



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 4438](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/4438)

To cite this version :

GIMIE, Fanny. *Evaluation des ARNm circulant sanguins comme nouveaux biomarqueurs de néphrotoxicité chez le rat*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2010, 111 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

Evaluation des ARNm circulants sanguins comme nouveaux biomarqueurs de néphrotoxicité chez le rat

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement le 8 décembre 2010
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Fanny GIMIE

Née, le 16 septembre 1985 à Le Port (La Réunion)

Directeur de thèse : Mme le Professeur Martine Kolf-Clauw

JURY

PRESIDENT :

M. Christian Virenque

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

Mme Martine Kolf-Clauw

Mme Nathalie Bourges-Abella

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

Docteur Stéphane Lezmi

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires : M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

NEGRE	M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES
	M. C. LABIE	M. JF. GUEIFI	M. DORCHIES
	M. C. PAVAU	M. ECKHOUTTE	
	M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
	M. A. RICO	M. CABANIE	
	M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
	Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

**PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE**

M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 1°
CLASSE**

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 2°
CLASSE**

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*

Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

**MAITRES DE CONFERENCES ET AGENTS
CONTRACTUELS**

- M. **IRUBETAGOYENA Iban**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **SOUBIES Sébastien**, *Microbiologie et infectiologie*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
CONTRACTUELS**

- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
- Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
- Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

Remerciements

A notre Président de thèse,

A Monsieur le Professeur Christian VIRENQUE

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Anesthésiologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude.

A notre Jury de thèse,

A Madame le Professeur Martine KOLF-CLAUW

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Toxicologie

Qui nous a fait l'honneur d'encadrer ce travail et de nous guider au cours de sa réalisation,
Sincères reconnaissances.

A Madame le Docteur Nathalie BOURGES-ABELLA

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Histologie, Anatomie-pathologique

Pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de notre jury de thèse,
Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Stéphane LEZMI

Anatomo-pathologiste à Sanofi-Aventis

Qui nous a fait l'honneur de prendre part à notre jury de thèse. Pour sa disponibilité, sa pédagogie et son soutien tout au long de ce travail, très sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Jean-Sylvain Beaufilets, *Responsable du service de Pathologie Clinique* sanofi-aventis sur le site R&D de Porcheville, merci de m'avoir fait bénéficier de votre passion pour la recherche et de m'avoir encouragée dans des moments de doute.

A l'équipe de sanofi-aventis R&D de Porcheville

A Monsieur **Jean-Daniel Finck**, Directeur du site Porcheville, pour m'avoir accueillie au sein de l'entreprise et Monsieur **Philippe Detilleux**, Directeur du département DSE (Drug Safety Evaluation) pour son accueil au sein du département. J'adresse toute ma gratitude à **Patricia Lafouge**, responsable du groupe des Opérations qui m'a permis d'effectuer mon stage au sein de ce service.

Je remercie chacune des laborantines du service de biologie clinique, **Catherine Cohin**, **Christelle Gomez-Henry**, **Silvana Isambourg**, **Carole Taravellier**, pour leur accueil chaleureux, leur bonne humeur et toute l'attention qu'elles m'ont portée durant ces 10 mois. Grâce à vous, l'adaptation fut très rapide, j'ai pu tisser des liens beaucoup plus que professionnels, vous êtes ma famille sanofienne.

Je remercie **Elsa Arrivet** et **Michel Kerbrat** du service de toxicogénomique. Merci de m'avoir tout appris sur la biologie moléculaire et pour tout le temps que vous m'avez consacré.

Je remercie **Lionel Guerecheau**, sans qui je n'aurais rien pu faire. Merci d'être resté tard parfois pour mes études et d'avoir pu partager la passion des chiens.

Je remercie également **toutes les équipes du site sanofi-aventis de Porcheville**, pour votre accueil, la disponibilité que vous m'avez accordée, les bons conseils et la chaleureuse ambiance.

