoue T, Kozawa E, Okada H, Inukai K, Watanabe S, Kikuta T, Watanabe Y, Takenaka T, Katayama S, Tanaka J, et al.: Noninvasive evaluation of kidney hypoxia and fibrosis using magnetic resonance imaging. *J Am Soc Nephrol* 22(8):1429–1434, 2011.
15. Rosenberger C, Griethe W, Gruber G, Wiesener M, Frei U, Bachmann S, Eckardt KU: Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction. *Kidney Int* 64(3):874–886, 2003.
16. Yee Koh M, Spivak-Kroizman TR, Powis G: HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci* 33(11):526–534, 2008.
17. Zhang Y, Ming J, Li T, Yang G, Xu J, Chen W, Liu L: regulatory effects of hypoxia-inducible factor 1alpha on vascular reactivity and its mechanisms following hemorrhagic shock in rats. *Shock* 30(5):557–562, 2008.
18. Cooper ME: Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet* 352(9123):213–219, 1998.
19. Jones N, Iljin K, Dumont DJ, Alitalo K: Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(4):257–267, 2001.
20. Yuan HT, Yang SP, Woolf AS: Hypoxia up-regulates angiotensin-2, a Tie-2 ligand, in mouse mesangial cells. *Kidney Int* 58(5):1912–1919, 2000.
21. Villanueva S, Cespedes C, Vio CP: Ischemic acute renal failure induces the expression of a wide range of nephrogenic proteins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(4):R861–R870, 2006.
22. 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* 294(4):F928–F936, 2008.
23. Horbelt M, Lee SY, Mang HE, Knipe NL, Sado Y, Kribben A, Sutton TA: Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 293(3):F688–F695, 2007.
24. van Meurs M, Wulfert FM, Knol AJ, De Haes A, Houwertjes M, Aarts LP, Molema G: Early organ-specific endothelial activation during hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock* 29(2):291–299, 2008.
25. Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, Heinig M, Clarke T, Campbell-Thompson M, Yuzawa Y, Atkinson MA, Johnson RJ, Croker B: Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 18(2):539–550, 2007.
26. Guan Z, Gobe G, Willgoss D, Endre ZH: Renal endothelial dysfunction and impaired autoregulation after ischemia-reperfusion injury result from excess nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 291(3):F619–F628, 2006.
27. Chen HI, Yeh DY, Kao SJ: The detrimental role of inducible nitric oxide synthase in the pulmonary edema caused by hypercalcemia in conscious rats and isolated lungs. *J Biomed Sci* 15(2):227–238, 2008.
28. Kiang JG, Peckham RM, Duke LE, Shimizu T, Chaudry IH, Tsokos GC: Androstenediol inhibits the trauma-hemorrhage-induced increase in caspase-3 by downregulating the inducible nitric oxide synthase pathway. *J Appl Physiol* 102(3):933–941, 2007.
29. Liu LM, Ward JA, Dubick MA: Hemorrhage-induced vascular hyporeactivity to norepinephrine in select vasculatures of rats and the roles of nitric oxide and endothelin. *Shock* 19(3):208–214, 2003.
30. Tay YC, Wang Y, Kairaitis L, Rangan GK, Zhang C, Harris DC: Can murine diabetic nephropathy be separated from superimposed acute renal failure? *Kidney Int* 68(1):391–398, 2005.



V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail nous a permis, dans un premier temps, de mettre au point un modèle d'agression rénale aiguë par choc hémorragique contrôlé chez la souris. Pour effectuer l'exploration de ce nouveau modèle, nous nous sommes intéressés à en décrire l'impact rénal à trois niveaux complémentaires : moléculaire, fonctionnel et morphologique. Trois semaines après la procédure, les souris conservent des signes d'un impact fonctionnel (troubles de la concentration des urines et de la réabsorption sodée) et morphologique (séquelle fibreuse) (**manuscrit n°1**). Par la suite, nous nous sommes appliqués à décrire les particularités de l'impact de ce modèle dans une population murine sensibilisée par un diabète de type II. Nous avons ainsi observé, chez les souris diabétiques, que l'existence d'une hypoxie tissulaire rénale préalable à toute agression est associée à un impact plus sévère du choc associé avec une réponse modifiée à l'hypoxie (**manuscrit n°2**).

Les résultats décrits ci-dessus représentent une partie du travail scientifique réalisé au cours de ma préparation à cette soutenance. Quatre autres centres d'intérêts ont été par ailleurs développés dans la continuité de ceux déjà cités.

Nous nous sommes en premier lieu attachés à simplifier et fiabiliser l'exploration du DFG chez la souris en étudiant la pertinence de la cystatine C comme marqueur d'estimation du DFG chez la souris. Cette note technique a été placée en annexe précédée par une brève revue générale sur le sujet (**annexe n°1/ chapitre VI/ manuscrit n°3**).

En association avec le Dr Stanislas Faguer (I2MC, équipe 12), nous nous sommes également intéressés à la réparation épithéliale tubulaire rénale dans les suites de son agression en nous concentrant sur le facteur de transcription *Hepatocyte Nuclear Factor*

I-β (HNF1-β). En utilisant notre modèle d'agression rénale et des analyses *in vitro* nous avons pu aboutir à trois conclusions : 1) le facteur de transcription HNF1-β est finement régulé dans les suites d'une agression rénale aiguë hypoxique et participe à la réparation épithéliale ; 2) sa régulation par l'hypoxie est HIF indépendante ; 3) trois semaines après le choc hémorragique, les anomalies fonctionnelles tubulaires sont associées à des anomalies d'expression génique du complexe de la mégaline, étayant la persistance d'un impact tubulaire rénal. Ce travail n'a pas été intégré à ce manuscrit, car il a été porté principalement par le Dr Faguer (soutenance de Thèse d'Université, décembre 2012). Il fait l'objet d'une publication en cours de soumission (**annexe n°2/ manuscrit n°4**).

Une autre perspective de recherche a été axée sur la pharmaco-protection hémodynamique rénale et systémique, au sein d'une population murine spécifique non diabétique, dans les suites d'une agression hypovolémique (M2R du Dr Hélène Charbonneau). Les résultats ne sont pas présentés dans ce manuscrit car ils font l'objet d'une analyse en vue d'un dépôt de brevet scientifique par la société Inserm Transfert™ et sont donc soumis à confidentialité.

En dernier lieu, pour continuer à approfondir notre compréhension de ce nouveau modèle, nous nous sommes concentrés sur l'impact rénal tardif du choc hémorragique (délai de 5 mois). L'objectif de ce travail est de préciser si les séquelles moléculaires, fonctionnelles et morphologiques visualisées trois semaines après le choc sont cicatricielles ou si elles réalisent le lit d'une MRC. L'analyse des mécanismes impliqués dans cette évolution se concentrera sur les rôles respectifs des facteurs de croissance vasculaires et épithéliaux et de l'hypoxie chronique. Les résultats sont en cours d'analyse et n'ont pu être inclus dans ce manuscrit.

En plus de ces expérimentations, il sera intéressant de préciser l'impact glomérulaire et vasculaire rénal du choc hémorragique, deux composantes essentielles, que nous n'avons pas encore explorées. L'analyse de l'impact vasculaire pourra être débutée par une mise en évidence des variations de perfusion rénale par une imagerie doppler *in situ* couplée à une étude dynamique *in vivo* de l'oxygénation tissulaire. Une analyse des conséquences glomérulaires, structure rénale essentielle, devra également être menée. Nous pourrions nous intéresser, en particulier, à l'*Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor*, exprimé principalement par les podocytes et dont le rôle essentiel dans la sévérité de l'atteinte glomérulaire a été récemment mis en évidence dans un autre cadre d'agression rénale aiguë : la glomérulonéphrite rapidement progressive³⁷⁵. Enfin, il sera indispensable de préciser l'impact multi-organique de notre modèle. Les rôles de l'inflammation et de l'atteinte endothéliale dans la pathogénie d'une éventuelle défaillance multi-organique devront ainsi être précisés.

VI. ANNEXES

A. Note technique : validation d'un marqueur d'estimation du DGF chez la souris

L'expérimentation animale dans le domaine de l'agression rénale nécessite une utilisation fréquente de marqueurs d'estimation du DFG (peu fiables) ou la réalisation de clearance de l'inuline pour le mesurer (procédure contraignante). Nous nous sommes donc attachés à évaluer l'intérêt de la cystatine C chez la souris afin d'améliorer la validité et de simplifier l'estimation du DFG.

1. Généralités chez l'humain : mesure et estimation du DFG, place de la cystatine C

a) Mesure et estimation du DFG chez l'humain : généralités

L'insuffisance rénale est définie par une diminution du DFG. Chez l'humain, la mesure du DFG est réalisée selon une méthode de référence : la détermination de la clairance rénale d'une substance librement filtrée par le rein, non réabsorbée, non sécrétée ni dégradée par les tubules rénaux. Le marqueur historique est l'inuline, un polymère inerte du fructose de 5,2 kDa, mais l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) est également utilisé après marquage par un radio-isotope (Cr^{51} ou $\text{Tc}^{99\text{m}}$)³⁷⁶. La réalisation de ces explorations fonctionnelles rénales est contraignante et s'effectue au sein de structures spécialisées car elle requiert une expertise particulière. Cette mesure de référence n'est donc pas adaptée au dépistage ni à l'évaluation de la filtration glomérulaire en routine. L'évaluation du DFG est ainsi, le plus souvent, obtenue par la mesure de la clairance rénale d'un traceur endogène imparfait à l'aide de formules mathématiques incluant des données démographiques et biométriques propres au

patient³⁷⁷. Les plus fréquemment utilisées sont les formules basées sur le dosage de la créatinine telles que celles de Cockcroft et Gault (qui varie avec l'âge, le poids et la créatininémie) et le MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) simplifiée (fonction de l'âge et de la créatininémie) ou complet (idem + urée et albumine sanguines)³⁷⁷. La valeur prédictive individuelle de ces formules chez l'homme reste imparfaite, principalement parce que la créatinine est sécrétée de façon variable, par le tubule proximal, mais aussi parce que son dosage est d'une fiabilité médiocre pour des concentrations faibles en routine. Pour cette raison, la recherche de nouveaux marqueurs endogènes de filtration glomérulaire continue, avec actuellement une attention particulière pour la cystatine C plasmatique.

b) Intérêt de la cystatine C

(1) Cystatine C : rappel physiologique et intérêt pour estimer le DFG chez l'humain

Récemment, la cystatine C a émergé comme un marqueur d'estimation du DFG potentiellement plus sensible et plus spécifique que la créatinine plasmatique chez l'humain. La cystatine C est un polypeptide (PM 13,59 kDa) appartenant à la superfamille des cystéines protéases (**Figure 13**). L'ARNm de la cystatine C est retrouvé dans toutes les cellules nucléées de l'organisme et son expression est faiblement régulée, ce qui la fait considérer comme un gène de ménage³⁷⁸. Plusieurs études ont montré qu'elle est librement filtrée et quasiment intégralement réabsorbée et catabolisée au niveau du tube contourné proximal. De plus, il n'existe pas de preuve de sécrétion tubulaire de cystatine C, contrairement à la créatinine. Ainsi, sa concentration plasmatique est considérée comme presque exclusivement influencée par la masse des cellules nucléées qui la produisent et le DFG³⁷⁹⁻³⁸¹: Cette relation peut s'exprimer ainsi : plus le DFG diminue, plus sa concentration plasmatique augmente. Il semble

toutefois que sa synthèse soit modifiée en situation d'hypo-métabolisme ou d'hyper-métabolisme en particulier dans les dysthyroïdies ou l'utilisation de cortico-stéroïdes³⁸²⁻³⁸³. Des études épidémiologiques ont également suggéré que l'âge, le BMI, le sexe, l'albuminémie, le diabète ou la protéine C réactive (CRP) pouvaient augmenter la cystatine C indépendamment du DFG³⁸⁴⁻³⁸⁵. Il semble néanmoins que sa valeur soit indépendante du régime alimentaire et probablement de l'inflammation³⁸⁶⁻³⁸⁹.

En situation chronique, la cystatine C plasmatique est d'autant mieux corrélée au DFG chez l'humain qu'elle est intégrée dans une formule multiparamétrique incluant des caractères biométriques, et surtout la créatininémie telles que celles proposées par Hoek, Larson, Stevens ou récemment Inker^{385, 390-392}. Inker et al. ont ainsi récemment montré que son association avec la créatininémie permet d'obtenir l'estimation la plus fiable connue à ce jour³⁹⁰. En conclusion, de nombreux arguments laissent envisager que la cystatine C est supérieure à la créatininémie en tant que marqueur d'estimation du DFG chez l'humain, néanmoins ceci reste encore à démontrer³⁹³.

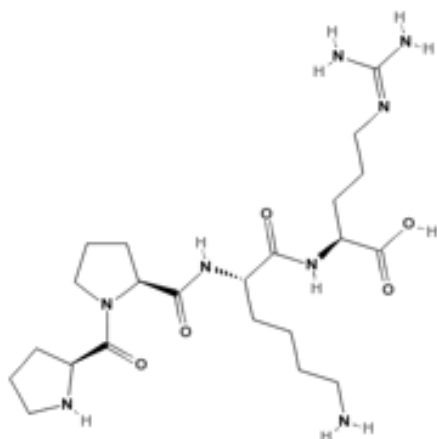


Figure 13 : Formule moléculaire de la cystatine C

(2) Intérêt de la cystatine C plasmatique dans l'IRA

La cystatine C présente un volume de distribution plus petit et une demi-vie plasmatique moindre que celles de la créatininémie, ce qui devrait en faire un meilleur marqueur du DFG en situation aiguë. La cystatine C a été évaluée dans plusieurs études en comparaison à la créatininémie³⁹⁴⁻³⁹⁶. Certains travaux basés sur la néphropathie des produits de contraste iodés n'ont pas mis en évidence de supériorité patente de la cystatine C sur la créatininémie. Toutefois, les travaux de Kim et al. laissent envisager une possible interférence technique intervenant dans le dosage de la cystatine C liée à la N acétyl-cystéine ou au produit de contraste³⁹⁷. Pourtant, dans la même situation pathologique, Briguori et al. ont conclu que l'association d'une augmentation de 10% et d'une augmentation de 3 mg/l de la cystatine C est un facteur de mauvais pronostic plus performant que la créatininémie seule³⁹⁸. En parallèle, la cystatinémie C permet de diagnostiquer plus précocement (24-48 heures) une IRA en réanimation³⁹⁹. De même, en chirurgie cardiaque pédiatrique, la valeur de cystatine C sanguine six heures après la chirurgie semble permettre de prédire l'apparition d'une IRA de stade 1 ou 2 de la classification AKIN. De plus, dans ce travail, la cystatinémie C prédit la durée de ventilation et la durée de séjour en réanimation⁴⁰⁰. Ceci a été également en partie confirmé chez l'adulte⁴⁰¹. Dans un travail récent de cardiologie interventionnelle, la cystatine C présente un meilleur pouvoir discriminant, un meilleur index de Youden et une meilleure précision pour diagnostiquer l'insuffisance rénale lorsqu'elle était comparée à plusieurs autres biomarqueurs⁴⁰².

Cependant, ces résultats ne sont pas constants et certains auteurs ont rapporté des conclusions différentes. En terme pronostic, le travail de Perianayagam et al. n'a pas révélé de supériorité de la cystatine C en tant que facteur prédictif de mortalité ou de nécessité de suppléance rénale, en comparaison à la diurèse ou à la créatininémie⁴⁰³.

Pour Wald et al., son intérêt pronostic post chirurgie cardiaque apparait faible³⁹⁵. De même, récemment, Slort et al. n'ont pas retrouvé, au sein d'une population de transplantés rénaux pédiatriques, une valeur prédictive de la cystatinémie C supérieure à celle de la créatininémie⁴⁰⁴. Ceci a également été constaté dans plusieurs travaux de réanimation, en particulier dans les situations d'IRA post-rénale (résultats confirmés *in vivo* chez le rat), durant lesquelles une importante dissociation entre la créatininémie et la cystatinémie a été révélée. Cette dernière semble sous-estimer l'intensité de l'IRA dans cette situation⁴⁰⁵⁻⁴⁰⁷.

Il est en réalité difficile d'évaluer précisément la validité de tous les marqueurs d'estimation du DFG en situation aiguë car, par définition, les situations d'IRA sont instables et rendent l'ensemble des techniques d'estimation du DFG difficilement interprétables.

La cystatine C semble donc être un marqueur d'estimation du DFG intéressant en situation aiguë, mais sa pertinence nécessite encore davantage d'évaluations. Ce constat, associé au coût du dosage rend actuellement inenvisageable de considérer la cystatine C comme le marqueur universel d'estimation du DFG en situation d'IRA.

(3) Intérêt de la cystatine C urinaire comme marqueur de lésion tubulaire

La cystatine C est librement filtrée par le glomérule puis est, en situation physiologique, intégralement réabsorbée et métabolisée au niveau tubulaire³⁷⁹. En conséquence, la présence de cystatine C urinaire a été proposée comme un marqueur potentiel de dysfonctionnement tubulaire proximal. Plusieurs travaux ont appuyé cette hypothèse.

En situation chronique la cystatine C pourrait être un marqueur précoce d'atteinte tubulaire chez les patients diabétiques de type II non protéinuriques⁴⁰⁸. Sa pertinence

comme modalité de dépistage de la toxicité tubulaire proximale (syndrome de Fanconi) par ténofovir a été mise en évidence par notre équipe⁴⁰⁹.

En situation aiguë, la cystatine C urinaire est prédictive de la nécessité de dialyse chez les patients en IRA deux jours avant la réduction de la clearance de la créatinine avec une AUC modeste de 0,72⁴⁰⁶. La concentration urinaire de cystatine C semble corrélée à l'intensité de la nécrose tubulaire en chirurgie cardiaque⁴¹⁰⁻⁴¹¹. Six heures après la chirurgie, une augmentation du taux de cystatinurie est corrélée à l'apparition d'une IRA. En cas de lésions tubulaires, l'augmentation de son excrétion urinaire peut aller jusqu'à 200 fois la normale et semble corrélée à l'intensité de l'IRA⁴¹²⁻⁴¹³.

Ainsi, la cystatinurie reflète la dysfonction tubulaire chez les patients les plus sévèrement agressés et pourrait être un facteur prédictif de sévérité⁴¹³⁻⁴¹⁵.

c) Dosage de la cystatine C

Les techniques de dosage de la cystatine C les plus utilisées sont la néphélométrie, la turbidimétrie et la méthode immuno-enzymatique (ELISA). Le principal problème chez l'humain est la forte variation intra et inter-essais. Récemment l'*International Federation of Clinical Chemists (IFCC)* a publié des référentiels afin d'en standardiser le dosage⁴¹⁶⁻⁴¹⁷.

Plusieurs techniques de dosage sont disponibles chez l'humain. La technique dite *Particle-Enhanced Nephelometry Immunoassay (PENIA)*, basée sur la quantification par néphélométrie mise au point par SiemensTM est la première à avoir bénéficié d'une autorisation par l'administration américaine FDA (*Food and Drugs Administration*)⁴¹⁸⁻⁴¹⁹. En parallèle, des techniques de dosage basées sur la turbidimétrie, dénommées *Particle-Enhanced Turbidimetric Immunoassay (PETIA)*, ont été développées par d'autres laboratoires (RocheTM, GenzymeTM). Elles ont l'intérêt d'être réalisables sur des automates multifonctions de laboratoire et de nécessiter un volume d'échantillon

inférieur⁴²⁰⁻⁴²². Une autre méthode est développée par TosohTM selon une technique de quantification par fluorescence faisant suite à une double réaction immunologique. Néanmoins, comme la technique PENIA, elle nécessite un appareillage spécifique⁴¹⁶. La valeur de ces dosages semble être relativement comparable et ils bénéficient tous de l'autorisation de dosage par la FDA. Un test ELISA est également disponible depuis plus de 20 ans⁴²³. De nombreuses autres techniques de dosage sont encore au stade du développement et/ou de la validation expérimentale⁴²⁴⁻⁴²⁵.

2. Etats des lieux de la cystatine C comme marqueur d'estimation du DFG chez la souris

a) Limites des marqueurs et techniques actuelles

(1) Place des marqueurs d'estimation historique du DFG

Nous avons déjà souligné que la recherche médicale nécessite fréquemment de recourir à des études *in vivo* chez l'animal, en particulier chez le muridé. Chez la souris, la mesure de la fonction rénale par la technique de référence présente les mêmes difficultés de réalisation que chez l'humain et demande une expertise encore plus grande. Ainsi, le diagnostic d'insuffisance rénale est fréquemment effectué chez le muridé au moyen de marqueurs biologiques « historiques » d'estimation du DGF (créatininémie et urée sanguine). Différents travaux ont pourtant souligné les limites de spécificité et de sensibilité de l'urée sanguine et de la créatininémie. Ainsi Meyer et al. ont montré que l'utilisation de la créatininémie plasmatique, mesurée par la méthode de Jaffé, aboutit à une surestimation de la valeur de la créatininémie en comparaison à celle mesurée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)⁴²⁶. La présence de nombreux facteurs chromatogènes interférant avec le dosage chez la souris en est la raison principale⁴²⁶. De plus, l'utilisation de la clearance de la créatinine (malgré

l'utilisation de la technique HPLC) pourrait être prise à défaut du fait d'une sécrétion tubulaire de créatinine beaucoup plus importante chez la souris que chez l'homme : elle peut, en effet, atteindre 35 à 50% de la valeur totale de créatinine dans les urines⁴²⁷.

(2) Techniques de mesure du DFG

La méthode de référence chez la souris reste la clearance de l'inuline⁴²⁸. Contrairement à l'humain, la mise en œuvre de cette méthode chez la souris nécessite idéalement une anesthésie générale afin d'effectuer un recueil urinaire et une perfusion continue d'inuline de qualité. Il est évident que cette anesthésie modifie le DFG. Certains auteurs ont récemment proposé de réaliser ces explorations chez des souris conscientes pour s'affranchir des modifications hémodynamiques inhérentes à l'anesthésie. En fait, ces méthodes nécessitent tout de même une anesthésie pour mettre en place le cathéter ou les pompes d'injection continue d'inuline puis une surveillance prolongée des souris en cage métabolique⁴²⁹. Ces procédures ne résolvent donc que partiellement les limites de cette méthode de mesure et en alourdissent la mise en œuvre. Ainsi Stechman et al. ont évalué à un minimum de 3 jours le délai au-delà duquel la souris peut être considérée comme « acclimatée » à la cage métabolique. En effet, durant les trois premiers jours, les souris présentent une diminution de 5 à 10% de leur poids corporel, de leur prise alimentaire et de leur diurèse⁴³⁰. Qi et al., dans le travail cité ci-dessus, décrivant l'utilisation de pompes d'injection continue d'inuline, ont effectué le recueil urinaire sept jours après la mise en cage métabolique pour s'affranchir de ce biais⁴²⁹. Ceci disqualifie néanmoins cette technique pour une analyse séquentielle de la fonction rénale chez un même animal et/ou pour une analyse de la fonction rénale en situation aiguë.

Des techniques de mesure de la clearance plasmatique de l'inuline ont également été proposées pour s'affranchir du recueil urinaire (*nous décrivons cette technique dans*

le manuscrit n°2) : néanmoins cette analyse nécessite plusieurs prélèvements et donc une déplétion sanguine qui rend cette technique incompatible avec une exploration séquentielle de la fonction rénale chez un même animal⁴³¹⁻⁴³².

b) Cystatine C et souris : que savons-nous ?

Chez la souris, une seule étude s'est intéressée à la corrélation de la cystatinémie avec la créatininémie : Song S et al. ont montré, dans un modèle d'IRA par réduction néphronique, que la cystatine C plasmatique est un marqueur plus sensible que la créatininémie pour dépister une IRA⁴³³. De rares travaux ont, par la suite, utilisé la cystatine C plasmatique comme marqueur d'estimation du DFG chez la souris mais sans en analyser la pertinence. Les techniques de dosage utilisées dans ces études sont variables : soit par PENIA, soit par une technique non précisée, ou bien, le plus souvent par la technique ELISA⁴³⁴⁻⁴³⁸. Or, la participation d'une réaction immunologique à ces techniques de dosage rend nécessaire leur évaluation préalable en cas de changement d'espèce en raison de l'immuno-spécificité de nombreux Ac monoclonaux. Cette évaluation est d'autant plus nécessaire que ce particularisme d'espèce a déjà été mis en évidence dans le cadre du dosage de la cystatine C chez le chat. En effet, malgré une forte concordance de la séquence d'acides aminés de la cystatine C, le dosage de cystatine C ne semble pas réalisable chez cet animal avec les anticorps décrits pour l'humain (contrairement au chien et au rat)⁴³⁹. A notre connaissance, il n'existe aucune étude de corrélation disponible chez le muridé entre la cystatinémie C et le DFG mesuré par une technique « gold standard », telle que la clairance de l'inuline.

3. Travail personnel

Introduction au travail personnel

L'objectif de cette partie de notre travail était d'étudier, chez la souris, la corrélation entre la clairance de l'inuline sanguine et la cystatine C afin d'étudier son intérêt en tant que marqueur d'estimation du DFG. Nous avons donc dosé différents marqueurs plasmatiques d'estimation du DFG : la cystatine C (techniques PETIA humaine et ELISA spécifique de la souris), la créatinine (techniques colorimétrique de Jaffé et immunoenzymatique) et l'urée chez 80 souris contrôles ou présentant une IRC. Nous avons analysé la corrélation du DFG estimé par ces dosages avec celui mesuré par la clearance de l'inuline au même instant. La cystatine C (ELISA) et la créatinine (immunoenzymatique) présentent la meilleure corrélation avec le DFG mesuré. La cystatine C (ELISA) semble le marqueur le plus performant. Par contre, ni l'urée, ni la créatininémie (colorimétrique Jaffé), ni la cystatine C (PETIA) ne sont correctement corrélées avec le DFG mesuré.

Ces résultats mettent en évidence : 1) l'intérêt de la cystatine C (ELISA) comme marqueur d'estimation du DFG chez la souris ; 2) l'importance de l'utilisation d'un anticorps spécifique à l'espèce pour doser la cystatine C chez la souris car l'anticorps utilisé dans la technique PETIA semble présenter une *cross* réactivité insuffisante avec la cystatine C de la souris ; 3) la mauvaise corrélation de l'urée et de la créatininémie (colorimétrique Jaffé) avec le DFG mesuré chez la souris doit inciter à abandonner définitivement ces méthodes d'évaluation du DFG dans ce modèle animal.

Plasma ELISA Cystatine C, but not PETIA, is a valid marker of GFR in mice

Nicolas Mayeur^{1,2,3}, Acil Jaafar¹, Maeva Guillaume⁴, Marie Buleon¹, Françoise Praddaude^{1,2}, Ivan Tack^{1,2}

¹ Service des explorations fonctionnelles physiologiques et laboratoire de physiologie, CHU Rangueil, Université Toulouse III, Toulouse, France

² Inserm UMR 1048, équipe 12, CHU Toulouse, France

³ Pôle d'anesthésie réanimation, CHU Purpan, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

⁴ Service d'hépatologie gastro entérologie, CHU Purpan, Toulouse, France

*** Corresponding author: Nicolas Mayeur, MD**

Service des explorations fonctionnelles physiologiques et laboratoire de physiologie, Inserm U858, équipe 12, Université Paul Sabatier Toulouse III, CHU Rangueil Toulouse et Département d'anesthésie réanimation, Equipe Accueil Inserm 4564, Université Paul Sabatier Toulouse III, CHU Purpan, Toulouse, France.

Phone: +33 561 32 26 83

Fax: +33 561 32 20 28

Abstract:

In mice, the measure of glomerular filtration rate (GFR) by exogenous inulin or EDTA^{Cr51} clearance is complex and historical markers of GFR present serious flaws. Cystatin C is a valid marker of GFR in human but its relevance, in mice, is unknown. We prospectively compared cystatin C (PETIA and ELISA), creatinin (Jaffé and immuno-enzymatic assays) and urea to GFR, measured by inulin clearance, in a population of C57Bl/6 mice. Correlation was significant for PETIA cystatin C (r Spearman=-0.76, $p<0.05$) and immunoenzymatic creatininemia (r Spearman -0.62; $p<0.05$). Correlation was low for urea and absent for PETIA cystatin C and Jaffé creatininemia. Our results suggest that ELISA cystatin C, but not PETIA, is better correlated to GFR in mice than immuno enzymatic creatininemia and could be an interesting GFR marker. Conversely, in this study, Jaffé creatininemia and urea were non relevant.

Introduction:

In mice, determination of the glomerular filtration rate (GFR) is ideally performed by measuring the renal clearance of exogenous markers such as inulin and EDTA^{Cr51}. In mice, this technique presents some shortcomings: a certain field of expertise, a prolonged time of procedure and animal anesthesia or sacrifice. Thus, for years, the follow up of renal function or its determination is frequently based on the dosage of blood markers, such as blood creatinin and urea. However, various works have underlined the limitations of these markers, mostly because of assays imprecision, or extrarenal influences.¹ Moreover, the use of creatinin clearance in order to estimate GFR could be disappointing because of the high tubular secretion of creatinin in mice (up to 35 to 50% of the total value).² As a consequence and despite recent technical advances,³⁻⁴ a reliable and easy to use endogenous marker of GFR is still lacking in mice.

For more than 15 years, cystatin C has appeared as a marker of GFR potentially more efficient than creatinin.⁵ In mice, only few data are available regarding the interest of blood cystatin C dosage as a way to estimate GFR. Song S and coll. have recently shown in a model of partial nephrectomy that cystatin C was more sensitive than creatinin in order to detect acute renal failure.⁶ However, the interest to use plasma cystatin C in order to efficiently estimate GFR remains to be validated using a gold standard method.

Material and methods

Mice population

C57Bl/6 wild type mice were obtained from HarlanTM. Animal experimentations were performed according to national and institutional animal care and ethical guidelines and were approved by local board. Male or female C67Bl/6 mice, aged between 16 and 40 weeks, were subjected to various kidney injuries or analyzed as controls. Chronic renal failure was obtained by partial

bilateral nephrectomy or unilateral nephrectomy. Analysis of renal function was performed at least 15 days after initial procedure.

Renal function studies

Measured GFR (mGFR) was assessed by inulin clearance as previously described.⁷ Briefly, mice were anesthetized with a single intra-peritoneal injection of 150 mg/kg sodium thiobutobarbital (Inactine[®], Sigma-AldrichTM) and anaesthesia was maintained using intravenous infusion (0.83 mg/kg/min) of sodic thiopental (penthothal[®], Mayne PharmaTM). After tracheotomy, the left jugular vein and femoral artery were cannulated in order to perfuse inulin and to monitor arterial blood pressure, respectively. Urine was collected through an intravesical catheter inserted after minimal laparotomy incision. After surgery, mice were allowed to recover for 30 minutes. Then, mGFR was determined over a 60-min clearance period. Inulin levels in plasma and urine samples were determined by enzymatic quantification of fructose (Enzytec D-Glucose/Fructose kit, r-biopharm[®]) on a Pentra 400 analyzer (Horiba Medical[®]) after a one hour 37°C incubation of the samples with inulinase.

Cystatin C assay

Cystatin C was determined on plasma samples at the time of sacrifice. Two different techniques were used: 1) a fully automated particle-enhanced turbidimetric assay (PETIA) on undiluted samples using a clinical commercial kit (DakoCytomation[®]) and performed on the Pentra 400 instrument (Horiba Medical[®]). To allow the capability of this assay to measure Cystatin C at the expected range of blood mice, two modifications were done compared to the manufacturer's recommendations: sample volume was enhanced (from 10 to 50 µl) and calibration curve was performed with the commercial standard diluted at 1:10, ensuring a final linear range of the modified PETIA assay between 0.04 to 0.75 mg/l; 2) an ELISA method using a mouse specific kit (Cystatin C mouse Elisa kit, Biovendor[®]) performed on 1:500 plasma dilution samples.

Creatininemia and uremia quantification

Plasma creatinine was determined by two different methods: 1) a classic modified kinetic Jaffe reaction (Creatinine 120 CP, Horiba Medical[®]) and; 2) an enzymatic colorimetric assay using an ID-MS traceable calibration (Creatinine Enzymatic, Beckman Coulter). Blood nitrogen was measured by the urease-GLDH enzymatic UV method (Urea CP, Horiba Medical[®]). All these tests were performed on the the Pentra 400 analyzer (Horiba Medical[®]).

Statistical analysis

Spearman correlation tests, regression curves and calculation of estimated GFR (EGFR) by plasma cystatin C were performed using Statview[®] (SAS Institute IncTM). Plot of Bland-Altman and figures were realized on Graph Pad Prism 4[®] (Graph pad software IncTM).

Results

A first analysis was performed on 41 mice: urea, immunoenzymatic creatininemia and ELISA cystatin C were significantly correlated to mGFR. Neither PETIA Cystatin C (data not shown), nor Jaffé creatininemia were correlated with mGFR (Figure 1). After this analysis, we focused on ELISA cystatin C, immuno enzymatic creatininemia and urea using complementary groups. We have collected a total of 80 points of cystatin C and 71 points of creatinin and urea. Urea was significantly but weakly correlated to mGFR (rSpearman -0.28, $p < 0.05$) (Figure 1). ELISA Cystatin C and creatinin were significantly correlated although cystatin C correlation was tighter (rSpearman -0.76 and -0.62, respectively) (Figure 1 and 2).

Discussion

In this experimental study in mice, we have shown that ELISA cystatin C and, to a lesser extent, immuno-enzymatic creatinin are significantly correlated with mGFR. Conversely, neither blood urea, nor Jaffé creatinin, nor PETIA cystatin C are relevant in order to estimate GFR.

In human, cystatin C has emerged as a marker of GFR.⁵ Indeed, there is no evidence of tubular secretion of cystatin C (conversely to creatinin) and its plasma concentration is considered as almost exclusively influenced by GFR.⁸ Our results suggest that ELISA Cystatin C correlation with mGFR is the strongest of all, but this correlation is however weaker than in human.⁹ Cystatin C synthesis or plasma level are, in human, partly dependant of metabolism, thyroid dysfunction, age, body mass index, sex, albuminemia and diabetes.¹⁰ Other bias could exist in mice. Moreover, the delay between kidney injuries and dosage could have been insufficient to preclude acute change in GFR.¹¹⁻¹² Finally, GFR measure in mice presents serious shortcomings: it requires anaesthesia, surgical procedure and the measure duration is shorter than in human. As a consequence, part of this mild correlation could be explained by the validity of mGFR itself. Nevertheless, inulin clearance is routinely performed in various laboratories including ours and,² despite being imperfect, still stands as a gold standard. Interestingly, this correlation is almost equal to that previously described in dogs.¹²⁻¹³

PETIA cystatin C was not correlated with mGFR. Various studies have used plasma cystatin C as a GFR marker in mice. PENIA, ELISA, or even unspecified assays were indifferently used in these studies.^{6, 14-16} Commercial reagents, designed for clinical diagnosis, either by PENIA or PETIA, are theoretically inappropriate because they use anti human cystatin C protein antibodies, without manufacturer's information about immunological targets nor interspecies cross reactivity validation. Nevertheless, some authors used it successfully in rat or dogs.¹⁷ Given the nearly identical mouse and human cystatin C aminoacid identity, the total lack of correlation between PETIA and mGFR found in this study suggests that the antibody used in this assay is partially or

totally unspecific in mice, a phenomenon probably amplified by the necessary increase in sample volume.¹⁸ Such uncross reactivity has been previously described in cats.¹⁷ In our opinion this inaccuracy should be enlarged to any polyclonal commercial kit based on human cystatin C: authors using such test should systematically performed a validation comparison with a specific anti-mice cystatin C ELISA.

Immuno-enzymatic creatininemia was correlated to mGFR but this correlation was weak. The supposed superiority of HPLC on immuno-enzymatic creatinin could explain such discrepancy but, in a recent study, Keppler et al. did not show any difference between these two assays.⁴ Moreover, using Jaffé assay, we do not show any correlation. Indeed, the numerous chromogenic factors in mice blood are a major shortcoming of Jaffé assay in mice.¹⁹ These results confirm previous studies highlighting the limitations of creatinin to accurately estimate GFR in mice.²⁰ At least, the validity of blood urea is weak and, as in human, urea must not be considered as relevant in order to estimate GFR.

In this work, ELISA cystatin C showed a higher correlation with mGFR than immuno-enzymatic creatinin. Furthermore, urea, Jaffé creatinin, and PETIA cystatin C were not relevant in order to estimate GFR.

Bibliography

1. O'Donnell MP, Burne M, Daniels F, *et al.* Utility and limitations of serum creatinine as a measure of renal function in experimental renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2002; 73: 1841-1844.
2. Eisner C, Faulhaber-Walter R, Wang Y, *et al.* Major contribution of tubular secretion to creatinine clearance in mice. *Kidney Int* 2010; 77: 519-526.
3. Takahashi N, Boysen G, Li F, *et al.* Tandem mass spectrometry measurements of creatinine in mouse plasma and urine for determining glomerular filtration rate. *Kidney Int* 2007; 71: 266-271.
4. Keppler A, Gretz N, Schmidt R, *et al.* Plasma creatinine determination in mice and rats: an enzymatic method compares favorably with a high-performance liquid chromatography assay. *Kidney Int* 2007; 71: 74-78.
5. Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, *et al.* Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl J Med* 2012; 367: 20-29.
6. Song S, Meyer M, Turk TR, *et al.* Serum cystatin C in mouse models: a reliable and precise marker for renal function and superior to serum creatinine. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 1157-1161.
7. Mayeur N, Minville V, Jaafar A, *et al.* Morphologic and functional renal impact of acute kidney injury after prolonged hemorrhagic shock in mice. *Critical care medicine* 2011; 39: 2131-2138.
8. Jacobsson B, Lignelid H, Bergerheim US. Transthyretin and cystatin C are catabolized in proximal tubular epithelial cells and the proteins are not useful as markers for renal cell carcinomas. *Histopathology* 1995; 26: 559-564.
9. Nitta K, Hayashi T, Uchida K, *et al.* Serum cystatin C concentration as a marker of glomerular filtration rate in patients with various renal diseases. *Intern Med* 2002; 41: 931-935.
10. Knight EL, Verhave JC, Spiegelman D, *et al.* Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney Int* 2004; 65: 1416-1421.
11. Tsuda H, Isaka Y, Takahara S, *et al.* Discrepancy between serum levels of low molecular weight proteins in acute kidney injury model rats with bilateral ureteral obstruction and bilateral nephrectomy. *Clin Exp Nephrol* 2009; 13: 567-570.
12. Almy FS, Christopher MM, King DP, *et al.* Evaluation of cystatin C as an endogenous marker of glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 45-51.

13. Wehner A, Hartmann K, Hirschberger J. Utility of serum cystatin C as a clinical measure of renal function in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2008; 44: 131-138.
14. Ito M, Sugihara K, Asaka T, *et al.* Glycoprotein hyposialylation gives rise to a nephrotic-like syndrome that is prevented by sialic acid administration in GNE V572L point-mutant mice. *PLoS One* 2012; 7: e29873.
15. Aikawa E, Aikawa M, Libby P, *et al.* Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation* 2009; 119: 1785-1794.
16. Knight J, Holmes RP, Cramer SD, *et al.* Hydroxyproline metabolism in mouse models of primary hyperoxaluria. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 302: F688-693.
17. Emeigh Hart SG. Assessment of renal injury in vivo. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005; 52: 30-45.
18. Pennacchio LA, Myers RM. Isolation and characterization of the mouse cystatin B gene. *Genome Res* 1996; 6: 1103-1109.
19. Meyer MH, Meyer RA, Jr., Gray RW, *et al.* Picric acid methods greatly overestimate serum creatinine in mice: more accurate results with high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1985; 144: 285-290.
20. Meyer MH, Smith S, Meyer RA, Jr. Creatinine assay by the fuller's earth procedure or by enzymatic determination is adequate for urine but not plasma of mice. *Comp Biochem Physiol B* 1993; 106: 685-689.

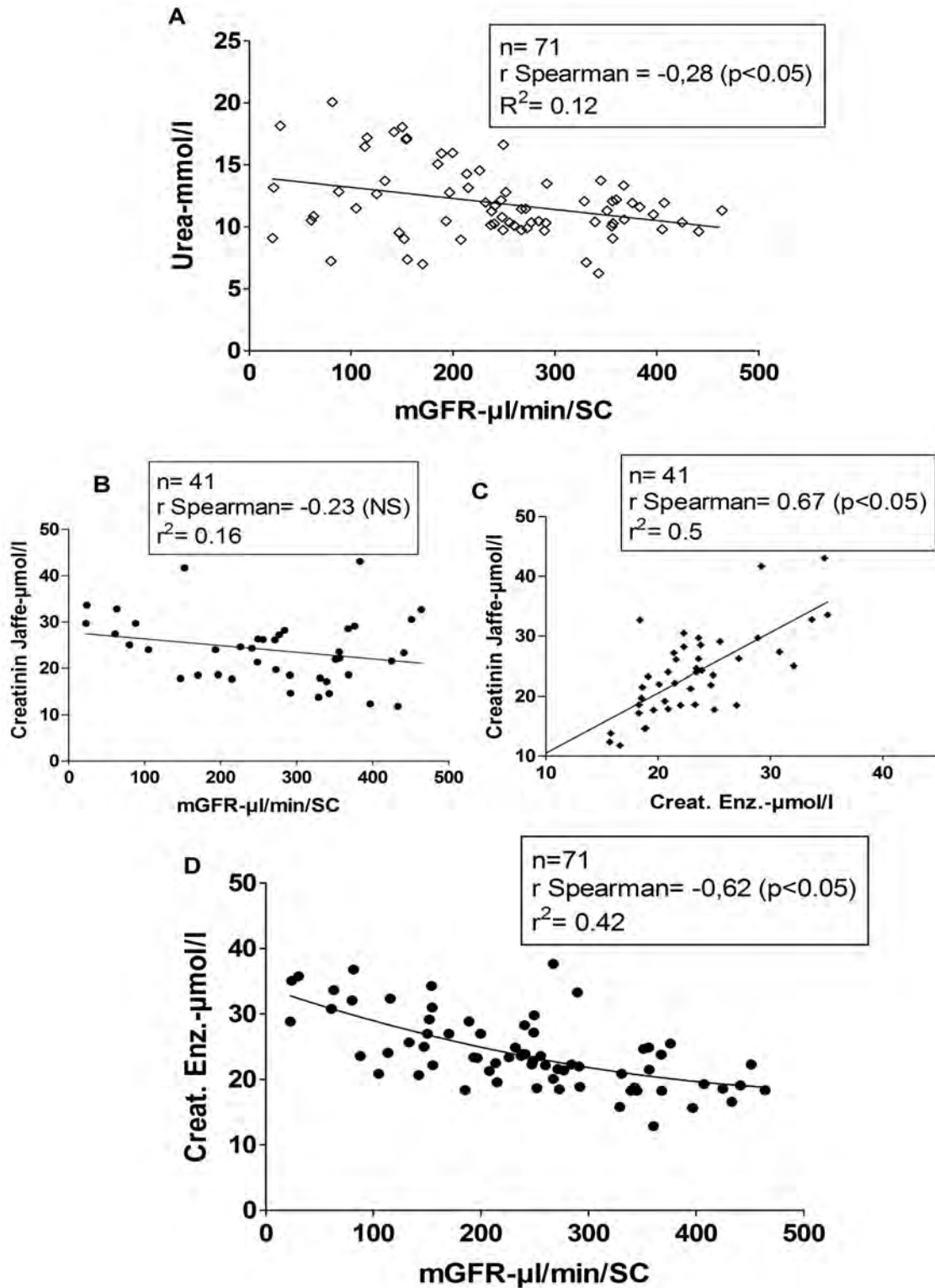


Figure 1: **A** non linear regression and correlation between urea and mGFR; **B** non linear regression and correlation between Jaffé creatinin and mGFR; **C** linear regression and correlation between Jaffé creatinin and enzymatic creatinin; **D** non linear regression and correlation between enzymatic creatinin and mGFR. mGFR: GFR measured by inulin clearance.

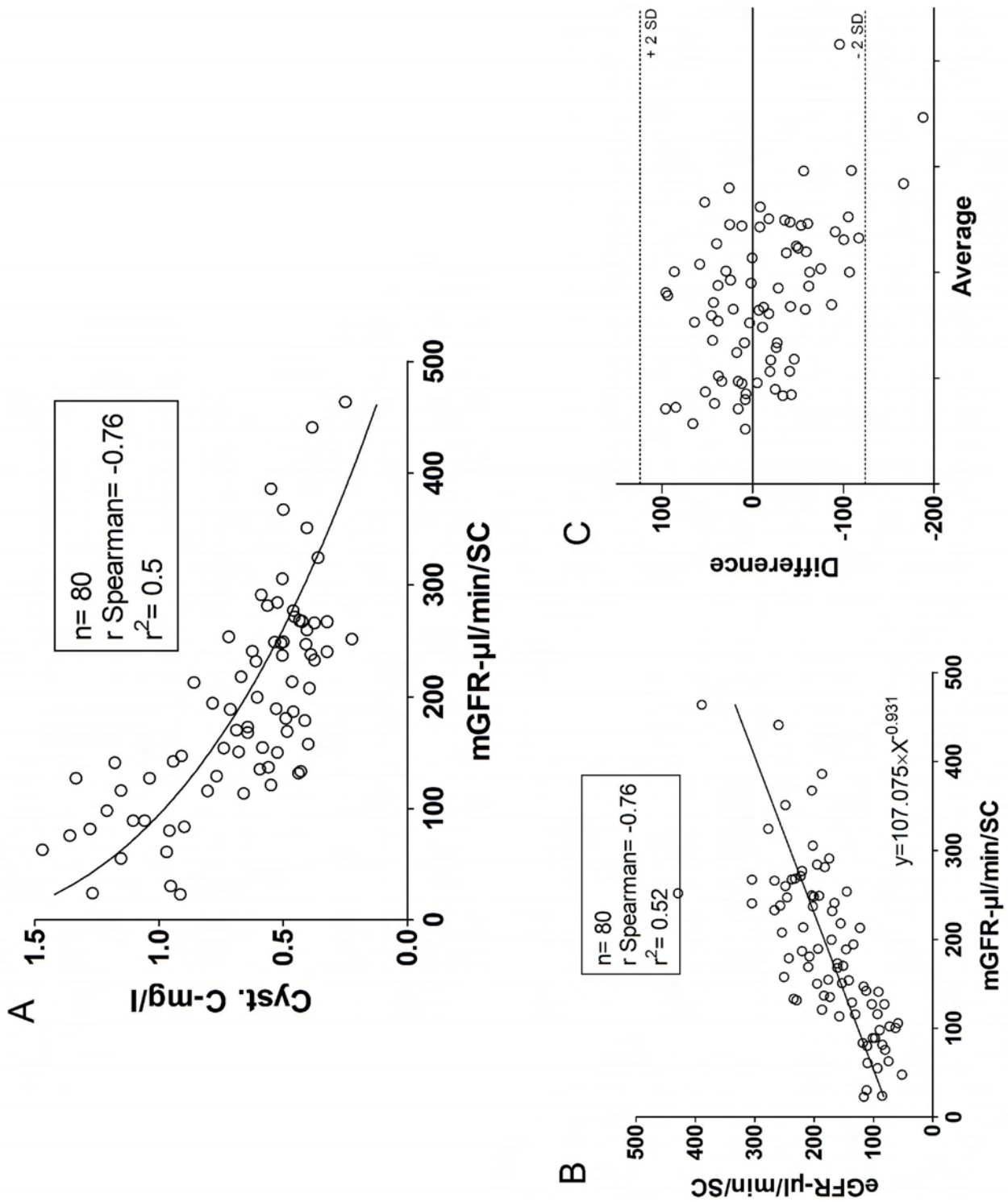


Figure 2: **A** correlation between ELISA cystatin C and GFR measured by inulin clearance (mGFR). **B** correlation between GFR estimated by cystatin C (eGFR) and mGFR. **C** Plot of Bland-Altman between eGFR by plasma cystatin C and mGFR.

B. Autres annexes

- Annexe n°2/ manuscrit n°4** : *Hnf-1 β transcription factor is an early Hif-1 α -independant marker of epithelial hypoxia and controls renal repair* soumis au journal *Plos One*.....131
- Annexe n°3** : éditorial «*Plumbing the depths of blood pressure: hypotensive haemorrhage and acute kidney injury*». Anderson R.J., *Crit Care Med.* 2011 39(9): 2196-2197.....149
- Annexe n°4** : abstract «*Pressure controlled hemorrhagic shock in mice: a new model of AKI*» N Mayeur et al from 30th ISICEM Brussels, Belgium. 9–12 March 2010 *Crit Care* 2010, 4(Suppl1):P552doi:10.1186/cc8754151
- Annexe n°5** : poster «*Elaboration d’un modèle murin d’IRA par choc hémorragique contrôlé*». N Mayeur et al from 38ème Congrès SRLF Paris 2010 *Réanimation* 19(Suppl 1)SP371 doi : 10.1016/j.reaurg. 2009.11.001.....153
- Annexe n°6** : poster «*Type 2 diabetes mellitus in mice worsens renal impact following hemorrhagic shock*» N Mayeur et al from 7ème Congrès de la société française de Physiologie 2012 Dijon, France 4 au 6 Avril154

Hnf-1 β transcription factor is an early Hif-1 α -independant marker of epithelial hypoxia and controls renal repair

Stanislas Faguer^{1,2,3,6}, Nicolas Mayeur^{2,5,6}, Anne-Laure Pageaud², Claire Courtellemont^{1,6}, Claire Cartery¹, Audrey Casemayou², Gilbert J Fournié¹, Joost P. Schanstra^{2,6}, Ivan Tack^{2,4,6}, Jean-Loup Bascands^{2,6} and Dominique Chauveau^{1,2,3,6}

1 Département de Néphrologie - Transplantation d'organes, CHU Rangueil, Toulouse, France

2 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048, Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (équipe 12), Toulouse, France.

3 Centre de référence des maladies rénales rares, CHU Rangueil, Toulouse, France

4 Service des explorations physiologiques, CHU Rangueil, Toulouse, France

5 Département d'Anesthésie - Réanimation, équipe Accueil Inserm 4564, CHU Purpan, Toulouse, France

6 Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France

Word count : 2857

Keywords: ischemic acute kidney injury, *Hnf1a*, *Hnf1b*, renal repair, Socs3

Running title : Hnf-1 β and ischemic AKI

Corresponding author :

Dr Stanislas FAGUER, MD
Service de Néphrologie et Immunologie clinique
Hôpital Rangueil
1 avenue Jean Poulhes
31059 Toulouse Cedex 09
France
Tél : + 33 5 61 32 33 79
Fax : + 33 5 61 32 23 51
Mail : faguer.s@chu-toulouse.fr

Abstract

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Epithelial repair following acute kidney injury (AKI) requires epithelial-mesenchyme-epithelial cycling associated with transient re-expression of genes normally expressed during kidney development as well as activation of growth factors and cytokine-induced signaling. In normal kidney, the Hnf-1 β transcription factor drive nephrogenesis, tubulogenesis and epithelial homeostasis through the regulation of epithelial planar cell polarity and expression of developmental or tubular segment-specific genes. In a mouse model of ischemic AKI induced by a 2-hours hemorrhagic shock, we show that expression of this factor is tightly regulated in the early phase of renal repair with a biphasic expression profile (early down-regulation followed by transient over-expression). These changes are associated to tubular epithelial differentiation as assessed by KSP-cadherin and megalin-cubilin endocytic complex expression analysis. In addition, early decrease in *Hnf1b* expression is associated with the transient over-expression of one of its main target genes, the suppressor of cytokine signaling *Socs3*, which has been shown essential for renal repair. *In vitro*, hypoxia induced early up-regulation of Hnf-1 β from 1 to 24 hours. When prolonged, hypoxia induced Hnf-1 β down-regulation while normoxia led to Hnf-1 β normalization. However induction of the hypoxia-inducible factor Hif-1 α in normoxic condition was not associated with Hnf-1 β up-regulation suggesting a more complex mechanism than a sole direct Hif-1 α regulation. Taken together, we showed that Hnf-1 β may drive recovery from ischemic AKI by regulating both the expression of genes important for homeostasis control during organ repair and the state of epithelial cell differentiation.