Dédicaces

A ma petite famille,

Merci à la meilleure des Mama pour ta patience et pour tout le temps que tu m'as consacré, tu m'as toujours fait confiance dans mes choix et toujours su m'orienter quand j'étais perdue, je t'aime très fort ;

A mon tonton préféré, merci pour ton oreille attentive à mes petits soucis de cœur, tu as toujours réussi à me faire relativiser quand j'étais paniquée ;

A mes frères, pour votre protection et pour vos encouragements, à notre belle complicité (zaama !) ;

A mes belles-sœurs, pour m'avoir soutenue et pour vos bons conseils ;

A Lisa et Jeanne, les petites lumières de la famille.

A ma famille marocaine,

A mon papa, malgré la distance je sais que tu as toujours cru en moi et que tu seras là quoi qu'il arrive, tu me manques ;

A Aziza pour tes encouragements et ton soutien ;

A mes petits amours Ilias et Selma, votre grande sœur veillera toujours sur vous.

A mes grands parents,

A ma Manou chérie, je t'aime très fort et j'espère que tu arriveras à trouver la force de venir me voir à la Réunion ! A Christian, merci pour ton soutien dans mes études depuis le départ.

A Dédé, pour m'avoir soutenue dans mon parcours et l'intérêt que tu y as porté. A Gigi pour toutes les ondes positives que tu m'as transmises, tu as contribué au succès du concours j'en suis sûre.

A mes amis vétérinaires,

A tous mes amis vétérinaires de la promo Gellé-Desnoyers en particulier Anaïs, merci de nous faire rêver avec tes aventures et tes histoires de dingue en Namibie, je suis tellement fière de toi ! ; Aurélie, je me souviens encore de la file d'attente lors de l'inscription (c'est là que tout a commencé !) ; Elsa, merci d'avoir permis de réaliser une de mes envies les plus chères, maintenant on va pouvoir profiter à fond de cette île merveilleuse ; Marielle, merci

pour ton écoute et ton énergie débordante (ménage tes coups quand même...) ; Fanny G., nos petits moments de toutouyoutou me manquent ; Fanny D., je veux encore faire des booms réconcils avec toi ! ; Eugénie, pour ta passion de l'aventure et des horizons nouveaux ; Nelly, à très bientôt sous les cocotiers ! ; Guillaume, à nos bonnes soirées arrosées (surtout la prise de la barricade) et au wyki koka ; Hélène, à ta bonne humeur.

A tous mes poulots qui sont déjà bien grands (j'ai toujours été la plus « mini-pouce » des docteurs j'avoue...).

A ma Virg, notre amitié ne changera jamais tu le sais, merci de me communiquer à chaque fois ta joie de vivre et ton optimisme, on a fait ensemble les plus grandes folies, on a toute la vie devant nous pour changer le monde ! Aaaaah si !

A mes amis de la prépa BCPST Ozenne promo 2003-2005 en particulier Ben, à notre amitié et à notre futur Riad doré au Maroc ; Marie, à notre envie commune de découvrir des cultures nouvelles (surtout la chaleur latine !) ; Loulou, malgré tes neurones en moins tu sais que je t'adore ; Timothée et ton nouveau laboratoire de mojitos ; Cam ; Jen ; Madou ; Matthieu ; Nico, à tous les bons moments passés et le soutien collectif dans les périodes difficiles.

Aux rabastinois, à votre ville qui restera pour moi la plus belle du monde ! Je remercie en particulier Clem, pour ton appart si cosy où j'ai pu rédiger la plus grande partie de cette thèse ! Je n'oublierai jamais cet été 2010 chez toi, et tout particulièrement les paquis d'à côté et le goût des chocapics périmés.

A la RDP (alias Melrose Place), à nos apéros quotidiens qui m'ont aidé à écrire ces dédicaces ! A nos grandes soirées folles, aux bons moments que nous allons partager, nous avons tout l'avenir devant nous pour profiter à fond de ce petit coin de paradis.

A toutes les personnes qui ont cru en moi.