Introduction

1
2 In the general population, acute renal failure (ARF) is noted in 1% of all hospital admissions.
3
4 Hospital-acquired ARF occurs in up to 7% of all hospitalizations. Ischemic acute kidney injury (AKI)
5 is the major cause of ARF and is associated with increased mortality in hospitalized populations. ¹
6
7 Renal pathological changes of ischemic AKI are characterized by changes in proximal tubule
8 epithelium. Disruption of the cytoskeleton and the loss of cell polarity result in the loss of the proximal
9 tubule brush border, patchy loss of tubule cells, focal areas of proximal tubular dilatation and distal
10 tubular casts. and areas of cellular regeneration characterized by cell proliferation.² Following AKI,
11 replacement of lethally injured tubular cells is achieved by a complex reparative process leading to cell
12 proliferation. Epithelial-mesenchyme-epithelial cycling allows almost complete recovery of renal
13 architecture and renal function in most of the cases.³ Tight regulation of this complex process involves
14 cell cycle control,⁴ transient re-expression of genes normally expressed during kidney development,
15 including *Pax2*, *Notch-2*, *Wnt4* and *Ets-1*,⁵⁻⁸ and transient activation of growth factors- or cytokine-
16 induced signaling, including the hepatocyte and epidermal growth factor (HGF/EGF) and the
17 interleukine-6 receptor pathways.^{9,10}

26
27 During early kidney development, hepatocyte nuclear factor-1 β (Hnf-1 β) drives nephrogenesis,
28 tubulogenesis and epithelial maturation through the regulation of epithelial planar cell polarity and
29 expression of developmental or tubular segment-specific genes.¹¹⁻¹³ *Hnf1b* is expressed during early
30 mouse embryogenesis, especially in the Wolffian duct, the ureteric bud and the metanephric kidney.¹⁴
31 During later stages of kidney development, *Hnf1b* is expressed in all segments of the nephron, from
32 the proximal tubule (PT) to the collecting duct. Hnf-1 β is a transcription factor that controls the
33 expression of a number of genes including *Pkhd1*, *Umod* and *Socs3*.^{15, 16} Hnf-1 β acts as a homo- or
34 heterodimer with the closely related transcription factor Hnf-1 α . The latter is mostly expressed in PT
35 cells where it drives cells differentiation.¹⁷ Antenatal kidney-specific conditional inactivation of *Hnf1b*
36 in mice induces polycystic kidney disease with lethal renal failure around three weeks after birth.^{15, 18}
37 Some recent studies suggested that Hnf-1 β may have a role in epithelial kidney and liver repair.^{19, 20}

46 Data concerning the role of Hnf-1 β in renal repair following AKI are scarce. Interestingly,
47 invalidation of *Hnf1b* after the end of renal development (*i.e.* after P10 in mouse) is not followed by
48 renal changes, except when cells are forced to enter the cell cycle.¹⁹ In mice with renal specific *Hnf1b*
49 invalidation after P10, ischemic AKI promotes tubular dilatation and cystic kidney disease. Among
50 Hnf-1 β target genes *Socs3* is a key player in epithelial repair following ischemic AKI. Within the first
51 hours following ischemic injury, a dramatic increase in the intra-renal expression of *Socs3*, a
52 suppressor of cytokine signaling, induced through an interleukine-6-mediated feedback, has been
53 identified.²¹ Reduced *Socs3* expression in proximal tubular cells accelerates acute renal failure²². In
54 addition, it has been demonstrated that *Socs3* negatively regulates signaling of various growth factors

and cytokines, including EGF, leukemia inhibitor factor, fibroblast growth factor, angiotensin-II and insulin-like growth factor-1, all involved in renal repair.²³⁻²⁶

Surprisingly, expression of *Hnf1b* during early steps of renal repair has not been studied. We thus investigated the expression of *Hnf1b* in parallel with some target genes in an ischemic AKI model. We found that Hnf-1 β drive recovery from ischemic AKI by regulating both the expression of important genes for homeostasis control during PT repair, and the state of epithelial cell differentiation. In addition, we deciphered the respective roles of the hypoxia-inducible factor Hif-1 α up-regulation and low oxygen pressure per se in the regulation of the *Hnf1b* expression.

Results

Renal expression of Hnf-1 β after ischemic AKI in mouse

In the mouse model of hemorrhagic shock-induced AKI, we demonstrated a significant decrease in GFR at 2 and 6 days post shock, followed by complete recovery at day 21.²⁷ Changes in GFR were associated with typical lesions of AKI up to day 6, while a complete repair of the tubules was observed at day 21. In this model, we now show a significant ~ 50 % decrease in the expression of *Hnf1b* within the first 10 hours post-shock followed by a transient over-expression at 24 hours (Fig.1a). The kinetics of Hnf-1 β expression was confirmed at protein level (Fig.1b). Consistent with previous mouse models using an ischemia/reperfusion (I/R) model to mimic AKI^{21,28}, assessment of cell proliferation by *Pcna* mRNA expression showed a significant increase within the first 10 hours (Fig. 1c).

Renal expression of Hnf-1 β target genes after ischemic AKI in mouse

Renal expression of *Cdh16* (KSP-cadherin), *Pkhd1* (Polyductin) and *Socs3*, three genes directly regulated by Hnf-1 β , were also assessed. *Cdh16* and *Pkhd1* are known to be positively regulated, while *Socs3* is negatively regulated by Hnf-1 β .^{15, 16} A significant decrease of *Cdh16* and *Pkhd1* expression was observed 10 hours after the hemorrhagic shock followed by progressive normalization until day 21 (Fig. 2a-b). Conversely, the expression of *Socs3* (a gene negatively regulated by Hnf-1 β) displayed a mirror expression profile with Hnf-1 β in this model (Fig.2c). These results suggest that the expression of Hnf-1 β and three of its target genes is tightly regulated during the regeneration phase following ischemic AKI in mice.

Renal expression of Hnf1 α and proximal tubule markers after ischemic AKI in mouse

Hnf-1 α is involved in epithelial repair in the liver²⁸. In addition, Hnf-1 α is required for proper differentiation of proximal tubule¹⁷ and acts in homo- or heterodimers with Hnf-1 β . We have therefore studied its renal expression after ischemic AKI. A significant ~ 50 % decrease in the expression of *Hnf1a* was observed at 10 hours followed by a transient rebound at 48 hours (Fig. 3a). Thus, temporally changes in *Hnf1a* expression occur later than the change in *Hnf1b* expression. We also studied the renal expression of proximal tubule markers *Lrp2* and *Cubln*, which encode for the endocytosis complex megalin-cubilin, in this ischemic AKI mouse model. Expression of both genes was significantly decreased from 3 up to 24 hours after hemorrhagic shock. Expression of *Cubln* normalized at 48 hours while *Lrp2* remained down regulated until 21 days after the insult (Fig.3b-c).

Persistent down-regulation of *Lrp2* at day 21 suggested permanent proximal tubule dysfunction escaping clinical and pathological detection.

In vitro studies of Hnf1b and Hif-1α expression under hypoxic conditions

To decipher the molecular mechanisms that controls *Hnf1b* expression in kidney during and after ischemic injury, we assessed the consequences of hypoxia on Hnf-1β *in vitro*. HK-2 cells (a cell line issued from human proximal tubule) were grown under normoxic (21% oxygen) and hypoxic (1% oxygen) conditions, and Hnf-1β levels were measured at various time of hypoxia. Western blot analyses showed a significant increase of Hnf-1β expression as early as one hour after hypoxia and up to 24 hours (Fig.4a), followed by a progressive decline reaching control values after 48 hours hypoxia and a down regulation at 72 hours. Restoring normoxia after 2 hours of hypoxia leads to the normalization of Hnf-1β expression at 24 hours (Fig. 4b).

The transcriptome adaptive response to hypoxia has been shown to be primarily controlled by hypoxia-inducible factor (Hif-1α).²⁹ To determine whether *Hnf1b* expression is dependant of Hif-1α, we analyzed its expression in HK-2 cells submitted to hypoxia. As shown in figure 4c, Hif-1α was early and significantly up-regulated when HK-2 cells were submitted to 1%-hypoxia reaching a maximal value after 2 hours of hypoxia. This increase was transient since persistent hypoxia lead to down-regulation of Hif-1α after 24 hours of hypoxia. This down regulation became highly significant at 72 hours of hypoxia. As Hnf-1β and Hif-1α expression followed a similar but not overlapping expression profile with time in hypoxic HK-2 cells, we hypothesized that the increase in Hnf-1β could be related to Hif-1α overexpression. To test it, we cultivated HK-2 cells in normoxic conditions and added to the culture medium an inhibitor of Hif-1α specific prolylhydroxylases (PHD) to inhibit Hif-1α degradation. As expected, PHD inhibition was accompanied by a significant over-expression of Hif-1α (Fig. 5a), while Hnf-1β expression was not modified (Fig. 5b), a finding consistent with a differentially targeted regulation for each of the transcription factor under hypoxia.

Discussion

1
2 Hnf-1 β is a transcription factor that controls planar cell polarity, tubulogenesis and tubular
3 segment differentiation,^{11-13, 15} which are all events required for proper renal repair. To date, the role of
4 *Hnf1b* in epithelial regeneration remains highly elusive. The main finding in this study is that *Hnf1b*
5 expression is tightly regulated during epithelial repair following ischemic AKI induced by a 120-
6 minutes hemorrhagic shock-related hypotension. The biphasic kinetics suggests that *Hnf1b* may
7 control expression of molecular actors required for proper epithelial repair (e.g. *Socs3*).
8
9

10
11
12
13 Verdeguer *et al.* showed that ischemic AKI in mice with conditional renal-specific
14 invalidation of *Hnf1b* in adulthood induces a severe tubular disorder characterized by the lost of planar
15 cell polarity and abnormal epithelial cell proliferation with subsequent cystic dilatation.³⁰ Hnf-1 β may
16 drive the tubular regeneration by controlling the network of epithelial genes that have to be early re-
17 expressed after mitosis. This finding was identified *in vitro* with conditions mimicking physiological
18 process of cell renewal. The consequences of (ischemic) AKI on *Hnf1b* expression and role were not
19 reported in this article. In a rat model of cisplatin- or gentamicin-induced renal failure, Xu *et al.*
20 showed that *Hnf1b* expression is reduced three days after nephrotoxicants injection³¹. However, the
21 characteristics of this model (i.e. induction of complete proximal tubule dysfunction leading to a renal
22 Fanconi syndrome phenotype) precluded any analogy concerning the role of the Hnf-1 β transcription
23 factor during renal repair following ischemic insult.
24
25
26
27
28
29
30
31

32
33 In our study, we identified a more complex role of *Hnf1b* after ischemic AKI. First, during the
34 early steps of epithelial repair, its expression is significantly decreased which is consistent with the
35 concomitant dramatic up-regulation of *Socs3*, a gene negatively regulated by Hnf-1 β .¹⁶ *Socs3* acts as
36 an inhibitor of signaling pathways downstream of the interleukine-6-receptor and the EGF/HGF
37 receptors, two pathways actively involved in renal repair.^{10, 32-34} Thus, one of the roles of Hnf-1 β
38 during renal epithelial repair could be to control a number of cytokines or growth factor signaling
39 pathways by allowing the transient up-regulation of *Socs3*. Second, the subsequent transient over-
40 expression of *Hnf1b* was accompanied by the progressive normalization of the expression of its target
41 genes *Cdh16* and *Pkhd1*. Hence, together with the report from Verdeguer *et al.*,³⁰ our findings also
42 confirm the role of Hnf-1 β in the epithelial renal repair following ischemic AKI through the tight
43 regulation of a number of cystic disease-associated genes that control renal tubular morphogenesis.
44
45
46
47
48
49
50
51

52 The molecular mechanisms that underlie the kinetics of Hnf-1 β expression after AKI remain
53 unknown. The sharp decrease suggests a direct post-transcriptional effect involving an as yet unknown
54 pathway. We hypothesized that hypoxia, inflammatory response or growth factors may trigger the
55 expression of *Hnf1b* *in vivo*. Relevant to the first possibility, we assessed the expression of Hnf-1 β in a
56 proximal tubule cell line (HK-2 cells) grown in various conditions of hypoxia. *In vitro*, hypoxia was
57 followed by an early up-regulation of Hnf-1 β (one hour), while Hnf-1 β down-regulation was observed
58
59
60
61
62
63
64
65

1 only if hypoxia was maintained for 48 to 72 hours. This effect of hypoxia was reversible as Hnf-1 β
2 expression returned to a basal value after 24 hours of normoxia. The timing of Hnf-1 β up-regulation
3 was similar to that of Hif-1 α over-expression. Hif-1 α is a hypoxia-inducible transcription factor
4 dramatically up-regulated during cell hypoxia (as soon as 0.5 to 1 hour after the start of hypoxia).
5 Under normoxic condition, hydroxylation of Hif-1 α by specific prolylhydroxylase 1-3 (PHD) leads to
6 its degradation through the proteasomal pathway. Hypoxia inhibits Hif-1 α -specific PHD and
7 abolishes the degradation of Hif-1 α which is thus translocated to the nucleus where it acts as a
8 transcription factor. During hypoxia, Hif-1 α directly regulates the expression of specific target genes,
9 like the vascular endothelial growth factor (VEGF),³⁵ and induces a dedifferentiation of epithelial cells
10 submitted with loss of epithelial markers like E-cadherin.³⁶ Herein, we showed that up-regulation of
11 Hnf-1 β is a very early event during hypoxia but is not dependent on Hif-1 α expression. Further studies
12 will have to better delineate the molecular pathways that regulate *Hnf1b* expression during epithelial
13 hypoxia.
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 Interestingly, our *in vivo* study showed that epithelial repair is accompanied by modulation of
24 *Hnf1b* expression potentially allowing specific transcriptional changes like transient *Socs3* over-
25 expression. However, contrasting with *in vitro* data, first Hnf-1 β change observed after ischemic insult
26 was a dramatic fall despite the concomitant low intra-renal oxygen partial pressure observed in this
27 model, as demonstrated by pimonidazole staining.²⁷ These conflicting results suggest that the
28 expression of *Hnf1b* during epithelial regeneration is dependent of various pathways and that hypoxia
29 is not the main regulator of *Hnf1b* in this context.
30
31
32
33
34

35 Altogether, these results suggest that (1) hypoxia may have short and long term effect on
36 *Hnf1b* expression, (2) molecular mechanisms underlying *Hnf1b* changes observed during epithelial
37 renal repair are more complex than a sole response to hypoxia/normoxia condition and (3) *Hnf1b* may
38 drive an adaptative response to epithelial injury by regulating growth factors / cytokine signaling
39 (*Socs3* expression) and epithelial differentiation (*Cdh16*, *Pkhd1* expression). Whether these findings
40 may be extended to other cause of acute kidney injury (*i.e.* septic or toxic insult) and to other ischemic
41 epithelial insults (*i.e.* liver or gut injury) needs to be addressed.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Materials and Methods

Hemorrhagic shock protocol

Validation of this model of ischemic AKI was recently reported.²⁷ Animal experimentations were performed according to national and institutional animal care and ethical guidelines, and were approved by local board (Comités régionaux d'éthique en matière d'expérimentation animale, INSERM, Toulouse, France). Briefly, a 2 hours-hypotension (35 mmHg mean arterial blood pressure) induced by temporary blood removal was applied to C57/Bl6 female mice (Harlan France, Gannat, France), further called shocked mice. Anesthesia was based on ketamine and xylazine (250 mg/kg and 10 mg/kg, respectively). Mice were intubated and left jugular vein and femoral artery were catheterized. Mechanical ventilation through intratracheal canula was realized with a specific ventilator Minivent 845[®] (Hugo Sachs Electronik, Germany). At the end of that period, shed blood and lactated Ringer's solution (twice the shed blood volume) were infused in order to provide adequate fluid resuscitation. Sham-operated mice (further called sham mice) underwent the same anesthetic and surgical procedures, but neither hemorrhage nor fluid resuscitation were performed. Shocked (n=5-6) and sham mice (n=4) were sacrificed at different times: 3 hours, 10 hours, 24 hours, 2 days, 6 days and 21 days after the beginning of the blood removal.

Cell culture

The human proximal tubule epithelial cell-line HK-2 was purchased from ATCC[®] (Molsheim, France) and were grown in DMEM/F12 + Glutamax[®] (1/1) medium supplemented with 50 U/mL Penicillin, 50 mg/mL Streptomycin, 400 µg/mL of hydrocortisone, 10 µg/mL of EGF, 1.4 µg/mL of triiodothyroxine, 5 mg/mL of insulin and 10% fetal calf serum. The cells were grown in 6-wells plates. All experiments were conducted with confluent cultures. For hypoxic culture, cells were placed in a hypoxic (1% O₂, 5% CO₂, 37°C) incubator (Sanyo O₂/CO₂ incubator, Ontario) for 0, ½, 1, 2, 24, 48 or 72 h. Control cells were incubated for equivalent periods under normoxic conditions (21% O₂, 5% CO₂, 37°C). Last, normoxic up-regulation of Hif-1α was obtained with the use of specific prolylhydroxylase inhibitor (Calbiochem-Merck[®], Fontenay-sous-bois, France).

Molecular analyses

The left kidney of mice was excised, washed with 1X PBS and subsequently used for molecular studies.

1 Total RNA was collected with the help of the RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France)
2 and 1 µg of total RNA was engaged in a reaction of RT-PCR (Superscript II Rnase H Reverse
3 Transcriptase[®] (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France)). cDNA were subsequently quantified using
4 the LightCycler Mix (Roche, Meylan, France) using the following conditions : 95°C for 5 min
5 followed by 40 cycles (95°C for 15 secondes, 60°C for 10 secondes and 72°C for 15 secondes) and
6 denaturation. Quantitative PCR was carried out on a LightCycler[®] 480 sequence detection system. The
7 primers were designed using Primer3 and GeneQant softwares. The efficiency of each set of primers
8 was assessed by dilution curves and only set with efficiency higher than 95% were used. Ct
9 differences between the reference (*Gapdh* and *18S*) and target genes were calculated for each sample.
10 The formula used to quantify the relative changes in target over references mRNAs between the two
11 groups is derived from the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula as recommended.
12
13
14
15
16
17
18

19 For protein extraction, kidney samples were homogenized in lysis buffer (10 mM Tris pH 7.5,
20 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA and 0.1% SDS) with a protease inhibitor cocktail
21 (Complete Mini kit (Roche, Meylan, France)) and separated on nitrocellulose membranes. Membranes
22 were blocked with TBS-0.1% Tween + 5% BSA at room temperature for 2 hours and probed with the
23 monoclonal antibodies anti-*Hnf1b* (sc-22840X, SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA;
24 1:1000) overnight at 4°C. The membranes were then incubated for 1 hour with the appropriate
25 secondary antibody (1:7500) conjugated with peroxidase (ECLTM anti-rabbit, GE Healthcare-little
26 Chalfont-GB). Detection was performed with SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate
27 (ThermoScientific, Rockford, USA) and analyzed by the photon detector Gene Gnome[®] (Syngene Bio
28 Imaging, Cambridge, UK). Membranes were reprobbed with polyclonal goat anti-B-actine (1:10 000).
29 Protein bands were quantified by densitometry using ImageJ public open source software and results
30 are expressed as *Hnf1b*/Beta-actin ratio.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 *Statistical analysis*

44
45 Quantitative parameters are reported as median and limits, and qualitative parameters as
46 numbers and percentage. Continuous variables were compared using one-way ANOVA test followed
47 by unpaired t-test. A *P*-value < 0.05 was considered as statistically significant. Analyses were
48 performed using GraphPad Prism 4 (Graphpad software Inc, San Diego, USA).
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1. Chertow GM, Burdick E, Honour M, *et al.*: Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**:3365-3370.
2. Racusen L: *The morphologic basis of acute renal failure.*, Molitoris BA, Finn WF, edn, vol. pp 1-12. W.B. Saunders Philadelphia, 2001.
3. Ishibe S, Cantley LG: Epithelial-mesenchymal-epithelial cycling in kidney repair. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; **17**:379-385.
4. Price PM, Safirstein RL, Megyesi J: The cell cycle and acute kidney injury. *Kidney Int* 2009; **76**:604-613.
5. Lindoso RS, Verdoorn KS, Einicker-Lamas M: Renal recovery after injury: the role of Pax-2. *Nephrol Dial Transplant* 2009; **24**:2628-2633.
6. Kobayashi T, Terada Y, Kuwana H, *et al.*: Expression and function of the Delta-1/Notch-2/Hes-1 pathway during experimental acute kidney injury. *Kidney Int* 2008; **73**:1240-1250.
7. Terada Y, Tanaka H, Okado T, *et al.*: Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**:1223-1233.
8. Tanaka H, Terada Y, Kobayashi T, *et al.*: Expression and function of Ets-1 during experimental acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**:3083-3092.
9. Humes HD, Cieslinski DA, Coimbra TM, *et al.*: Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in postischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 1989; **84**:1757-1761.
10. Nechemia-Arbely Y, Barkan D, Pizov G, *et al.*: IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**:1106-1115.
11. Adalat S, Woolf AS, Johnstone KA, *et al.*: HNF1B mutations associate with hypomagnesemia and renal magnesium wasting. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**:1123-1131.
12. Fischer E, Legue E, Doyen A, *et al.*: Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genet* 2006; **38**:21-23.
13. Lokmane L, Heliot C, Garcia-Villalba P, *et al.*: vHNF1 functions in distinct regulatory circuits to control ureteric bud branching and early nephrogenesis. *Development* 2010; **137**:347-357.
14. Coffinier C, Barra J, Babinet C, *et al.*: Expression of the vHNF1/HNF1beta homeoprotein gene during mouse organogenesis. *Mech Dev* 1999; **89**:211-213.
15. Gresh L, Fischer E, Reimann A, *et al.*: A transcriptional network in polycystic kidney disease. *Embo J* 2004; **23**:1657-1668.
16. Ma Z, Gong Y, Patel V, *et al.*: Mutations of HNF-1beta inhibit epithelial morphogenesis through dysregulation of SOCS-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**:20386-20391.
17. Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, *et al.*: Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* 1996; **84**:575-585.
18. Hiesberger T, Bai Y, Shao X, *et al.*: Mutation of hepatocyte nuclear factor-1beta inhibits Pkhd1 gene expression and produces renal cysts in mice. *J Clin Invest* 2004; **113**:814-825.
19. Verdeguer F, Le Corre S, Fischer E, *et al.*: A mitotic transcriptional switch in polycystic kidney disease. *Nat Med* 2010; **16**:106-110.
20. Yoshioka K, Kunitomo M, Yanai K, *et al.*: Hepatocyte nuclear factor 1beta induced by chemical stress accelerates cell proliferation and increases genomic instability in mouse liver. *J Recept Signal Transduct Res* **31**:132-138.
21. Grigoryev DN, Liu M, Hassoun HT, *et al.*: The local and systemic inflammatory transcriptome after acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**:547-558.
22. Mitazaki S, Kato N, Suto M, *et al.*: Interleukin-6 deficiency accelerates cisplatin-induced acute renal failure but not systemic injury. *Toxicology* 2009; **265**:115-121.
23. Elliott J, Johnston JA: SOCS: role in inflammation, allergy and homeostasis. *Trends Immunol* 2004; **25**:434-440.
24. Dey BR, Furlanetto RW, Nissley P: Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 protein interacts with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **278**:38-43.
25. Tan JC, Rabkin R: Suppressors of cytokine signaling in health and disease. *Pediatr Nephrol* 2005; **20**:567-575.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
26. Ben-Zvi T, Yayon A, Gertler A, *et al.*: Suppressors of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 interact with and modulate fibroblast growth factor receptor signaling. *J Cell Sci* 2006; **119**:380-387.
 27. Mayeur N, Minville V, Jaafar A, *et al.*: Morphologic and functional renal impact of acute kidney injury after prolonged hemorrhagic shock in mice. *Crit Care Med* 2011; **39**:2131-2138.
 28. Leu JJ, Crissey MA, Leu JP, *et al.*: Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury. *Mol Cell Biol* 2001; **21**:414-424.
 29. Semenza GL: Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* 2011; **365**:537-547.
 30. Verdeguer F, Le Corre S, Fischer E, *et al.*: A mitotic transcriptional switch in polycystic kidney disease. *Nat Med* **16**:106-110.
 31. Xu EY, Perlina A, Vu H, *et al.*: Integrated pathway analysis of rat urine metabolic profiles and kidney transcriptomic profiles to elucidate the systems toxicology of model nephrotoxicants. *Chem Res Toxicol* 2008; **21**:1548-1561.
 32. Homsí E, Janino P, Amano M, *et al.*: Endogenous hepatocyte growth factor attenuates inflammatory response in glycerol-induced acute kidney injury. *Am J Nephrol* 2009; **29**:283-291.
 33. Homsí E, Ribeiro-Alves MA, Lopes de Faria JB, *et al.*: Interleukin-6 stimulates tubular regeneration in rats with glycerol-induced acute renal failure. *Nephron* 2002; **92**:192-199.
 34. Franquesa M, Alperovich G, Herrero-Fresneda I, *et al.*: Direct electrotransfer of hHGF gene into kidney ameliorates ischemic acute renal failure. *Gene Ther* 2005; **12**:1551-1558.
 35. Leonard MO, Cottell DC, Godson C, *et al.*: The role of HIF-1 alpha in transcriptional regulation of the proximal tubular epithelial cell response to hypoxia. *J Biol Chem* 2003; **278**:40296-40304.
 36. Sun S, Ning X, Zhang Y, *et al.*: Hypoxia-inducible factor-1alpha induces Twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition. *Kidney Int* 2009; **75**:1278-1287.

Faguer et al. *HNF1B* and hypoxia

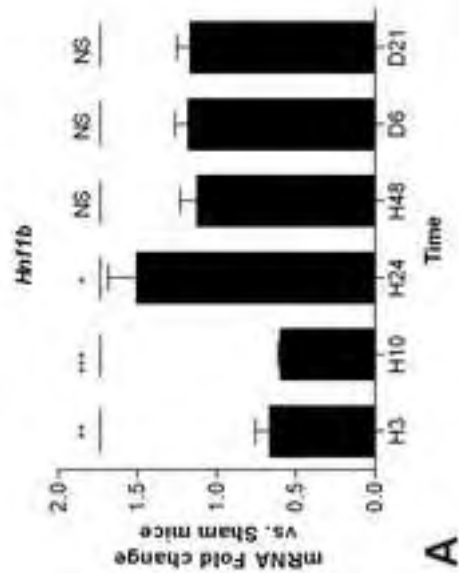
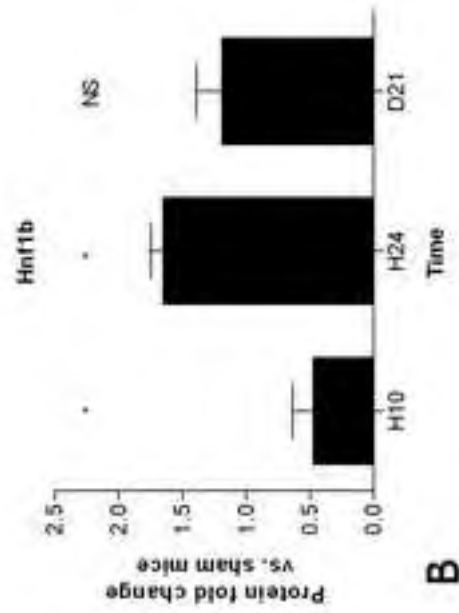
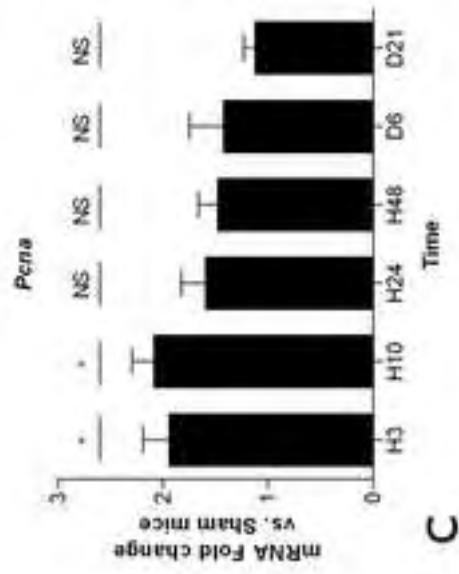
Figure 1: Sequential whole-kidney expression of *Hnf1b*, and *Pena* after hemorrhagic shock. A, C, Sequential whole-kidney expression of *Hnf1b* and *Pena* normalized to *Gapdh* mRNA amount at 3 hrs, 10 hrs, 24 hrs, 48 hrs, 6 days and 21 days (H3, H10, H24, H48, D6 and D21, respectively) after hemorrhagic shock. B, whole-kidney expression of Hnf-1 β (protein) normalized to Beta-Actin amount at 10 hrs, 24 hrs and 21 days after hemorrhagic shock. Data are shown as ratio of mRNA or protein expression between shock and sham mice. * P < 0.05, ** P < 0.01; shock (n=5) vs. sham (n=4); NS, not significant.

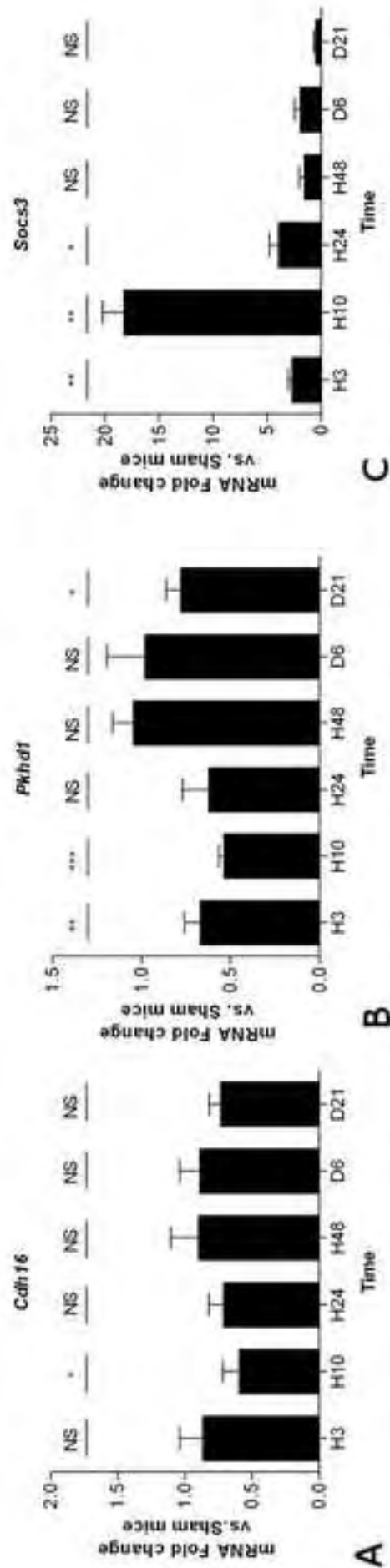
Figure 2: Sequential whole-kidney expression of *Cdh16*, *Pkhd1* and *Socs3* after hemorrhagic shock. Relative mRNA expression of *Cdh16* (A), *Pkhd1* (B) and *Socs3* (C) at 3 hrs, 10 hrs, 24 hrs, 48 hrs, 6 days and 21 days (H3, H10, H24, H48, D6 and D21, respectively) normalized to *Gapdh* mRNA. Data are shown as ratio of mRNA (or protein) expression between shock and sham mice * P < 0.05, ** P < 0.01; shock (n=5) vs. sham (n=4); NS, not significant.

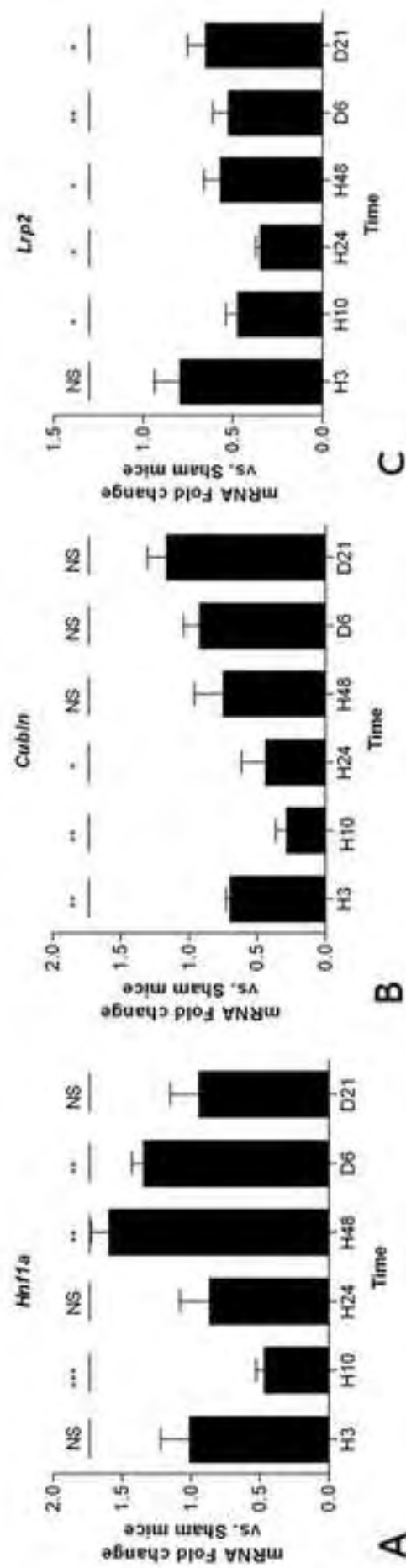
Figure 3: Sequential whole-kidney expression of *Hnf1a* and the *Lrp2* and *Cubln* megalin-cubilin endocytic complex after hemorrhagic shock. Relative mRNA expression of *Hnf1a*, *Lrp2* and *Cubln* at 3 hrs, 10 hrs, 24 hrs, 48 hrs, 6 days and 21 days (H3, H10, H24, H48, D6 and D21, respectively) normalized to *Gapdh* mRNA. Data are shown as ratio of mRNA expression between shock and sham mice. * P < 0.05, ** P < 0.01; shock (n=5) vs. sham (n=4); NS, not significant.

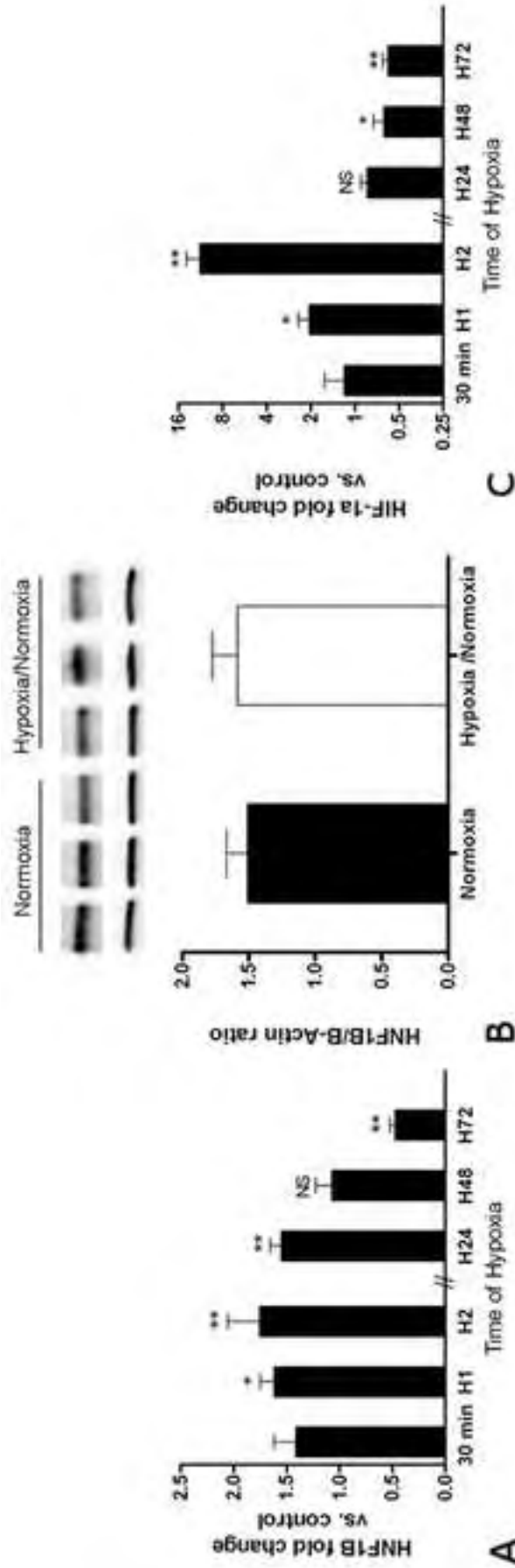
Figure 4: Expression of Hnf-1 β and Hif-1 α in HK-2 cells under hypoxic conditions. Relative protein expression of Hnf-1 β (A) and Hif-1 α (B) after 30 min, 1hr, 2 hrs, 24 hrs, 48 hrs or 72 hrs of hypoxia. Protein expression was normalized to Beta-actin. Data are shown as ratio of protein expression between cells grown under normoxic (n=6) or hypoxic condition (n=6). Relative expression of Hnf-1 β after 2 hours of hypoxia followed by 24 hours of normoxia. * P < 0.05, ** P < 0.01; NS, not significant.

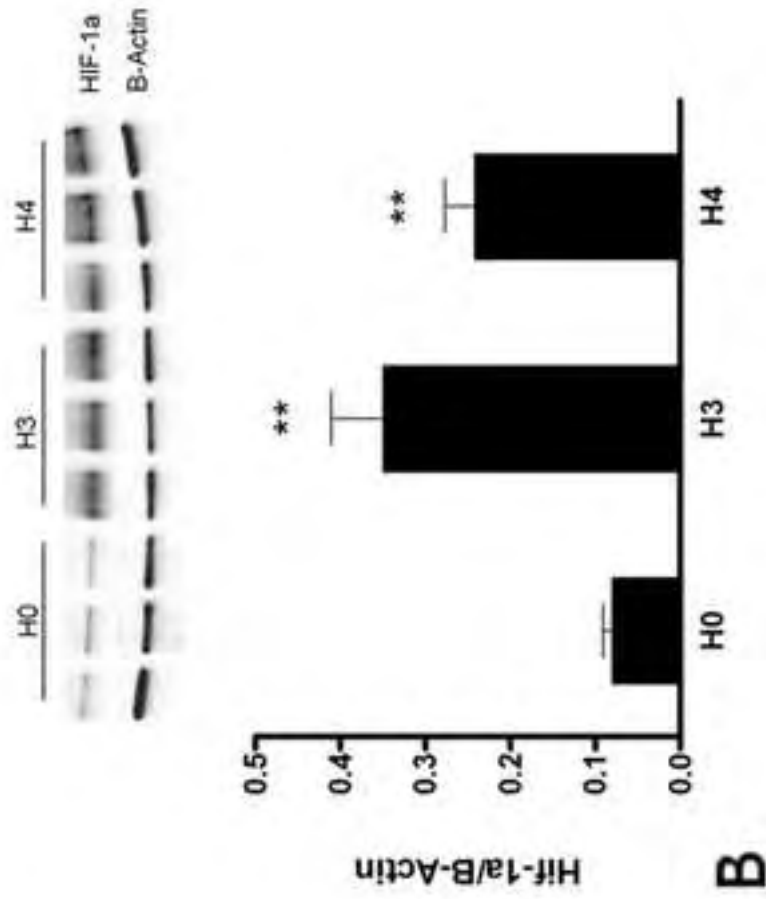
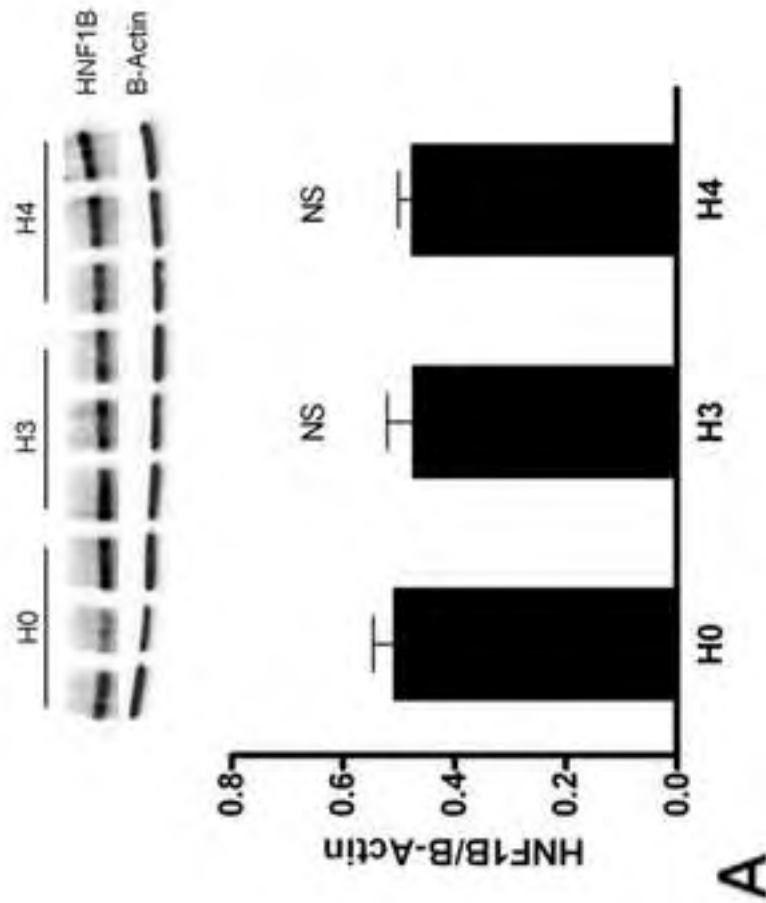
Figure 5: Expression of Hnf-1 β and Hif-1 α in HK-2 cells incubated with Hif-1 α -specific prolyhydroxylase inhibitor. Relative protein expression of Hnf-1 β (A) and Hif-1 α (B) after 3 and 4 hours of exposure to Hif-1 α specific proly hydroxylase inhibitor. Protein expressions were normalized to Beta-actin (n=6). ** P < 0.01; NS, not significant.











Plumbing the depths of blood pressure: Hypotensive hemorrhage and acute kidney injury*

An abrupt decline in kidney function, now termed acute kidney injury (AKI), occurs commonly in hospitalized patients (1, 2). Even mild forms of AKI are independently associated with significant morbidity and mortality, and more severe forms are associated with mortality in excess of 50% (1, 2). Despite advances in the care of seriously ill patients, outcomes associated with AKI have not significantly improved over several decades.

AKI is usually diagnosed when either an increase in serum creatinine concentration (which is an insensitive and time-delayed marker for AKI) or a decrease in urine output (which often does not accompany AKI) is observed (3, 4). Thus, diagnosis of AKI is usually delayed until after a substantial reduction in kidney function, and perhaps nonreversible renal cellular damage, has been initiated. Also, despite many studies, there is currently no specific treatment that has been shown to either attenuate the severity or speed recovery from AKI. The complex and dynamic nature of the clinical setting in which clinical AKI is encountered often renders conduct and interpretation of clinical studies difficult. Finally, many of the animal models developed for study of AKI may not be relevant (5). Collectively, these observations demonstrate a need for better models with which to study AKI, potentially leading to earlier diagnosis and tailored interventions that attenuate AKI.

Renal ischemia occurs in several settings, including hemorrhagic hypotension, and is one of the most common factors predisposing to AKI. Pioneering whole-animal work by Henrich et al (6, 7), published more than 3 decades ago,

delineated a delicate interplay between neurohumoral factors to acutely regulate renal blood flow and glomerular filtration rate in response to hemorrhage. Removal of vasodilatory eicosanoids (which enhance renal blood flow) and angiotensin II (which increases glomerular capillary hydrostatic pressure by constricting the efferent arteriole), and the presence of intact renal adrenergic neural pathways (which decrease renal blood flow), markedly enhance the effect of hemorrhage to induce renal ischemia and decrease glomerular filtration rate. These observations provided a physiologic explanation for the now well-known effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and drugs that impair angiotensin II formation and action to induce AKI in hemodynamically compromised states.

In this issue of *Critical Care Medicine*, Mayeur and colleagues (8) extend our insights into kidney responses to ischemia by providing a comprehensive short- and longer-term evaluation of the functional and morphologic response of the mouse kidney to hemorrhagic hypotension. This study is of interest because AKI occurring in the context of hypotension may more closely mimic clinical AKI than widely used models, such as warm ischemia-reperfusion induced by short-term renal artery occlusion. It is likely that the multiorgan hypoperfusion that occurs with hypotension induces systemic responses that contribute to altered function of several organs, including the kidney. Also, the multiple genetic alterations that are possible to induce in mice provide a potentially rich opportunity to analyze the pathogenetic role of several pathways in AKI.

Mayeur et al demonstrate a time-dependent effect of controlled hypotension to induce increasing degrees of AKI. The AKI is characterized by decreased glomerular filtration rate, impaired tubular resorption of sodium and water, and the presence of tubular lesions that are most marked in the outer medulla and cortex. Mayeur et al also find an increase

in kidney injury molecule-1 and hypoxia-inducible factor-1 α mRNA, beginning shortly after induction of hypotension and persisting for up to 6 days. The renal functional and histologic abnormalities are maximal 2–6 days after the induction of hypotension and much less prominent 21 days later. However, impaired renal tubular sodium resorption and mild peritubular fibrosis are observed 21 days following induction of AKI. The finding of mild fibrosis several days after development of AKI is of note with regard to increasing reports of lack of complete recovery from AKI in selected cases (9). Collectively, these results suggest that the model described by Mayeur and others share many characteristics with clinical AKI.

The hope is that with further study, relevant animal models, such as that characterized by Mayeur et al, will be utilized to provide pathogenetic insights leading to prevention, earlier diagnosis, and attenuation of AKI. While awaiting real-time methods to diagnose and more specific pathophysiologic-based methods to attenuate AKI, the prudent clinician will use tested prophylactic methods to protect the kidneys in response to exposure to potential nephrotoxins, and will identify patients at high risk for development of AKI and monitor renal function closely in these patients (1, 2).

Robert J. Anderson, MD

Clinical Professor of Medicine
Department of Medicine
New York University Medical
Center
New York, NY

REFERENCES

1. Waiker SS, Liu KD, Chertow GM: Diagnosis, epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3:844–861
2. Dennen P, Douglas IS, Anderson R: Acute kidney injury in the intensive care unit: An update and primer for the intensivist. *Crit Care Med* 2010; 38:261–275
3. Ricci Z, Cruz DN, Ronco C: Classification and staging of acute kidney injury: Beyond the

*See also p. 2131.

Key Words: acute kidney injury; hemorrhage; hemorrhagic shock; hypotensive hemorrhage

The author has not disclosed any potential conflicts of interest.

Copyright © 2011 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/CCM.0b013e3182217465

Annexe n°3

- RIFLE and AKIN criteria. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7:201–208
4. Kellum JA: Acute kidney injury. *Crit Care Med* 2008; 36:S141–S145
 5. Lieberthal W, Nigam SK: Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: Imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278:F1–F12
 6. Henrich WL, Anderson RJ, Berns AS, et al: The role of renal nerves and prostaglandins in control of renal hemodynamics and plasma renin activity during hypotensive hemorrhage in the dog. *J Clin Invest* 1978; 61:744–750
 7. Henrich WL, Berl T, McDonald KM, et al: Angiotensin II, renal nerves, and prostaglandins in renal hemodynamics during hemorrhage. *Am J Physiol* 1978; 235:F46–F51
 8. Mayeur N, Minville V, Jaafar A, et al: Morphologic and functional renal impact of acute kidney injury after prolonged hemorrhagic shock in mice. *Crit Care Med* 2011; 39: 2131–2138
 9. Joanidis M, Philipp GH: Long-term outcome of acute kidney injury. *In: Management of Acute Kidney Problems*, Jörres A, Ronco C, Kellum JA Jr (Eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, pp 260–278

Critical Care 2010, **14**(Suppl 1):P522 doi:10.1186/cc8754

Title: Pressure controlled hemorrhagic shock in mice : a new model of AKI.

Introduction: Present time mice models failed to reproduce human acute kidney injury (AKI) and new relevant models of AKI are required [1]. In this study we developed a model of AKI in mice based on pressure controlled hemorrhagic shock that closely reproduce hypotension involved in most of human ischemic AKI.

Methods: We determined at first shock and resuscitation modalities in a C57/Bl6 mice population. Femoral arterial catheter was used for pressure control and bleeding and central jugular catheterism for anesthesia and resuscitation. We secondly explored renal repercussions of a two hours shock duration at 35 mmHg of mean arterial pressure. We assessed successively glomerular filtration rate (GFR), histological kidney injury score and performed real time PCR after procedure. Shock group was compared to sham mice and to a control group which underwent no procedure (n=5 in each group)

Results: Shock group GFR was decreased 2 (D2) and 6 (D6) days after shock when compared to control and sham (Figure 1). This AKI was intrinsic as showed by the Na/K urinary ratio increase and the decrease in urine concentration ability. Tissular damages prevailed in the outer medulla with a maximal expression at D6 (paucicellular tubular epithelium, intratubular casts) (Figure 2). These lesions are associated with an increase of tissular KIM-1 and HIFs mRNA. Despite GFR normalization, shock group showed discreet defect in urine concentration ability and a slight peritubular fibrosis 3 weeks after shock.

Conclusions: This new model of AKI based on hypotension opens new perspectives in the field of short and long term kidney function following AKI.

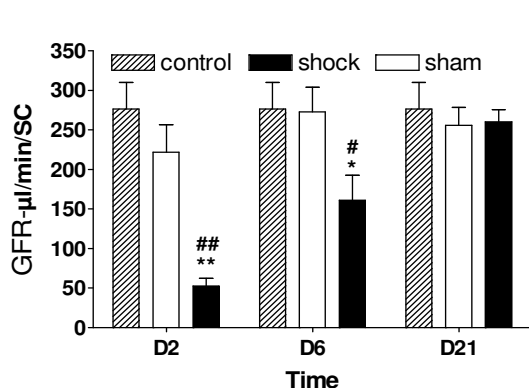


Figure 1: Glomerular filtration rate 2 (D2), 6 (D6) and 21 (D21) days after hemorrhagic shock. *p<0.05 and ** p< 0.01 vs sham; #p<0.05and ##p<0.01 vs control

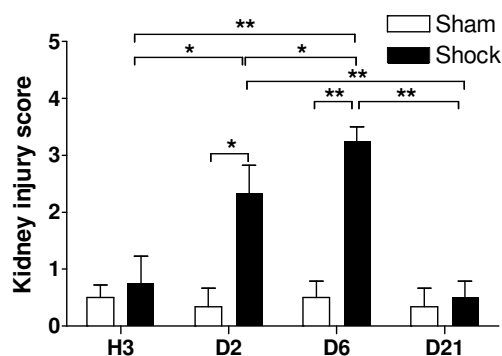


Figure 2: Tubular injury score at H3, D2, D6 and D21. *p<0.05 and ** p< 0.01 vs sham.

- Rosen, S. and I.E. Stillman, Acute Tubular Necrosis Is a Syndrome of Physiologic and Pathologic Dissociation. *J Am Soc Nephrol*, 2008.

SP371-Elaboration d'un modèle murin d'insuffisance rénale aiguë par choc hémorragique contrôlé

N. MAYEUR (1,2); V. MINVILLE (1,2); T. AL SAATI (3); J. ALLARD (2); I. TACK (2)

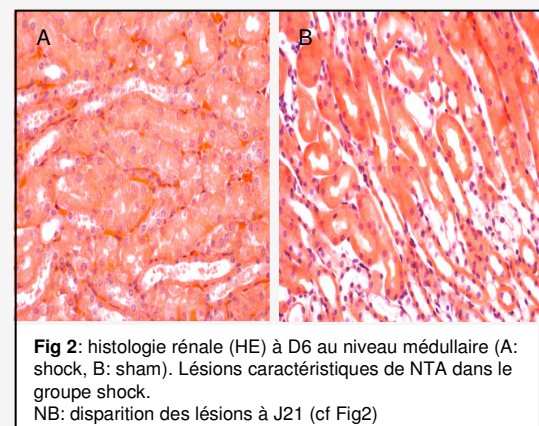
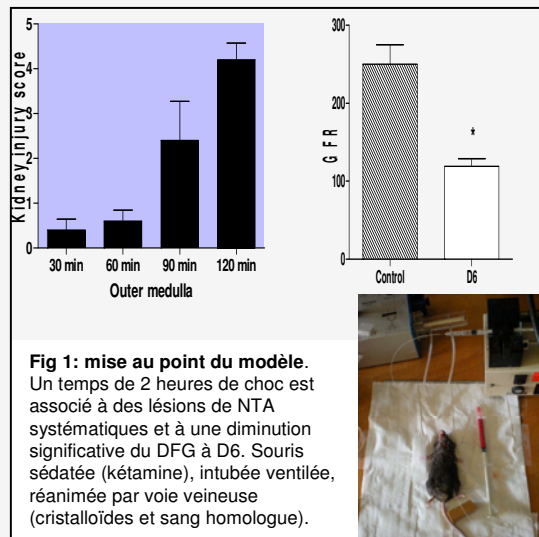
(1) Département d'anesthésie réanimation, GRCB 48 - Toulouse (2) Unité Inserm 858, équipe 5 Rangueil - Toulouse (3) Unité Inserm 563 Purpan - Toulouse

Introduction

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est un marqueur indépendant de surmortalité dans de nombreuses pathologies médico-chirurgicales. L'absence d'efficacité chez l'Homme des thérapeutiques pourtant testées avec succès chez l'animal pourrait être liée aux carences des modèles expérimentaux de nécrose tubulaire aiguë (NTA). Ces modèles (clampage artère rénale, dose massive de drogues tubulo-toxiques) proposent une approche caricaturale de l'IRA qui prévient tout mécanisme physiologique d'adaptation [1]. L'émergence récente de données soulignant les conséquences délétères à long terme de la NTA impose l'élaboration de nouveaux modèles mimant au mieux la physiopathologie humaine. L'hypotension artérielle, cause fréquente d'IRA chez l'humain, est un mécanisme physiopathologique de NTA jamais modélisé avec succès chez la souris [2].