Sommaire

Remerciements	9
Dédicaces	11
Sommaire	13
Liste des abréviations	17
Table des illustrations.....	19
INTRODUCTION.....	21
Première partie : contexte scientifique	23
I- Physiologie et toxicité rénale.....	25
<i>I.1 Structure et fonction</i>	25
I.1.1 Structure macroscopique	25
I.1.2 Structure microscopique	27
I.1.3 Fonction rénale	30
<i>I.2 Néphrotoxicité</i>	31
I.2.1 Néphropathies d'origine toxique : définition générale	31
I.2.2 Lésions histologiques et agents toxiques	32
I.2.3 Les aminosides : un modèle de néphrotoxicité	34
II- Biomarqueurs de néphrotoxicité	37
<i>II.1 Biomarqueurs validés</i>	37
II.1.1 Analyse urinaire	37
II.1.2 Urémie	38
II.1.3 Créatininémie	38
II.1.4 Autres Modifications	38
II.1.5 Limites des analyses	39
<i>II.2 Les nouveaux biomarqueurs de néphrotoxicité</i>	40
II.2.1 Nécessité de nouveaux biomarqueurs pour l'exploration rénale	40
II.2.2 Biotechnologies et biomarqueurs : généralités	40
II.2.3 Nouveaux biomarqueurs	41
II.2.4 Identification des différents segments du néphron	48
<i>II.3 Les limites de la protéomique</i>	49
III. Les ARNm circulants, nouveaux biomarqueurs potentiels.....	51
<i>III.1 Les avancées techniques en biologie moléculaire</i>	51
III.1.1 Extraction dans les tissus	51

III.1.2 Extraction dans le sang	51
<i>III.2 Application clinique</i>	52
III.2.1 Virologie	52
III.2.2 Cancérologie	53
III.2.3 Test pré-natal	53
III.2.4 Diagnostic maladie métabolique	54
<i>III.3 Nouvelle approche : ARNm plasmatiques comme nouveaux biomarqueurs de toxicité</i>	54
Deuxième partie : expérimentations.....	57
I. ETUDES PRELIMINAIRES SUR L'HEPATOTOXICITE	59
<i>I.1 Objectifs : Mise en place d'un protocole d'extraction</i>	59
<i>I.2 Matériel et méthode : cinétique de dosage des ARNm d'albumine avec un seul traitement à l'acétaminophène</i>	60
I.2.1 Animaux	60
I.2.2 Traitement	60
I.2.3 Prélèvements	60
I.2.4 Analyse biochimique plasmatique	61
I.2.5 Anatomie pathologique et examens histologiques	61
I.2.6 Extraction et quantification des ARN	62
I.2.7 RT-PCR semi quantitative en temps réel Taqman	62
I.2.8 Analyse des résultats	63
<i>I.3 Résultats</i>	63
I.3.1 Biochimie et histologie	63
I.3.2 Dosage des ARNm d'albumine dans le sang	66
II. ETUDE PRINCIPALE	69
<i>II.1 Objectifs</i>	69
<i>II.2 Matériels et méthodes</i>	69
II.2.1 Animaux	69
II.2.2 Traitement	69
II.2.3 Prélèvements	70
II.2.4 Analyses biochimiques plasmatiques	71
II.2.5 Analyse urinaire	71
II.2.6 Anatomie pathologique et examens histologiques	71
II.2.7 Extraction et quantification des ARN	71
II.2.8 RT-PCR semi-quantitative en temps réel TaqMan	72
II.2.9 Analyse des résultats	73
<i>II.3 Résultats</i>	73

II.3.1 Biochimie et histologie	73
II.3.2 Dosage des ARNm	77
III. DISCUSSION	83
<i>III.1 Etude préliminaire sur l'hépatotoxicité</i>	83
<i>III.2 Etude principale</i>	84
<i>Corrélations et comparaison des résultats biochimiques, histologiques et du dosage des ARNm dans les reins</i>	84
<i>Modification de l'expression des ARNm du rein en fonction de la durée du traitement</i>	87
<i>Les ARNm circulants sanguins</i>	88
<i>Dosages des ARNm sanguins versus dosages immunologiques des protéines urinaires : Comparaison avec une étude du consortium (Guffroy et al. 2010)</i>	89
<i>Limites de notre modèle d'étude sur la néphrotoxicité</i>	89
IV. PERSPECTIVES	91
Bibliographie.....	93
Annexes	97
Annexe 1 : Protocoles expérimentaux : Extraction des ARN des tissus, Traitements à la DNase et Synthèse du cDNA	97
Annexe 2 : Electrophorèse capillaire (Bioanalyser).....	101
Annexe 3 : Interprétation des résultats Taqman : calcul du $\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen 2001; Schmittgen and Livak 2008)	105
Annexe 4 : données individuelles biochimiques et histologiques de l'étude sur l'acétaminophène	107
Annexe 5 : Résultats de biologie moléculaire de l'étude à l'acétaminophène	109
Annexe 6 : Résultats de biologie moléculaire de la gentamicine	111

Liste des abréviations

α -GST :	α -Glutathion-S-Transférase
ADN :	Acide Desoxyribonucléique
ADNc :	Acide Desoxyribonucléique complémentaire
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
ARNtt :	Acides Ribonucléiques totaux
ALT :	Alanine Amino Transférase
AST :	Asparate Amino Transférase
CEPAL :	Comité d’Ethique Pour Les Animaux de Laboratoire
DNase :	Désoxyribonucléase
DSE :	Drug Safety Evaluation
EDTA :	Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
EMA :	European Medicines Agency
FDA :	Food and Drug Administration
IRA :	Insuffisance rénale aigüe
IRC :	Insuffisance rénale chronique
R&D :	Recherche et Développement
RIN :	RNA Integrity Number
RNase :	Ribonucléase
RNase free :	Absence de Ribonucléases
RT-PCR :	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Table des illustrations

Figure 1 : Les différentes régions du rein et du néphron

Figure 2 : Schéma de la vascularisation rénale

Figure 3 : Schéma des tubules rénaux

Figure 4 : Exemples d'agents néphrotoxiques

Figure 5 : Tableau récapitulatif des neuf biomarqueurs sélectionnés pour l'étude

Figure 6 : Schéma des différents segments tubulaire et expression des biomarqueurs

Figure 7 : Schéma illustrant le concept de la détection d'ARNm spécifiques d'un organe dans le sang circulant comme nouveau biomarqueur de toxicité (exemple du cœur et du foie)

Figure 8 : Doses et animaux correspondants à chaque lot (étude acétaminophène)

Figure 9 : Répartition des animaux selon le temps de prélèvement (étude acétaminophène)

Figure 10 : Les différentes étapes pour quantifier les ARNm

Figure 11 : Résultats des analyses biochimiques plasmatiques et des observations histologiques (* = $p < 0.05$ vs contrôle)

Figure 12 : illustration des lésions hépatiques (objectif 20)

Figure 13 : Valeurs des Ct pour chaque échantillon

Figure 14 : Doses et animaux correspondants à chaque lot (étude gentamicine)

Figure 15 : Numéros des rats par lots et par période de traitement (étude gentamicine)

Figure 16 : Numéro des animaux utilisés pour extraction ARN des reins

Figure 17 : Résultats biochimiques plasmatiques et urinaires (* = $p < 0.05$ vs contrôle)

Figure 18 : Illustrations des lésions corticales rénales

Figure 19 : a : Représentation des $\Delta\Delta Ct$ des biomarqueurs à 25 mg/kg/j

b : Représentation des $\Delta\Delta Ct$ des biomarqueurs à 75 mg/kg/j

Figure 20 : Synthèse des modifications observées par lots traités en biochimie, histologie et quantification d'ARNm dans les reins et le sang

Figure 21 : Synthèse des biomarqueurs significatifs dans le rein et le sang chez les lots traités en fonction des durées de traitements

INTRODUCTION

Dans l'industrie pharmaceutique, le département DSE (Drug Safety Evaluation) contribue à rechercher et étudier les éventuels effets toxiques ou indésirables des produits en développement.