Objectif

- 1) élaborer un nouveau modèle d'insuffisance rénale aiguë par choc hémorragique à pression contrôlée chez la souris.
- 2) évaluer la cinétique du retentissement histologique, fonctionnel et moléculaire rénal de ce modèle.



Matériel et méthodes

Souris:

souris C57/Bl6; âge 24-30 semaine (n=5 dans chaque groupe).

Groupes expérimentaux:

shock: sacrifice à 3, 12 heures et 1, 2, 6 et 21 jours après le choc (H3, H12, D1, D2, D6 et D21 respectivement)

Sham: sacrifice aux mêmes temps après l'ensemble de la procédure sauf le choc

Control: population identique n'ayant subi aucune procédure

Mesures:

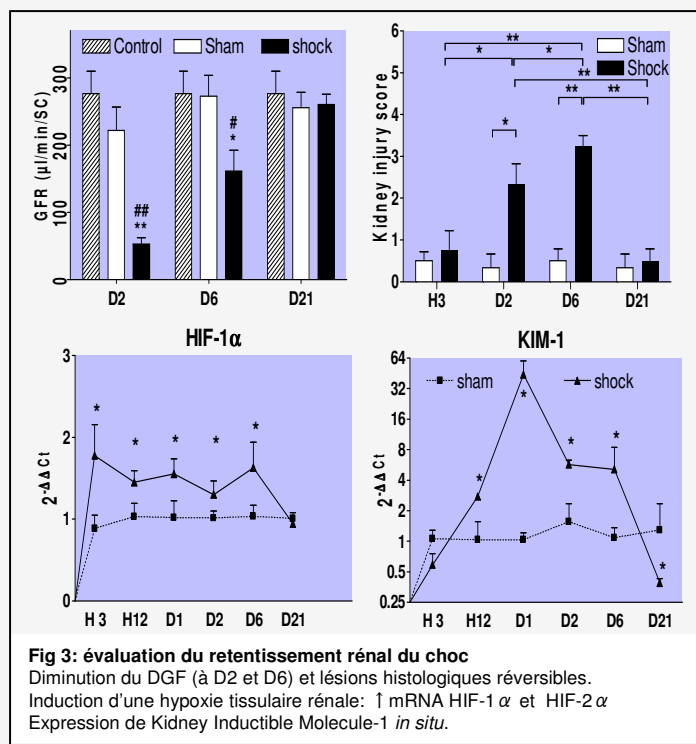
Clearance de l'inuline à D2, D6 et D21

Real time PCR pour KIM-1 et HIF-1 α à chaque temps

Score histologique à H3, D2, D6 et D21.

Analyse statistique:

friedman non parametric test pour les valeurs répétées. Dunn's Multiple Comparison test.



Conclusion: Nous décrivons ici le premier modèle d'IRA par hypotension artérielle systémique chez la souris. Ce nouveau modèle possède un impact fonctionnel, histologique et moléculaire rénal proche de celui observé chez l'humain. Il ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'IRA et son pronostic à long terme.

P043 - Type 2 diabetes mellitus in mice worsens renal impact following hemorrhagic shock

N. MAYEUR (1,2); V. DUPUY (2); M. BULEON (3); A. JAAFAR (1); M. VALLET; V. MINVILLE (2); I. TACK (1,3).

(1) Service des explorations fonctionnelles physiologiques, CHU Rangueil, UPS Toulouse III. (2) Département d'anesthésie réanimation, CHU Rangueil, Toulouse (3) Faculté de médecine Rangueil, UPS Toulouse III

Introduction

The role of hypoxia in the development of diabetic CKD appears critical and is increasingly studied (2). The purpose of this study was to determine if type 2 diabetic mice would present a severer renal impact following a hemorrhagic shock (HS) based on a recently described model of acute kidney injury (1) and to describe the impact of HS on renal response to hypoxia.

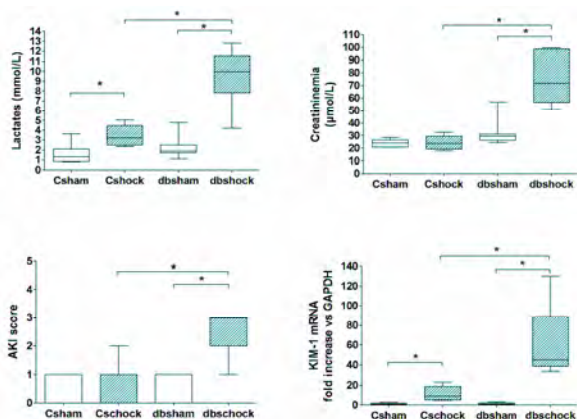


Figure 1 (A) H6 Lactates in dbshock and Cshock and their respective shams. (B) H6 Creatininemia (C) Renal medulla acute kidney injury score. (D) Kidney inducible molecule 1 (KIM-1) mRNA.

Diabetic shocked mice exhibit severer renal and systemic impact following HS

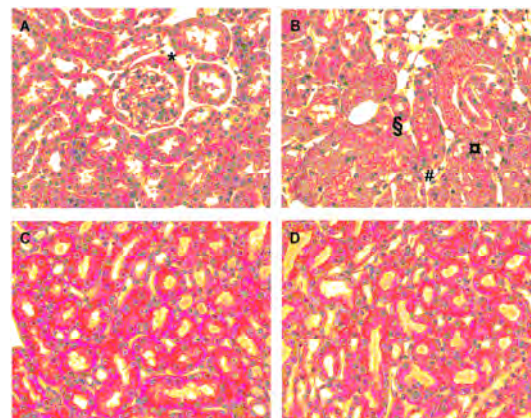


Figure 2 : Haematoxylin eosin coloration of kidney sections (X400) of (A) dbshock, (B) dbshock, (C) Csham and (D) Cshock mice.

* mesangial proliferation, § intratubular casts, # cell vacuolisations, □ desepithelialisation

Diabetic shocked mice present also a severer tubular impact

Methods

We performed HS or sham procedure in type 2 diabetic obese db/db mice and control mice (n=7). Creatininemia, histologic injury score and KIM-1 mRNA were used to study renal impact of HS. Tissue hypoxia and its impact were quantified by pimonidazole immunostaining and mRNA quantification of HIF-1 α , VEGF-R1, VEGFR-2, Tie-2, eNOs and iNOS.

Results

- The early increase (H6) in creatininemia and histological findings underline the intensity of AKI in diabetic mice.
- Diabetic shocked mice exhibited overexpression of KIM-1 when compared to control.
- Diabetic mice exhibiting a mild diabetic nephropathy already express hypoxic signals at baseline.
- In diabetic shocked mice, hypoxia is severer than in Cshock, as illustrated by the increase in blood lactates, pimonidazole staining (not shown) and HIF-1 α quantification.

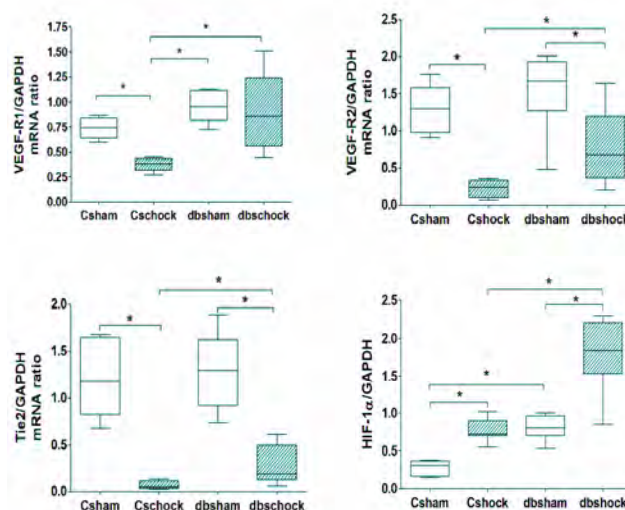


Figure 3 : mRNA quantification by Rt-PCR of VEGF-R1, VEGF-R2, Tie 2 and HIF-1 α . * p<0.02 Mann Whitey test.

Diabetic shocked mice present both prerequisite hypoxia and altered response to hypoxia after HS.

Conclusions Our work confirms hypoxic impact of diabetes mellitus in the diabetic mice kidney, even in the absence of any acute injury. Renal impact of a HS in type 2 diabetic mice is more intense than in non diabetic. Prerequisite hypoxia during diabetes could result in a renal preconditioning that modifies endothelial and tissular response to AKI.

TABLES DES MATIERES, FIGURES ET TABLEAUX

A. Table générale

SOMMAIRE/ LISTE DES ABREVIATIONS	5
---	----------

PREAMBULE : Modéliser l'agression rénale aiguë, facteur d'entrée dans la maladie rénale chronique	9
--	----------

I. L'ETAT DE CHOC	13
--------------------------------	-----------

A. Définitions et classification des états de choc	13
---	-----------

1. Définitions de l'état de choc	13
2. Classification des états de choc	13
(1) Le choc hypovolémique.....	13
(2) Le choc cardiogénique.....	14
(3) Le choc distributif.....	14
(4) Le choc obstructif.....	15
3. Perpétuation de l'état de choc	16

B. Particularités du choc hémorragique	17
---	-----------

1. Données générales chez l'Homme	17
2. Le choc hémorragique est un choc hypovolémique	18
a) Définition de la volémie	18
(1) L'hypovolémie	18
(2) L'hypervolémie	19
(3) L'euvolémie.....	19
b) Les différents modèles de choc hémorragique	20
(1) Modèle à pression contrôlée	21
(2) Modèle à volume contrôlé	21
(3) Modèle à saignement incontrôlé.....	21
c) Impact hémodynamique de la spoliation sanguine.....	22
(1) Réponse neuro-hormonale :	22
(2) Réponse hémodynamique systémique : différentes phases	23
d) L'anesthésie modifie la réponse hémodynamique à l'hypotension	27
e) Oxygène et choc	28
(1) Choc et désordres métaboliques	28
(2) Notion de dette en oxygène	28
f) Physiopathologie du choc incontrôlé et de la défaillance multi-organique	29
(1) Généralités physiopathologiques	29
(2) Impact sur la microcirculation, la coagulation, l'inflammation et l'immunité	30
(3) Rôle du territoire hépato-splanchnique.....	30
(4) Impact cardio circulatoire.....	31
(5) La DMO : un mécanisme adaptatif ?.....	32
3. Généralités sur la thérapeutique	32

II. L'INSUFFISANCE RENALE AIGUE EN REANIMATION	35
---	-----------

A. Définition de l'IRA, la vision de la réanimation	35
--	-----------

1. Un florilège de définitions	35
2. Place des biomarqueurs.....	36
3. Epidémiologie de l'IRA en réanimation	37
4. Le nouveau défi de l'IRA : son impact à long terme	39
a) L'IRA est elle un facteur de risque d'insuffisance rénale chronique ?.....	40
(1) Arguments épidémiologiques généraux associant l'IRA à l'apparition d'une maladie rénale chronique et à la mortalité.....	40

(2) Relation entre l' intensité de l' IRA et l'apparition de l'IRC.....	41
(3) Relation entre la durée et la fréquence de l'IRA et l'apparition de l'IRC	41
(4) Limites de cette hypothèse	42
b) L'IRA : un facteur de progression de l'IRC	43
(1) L'IRC est elle un facteur de risque d'IRA ?	43
(2) L'IRA induit elle une aggravation de l'IRC ?	44
B. Physiopathologie de l'IRA : une vision métabolique.....	45
1. Données physiologiques hémodynamiques rénales	46
a) Réflexe local myogène	47
b) Rétrocontrôle tubulo-glomérulaire	48
c) Autres mécanismes de régulation.....	48
(1) Régulation nerveuse	48
(2) Régulation paracrine et endocrine du DFG.	49
2. Physiopathologie : IRA et hémodynamique rénale.....	49
3. Concept de lésions « subléthales ».....	50
4. Hypothèse physiopathologique de la progression de l'IRA vers la MRC.....	51
a) Réduction néphronique	51
b) La fibrose tubulo-interstitielle	51
(1) Relation entre la fibrose interstitielle et la diminution DFG.....	52
(2) Origine de la fibrose tubulo-interstitielle.....	52
5. Hypoxie et IRC	53
a) Mécanismes physiopathologiques de l'hypoxie au cours de l'IRC.....	54
(1) Perte des capillaires péri-tubulaires et fibrose	54
(2) L'impact glomérulaire favorise l'hypoxie tubulo-interstitielle.....	54
(3) Anomalies de la vasomotricité rénale.....	54
(4) Rôle du stress oxydant et de la respiration cellulaire.....	55
(5) Rôle de l'anémie.....	55
b) Hypoxie chronique et fibrose	56
(1) Données physiopathologiques	56
(2) Données thérapeutiques sur le ciblage du gène Hypoxic Inducible Factor	57
III. MODELES MURINS D'INSUFFISANCE RENALE AIGUE	59
A. Les différents modèles.....	59
1. Modèles par clampage du pédicule rénal	59
a) Caractéristiques générales	59
b) Faiblesses du modèle.....	60
(1) Défaut de modélisation de l'hypoxie et de sa tolérance	60
(2) Absence d'équivalence thermique.....	61
(3) Différences histologiques	61
(4) L'ischémie totale empêche les interactions systémiques.....	61
(5) Lésions microcirculatoires.....	62
(6) Conséquence des ces disparités physiopathologiques sur les essais thérapeutiques.....	62
2. Modèles toxiques	63
a) Les modèles de néphrotoxicité.....	63
b) Le modèle de rhabdomyolyse.....	63
3. Particularités du modèle de choc septique.	64
4. Modèles intracellulaires et <i>ex vivo</i>	64
a) Modèles <i>in vitro</i>	64
b) Modèles <i>ex vivo</i>	65
5. Autres modèles.....	65
a) Modèles par néphrectomie	65
b) Modèle d'ischémie reperfusion par arrêt cardiaque	65
c) Modèles transgéniques	66
B. Modélisation par hypotension.....	67
1. Modèle du choc hémorragique.....	67
a) Modélisation de l'ARA par choc hémorragique chez le muridé	67
(1) Quarante ans de doute	67
(2) Premières preuves.....	68

C.	Travail personnel.....	68
IV.	APPLICATION DU MODELE A UNE POPULATION PARTICULIERE	83
A.	Rappels généraux sur le diabète.....	83
B.	Physiopathologie de la néphropathie diabétique.....	84
1.	Une complication hémodynamique.....	84
2.	Rôle de l'hyperglycémie et des produits avancés de glycation	85
3.	Rôle du stress oxydant	85
4.	Implication des facteurs de croissance.....	86
C.	Hypoxie et progression de maladie rénale diabétique.....	86
1.	Origine de l'hypoxie rénale au cours du diabète : rôle du stress oxydant et de l'inflammation.....	87
2.	Augmentation de la consommation en oxygène.....	87
a)	Découplage mitochondrial	87
b)	Activité métabolique de la BALH.....	88
c)	Autres facteurs	88
D.	Modélisation diabétique chez la souris.....	90
1.	Différents modèles de diabète	90
2.	Modèle db/db	91
3.	Données contradictoires des conséquences du diabète sur l'impact d'une IRA.....	92
E.	Travail personnel.....	93
V.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	103
VI.	ANNEXES	107
A.	Note technique : validation d'un marqueur d'estimation du DGF chez la souris.....	107
1.	Généralités chez l'humain : mesure et estimation du DFG, place de la cystatine C	107
a)	Mesure et estimation du DFG chez l'humain : généralités	107
b)	Intérêt de la cystatine C.....	108
(1)	Cystatine C : rappel physiologique et intérêt pour estimer le DFG chez l'humain	108
(2)	Intérêt de la cystatine C plasmatique dans l'IRA	110
(3)	Intérêt de la cystatine C urinaire comme marqueur de lésion tubulaire	111
c)	Dosage de la cystatine C	112
2.	Etats des lieux de la cystatine C comme marqueur d'estimation du DFG chez la souris.....	113
a)	Limites des marqueurs et techniques actuelles.....	113
(1)	Place des marqueurs d'estimation historique du DFG	113
(2)	Techniques de mesure du DFG	114
b)	Cystatine C et souris : que savons-nous ?	115
3.	Travail personnel.....	116
B.	Autres annexes.....	129
	TABLES DES MATIERES, FIGURES ET TABLEAUX.....	155
A.	Table générale.....	155
B.	Table des figures.....	158
C.	Table des tableaux.....	158
	BIBLIOGRAPHIE.....	159

B. Table des figures

FIGURE 1: VARIATIONS DU DEBIT CARDIAQUE EN FONCTION DE SA PRESSION DE REMPLISSAGE.....	20
FIGURE 2: SCHEMATISATION DES VARIATIONS HEMODYNAMIQUES DANS LES DEUX MODELES LES PLUS UTILISES DE CHOC HEMORRAGIQUE CONTROLE.....	26
FIGURE 3 : VASODILATATION PROGRESSIVE AU COURS DE L'ETAT DE CHOC.....	31
FIGURE 4 : CLASSIFICATIONS RIFLE ET AKIN	37
FIGURE 5 : MORTALITE DES PATIENTS EN FONCTION DE LA CLASSIFICATION RIFLE.....	39
FIGURE 6 : EVOLUTION NATURELLE DE L'IRA SELON OKUSA ET AL. ¹⁴³	45
FIGURE 7 : SCHEMATISATION DE LA VASCULARISATION RENALE.....	47
FIGURE 8 : SCHEMA INTEGRATIF EXPLIQUANT LE LIEN ENTRE L'HYPOXIE, LA FIBROSE INTERSTITIELLE ET L'ATROPHIE TUBULAIRE AU COURS DE L'IRC.....	58
FIGURE 9 : INTERETS ET INCONVENIENTS RESPECTIFS DES DIFFERENTS MODELES D'IRA DISPONIBLES EN EXPERIMENTATION ANIMALE OU <i>IN VITRO</i> ³⁰⁵	66
FIGURE 10 : CONSEQUENCES DES EPISODES SUCCESSIFS D'IRA SUR LA SURVIE DU PATIENT DIABETIQUE ¹³¹	84
FIGURE 11 : ORIGINE DE L'HYPOXIE DANS LA NEPHROPATHIE DIABETIQUE.....	89
FIGURE 12 : SOURIS DB/DB CHOQUEE.....	94
FIGURE 13 : FORMULE MOLECULAIRE DE LA CYSTATINE C.....	109

C. Table des tableaux

TABLEAU 1 : PRINCIPAUX TYPES DE CHOC SELON WEIL ²	16
TABLEAU 2 : CRITERES DE BRADFORD HILL.....	43
TABLEAU 3 : MODELES MURINS DE DIABETE.....	90

BIBLIOGRAPHIE

1. Lancelleur A CA, Dhainaut JF. *Etats de choc*. Paris: Masson; 2009.
2. Weil MH, Henning RJ. New concepts in the diagnosis and fluid treatment of circulatory shock. Thirteenth annual Becton, Dickinson and Company Oscar Schwidetsky Memorial Lecture. *Anesth Analg*. 1979 Mar-Apr;58(2):124-32.
3. Traverso LW, Moore CC, Tillman FJ. A clinically applicable exsanguination shock model in swine. *Circ Shock*. 1984;12(1):1-7.
4. Topalian S, Ginsberg F, Parrillo JE. Cardiogenic shock. *Crit Care Med*. 2008 Jan;36(1 Suppl):S66-74.
5. Elbers PW, Ince C. Mechanisms of critical illness--classifying microcirculatory flow abnormalities in distributive shock. *Crit Care*. 2006;10(4):221.
6. Bodson L, Bouferrache K, Vieillard-Baron A. Cardiac tamponade. *Curr Opin Crit Care*. 2011 Oct;17(5):416-24.
7. Lee L, Kavinsky CJ, Spies C. Massive pulmonary embolism: review of management strategies with a focus on catheter-based techniques. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010 Jun;8(6):863-73.
8. Booher AM, Eagle KA. Diagnosis and management issues in thoracic aortic aneurysm. *Am Heart J*. 2011 Jul;162(1):38-46 e1.
9. Reynolds HR, Hochman JS. Cardiogenic shock: current concepts and improving outcomes. *Circulation*. 2008 Feb 5;117(5):686-97.
10. Brown SG. The pathophysiology of shock in anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007 May;27(2):165-75, v.
11. Angele MK, Schneider CP, Chaudry IH. Bench-to-bedside review: latest results in hemorrhagic shock. *Crit Care*. 2008;12(4):218.
12. Mees ST, Gwinner M, Marx K, Faendrich F, Schroeder J, Haier J, et al. Influence of sex and age on morphological organ damage after hemorrhagic shock. *Shock (Augusta, Ga)*. 2008 Jun;29(6):670-4.
13. Kauvar DS, Lefering R, Wade CE. Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. *J Trauma*. 2006 Jun;60(6 Suppl):S3-11.
14. Rossaint R, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernandez-Mondejar E, Gordini G, et al. Key issues in advanced bleeding care in trauma. *Shock*. 2006 Oct;26(4):322-31.
15. McMichael J. Practical Management of Wound Shock. *Br Med J*. 1942 Dec 5;2(4274):671-3.
16. Grant RT. Memorandum on the Observations Required in Cases of Wound Shock. *Br Med J*. 1941 Sep 6;2(4209):332-6.
17. Artz CP, Howard JM, Sako Y, Bronwell AW, Prentice T. Clinical experiences in the early management of the most severely injured battle casualties. *Ann Surg*. 1955 Mar;141(3):285-96.
18. Durham RM, Moran JJ, Mazuski JE, Shapiro MJ, Baue AE, Flint LM. Multiple organ failure in trauma patients. *The Journal of trauma*. 2003 Oct;55(4):608-16.
19. Patterson SW, Starling EH. On the mechanical factors which determine the output of the ventricles. *J Physiol*. 1914 Sep 8;48(5):357-79.
20. Cooke WH, Ryan KL, Convertino VA. Lower body negative pressure as a model to study progression to acute hemorrhagic shock in humans. *J Appl Physiol*. 2004 Apr;96(4):1249-61.
21. Pinsky MR. Functional hemodynamic monitoring. *Intensive Care Med*. 2002 Apr;28(4):386-8.
22. Bundgaard-Nielsen M, Sorensen H, Dalsgaard M, Rasmussen P, Secher NH. Relationship between stroke volume, cardiac output and filling of the heart during tilt. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 2009 Nov;53(10):1324-8.
23. van Lieshout JJ, Harms MP, Pott F, Jenstrup M, Secher NH. Stroke volume of the heart and thoracic fluid content during head-up and head-down tilt in humans. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005 Oct;49(9):1287-92.
24. Ejlersen E, Skak C, Moller K, Pott F, Secher N. Central cardiovascular responses to surgical incision at a maximal mixed venous oxygen saturation. *Transplant Proc*. 1995 Dec;27(6):3500.

25. Blalock A. Shock: further studies with particular reference to the effects of hemorrhage. 1934. *Arch Surg.* 2010 Apr;145(4):393-4.
26. Wiggers HC, Ingraham RC. Hemorrhagic Shock: Definition and Criteria for Its Diagnosis. *J Clin Invest.* 1946 Jan;25(1):30-6.
27. Crowell JW, Guyton AC. Evidence favoring a cardiac mechanism in irreversible hemorrhagic shock. *Am J Physiol.* 1961 Nov;201:893-6.
28. Fleisher GR, Templeton J, Delgado-Paredes C. An animal model for the study of hemorrhagic shock from abdominal trauma in children. *Pediatr Emerg Care.* 1987 Mar;3(1):18-21.
29. Mittmann U, Schmidt HD, Schmier J, Wirth RH. Hemorrhagic shock with fixed hypotension and with spontaneous recovery of blood pressure. A comparison of two shock models. *Basic Res Cardiol.* 1976 Jan-Feb;71(1):47-59.
30. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock.* 1998 Jan;9(1):1-11.
31. Secher NH, Jacobsen J, Friedman DB, Matzen S. Bradycardia during reversible hypovolaemic shock: associated neural reflex mechanisms and clinical implications. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1992 Nov;19(11):733-43.
32. Jacobsen J, Secher NH. Heart rate during haemorrhagic shock. *Clin Physiol.* 1992 Nov;12(6):659-66.
33. Shenkin HA CR, Govons SR, Hardy JD, Fletcher AG. On the diagnosis of hemorrhage in man. A study of volunteers bled large amounts. *Am J Med Sci.* 1944(208):421-36.
34. Kinsella SM, Tuckey JP. Perioperative bradycardia and asystole: relationship to vasovagal syncope and the Bezold-Jarisch reflex. *Br J Anaesth.* 2001 Jun;86(6):859-68.
35. Van Lieshout JJ SN. Orthostatic stress and autonomic dysfunction. In: Saltin B BR, Secher NH, Mitchell JH., editor. *Exercise and circulation in health and disease.* Champaign ed; 1999. p. 305-24.
36. Hoen S, Asehounne K, Brailly-Tabard S, Mazoit JX, Benhamou D, Moine P, et al. Cortisol response to corticotropin stimulation in trauma patients: influence of hemorrhagic shock. *Anesthesiology.* 2002 Oct;97(4):807-13.
37. Faden AI, Holaday JW. Opiate antagonists: a role in the treatment of hypovolemic shock. *Science.* 1979 Jul 20;205(4403):317-8.
38. Elam R, Bergmann F, Feuerstein G. The use of antiserotonergic agents for the treatment of acute hemorrhagic shock of cats. *Eur J Pharmacol.* 1985 Jan 2;107(2):275-8.
39. Remmers DE, Wang P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Testosterone receptor blockade after trauma-hemorrhage improves cardiac and hepatic functions in males. *Am J Physiol.* 1997 Dec;273(6 Pt 2):H2919-25.
40. Smail N, Catania RA, Wang P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Gut and liver: the organs responsible for increased nitric oxide production after trauma-hemorrhage and resuscitation. *Arch Surg.* 1998 Apr;133(4):399-405.
41. Scalia SV, Taheri PA, Force S, Ozmen V, Lui D, Fish J, et al. Mesenteric microcirculatory changes in nonlethal hemorrhagic shock: the role of resuscitation with balanced electrolyte or hypertonic saline/dextran. *J Trauma.* 1992 Aug;33(2):321-5.
42. Scannell G, Clark L, Waxman K. Regional flow during experimental hemorrhage and crystalloid resuscitation: persistence of low flow to the splanchnic organs. *Resuscitation.* 1992 Jun-Jul;23(3):217-25.
43. Scharf SM, Bark H, Einhorn S, Tarasiuk A. Blood flow to the canine diaphragm during hemorrhagic shock. *Am Rev Respir Dis.* 1986 Feb;133(2):205-11.
44. Horton JW, Poehlmann DS. Regional coronary blood flow in canine hemorrhagic shock. *Circ Shock.* 1987;23(4):271-83.
45. Schadt JC, Ludbrook J. Hemodynamic and neurohumoral responses to acute hypovolemia in conscious mammals. *Am J Physiol.* 1991 Feb;260(2 Pt 2):H305-18.
46. Schlichtig R, Kramer DJ, Pinsky MR. Flow redistribution during progressive hemorrhage is a determinant of critical O₂ delivery. *J Appl Physiol.* 1991 Jan;70(1):169-78.
47. Jarisch A. *Vagovasale Synkope.*; 1941.

48. Murray RH, Thompson LJ, Bowers JA, Albright CD. Hemodynamic effects of graded hypovolemia and vasodepressor syncope induced by lower body negative pressure. *Am Heart J.* 1968 Dec;76(6):799-811.
49. Matzen S, Perko G, Groth S, Friedman DB, Secher NH. Blood volume distribution during head-up tilt induced central hypovolaemia in man. *Clin Physiol.* 1991 Sep;11(5):411-22.
50. Sander-Jensen K, Secher NH, Bie P, Warberg J, Schwartz TW. Vagal slowing of the heart during haemorrhage: observations from 20 consecutive hypotensive patients. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1986 Feb 8;292(6517):364-6.
51. Barriot P, Riou B. Hemorrhagic shock with paradoxical bradycardia. *Intensive Care Med.* 1987;13(3):203-7.
52. Bond RF, Johnson G, 3rd. Vascular adrenergic interactions during hemorrhagic shock. *Fed Proc.* 1985 Feb;44(2):281-9.
53. Sander-Jensen K, Mehlsen J, Stadeager C, Christensen NJ, Fahrenkrug J, Schwartz TW, et al. Increase in vagal activity during hypotensive lower-body negative pressure in humans. *The American journal of physiology.* 1988 Jul;255(1 Pt 2):R149-56.
54. Kirkman E LR. Cardiovascular regulation during hypovolaemic shock-central integration. London: Edward Arnold; 1994.
55. Secher NH, Van Lieshout JJ. Heart rate during haemorrhage: time for reappraisal. *J Physiol.* 2010 Jan 1;588(Pt 1):19.
56. van Lieshout JJ, Wieling W, Karemaker JM, Eckberg DL. The vasovagal response. *Clin Sci (Lond).* 1991 Nov;81(5):575-86.
57. Murrell C, Cotter JD, George K, Shave R, Wilson L, Thomas K, et al. Influence of age on syncope following prolonged exercise: differential responses but similar orthostatic intolerance. *J Physiol.* 2009 Dec 15;587(Pt 24):5959-69.
58. O'Rourke MF, Nichols WW. Aortic diameter, aortic stiffness, and wave reflection increase with age and isolated systolic hypertension. *Hypertension.* 2005 Apr;45(4):652-8.
59. Constant I, Laude D, Elghozi JL, Murat I. Assessment of autonomic cardiovascular changes associated with recovery from anaesthesia in children: a study using spectral analysis of blood pressure and heart rate variability. *Paediatr Anaesth.* 2000;10(6):653-60.
60. Kato M, Komatsu T, Kimura T, Sugiyama F, Nakashima K, Shimada Y. Spectral analysis of heart rate variability during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology.* 1992 Oct;77(4):669-74.
61. Saeki Y, Hasegawa Y, Shibamoto T, Yamaguchi Y, Hayashi T, Tanaka S, et al. The effects of sevoflurane, enflurane, and isoflurane on baroreceptor-sympathetic reflex in rabbits. *Anesth Analg.* 1996 Feb;82(2):342-8.
62. Ebert TJ, Muzi M. Propofol and autonomic reflex function in humans. *Anesth Analg.* 1994 Feb;78(2):369-75.
63. Berdeaux A, Duranteau J, Pussard E, Edouard A, Giudicelli JF. Baroreflex control of regional vascular resistances during simulated orthostatism. *Kidney international.* 1992 Jun;37:S29-33.
64. Vatner SF, Braunwald E. Cardiovascular control mechanisms in the conscious state. *The New England journal of medicine.* 1975 Nov 6;293(19):970-6.
65. Ebert TJ, Muzi M, Berens R, Goff D, Kampine JP. Sympathetic responses to induction of anesthesia in humans with propofol or etomidate. *Anesthesiology.* 1992 May;76(5):725-33.
66. Russ AL, Haberstroh KM, Rundell AE. Experimental strategies to improve in vitro models of renal ischemia. *Exp Mol Pathol.* 2007 Oct;83(2):143-59.
67. Siegel JH. Through a glass darkly: the lung as a window to monitor oxygen consumption, energy metabolism, and severity of critical illness. *Clin Chem.* 1990 Aug;36(8 Pt 2):1585-93.
68. Shoemaker WC, Appel PL, Kram HB, Waxman K, Lee TS. Prospective trial of supranormal values of survivors as therapeutic goals in high-risk surgical patients. *Chest.* 1988 Dec;94(6):1176-86.
69. Crowell JW, Smith EE. Oxygen Deficit and Irreversible Hemorrhagic Shock. *Am J Physiol.* 1964 Feb;206:313-6.
70. Siegel JH, Rivkind AI, Dalal S, Goodarzi S. Early physiologic predictors of injury severity and death in blunt multiple trauma. *Arch Surg.* 1990 Apr;125(4):498-508.
71. Davis JW, Shackford SR, Mackersie RC, Hoyt DB. Base deficit as a guide to volume resuscitation. *J Trauma.* 1988 Oct;28(10):1464-7.

72. Shoemaker WC, Czer LS. Evaluation of the biologic importance of various hemodynamic and oxygen transport variables: which variables should be monitored in postoperative shock? *Crit Care Med.* 1979 Sep;7(9):424-31.
73. Surgeons ACo. American College of Surgeons: Shock; 1997.
74. Cairns CB. Rude unhinging of the machinery of life: metabolic approaches to hemorrhagic shock. *Curr Opin Crit Care.* 2001 Dec;7(6):437-43.
75. Barroso-Aranda J, Schmid-Schonbein GW, Zweifach BW, Engler RL. Granulocytes and no-reflow phenomenon in irreversible hemorrhagic shock. *Circ Res.* 1988 Aug;63(2):437-47.
76. Frith D, Cohen MJ, Brohi K. Animal models of trauma-induced coagulopathy. *Thromb Res.* 2012 May;129(5):551-6.
77. Schmand JF, Ayala A, Chaudry IH. Effects of trauma, duration of hypotension, and resuscitation regimen on cellular immunity after hemorrhagic shock. *Critical care medicine.* 1994 Jul;22(7):1076-83.
78. Ayala A, Ertel W, Chaudry IH. Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. *Shock.* 1996 Feb;5(2):79-90.
79. Foex BA. Bacterial translocation in hemorrhagic shock: Are we any wiser? *Crit Care Med.* 2005 May;33(5):1166-7.
80. Palizas F, Dubin A, Regueira T, Bruhn A, Knobel E, Lazzeri S, et al. Gastric tonometry versus cardiac index as resuscitation goals in septic shock: a multicenter, randomized, controlled trial. *Crit Care.* 2009;13(2):R44.
81. Calzia E, Radermacher P, Matejovic M. Splanchnic resuscitation revisited: combining hyperoxia and hypertonic saline during early goal-directed treatment. *Crit Care Med.* 2006 Nov;34(11):2858-60.
82. Poeze M, Takala J, Greve JW, Ramsay G. Pre-operative tonometry is predictive for mortality and morbidity in high-risk surgical patients. *Intensive Care Med.* 2000 Sep;26(9):1272-81.
83. Walley KR, Cooper DJ. Diastolic stiffness impairs left ventricular function during hypovolemic shock in pigs. *Am J Physiol.* 1991 Mar;260(3 Pt 2):H702-12.
84. Dalibon N, Schlumberger S, Saada M, Fischler M, Riou B. Haemodynamic assessment of hypovolaemia under general anaesthesia in pigs submitted to graded haemorrhage and retransfusion. *Br J Anaesth.* 1999 Jan;82(1):97-103.
85. Voelckel WG, Wenzel V. Managing hemorrhagic shock: fluids on the way out--drugs on the way in? *Crit Care Med.* 2003 Oct;31(10):2552-3.
86. Mongardon N, Dyson A, Singer M. Is MOF an outcome parameter or a transient, adaptive state in critical illness? *Curr Opin Crit Care.* 2009 Oct;15(5):431-6.
87. Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet.* 2004 Aug 7-13;364(9433):545-8.
88. Kreymann G, Grosser S, Buggisch P, Gottschall C, Matthaei S, Greten H. Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock. *Crit Care Med.* 1993 Jul;21(7):1012-9.
89. Boekstegers P, Weidenhofer S, Pilz G, Werdan K. Peripheral oxygen availability within skeletal muscle in sepsis and septic shock: comparison to limited infection and cardiogenic shock. *Infection.* 1991 Sep-Oct;19(5):317-23.
90. Annane D, Sebille V, Troche G, Raphael JC, Gajdos P, Bellissant E. A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. *JAMA.* 2000 Feb 23;283(8):1038-45.
91. Rivier C, Shen GH. In the rat, endogenous nitric oxide modulates the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to interleukin-1 beta, vasopressin, and oxytocin. *J Neurosci.* 1994 Apr;14(4):1985-93.
92. Spahn DR, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernandez-Mondejar E, Gordini G, et al. Management of bleeding following major trauma: a European guideline. *Crit Care.* 2007;11(1):R17.
93. Cotton BA, Guy JS, Morris JA, Jr., Abumrad NN. The cellular, metabolic, and systemic consequences of aggressive fluid resuscitation strategies. *Shock.* 2006 Aug;26(2):115-21.

94. Kellum JA, Levin N, Bouman C, Lameire N. Developing a consensus classification system for acute renal failure. *Current opinion in critical care*. 2002 Dec;8(6):509-14.
95. Liano F, Pascual J. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int*. 1996 Sep;50(3):811-8.
96. Brivet FG, Kleinknecht DJ, Loirat P, Landais PJ. Acute renal failure in intensive care units--causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality; a prospective, multicenter study. French Study Group on Acute Renal Failure. *Critical care medicine*. 1996 Feb;24(2):192-8.
97. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *Jama*. 2005 Aug 17;294(7):813-8.
98. Hoste EA, Clermont G, Kersten A, Venkataraman R, Angus DC, De Bacquer D, et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care*. 2006;10(3):R73.
99. Bagshaw SM, George C, Bellomo R. A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 May;23(5):1569-74.
100. Singbartl K, Kellum JA. AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes. *Kidney Int*. 2012 May;81(9):819-25.
101. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Sep;36(3):959-69.
102. Reichlin T, Hochholzer W, Stelzig C, Laule K, Freidank H, Morgenthaler NG, et al. Incremental value of copeptin for rapid rule out of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Jun 30;54(1):60-8.
103. Barrera-Chimal J, Bobadilla NA. Are recently reported biomarkers helpful for early and accurate diagnosis of acute kidney injury? *Biomarkers*. 2012 Aug;17(5):385-93.
104. Constantin JM, Futier E, Perbet S, Roszyk L, Lautrette A, Gillart T, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in adult critically ill patients: a prospective study. *J Crit Care*. 2010 Mar;25(1):176 e1-6.
105. Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest*. 2008 May;118(5):1657-68.
106. Vaidya VS, Ford GM, Waikar SS, Wang Y, Clement MB, Ramirez V, et al. A rapid urine test for early detection of kidney injury. *Kidney Int*. 2009 Apr 22.
107. Nejat M, Pickering JW, Devarajan P, Bonventre JV, Edelstein CL, Walker RJ, et al. Some biomarkers of acute kidney injury are increased in pre-renal acute injury. *Kidney Int*. 2012 Jun;81(12):1254-62.
108. Ali T, Khan I, Simpson W, Prescott G, Townend J, Smith W, et al. Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Apr;18(4):1292-8.
109. Bagshaw SM, George C, Dinu I, Bellomo R. A multi-centre evaluation of the RIFLE criteria for early acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Apr;23(4):1203-10.
110. Muller L, Jaber S, Molinari N, Favier L, Larche J, Motte G, et al. Fluid management and risk factors for renal dysfunction in patients with severe sepsis and/or septic shock. *Crit Care*. 2012;16(1):R34.
111. Hobson CE, Yavas S, Segal MS, Schold JD, Tribble CG, Layon AJ, et al. Acute kidney injury is associated with increased long-term mortality after cardiothoracic surgery. *Circulation*. 2009 May 12;119(18):2444-53.
112. Bihorac A, Yavas S, Subbiah S, Hobson CE, Schold JD, Gabrielli A, et al. Long-term risk of mortality and acute kidney injury during hospitalization after major surgery. *Ann Surg*. 2009 May;249(5):851-8.
113. Barrantes F, Tian J, Vazquez R, Amoateng-Adjepong Y, Manthous CA. Acute kidney injury criteria predict outcomes of critically ill patients. *Crit Care Med*. 2008 May;36(5):1397-403.
114. Vieira JM, Jr., Castro I, Curvello-Neto A, Demarzo S, Caruso P, Pastore L, Jr., et al. Effect of acute kidney injury on weaning from mechanical ventilation in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2007 Jan;35(1):184-91.

115. Palmieri T, Lavrentieva A, Greenhalgh DG. Acute kidney injury in critically ill burn patients. Risk factors, progression and impact on mortality. *Burns*. 2010 Mar;36(2):205-11.
116. Ozcakar ZB, Yalcinkaya F, Altas B, Ergun H, Kendirli T, Ates C, et al. Application of the new classification criteria of the Acute Kidney Injury Network: a pilot study in a pediatric population. *Pediatr Nephrol*. 2009 Jul;24(7):1379-84.
117. Kjellstrand CM, Ebben J, Davin T. Time of death, recovery of renal function, development of chronic renal failure and need for chronic hemodialysis in patients with acute tubular necrosis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1981;27:45-50.
118. Liano F, Felipe C, Tenorio MT, Rivera M, Abraira V, Saez-de-Urturi JM, et al. Long-term outcome of acute tubular necrosis: a contribution to its natural history. *Kidney Int*. 2007 Apr;71(7):679-86.
119. Lowe KG. The late prognosis in acute tubular necrosis; an interim follow-up report on 14 patients. *Lancet*. 1952 May 31;1(6718):1086-8.
120. Finkenstaedt JT, Merrill JP. Renal function after recovery from acute renal failure. *N Engl J Med*. 1956 May 31;254(22):1023-6.
121. Wald R, Quinn RR, Luo J, Li P, Scales DC, Mamdani MM, et al. Chronic dialysis and death among survivors of acute kidney injury requiring dialysis. *JAMA*. 2009 Sep 16;302(11):1179-85.
122. Amdur RL, Chawla LS, Amodeo S, Kimmel PL, Palant CE. Outcomes following diagnosis of acute renal failure in U.S. veterans: focus on acute tubular necrosis. *Kidney Int*. 2009 Nov;76(10):1089-97.
123. Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, Eggers PW, Kimmel PL, Molitoris BA, et al. Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Jan;20(1):223-8.
124. Lo LJ, Go AS, Chertow GM, McCulloch CE, Fan D, Ordonez JD, et al. Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2009 Oct;76(8):893-9.
125. Chawla LS, Amdur RL, Amodeo S, Kimmel PL, Palant CE. The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2011 Jun;79(12):1361-9.
126. James MT, Ghali WA, Knudtson ML, Ravani P, Tonelli M, Faris P, et al. Associations between acute kidney injury and cardiovascular and renal outcomes after coronary angiography. *Circulation*. 2011 Feb 1;123(4):409-16.
127. Ishani A, Nelson D, Clothier B, Schult T, Nugent S, Greer N, et al. The magnitude of acute serum creatinine increase after cardiac surgery and the risk of chronic kidney disease, progression of kidney disease, and death. *Arch Intern Med*. 2011 Feb 14;171(3):226-33.
128. Bucaloiu ID, Kirchner HL, Norfolk ER, Hartle JE, 2nd, Perkins RM. Increased risk of death and de novo chronic kidney disease following reversible acute kidney injury. *Kidney Int*. 2012 Mar;81(5):477-85.
129. Coca SG, King JT, Jr., Rosenthal RA, Perkal MF, Parikh CR. The duration of postoperative acute kidney injury is an additional parameter predicting long-term survival in diabetic veterans. *Kidney Int*. 2010 Nov;78(9):926-33.
130. Brown JR, Kramer RS, Coca SG, Parikh CR. Duration of acute kidney injury impacts long-term survival after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*. 2010 Oct;90(4):1142-8.
131. Thakar CV, Christianson A, Himmelfarb J, Leonard AC. Acute kidney injury episodes and chronic kidney disease risk in diabetes mellitus. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Nov;6(11):2567-72.
132. Vineis P. Causality assessment in epidemiology. *Theor Med*. 1991 Jun;12(2):171-81.
133. Pickering JW, Endre ZH. Back-calculating baseline creatinine with MDRD misclassifies acute kidney injury in the intensive care unit. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Jul;5(7):1165-73.
134. Macedo E, Zanetta DM, Abdulkader RC. Long-term follow-up of patients after acute kidney injury: patterns of renal functional recovery. *PLoS One*. 2012;7(5):e36388.
135. Singh P, Rifkin DE, Blantz RC. Chronic kidney disease: an inherent risk factor for acute kidney injury? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Sep;5(9):1690-5.
136. Thakar CV, Worley S, Arrigain S, Yared JP, Paganini EP. Influence of renal dysfunction on mortality after cardiac surgery: modifying effect of preoperative renal function. *Kidney Int*. 2005 Mar;67(3):1112-9.

137. James MT, Hemmelgarn BR, Wiebe N, Pannu N, Manns BJ, Klarenbach SW, et al. Glomerular filtration rate, proteinuria, and the incidence and consequences of acute kidney injury: a cohort study. *Lancet*. 2010 Dec 18;376(9758):2096-103.
138. Goldfarb M, Rosenberger C, Abassi Z, Shina A, Zilbersat F, Eckardt KU, et al. Acute-on-chronic renal failure in the rat: functional compensation and hypoxia tolerance. *Am J Nephrol*. 2006;26(1):22-33.
139. Bidani AK, Griffin KA, Williamson G, Wang X, Loutzenhiser R. Protective importance of the myogenic response in the renal circulation. *Hypertension*. 2009 Aug;54(2):393-8.
140. Hsu CY, Chertow GM, McCulloch CE, Fan D, Ordonez JD, Go AS. Nonrecovery of kidney function and death after acute on chronic renal failure. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 May;4(5):891-8.
141. Menon V, Wang X, Sarnak MJ, Hunsicker LH, Madero M, Beck GJ, et al. Long-term outcomes in nondiabetic chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2008 Jun;73(11):1310-5.
142. Levey AS, Stevens LA, Coresh J. Conceptual model of CKD: applications and implications. *Am J Kidney Dis*. 2009 Mar;53(3 Suppl 3):S4-16.
143. Okusa MD, Chertow GM, Portilla D. The nexus of acute kidney injury, chronic kidney disease, and World Kidney Day 2009. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Mar;4(3):520-2.
144. Just A. Mechanisms of renal blood flow autoregulation: dynamics and contributions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Jan;292(1):R1-17.
145. Navar LG. Renal autoregulation: perspectives from whole kidney and single nephron studies. *Am J Physiol*. 1978 May;234(5):F357-70.
146. Loutzenhiser R, Bidani A, Chilton L. Renal myogenic response: kinetic attributes and physiological role. *Circ Res*. 2002 Jun 28;90(12):1316-24.
147. Flemming B, Arenz N, Seeliger E, Wronski T, Steer K, Persson PB. Time-dependent autoregulation of renal blood flow in conscious rats. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Nov;12(11):2253-62.
148. Takenaka T, Harrison-Bernard LM, Inscho EW, Carmines PK, Navar LG. Autoregulation of afferent arteriolar blood flow in juxtamedullary nephrons. *Am J Physiol*. 1994 Nov;267(5 Pt 2):F879-87.
149. Ren Y, Garvin JL, Carretero OA. Efferent arteriole tubuloglomerular feedback in the renal nephron. *Kidney Int*. 2001 Jan;59(1):222-9.
150. Barajas L. Renin secretion: an anatomical basis for tubular control. *Science*. 1971 Apr 30;172(3982):485-7.
151. Taher MS, McLain LG, McDonald KM, Schrier RW, Gilbert LK, Aisenbrey GA, et al. Effect of beta adrenergic blockade on renin response to renal nerve stimulation. *J Clin Invest*. 1976 Feb;57(2):459-65.
152. DA M, editor. *The Kidney*. Philadelphia: Brenner.
153. Johnson MD, Malvin RL. Stimulation of renal sodium reabsorption by angiotensin II. *Am J Physiol*. 1977 Apr;232(4):F298-306.
154. Porush JG, Kaloyanides GJ, Cacciaguida RJ, Rosen SM. The Effects of Angiotensin II on Renal Water and Electrolyte Excretion in Normal and Caval Dogs. *J Clin Invest*. 1967 Dec;46(12):2109-22.
155. Janssen WM, Beekhuis H, de Bruin R, de Jong PE, de Zeeuw D. Noninvasive measurement of intrarenal blood flow distribution: kinetic model of renal ¹²³I-hippuran handling. *Am J Physiol*. 1995 Oct;269(4 Pt 2):F571-80.
156. Zhang W, Edwards A. Oxygen transport across vasa recta in the renal medulla. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Sep;283(3):H1042-55.
157. Brezis M, Rosen S. Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *The New England journal of medicine*. 1995 Mar 9;332(10):647-55.
158. Epstein FH, Silva P, Spokes K, Brezis M, Rosen S. Renal medullary Na-K-ATPase and hypoxic injury in perfused rat kidneys. *Kidney Int*. 1989 Nov;36(5):768-72.
159. Shanley PF, Brezis M, Spokes K, Silva P, Epstein FH, Rosen S. Transport-dependent cell injury in the S3 segment of the proximal tubule. *Kidney Int*. 1986 May;29(5):1033-7.
160. Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T, et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Nov;281(5):F948-57.

161. Alejandro V, Scandling JD, Jr., Sibley RK, Dafoe D, Alfrey E, Deen W, et al. Mechanisms of filtration failure during postischemic injury of the human kidney. A study of the reperfused renal allograft. *J Clin Invest.* 1995 Feb;95(2):820-31.
162. Donohoe JF, Venkatachalam MA, Bernard DB, Levinsky NG. Tubular leakage and obstruction after renal ischemia: structural-functional correlations. *Kidney Int.* 1978 Mar;13(3):208-22.
163. Moran SM, Myers BD. Pathophysiology of protracted acute renal failure in man. *J Clin Invest.* 1985 Oct;76(4):1440-8.
164. Myers BD, Chui F, Hilberman M, Michaels AS. Transtubular leakage of glomerular filtrate in human acute renal failure. *Am J Physiol.* 1979 Oct;237(4):F319-25.
165. Molitoris BA, Dahl R, Geerdes A. Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase during ischemia. *Am J Physiol.* 1992 Sep;263(3 Pt 2):F488-95.
166. Van Why SK, Mann AS, Ardito T, Siegel NJ, Kashgarian M. Expression and molecular regulation of Na(+)-K(+)-ATPase after renal ischemia. *Am J Physiol.* 1994 Jul;267(1 Pt 2):F75-85.
167. Neugarten J, Feiner HD, Schacht RG, Gallo GR, Baldwin DS. Aggravation of experimental glomerulonephritis by superimposed clip hypertension. *Kidney Int.* 1982 Sep;22(3):257-63.
168. Venkatachalam MA, Griffin KA, Lan R, Geng H, Saikumar P, Bidani AK. Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010 May;298(5):F1078-94.
169. Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med.* 1982 Sep 9;307(11):652-9.
170. Hostetter TH. Progression of renal disease and renal hypertrophy. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:263-78.
171. Nath KA, Croatt AJ, Hostetter TH. Oxygen consumption and oxidant stress in surviving nephrons. *Am J Physiol.* 1990 May;258(5 Pt 2):F1354-62.
172. Tapp DC, Wortham WG, Addison JF, Hammonds DN, Barnes JL, Venkatachalam MA. Food restriction retards body growth and prevents end-stage renal pathology in remnant kidneys of rats regardless of protein intake. *Lab Invest.* 1989 Feb;60(2):184-95.
173. Baldwin DS, Neugarten J. Hypertension and renal diseases. *Am J Kidney Dis.* 1987 Sep;10(3):186-91.
174. Risdon RA, Sloper JC, De Wardener HE. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet.* 1968 Aug 17;2(7564):363-6.
175. Schainuck LI, Striker GE, Cutler RE, Benditt EP. Structural-functional correlations in renal disease. II. The correlations. *Hum Pathol.* 1970 Dec;1(4):631-41.
176. Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis.* 1992 Jul;20(1):1-17.
177. Azuma H, Nadeau K, Takada M, Mackenzie HS, Tilney NL. Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation.* 1997 Jul 27;64(2):190-7.
178. Azuma H, Nadeau K, Mackenzie HS, Brenner BM, Tilney NL. Nephron mass modulates the hemodynamic, cellular, and molecular response of the rat renal allograft. *Transplantation.* 1997 Feb 27;63(4):519-28.
179. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med.* 1998 Nov 12;339(20):1448-56.
180. Zoja C, Benigni A, Remuzzi G. Cellular responses to protein overload: key event in renal disease progression. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2004 Jan;13(1):31-7.
181. Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int.* 2005 Feb;67(2):404-19.
182. Fine LG, Bandyopadhyay D, Norman JT. Is there a common mechanism for the progression of different types of renal diseases other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia. *Kidney Int Suppl.* 2000 Apr;75:S22-6.

183. Klahr S, Levey AS, Beck GJ, Caggiula AW, Hunsicker L, Kusek JW, et al. The effects of dietary protein restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal disease. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *N Engl J Med.* 1994 Mar 31;330(13):877-84.
184. Ruggenti P, Perna A, Mosconi L, Pisoni R, Remuzzi G. Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. "Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia" (GISEN). *Kidney Int.* 1998 May;53(5):1209-16.
185. Jafar TH, Stark PC, Schmid CH, Landa M, Maschio G, de Jong PE, et al. Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin-converting enzyme inhibition: a patient-level meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2003 Aug 19;139(4):244-52.
186. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Aug;14(8):2199-210.
187. Castano AP, Lin SL, Surowy T, Nowlin BT, Turlapati SA, Patel T, et al. Serum amyloid P inhibits fibrosis through Fc gamma R-dependent monocyte-macrophage regulation in vivo. *Sci Transl Med.* 2009 Nov 4;1(5):5ra13.
188. David S, Biancone L, Caserta C, Bussolati B, Cambi V, Camussi G. Alternative pathway complement activation induces proinflammatory activity in human proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Jan;12(1):51-6.
189. Hodeify R, Tarcsfalvi A, Megyesi J, Safirstein RL, Price PM. Cdk2-dependent phosphorylation of p21 regulates the role of Cdk2 in cisplatin cytotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011 May;300(5):F1171-9.
190. Megyesi J, Price PM, Tamayo E, Safirstein RL. The lack of a functional p21(WAF1/CIP1) gene ameliorates progression to chronic renal failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 14;96(19):10830-5.
191. Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah JV, Bonventre JV. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med.* 2010 May;16(5):535-43, 1p following 143.
192. Bechtel W, McGoochan S, Zeisberg EM, Muller GA, Kalbacher H, Salant DJ, et al. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med.* 2010 May;16(5):544-50.
193. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001 Nov;281(5):F887-99.
194. Yuan HT, Li XZ, Pitera JE, Long DA, Woolf AS. Peritubular capillary loss after mouse acute nephrotoxicity correlates with down-regulation of vascular endothelial growth factor-A and hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Am J Pathol.* 2003 Dec;163(6):2289-301.
195. Francois H, Placier S, Flamant M, Tharaux PL, Chansel D, Dussaule JC, et al. Prevention of renal vascular and glomerular fibrosis by epidermal growth factor receptor inhibition. *FASEB J.* 2004 May;18(7):926-8.
196. Kang DH, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschki D, et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Mar;13(3):806-16.
197. Eckardt KU, Rosenberger C, Jurgensen JS, Wiesener MS. Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Blood Purif.* 2003;21(3):253-7.
198. Heyman SN, Rosen S, Rosenberger C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia adaptation, and the pathogenesis of radiocontrast nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 Jan;3(1):288-96.
199. Rosenberger C, Mandriota S, Jurgensen JS, Wiesener MS, Horstrup JH, Frei U, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Jul;13(7):1721-32.
200. Epstein FH. Oxygen and renal metabolism. *Kidney Int.* 1997 Feb;51(2):381-5.
201. Futrakul N, Laohaphaibul A, Futrakul P. Glomerular endothelial dysfunction and hemodynamic maladjustment in vesicoureteric reflux. *Ren Fail.* 2003 May;25(3):479-83.
202. Kairaitis LK, Wang Y, Gassmann M, Tay YC, Harris DC. HIF-1alpha expression follows microvascular loss in advanced murine adriamycin nephrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jan;288(1):F198-206.
203. Ohashi R, Kitamura H, Yamanaka N. Peritubular capillary injury during the progression of experimental glomerulonephritis in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Jan;11(1):47-56.

204. Futrakul N, Vongthavarawat V, Sirisalipotch S, Chairatanarat T, Futrakul P, Suwanwalaikorn S. Tubular dysfunction and hemodynamic alteration in normoalbuminuric type 2 diabetes. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005;32(1):59-65.
205. Matsumoto M, Tanaka T, Yamamoto T, Noiri E, Miyata T, Inagi R, et al. Hypoperfusion of peritubular capillaries induces chronic hypoxia before progression of tubulointerstitial injury in a progressive model of rat glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Jun;15(6):1574-81.
206. Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Miyata T, Inagi R, et al. Evidence of tubular hypoxia in the early phase in the remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol.* 2004 May;15(5):1277-88.
207. Lombardi D, Gordon KL, Polinsky P, Suga S, Schwartz SM, Johnson RJ. Salt-sensitive hypertension develops after short-term exposure to Angiotensin II. *Hypertension.* 1999 Apr;33(4):1013-9.
208. Shao J, Nangaku M, Miyata T, Inagi R, Yamada K, Kurokawa K, et al. Imbalance of T-cell subsets in angiotensin II-infused hypertensive rats with kidney injury. *Hypertension.* 2003 Jul;42(1):31-8.
209. Norman JT, Stidwill R, Singer M, Fine LG. Angiotensin II blockade augments renal cortical microvascular pO₂ indicating a novel, potentially renoprotective action. *Nephron Physiol.* 2003;94(2):p39-46.
210. Welch WJ, Baumgartl H, Lubbers D, Wilcox CS. Renal oxygenation defects in the spontaneously hypertensive rat: role of AT1 receptors. *Kidney Int.* 2003 Jan;63(1):202-8.
211. Adler S, Huang H. Impaired regulation of renal oxygen consumption in spontaneously hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Jul;13(7):1788-94.
212. Iseki K, Ikemiya Y, Iseki C, Takishita S. Haematocrit and the risk of developing end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 May;18(5):899-905.
213. Mohanram A, Zhang Z, Shahinfar S, Keane WF, Brenner BM, Toto RD. Anemia and end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *Kidney Int.* 2004 Sep;66(3):1131-8.
214. Ries M, Basseau F, Tyndal B, Jones R, Deminiere C, Catargi B, et al. Renal diffusion and BOLD MRI in experimental diabetic nephropathy. Blood oxygen level-dependent. *J Magn Reson Imaging.* 2003 Jan;17(1):104-13.
215. Gouva C, Nikolopoulos P, Ioannidis JP, Siamopoulos KC. Treating anemia early in renal failure patients slows the decline of renal function: a randomized controlled trial. *Kidney Int.* 2004 Aug;66(2):753-60.
216. Border WA, Noble NA. Fibrosis linked to TGF-beta in yet another disease. *J Clin Invest.* 1995 Aug;96(2):655-6.
217. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int.* 1994 Mar;45(3):916-27.
218. Kaneto H, Morrissey J, Klahr S. Increased expression of TGF-beta 1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation. *Kidney Int.* 1993 Aug;44(2):313-21.
219. Tanaka T, Hanafusa N, Ingelfinger JR, Ohse T, Fujita T, Nangaku M. Hypoxia induces apoptosis in SV40-immortalized rat proximal tubular cells through the mitochondrial pathways, devoid of HIF1-mediated upregulation of Bax. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Sep 12;309(1):222-31.
220. Norman JT, Clark IM, Garcia PL. Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int.* 2000 Dec;58(6):2351-66.
221. Mu W, Ouyang X, Agarwal A, Zhang L, Long DA, Cruz PE, et al. IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Dec;16(12):3651-60.
222. Eddy AA, Giachelli CM. Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. *Kidney Int.* 1995 Jun;47(6):1546-57.
223. Kizu A, Medici D, Kalluri R. Endothelial-mesenchymal transition as a novel mechanism for generating myofibroblasts during diabetic nephropathy. *Am J Pathol.* 2009 Oct;175(4):1371-3.
224. Basile DP, Friedrich JL, Spahic J, Knipe N, Mang H, Leonard EC, et al. Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011 Mar;300(3):F721-33.

225. Sun S, Ning X, Zhang Y, Lu Y, Nie Y, Han S, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α induces Twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition. *Kidney Int.* 2009 Jun;75(12):1278-87.
226. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2007 Dec;117(12):3810-20.
227. Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol.* 1995 Jul;130(2):393-405.
228. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* 2002 Aug;110(3):341-50.
229. Dussaule JC, Guerrot D, Huby AC, Chadjichristos C, Shweke N, Boffa JJ, et al. The role of cell plasticity in progression and reversal of renal fibrosis. *Int J Exp Pathol.* 2011 Jun;92(3):151-7.
230. Kriz W, Kaissling B, Le Hir M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest.* 2011 Feb;121(2):468-74.
231. Semenza GL. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell.* 2001 Oct 5;107(1):1-3.
232. Eltzschig HK. Targeting Hypoxia-induced Inflammation. *Anesthesiology.* 2011 Feb;114(2):239-42.
233. Kapitsinou PP, Jaffe J, Michael M, Swan CE, Duffy KJ, Erickson-Miller CL, et al. Preischemic targeting of HIF prolyl hydroxylation inhibits fibrosis associated with acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 May;302(9):F1172-9.
234. Schley G, Klanke B, Schodel J, Forstreuter F, Shukla D, Kurtz A, et al. Hypoxia-inducible transcription factors stabilization in the thick ascending limb protects against ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Nov;22(11):2004-15.
235. Zhu Q, Wang Z, Xia M, Li PL, Van Tassell BW, Abbate A, et al. Silencing of hypoxia-inducible factor-1 α gene attenuated angiotensin II-induced renal injury in Sprague-Dawley rats. *Hypertension.* 2011 Oct;58(4):657-64.
236. Zhang S, Han CH, Chen XS, Zhang M, Xu LM, Zhang JJ, et al. Transient ureteral obstruction prevents against kidney ischemia/reperfusion injury via hypoxia-inducible factor (HIF)-2 α activation. *PLoS One.* 2012;7(1):e29876.
237. Kojima I, Tanaka T, Inagi R, Kato H, Yamashita T, Sakiyama A, et al. Protective role of hypoxia-inducible factor-2 α against ischemic damage and oxidative stress in the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Apr;18(4):1218-26.
238. Yu X, Fang Y, Liu H, Zhu J, Zou J, Xu X, et al. The balance of beneficial and deleterious effects of hypoxia-inducible factor activation by prolyl hydroxylase inhibitor in rat remnant kidney depends on the timing of administration. *Nephrol Dial Transplant.* 2012 Aug;27(8):3110-9.
239. Franklin WA, Ganote CE, Jennings RB. Blood reflow after renal ischemia. Effects of hypertonic mannitol on reflow and tubular necrosis after transient ischemia in the rat. *Arch Pathol.* 1974 Aug;98(2):106-11.
240. Puchalski Z, Zimnoch L, Musiatowicz B, Kurasz S. Systemic hemodynamics and renal histology and histochemistry in hemorrhagic shock and posthemorrhagic period. *Pol Med J.* 1972;11(5):1106-12.
241. Lavender JP, Sherwood T. The renal circulation in haemorrhagic hypotension. In-vivo renal micro-angiography in the dog. *Br Med Bull.* 1972 Sep;28(3):241-6.
242. Strauss J, Beran AV, Baker R, Boydston L, Reyes-Sanchez JL. Effect of hemorrhagic shock on renal oxygenation. *The American journal of physiology.* 1971 Dec;221(6):1545-50.
243. Stone AM, Stahl WM. Effect of ethacrynic acid and furosemide on renal function in hypovolemia. *Ann Surg.* 1971 Jul;174(1):1-11.
244. Carvalho M, Vyden JK, Bernstein H, Gold H, Corday E. Hemodynamic effects of 3-hydroxytyramine (dopamine) in experimentally induced shock. *Am J Cardiol.* 1969 Feb;23(2):217-23.
245. Munck O. The kidney during hypotension and shock. *Acta Anaesthesiol Belg.* 1968;19(3):277-83.
246. Dow RW, Fry WJ. Hemorrhagic shock. Changes in renal blood flow and vascular resistance. *Arch Surg.* 1967 Feb;94(2):190-4.

Bibliographie

247. Killen DA, Rhea WG, Jr., Foster JH. Effect of prior intravenous fluid administration on the nephrotoxicity of angio-CONRAY. *Surgery*. 1966 Apr;59(4):572-5.
248. Rhea WG, Jr., Killen DA, Foster JH. Renal Recovery Following Contrast Medium Injury. *Surgery*. 1965 Jan;57:53-60.
249. Camishion RC, Fishman NH. Effect of Mannitol on Renal Blood Flow and Cardiac Output in Hemorrhagic Shock. *Circulation*. 1964 Apr;29:SUPPL:130-4.
250. Baxter CR, Zedlitz WH, Shires GT. High Output Acute Renal Failure Complicating Traumatic Injury. *The Journal of trauma*. 1964 Sep;4:567-80.
251. Foster JH, Adkins RB, Chamberlain NO, Symbas PN, Harris AP. The renal effects of lower abdominal aortic cross-clamping. Report of negative results in dogs and monkeys. *JAMA*. 1963 Feb 9;183:451-4.
252. Chamberlain NO, Symbas PN, Foster JH, Harris AP. The influence of infrarenal aortic crossclamping on renal blood flow. *Surg Forum*. 1960;11:501-3.
253. Foster JH, Collins HA, Scott HW, Jr. The effect of levarterenol on renal blood flow in dogs subjected to hemorrhagic shock. *Surg Forum*. 1955;5:781-8.
254. Oliver J, Mac DM, Tracy A. The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury; renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode. *The Journal of clinical investigation*. 1951 Dec;30(12:1):1307-439.
255. Phillips RA, Dole VP, et al. Effects of acute hemorrhagic and traumatic shock on renal function of dogs. *The American journal of physiology*. 1946 Jan;145:314-36.
256. Shanley PF, Rosen MD, Brezis M, Silva P, Epstein FH, Rosen S. Topography of focal proximal tubular necrosis after ischemia with reflow in the rat kidney. *Am J Pathol*. 1986 Mar;122(3):462-8.
257. Heyman SN, Brezis M, Epstein FH, Spokes K, Rosen S. Effect of glycine and hypertrophy on renal outer medullary hypoxic injury in ischemia reflow and contrast nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 1992 Jun;19(6):578-86.
258. Brezis M, Rosen S, Silva P, Epstein FH. Transport activity modifies thick ascending limb damage in the isolated perfused kidney. *Kidney Int*. 1984 Jan;25(1):65-72.
259. Zager RA, Gmur DJ, Bredl CR, Eng MJ. Temperature effects on ischemic and hypoxic renal proximal tubular injury. *Lab Invest*. 1991 Jun;64(6):766-76.
260. Zager RA, Altschuld R. Body temperature: an important determinant of severity of ischemic renal injury. *The American journal of physiology*. 1986 Jul;251(1 Pt 2):F87-93.
261. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 1993 May;43(5):1160-78.
262. Finn WF, Chevalier RL. Recovery from postischemic acute renal failure in the rat. *Kidney Int*. 1979 Aug;16(2):113-23.
263. Glaumann B, Glaumann H, Berezesky IK, Trump BF. Studies on cellular recovery from injury. II. Ultrastructural studies on the recovery of the pars convoluta of the proximal tubule of the rat kidney from temporary ischemia. *Virchows Archiv*. 1977 May 3;24(1):1-18.
264. Kreisberg JJ, Bulger RE, Trump BF, Nagle RB. Effects of transient hypotension on the structure and function of rat kidney. *Virchows Archiv*. 1976 Nov 2;22(2):121-33.
265. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *The American journal of physiology*. 1996 Apr;270(4 Pt 2):F700-8.
266. Safirstein R. Renal stress response and acute renal failure. *Adv Ren Replace Ther*. 1997 Apr;4(2 Suppl 1):38-42.
267. Racusen LC. Pathology of acute renal failure: structure/function correlations. *Adv Ren Replace Ther*. 1997 Apr;4(2 Suppl 1):3-16.
268. Solez K, Racusen LC, Marcussen N, Slatnik I, Keown P, Burdick JF, et al. Morphology of ischemic acute renal failure, normal function, and cyclosporine toxicity in cyclosporine-treated renal allograft recipients. *Kidney Int*. 1993 May;43(5):1058-67.
269. Olsen S, Burdick JF, Keown PA, Wallace AC, Racusen LC, Solez K. Primary acute renal failure ("acute tubular necrosis") in the transplanted kidney: morphology and pathogenesis. *Medicine*. 1989 May;68(3):173-87.
270. Jones DB. Ultrastructure of human acute renal failure. *Lab Invest*. 1982 Mar;46(3):254-64.

271. Oliver J. Correlations of structure and function and mechanisms of recovery in acute tubular necrosis. *Am J Med.* 1953 Oct;15(4):535-57.
272. Zager RA. Partial aortic ligation: a hypoperfusion model of ischemic acute renal failure and a comparison with renal artery occlusion. *The Journal of laboratory and clinical medicine.* 1987 Oct;110(4):396-405.
273. Yap SC, Lee HT. Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence. *Anesthesiology.* 2012 May;116(5):1139-48.
274. Frega NS, DiBona DR, Guertler B, Leaf A. Ischemic renal injury. *Kidney international.* 1976 Oct;6:S17-25.
275. Mason J, Welsch J, Torhorst J. The contribution of vascular obstruction to the functional defect that follows renal ischemia. *Kidney Int.* 1987 Jan;31(1):65-71.
276. Olof P, Hellberg A, Kallskog O, Wolgast M. Red cell trapping and postischemic renal blood flow. Differences between the cortex, outer and inner medulla. *Kidney Int.* 1991 Oct;40(4):625-31.
277. Summers WK, Jamison RL. The no reflow phenomenon in renal ischemia. *Lab Invest.* 1971 Dec;25(6):635-43.
278. Powell WJ, Jr., DiBona DR, Flores J, Frega N, Leaf A. Effects of hyperosmotic mannitol in reducing ischemic cell swelling and minimizing myocardial necrosis. *Circulation.* 1976 Mar;53(3 Suppl):I45-9.
279. Yamamoto K, Wilson DR, Baumal R. Outer medullary circulatory defect in ischemic acute renal failure. *Am J Pathol.* 1984 Aug;116(2):253-61.
280. Zager RA, Mahan J, Merola AJ. Effects of mannitol on the postischemic kidney. Biochemical, functional, and morphologic assessments. *Lab Invest.* 1985 Oct;53(4):433-42.
281. Conger JD, Falk SA, Yuan BH, Schrier RW. Atrial natriuretic peptide and dopamine in a rat model of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 1989 May;35(5):1126-32.
282. Gellai M, Jugus M, Fletcher T, DeWolf R, Nambi P. Reversal of postischemic acute renal failure with a selective endothelinA receptor antagonist in the rat. *The Journal of clinical investigation.* 1994 Feb;93(2):900-6.
283. Kelly KJ, Tolkoff-Rubin NE, Rubin RH, Williams WW, Jr., Meehan SM, Meschter CL, et al. An oral platelet-activating factor antagonist, Ro-24-4736, protects the rat kidney from ischemic injury. *The American journal of physiology.* 1996 Nov;271(5 Pt 2):F1061-7.
284. Noiri E, Peresleni T, Miller F, Goligorsky MS. In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia. *The Journal of clinical investigation.* 1996 May 15;97(10):2377-83.
285. Humes HD, Cieslinski DA, Coimbra TM, Messana JM, Galvao C. Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in postischemic acute renal failure. *The Journal of clinical investigation.* 1989 Dec;84(6):1757-61.
286. Hammerman MR. Potential role of growth factors in the prophylaxis and treatment of acute renal failure. *Kidney international.* 1998 Feb;64:S19-22.
287. Rosen S, Brezis M, Stillman I. The pathology of nephrotoxic injury: a reappraisal. *Miner Electrolyte Metab.* 1994;20(4):174-80.
288. Zager RA, Prior RB. Gentamicin and gram-negative bacteremia. A synergism for the development of experimental nephrotoxic acute renal failure. *The Journal of clinical investigation.* 1986 Jul;78(1):196-204.
289. Heyman SN, Rosen S, Brezis M. Radiocontrast nephropathy: a paradigm for the synergism between toxic and hypoxic insults in the kidney. *Exp Nephrol.* 1994 May-Jun;2(3):153-7.
290. Rosen S, Stillman IE. Acute Tubular Necrosis Is a Syndrome of Physiologic and Pathologic Dissociation. *J Am Soc Nephrol.* 2008 Jan 30.
291. Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD, et al. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *The Journal of clinical investigation.* 1992 Jul;90(1):267-70.
292. Zager RA. Myoglobin depletes renal adenine nucleotide pools in the presence and absence of shock. *Kidney Int.* 1991 Jan;39(1):111-9.
293. Zager RA. Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure. *Kidney Int.* 1996 Feb;49(2):314-26.

294. Zarjou A, Agarwal A. Sepsis and acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Jun;22(6):999-1006.
295. Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest*. 2009 Oct;119(10):2868-78.
296. Heyman SN, Lieberthal W, Rogiers P, Bonventre JV. Animal models of acute tubular necrosis. *Current opinion in critical care*. 2002 Dec;8(6):526-34.
297. Bens M, Vandewalle A. Cell models for studying renal physiology. *Pflugers Arch*. 2008 Oct;457(1):1-15.
298. Ross BD. The isolated perfused rat kidney. *Clin Sci Mol Med Suppl*. 1978 Dec;55(6):513-21.
299. Grantham JJ, Irish JM, 3rd, Hall DA. Studies of isolated renal tubules in vitro. *Annu Rev Physiol*. 1978;40:249-77.
300. Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Izquierdo MC, Jakubowski A, Justo P, Blanco-Colio LM, et al. Tweak induces proliferation in renal tubular epithelium: a role in uninephrectomy induced renal hyperplasia. *J Cell Mol Med*. 2009 Sep;13(9B):3329-42.
301. Saotome T, Ishikawa K, May CN, Birchall IE, Bellomo R. The impact of experimental hypoperfusion on subsequent kidney function. *Intensive Care Med*. 2010 Mar;36(3):533-40.
302. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011;17(11):1391-401.
303. Burne-Taney MJ, Kofler J, Yokota N, Weisfeldt M, Traystman RJ, Rabb H. Acute renal failure after whole body ischemia is characterized by inflammation and T cell-mediated injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Jul;285(1):F87-94.
304. Sekine M, Monkawa T, Morizane R, Matsuoka K, Taya C, Akita Y, et al. Selective depletion of mouse kidney proximal straight tubule cells causes acute kidney injury. *Transgenic Res*. 2012 Feb;21(1):51-62.
305. Srichai MB, Hao C, Davis L, Golovin A, Zhao M, Moeckel G, et al. Apoptosis of the thick ascending limb results in acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Aug;19(8):1538-46.
306. Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Jan;278(1):F1-F12.
307. Kobbe P, Schmidt J, Stoffels B, Chanthaphavong RS, Bauer AJ, Pape HC. IL-10 administration attenuates pulmonary neutrophil infiltration and alters pulmonary iNOS activation following hemorrhagic shock. *Inflamm Res*. 2009 Mar;58(3):170-4.
308. Lv T, Shen X, Shi Y, Song Y. TLR4 is essential in acute lung injury induced by unresuscitated hemorrhagic shock. *The Journal of trauma*. 2009 Jan;66(1):124-31.
309. Benhamou Y, Favre J, Musette P, Renet S, Thuillez C, Levesque H, et al. Toll-like receptors 4 contribute to endothelial injury and inflammation in hemorrhagic shock in mice. *Critical care medicine*. 2009 Mar 25.
310. van Meurs M, Wulfert FM, Knol AJ, De Haes A, Houwertjes M, Aarts LP, et al. Early organ-specific endothelial activation during hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock (Augusta, Ga)*. 2008 Feb;29(2):291-9.
311. Matsutani T, Kang SC, Miyashita M, Sasajima K, Choudhry MA, Bland KI, et al. Liver cytokine production and ICAM-1 expression following bone fracture, tissue trauma, and hemorrhage in middle-aged mice. *American journal of physiology*. 2007 Jan;292(1):G268-74.
312. Wichmann MW, Ayala A, Chaudry IH. Severe depression of host immune functions following closed-bone fracture, soft-tissue trauma, and hemorrhagic shock. *Critical care medicine*. 1998 Aug;26(8):1372-8.
313. Dobyant DC, Nagle RB, Bulger RE. Hypovolemic models of acute tubular necrosis in the rat kidney. *Virchows Archiv*. 1977 Nov 21;25(4):271-80.
314. Dobyant DC, Nagle RB, Bulger RE. Acute tubular necrosis in the rat kidney following sustained hypotension: Physiologic and morphologic observations. *Lab Invest*. 1977 Oct;37(4):411-22.
315. Rosen S, Heyman SN. Difficulties in understanding human "acute tubular necrosis": limited data and flawed animal models. *Kidney Int*. 2001 Oct;60(4):1220-4.
316. Efrati S, Berman S, Ben Aharon G, Siman-Tov Y, Averbukh Z, Weissgarten J. Application of normobaric hyperoxia therapy for amelioration of haemorrhagic shock-induced acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Jul;23(7):2213-22.

317. Parikh CR, McSweeney P, Schrier RW. Acute renal failure independently predicts mortality after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplant. *Kidney international*. 2005 May;67(5):1999-2005.
318. Chansel D, Ciroldi M, Vandermeersch S, Jackson LF, Gomez AM, Henrion D, et al. Heparin binding EGF is necessary for vasospastic response to endothelin. *FASEB J*. 2006 Sep;20(11):1936-8.
319. Bays HE, Bazata DD, Clark NG, Gavin JR, 3rd, Green AJ, Lewis SJ, et al. Prevalence of self-reported diagnosis of diabetes mellitus and associated risk factors in a national survey in the US population: SHIELD (Study to Help Improve Early evaluation and management of risk factors Leading to Diabetes). *BMC Public Health*. 2007;7:277.
320. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. 2002 Jan 16;287(3):356-9.
321. Parving HH. Diabetic nephropathy: prevention and treatment. *Kidney Int*. 2001 Nov;60(5):2041-55.
322. Hsu CY, Ordonez JD, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Go AS. The risk of acute renal failure in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2008 Jul;74(1):101-7.
323. Hostetter TH. Diabetic nephropathy. Metabolic versus hemodynamic considerations. *Diabetes Care*. 1992 Sep;15(9):1205-15.
324. Noth RH, Krolewski AS, Kaysen GA, Meyer TW, Schambelan M. Diabetic nephropathy: hemodynamic basis and implications for disease management. *Ann Intern Med*. 1989 May 15;110(10):795-813.
325. Ishimura E, Nishizawa Y, Kawagishi T, Okuno Y, Kogawa K, Fukumoto S, et al. Intrarenal hemodynamic abnormalities in diabetic nephropathy measured by duplex Doppler sonography. *Kidney Int*. 1997 Jun;51(6):1920-7.
326. Wolf G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Invest*. 2004 Dec;34(12):785-96.
327. Shi XY, Hou FF, Niu HX, Wang GB, Xie D, Guo ZJ, et al. Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Endocrinology*. 2008 Apr;149(4):1829-39.
328. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.
329. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1615-25.
330. Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Aug;14(8 Suppl 3):S241-5.
331. Trachtman H. Vitamin E prevents glucose-induced lipid peroxidation and increased collagen production in cultured rat mesangial cells. *Microvasc Res*. 1994 Mar;47(2):232-9.
332. Craven PA, Melhem MF, Phillips SL, DeRubertis FR. Overexpression of Cu²⁺/Zn²⁺ superoxide dismutase protects against early diabetic glomerular injury in transgenic mice. *Diabetes*. 2001 Sep;50(9):2114-25.
333. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 2000 Jan 20;342(3):154-60.
334. Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: the case for tgf-Beta as the major mediator. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Jan;15 Suppl 1:S55-7.
335. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, et al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul 5;97(14):8015-20.
336. Tack I, Elliot SJ, Potier M, Rivera A, Striker GE, Striker LJ. Autocrine activation of the IGF-I signaling pathway in mesangial cells isolated from diabetic NOD mice. *Diabetes*. 2002 Jan;51(1):182-8.
337. Heilig CW, Liu Y, England RL, Freytag SO, Gilbert JD, Heilig KO, et al. D-glucose stimulates mesangial cell GLUT1 expression and basal and IGF-I-sensitive glucose uptake in rat mesangial cells: implications for diabetic nephropathy. *Diabetes*. 1997 Jun;46(6):1030-9.

338. Feld SM, Hirschberg R, Artishevsky A, Nast C, Adler SG. Insulin-like growth factor I induces mesangial proliferation and increases mRNA and secretion of collagen. *Kidney Int.* 1995 Jul;48(1):45-51.
339. Johnson R, Iida H, Yoshimura A, Floege J, Bowen-Pope DF. Platelet-derived growth factor: a potentially important cytokine in glomerular disease. *Kidney Int.* 1992 Mar;41(3):590-4.
340. Strutz F, Zeisberg M, Hemmerlein B, Sattler B, Hummel K, Becker V, et al. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int.* 2000 Apr;57(4):1521-38.
341. de Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2001 May;12(5):993-1000.
342. Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Mar;16 Suppl 1:S30-3.
343. Palm F, Cederberg J, Hansell P, Liss P, Carlsson PO. Reactive oxygen species cause diabetes-induced decrease in renal oxygen tension. *Diabetologia.* 2003 Aug;46(8):1153-60.
344. Inoue T, Kozawa E, Okada H, Inukai K, Watanabe S, Kikuta T, et al. Noninvasive evaluation of kidney hypoxia and fibrosis using magnetic resonance imaging. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Aug;22(8):1429-34.
345. Rosenberger C, Khamaisi M, Abassi Z, Shilo V, Weksler-Zangen S, Goldfarb M, et al. Adaptation to hypoxia in the diabetic rat kidney. *Kidney Int.* 2008 Jan;73(1):34-42.
346. Zou AP, Li N, Cowley AW, Jr. Production and actions of superoxide in the renal medulla. *Hypertension.* 2001 Feb;37(2 Part 2):547-53.
347. Juncos R, Garvin JL. Superoxide enhances Na-K-2Cl cotransporter activity in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 May;288(5):F982-7.
348. Xu X, Chen P, Zheng Q, Wang Y, Chen W. Effect of pioglitazone on diabetic nephropathy and expression of HIF-1 α and VEGF in the renal tissues of type 2 diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Jul;93(1):63-9.
349. Yang ZZ, Zhang AY, Yi FX, Li PL, Zou AP. Redox regulation of HIF-1 α levels and HO-1 expression in renal medullary interstitial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Jun;284(6):F1207-15.
350. Friederich M, Fasching A, Hansell P, Nordquist L, Palm F. Diabetes-induced up-regulation of uncoupling protein-2 results in increased mitochondrial uncoupling in kidney proximal tubular cells. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jul-Aug;1777(7-8):935-40.
351. Persson MF, Franzen S, Catrina SB, Dallner G, Hansell P, Brismar K, et al. Coenzyme Q10 prevents GDP-sensitive mitochondrial uncoupling, glomerular hyperfiltration and proteinuria in kidneys from db/db mice as a model of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2012 May;55(5):1535-43.
352. Ward DT, Yau SK, Mee AP, Mawer EB, Miller CA, Garland HO, et al. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Apr;12(4):779-90.
353. Leyssac PP, Holstein-Rathlou NH, Skott O. Renal blood flow, early distal sodium, and plasma renin concentrations during osmotic diuresis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000 Oct;279(4):R1268-76.
354. De Vriese AS, Stoenoiu MS, Elger M, Devuyst O, Vanholder R, Kriz W, et al. Diabetes-induced microvascular dysfunction in the hydronephrotic kidney: role of nitric oxide. *Kidney Int.* 2001 Jul;60(1):202-10.
355. Leiter EH. Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Jan;79(2):630-4.
356. Doi K, Matsuzaki H, Tsuda T, Onodera T. Rapid development of renal lesions in diabetic DBA mice infected with the D-variant of encephalomyocarditis virus (EMC-D). *Br J Exp Pathol.* 1989 Jun;70(3):275-81.
357. Mathews CE, Langley SH, Leiter EH. New mouse model to study islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus. *Transplantation.* 2002 Apr 27;73(8):1333-6.

358. Doi T, Hattori M, Agodoa LY, Sato T, Yoshida H, Striker LJ, et al. Glomerular lesions in nonobese diabetic mouse: before and after the onset of hyperglycemia. *Lab Invest.* 1990 Aug;63(2):204-12.
359. Kanetsuna Y, Takahashi K, Nagata M, Gannon MA, Breyer MD, Harris RC, et al. Deficiency of endothelial nitric-oxide synthase confers susceptibility to diabetic nephropathy in nephropathy-resistant inbred mice. *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1473-84.
360. Kakoki M, Takahashi N, Jennette JC, Smithies O. Diabetic nephropathy is markedly enhanced in mice lacking the bradykinin B2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 7;101(36):13302-5.
361. Zheng S, Noonan WT, Metreveli NS, Coventry S, Kralik PM, Carlson EC, et al. Development of late-stage diabetic nephropathy in OVE26 diabetic mice. *Diabetes.* 2004 Dec;53(12):3248-57.
362. Caron KM, James LR, Lee G, Kim HS, Smithies O. Lifelong genetic minipumps. *Physiol Genomics.* 2005 Jan 20;20(2):203-9.
363. Haluzik M, Colombo C, Gavriloova O, Chua S, Wolf N, Chen M, et al. Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice. *Endocrinology.* 2004 Jul;145(7):3258-64.
364. Suto J, Matsuura S, Imamura K, Yamanaka H, Sekikawa K. Genetic analysis of non-insulin-dependent diabetes mellitus in KK and KK-Ay mice. *Eur J Endocrinol.* 1998 Dec;139(6):654-61.
365. Noonan WT, Banks RO. Renal function and glucose transport in male and female mice with diet-induced type II diabetes mellitus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000 Dec;225(3):221-30.
366. Prpic V, Watson PM, Frampton IC, Sabol MA, Jezek GE, Gettys TW. Differential mechanisms and development of leptin resistance in A/J versus C57BL/6J mice during diet-induced obesity. *Endocrinology.* 2003 Apr;144(4):1155-63.
367. Leiter EH, Reifsnyder PC. Differential levels of diabetogenic stress in two new mouse models of obesity and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004 Feb;53 Suppl 1:S4-11.
368. Brosius FC, 3rd, Alpers CE, Bottinger EP, Breyer MD, Coffman TM, Gurley SB, et al. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Dec;20(12):2503-12.
369. Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science.* 1966 Sep 2;153(3740):1127-8.
370. Breyer MD, Bottinger E, Brosius FC, 3rd, Coffman TM, Harris RC, Heilig CW, et al. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Jan;16(1):27-45.
371. Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Jun;284(6):F1138-44.
372. Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenti P. Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2002 Apr 11;346(15):1145-51.
373. Rosenberger C, Khamaisi M, Goldfarb M, Shina A, Shilo V, Zilbertrest F, et al. Acute kidney injury in the diabetic rat: studies in the isolated perfused and intact kidney. *Am J Nephrol.* 2008;28(5):831-9.
374. Rosenberger C, Rosen S, Shina A, Frei U, Eckardt KU, Flippin LA, et al. Activation of hypoxia-inducible factors ameliorates hypoxic distal tubular injury in the isolated perfused rat kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Nov;23(11):3472-8.
375. Bollee G, Flamant M, Schordan S, Fligny C, Rumpel E, Milon M, et al. Epidermal growth factor receptor promotes glomerular injury and renal failure in rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Nat Med.* 2011 Oct;17(10):1242-50.
376. Stevens LA, Nolin TD, Richardson MM, Feldman HI, Lewis JB, Rodby R, et al. Comparison of drug dosing recommendations based on measured GFR and kidney function estimating equations. *Am J Kidney Dis.* 2009 Jul;54(1):33-42.
377. Froissart M, Delanaye P, Seronie-Vivien S, Cristol JP. [Evaluation of renal function: an update]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2008 May-Jun;66(3):269-75.
378. Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, Ulvsback M, Lundwall A, Jensson O, et al. Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem J.* 1990 Jun 1;268(2):287-94.
379. Jacobsson B, Lignelid H, Bergerheim US. Transthyretin and cystatin C are catabolized in proximal tubular epithelial cells and the proteins are not useful as markers for renal cell carcinomas. *Histopathology.* 1995 Jun;26(6):559-64.

380. Poge U, Gerhardt T, Stoffel-Wagner B, Palmedo H, Klehr HU, Sauerbruch T, et al. Cystatin C-based calculation of glomerular filtration rate in kidney transplant recipients. *Kidney Int.* 2006 Jul;70(1):204-10.
381. Conti M, Moutereau S, Zater M, Lallali K, Durrbach A, Manivet P, et al. Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(3):288-91.
382. Manetti L, Pardini E, Genovesi M, Campomori A, Grasso L, Morselli LL, et al. Thyroid function differently affects serum cystatin C and creatinine concentrations. *J Endocrinol Invest.* 2005 Apr;28(4):346-9.
383. Bjarnadottir M, Grubb A, Olafsson I. Promoter-mediated, dexamethasone-induced increase in cystatin C production by HeLa cells. *Scand J Clin Lab Invest.* 1995 Nov;55(7):617-23.
384. Knight EL, Verhave JC, Spiegelman D, Hillege HL, de Zeeuw D, Curhan GC, et al. Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney Int.* 2004 Apr;65(4):1416-21.
385. Stevens LA, Coresh J, Schmid CH, Feldman HI, Froissart M, Kusek J, et al. Estimating GFR using serum cystatin C alone and in combination with serum creatinine: a pooled analysis of 3,418 individuals with CKD. *Am J Kidney Dis.* 2008 Mar;51(3):395-406.
386. Xu Y, Schnorrer P, Proietto A, Kowalski G, Febbraio MA, Acha-Orbea H, et al. IL-10 controls cystatin C synthesis and blood concentration in response to inflammation through regulation of IFN regulatory factor 8 expression. *J Immunol.* 2011 Mar 15;186(6):3666-73.
387. Martensson J, Martling CR, Oldner A, Bell M. Impact of sepsis on levels of plasma cystatin C in AKI and non-AKI patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2012 Feb;27(2):576-81.
388. Grubb A, Bjork J, Nyman U, Pollak J, Bengzon J, Ostner G, et al. Cystatin C, a marker for successful aging and glomerular filtration rate, is not influenced by inflammation. *Scand J Clin Lab Invest.* 2011 Apr;71(2):145-9.
389. Tangri N, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Beck GJ, Greene T, et al. Changes in dietary protein intake has no effect on serum cystatin C levels independent of the glomerular filtration rate. *Kidney Int.* 2011 Feb;79(4):471-7.
390. Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, Eckfeldt JH, Feldman HI, Greene T, et al. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl J Med.* 2012 Jul 5;367(1):20-9.
391. Hoek FJ, Korevaar JC, Dekker FW, Boeschoten EW, Krediet RT. Estimation of residual glomerular filtration rate in dialysis patients from the plasma cystatin C level. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Jun;22(6):1633-8.
392. Rule AD, Bergstralh EJ, Slezak JM, Bergert J, Larson TS. Glomerular filtration rate estimated by cystatin C among different clinical presentations. *Kidney Int.* 2006 Jan;69(2):399-405.
393. Eriksen BO, Mathisen UD, Melsom T, Ingebretsen OC, Jenssen TG, Njolstad I, et al. Cystatin C is not a better estimator of GFR than plasma creatinine in the general population. *Kidney Int.* 2010 Dec;78(12):1305-11.
394. Merkle M, Sauter M, Argirov M, Wornle M. Cystatin C and creatinine as markers for radiocontrast-induced nephropathy in patients treated with N-acetylcysteine. *Ren Fail.* 2010 Jan;32(1):85-90.
395. Wald R, Liangos O, Perianayagam MC, Kolyada A, Herget-Rosenthal S, Mazer CD, et al. Plasma cystatin C and acute kidney injury after cardiopulmonary bypass. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010 Aug;5(8):1373-9.
396. Soto K, Coelho S, Rodrigues B, Martins H, Frade F, Lopes S, et al. Cystatin C as a marker of acute kidney injury in the emergency department. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010 Oct;5(10):1745-54.
397. Kim BJ, Sung KC, Kim BS, Kang JH, Lee KB, Kim H, et al. Effect of N-acetylcysteine on cystatin C-based renal function after elective coronary angiography (ENABLE Study): a prospective, randomized trial. *Int J Cardiol.* 2010 Feb 4;138(3):239-45.
398. Briguori C, Visconti G, Rivera NV, Focaccio A, Golia B, Giannone R, et al. Cystatin C and contrast-induced acute kidney injury. *Circulation.* 2010 May 18;121(19):2117-22.
399. Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Husing J, Goring F, Pietruck F, Janssen O, et al. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int.* 2004 Sep;66(3):1115-22.
400. Zappitelli M, Krawczeski CD, Devarajan P, Wang Z, Sint K, Thiessen-Philbrook H, et al. Early postoperative serum cystatin C predicts severe acute kidney injury following pediatric cardiac surgery. *Kidney Int.* 2011 Sep;80(6):655-62.

401. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Ma Q, Bennett MR, Mockel M, et al. Novel biomarkers early predict the severity of acute kidney injury after cardiac surgery in adults. *Ann Thorac Surg.* 2009 Jul;88(1):124-30.
402. Chen TH, Chang CH, Lin CY, Jenq CC, Chang MY, Tian YC, et al. Acute kidney injury biomarkers for patients in a coronary care unit: a prospective cohort study. *PLoS One.* 2012;7(2):e32328.
403. Perianayagam MC, Seabra VF, Tighiouart H, Liangos O, Jaber BL. Serum cystatin C for prediction of dialysis requirement or death in acute kidney injury: a comparative study. *Am J Kidney Dis.* 2009 Dec;54(6):1025-33.
404. Slort PR, Ozden N, Pape L, Offner G, Tromp WF, Wilhelm AJ, et al. Comparing cystatin C and creatinine in the diagnosis of pediatric acute renal allograft dysfunction. *Pediatr Nephrol.* 2012 May;27(5):843-9.
405. Hasslacher J, Lehner GF, Joannidis M. Insufficient performance of serum cystatin C as a biomarker for acute kidney injury of postrenal etiology. *Intensive Care Med.* 2012 Jan;38(1):170-1.
406. Royakkers AA, Korevaar JC, van Suijlen JD, Hofstra LS, Kuiper MA, Spronk PE, et al. Serum and urine cystatin C are poor biomarkers for acute kidney injury and renal replacement therapy. *Intensive Care Med.* 2011 Mar;37(3):493-501.
407. Tsuda H, Isaka Y, Takahara S, Horio M. Discrepancy between serum levels of low molecular weight proteins in acute kidney injury model rats with bilateral ureteral obstruction and bilateral nephrectomy. *Clin Exp Nephrol.* 2009 Dec;13(6):567-70.
408. Snell-Bergeon JK, Maahs DM, Ogden LG, Kinney GL, Hokanson JE, Schiffer E, et al. Evaluation of urinary biomarkers for coronary artery disease, diabetes, and diabetic kidney disease. *Diabetes Technol Ther.* 2009 Jan;11(1):1-9.
409. Jaafar A, Seronie-Vivien S, Malard L, Massip P, Chatelut E, Tack I. Urinary cystatin C can improve the renal safety follow-up of tenofovir-treated patients. *AIDS.* 2009 Jan 14;23(2):257-9.
410. Lisowska-Myjak B. Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. *Blood Purif.* 2010;29(4):357-65.
411. Hudson C, Hudson J, Swaminathan M, Shaw A, Stafford-Smith M, Patel UD. Emerging concepts in acute kidney injury following cardiac surgery. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2008 Dec;12(4):320-30.
412. Koyner JL, Bennett MR, Worcester EM, Ma Q, Raman J, Jeevanandam V, et al. Urinary cystatin C as an early biomarker of acute kidney injury following adult cardiothoracic surgery. *Kidney Int.* 2008 Oct;74(8):1059-69.
413. Nejat M, Pickering JW, Walker RJ, Westhuyzen J, Shaw GM, Frampton CM, et al. Urinary cystatin C is diagnostic of acute kidney injury and sepsis, and predicts mortality in the intensive care unit. *Crit Care.* 2010;14(3):R85.
414. Herget-Rosenthal S, Poppen D, Husing J, Marggraf G, Pietruck F, Jakob HG, et al. Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clin Chem.* 2004 Mar;50(3):552-8.
415. Ma Y, Li Q, Wang J, Xu Z, Song C, Zhuang R, et al. Cystatin C, a novel urinary biomarker for sensitive detection of acute kidney injury during haemorrhagic fever with renal syndrome. *Biomarkers.* 2010 Aug;15(5):410-7.
416. Li J, Dunn W, Breaud A, Elliott D, Sokoll LJ, Clarke W. Analytical performance of 4 automated assays for measurement of cystatin C. *Clin Chem.* 2010 Aug;56(8):1336-9.
417. Grubb A, Blirup-Jensen S, Lindstrom V, Schmidt C, Althaus H, Zegers I. First certified reference material for cystatin C in human serum ERM-DA471/IFCC. *Clin Chem Lab Med.* 2010 Nov;48(11):1619-21.
418. Mussap M, Ruzzante N, Varagnolo M, Plebani M. Quantitative automated particle-enhanced immunonephelometric assay for the routinary measurement of human cystatin C. *Clin Chem Lab Med.* 1998 Nov;36(11):859-65.
419. Finney H, Newman DJ, Gruber W, Merle P, Price CP. Initial evaluation of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems (BNA, BN II). *Clin Chem.* 1997 Jun;43(6 Pt 1):1016-22.

420. Jensen AL, Bomholt M, Moe L. Preliminary evaluation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) for the determination of serum cystatin C-like immunoreactivity in dogs. *Vet Clin Pathol.* 2001;30(2):86-90.
421. Kyhse-Andersen J, Schmidt C, Nordin G, Andersson B, Nilsson-Ehle P, Lindstrom V, et al. Serum cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate. *Clin Chem.* 1994 Oct;40(10):1921-6.
422. Hansson LO, Grubb A, Liden A, Flodin M, Berggren A, Delanghe J, et al. Performance evaluation of a turbidimetric cystatin C assay on different high-throughput platforms. *Scand J Clin Lab Invest.* 2010 Sep;70(5):347-53.
423. Ishiguro H, Ohkubo I, Mizokami M, Titani K, Sasaki M. The use of monoclonal antibodies to define levels of cystatin C in normal human serum. *Hybridoma.* 1989 Jun;8(3):303-13.
424. Ristiniemi N, Qin QP, Lindstrom V, Grubb A, Pettersson K. Quantification of cystatin C by time-resolved fluorometry-based immunoassays. *J Immunol Methods.* 2012 Apr 30;378(1-2):56-61.
425. Voskoboev NV, Larson TS, Rule AD, Lieske JC. Importance of cystatin C assay standardization. *Clin Chem.* 2011 Aug;57(8):1209-11.
426. Meyer MH, Meyer RA, Jr., Gray RW, Irwin RL. Picric acid methods greatly overestimate serum creatinine in mice: more accurate results with high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1985 Jan;144(1):285-90.
427. Eisner C, Faulhaber-Walter R, Wang Y, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mizel D, et al. Major contribution of tubular secretion to creatinine clearance in mice. *Kidney Int.* 2010 Mar;77(6):519-26.
428. Lorenz JN, Gruenstein E. A simple, nonradioactive method for evaluating single-nephron filtration rate using FITC-inulin. *Am J Physiol.* 1999 Jan;276(1 Pt 2):F172-7.
429. Qi Z, Whitt I, Mehta A, Jin J, Zhao M, Harris RC, et al. Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Mar;286(3):F590-6.
430. Stechman MJ, Ahmad BN, Loh NY, Reed AA, Stewart M, Wells S, et al. Establishing normal plasma and 24-hour urinary biochemistry ranges in C3H, BALB/c and C57BL/6J mice following acclimatization in metabolic cages. *Lab Anim.* 2010 Jul;44(3):218-25.
431. Qi Z, Breyer MD. Measurement of glomerular filtration rate in conscious mice. *Methods Mol Biol.* 2009;466:61-72.
432. Dupuy V, Mayeur N, Buleon M, Jaafar A, Al Saati T, Schaak S, et al. Type 2 Diabetes Mellitus in Mice Aggravates the Renal Impact of Hemorrhagic Shock. *Shock.* 2012 Jul 18.
433. Song S, Meyer M, Turk TR, Wilde B, Feldkamp T, Assert R, et al. Serum cystatin C in mouse models: a reliable and precise marker for renal function and superior to serum creatinine. *Nephrol Dial Transplant.* 2009 Apr;24(4):1157-61.
434. Aikawa E, Aikawa M, Libby P, Figueiredo JL, Rusanescu G, Iwamoto Y, et al. Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation.* 2009 Apr 7;119(13):1785-94.
435. Komura N, Kihara S, Sonoda M, Maeda N, Tochino Y, Funahashi T, et al. Increment and impairment of adiponectin in renal failure. *Cardiovasc Res.* 2010 Jun 1;86(3):471-7.
436. Wang HZ, Peng ZY, Wen XY, Rimmele T, Bishop JV, Kellum JA. N-acetylcysteine is effective for prevention but not for treatment of folic acid-induced acute kidney injury in mice. *Crit Care Med.* 2011 Nov;39(11):2487-94.
437. Sourris KC, Harcourt BE, Tang PH, Morley AL, Huynh K, Penfold SA, et al. Ubiquinone (coenzyme Q10) prevents renal mitochondrial dysfunction in an experimental model of type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2012 Feb 1;52(3):716-23.
438. Liu Y, El-Achkar TM, Wu XR. Tamm-horsfall protein regulates circulating and renal cytokines by affecting glomerular filtration rate and acting as a urinary cytokine trap. *J Biol Chem.* 2012 May 11;287(20):16365-78.
439. Emeigh Hart SG. Assessment of renal injury in vivo. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2005 Jul-Aug;52(1):30-45.

Abstract

Acute renal failure (ARF) is an independent mortality marker in numerous medical or surgical pathologies. The leading cause of organic ARF is ischemic acute tubular necrosis. The lack of efficacy in humans of therapeutic yet successfully tested in animals may be related to the deficiencies in experimental models of tubular necrosis. Indeed, these models (renal artery clamping, massive dose of tubulo-toxic drugs) propose a caricatural mechanism of ARF and prevent any physiological mechanism of adaptation. Our goal was to develop, in mice, a new model of ARF induced by pressure controlled hemorrhagic shock and to decipher its kidney impact. We initially developed the model of hemorrhagic shock and showed that two hours shock duration at 35 mmHg of mean arterial pressure is likely to create an organic ARF. Then, we tested the impact of this shock on kidney and observed a molecular and functional impact predominant between day (D) 2 and D6 after shock but still present at D21 with renal fibrosis and renal tubular dysfunction. The existence of renal hypoxia in the aftermath of shock led us to study its impact in a population of obese type 2 diabetic mice (db/db). We have indeed confirmed that diabetic mice kidneys already exhibit hypoxia before any aggression and that hemorrhagic shock led to a more severe functional impact and a different response to hypoxia in diabetic mice. At least, because evaluating glomerular filtration (GFR) in mice is hazardous, we have performed a correlation study between the historical markers (serum creatinin, plasma urea), cystatin c and measured GFR. We have confirmed that neither urea nor creatinin obtained by the colorimetric technique are reliable markers in mice. Nevertheless, creatinin obtained by immuno colorimetric assay and particularly cystatin C are better correlated with measured GFR. Altogether, we have described a new model of ARF in two different mice populations: control C57/B16 and type 2 diabetic obese mice. We also highlight that cystatin C in mice is more accurate for estimating GFR than historical markers (serum creatinin by the colorimetric technique and plasma urea).

AUTEUR : Dr Nicolas MAYEUR

TITRE DE LA THESE : Caractérisation de l'impact rénal à court et à long terme du choc hémorragique expérimental murin

DIRECTEURS DE THESE : Pr Ivan tack et Pr Vincent Minville

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : le 24 octobre 2012 à Toulouse

RESUME

La présence d'une insuffisance rénale aiguë (IRA) est un marqueur indépendant de surmortalité dans de nombreuses pathologies médico-chirurgicales. La première cause d'IRA organique est la nécrose tubulaire aiguë ischémique (NTAI). L'absence d'efficacité, chez l'Homme, des thérapeutiques pourtant testées avec succès chez l'animal pourrait être liée aux carences des modèles expérimentaux de nécrose tubulaire. En effet, ces modèles (clampage artère rénale, dose massive de drogues tubulo-toxiques) proposent une approche caricaturale de l'IRA qui prévient tout mécanisme physiologique d'adaptation. Notre objectif était d'élaborer un nouveau modèle d'IRA par choc hémorragique à pression contrôlée chez la souris C57/B16 et d'en étudier les conséquences rénales. Nous avons dans un premier temps mis au point le modèle de choc hémorragique et montré qu'une durée de choc de deux heures à 35 mmHg de pression artérielle moyenne est susceptible de créer une IRA par NTAI. Nous avons dans un deuxième temps étudié les répercussions rénales de ce choc et ainsi observé un impact fonctionnel moléculaire et structural prédominant entre le 2^{ème} jour (J) et J6 en post choc mais persistant à J21 avec la mise en évidence d'une fibrose rénale et d'anomalies fonctionnelles physiologiques tubulaires rénales. L'existence d'une hypoxie rénale dans les suites du choc nous a amené à étudier son impact dans une population de souris diabétiques de type 2 obèse (db/db). Nous avons en effet confirmé que les reins de souris diabétiques présentaient une hypoxie avant toute agression et que le choc hémorragique aboutissait à un impact fonctionnel plus sévère et une réponse à l'hypoxie différente chez les souris diabétiques. Enfin, la difficulté d'évaluation de la fonction de filtration rénale chez le muridé nous a conduits à effectuer une étude de corrélation entre les marqueurs historiques (créatininémie, urée plasmatique), la cystatine C et le gold standard (la clearance de l'inuline plasmatique) chez 80 souris. Dans cette note technique située en annexe, nous avons pu confirmer que ni l'urée ni la créatininémie par la technique colorimétrique n'étaient des marqueurs fiables chez la souris. La créatininémie par la technique immunoenzymatique et surtout la cystatine c sont mieux corrélées au DFG évalué par la clearance de l'inuline. Au total nous avons décrit un nouveau modèle d'agression rénale chez des souris sauvages C57/B16 et une population de souris diabétiques de type 2. Nous avons également mis en évidence l'intérêt de la cystatine C chez la souris en tant que marqueur d'estimation du DFG a contrario des marqueurs historiques (créatininémie par la technique colorimétrique et urée plasmatique).

MOTS CLEFS : choc hémorragique, insuffisance rénale aiguë, diabète, hypoxie, cystatine C

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Physiopathologie en Réanimation

Cette Thèse a été réalisée au sein de l'I2MC (équipe INSERM n°12) et du Laboratoire de Physiologie de la Faculté de Médecine de Rangueil à TOULOUSE