Dans le cadre des différentes études de sécurité réalisées lors de la conception et le développement des médicaments, il est essentiel de disposer de biomarqueurs de toxicité dans le but de prédire au plus tôt le risque d'apparition de défaillances fonctionnelles. Ce besoin est nécessaire lors des étapes précliniques chez l'animal afin d'assurer la sécurité des patients lors des premières phases cliniques. Ainsi la recherche de nouveaux biomarqueurs de toxicité fait partie des activités du département DSE en toxicologie. D'ailleurs, les autorités publiques appuient le développement de nouveaux biomarqueurs en organisant des consortiums comme par exemple le PSTC (Predictive Safety Testing Consortium), avec la participation de la FDA et de son homologue européen EMEA, qui regroupent plusieurs laboratoires pharmaceutiques dont sanofi-aventis.

La toxicité rénale est une des plus fréquemment rencontrées dans les études en toxicologie provoquant souvent l'arrêt de développement de certains composés. Pour cela l'histologie pathologique accompagnée de mesures biochimiques telles la créatinine et l'urée plasmatique sont les paramètres utilisés. Cependant le rein est un organe qui compense parfaitement lorsqu'il est lésé et la créatinine n'augmente que dans les derniers stades des lésions rénales (marqueur fonctionnel et non lésionnel). D'autre part l'urée varie selon d'autres critères extra rénaux et n'est pas spécifique du rein (Kaneko et al. 1997).

La recherche de nouveaux biomarqueurs en néphrotoxicité est le sujet sur lequel j'ai travaillé au sein de la structure Recherche et Développement sanofi-aventis à Porcheville. Pour cela, nous avons exploré une piste nouvelle qui est celle de l'utilisation des ARNm circulant dans le sang, comme marqueurs de nécrose tissulaire. Nous avons évalué le dosage dans le sang des ARNm libres de certaines protéines rénales comme potentiels biomarqueurs de toxicité rénale sur un modèle de traitement de rats à la gentamicine, connue pour sa néphrotoxicité.

Dans un premier temps, cette thèse reprend les notions de physiologie et toxicité rénale, puis décrit le contexte scientifique actuel concernant les nouveaux biomarqueurs en néphrotoxicité. Enfin nous verrons l'utilisation récente des ARNm dans ce domaine.

Dans un deuxième temps, nous présenterons les protocoles élaborés pour évaluer les ARNm comme nouveaux biomarqueurs en hépatotoxicité tout d'abord, puis en néphrotoxicité en dosant les ARNm de neuf biomarqueurs rénaux.

Enfin nous présenterons les résultats obtenus puis nous les interpréterons et discuterons de leurs limites.

Première partie : contexte scientifique

I- Physiologie et toxicité rénale

Dans cette partie, nous rappelons tout d'abord le fonctionnement normal du rein pour pouvoir ensuite décrire et comprendre les mécanismes physiopathologiques induits lors d'une toxicité en prenant l'exemple de celle des aminosides.

I.1 Structure et fonction

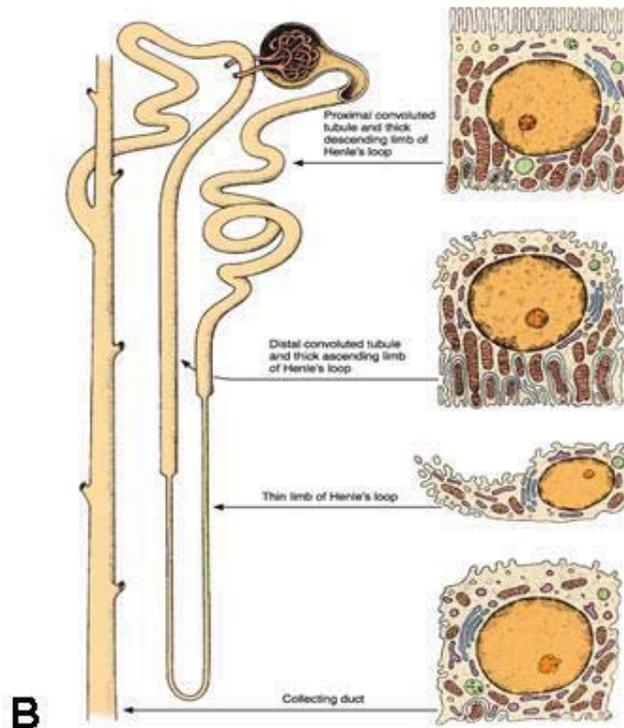
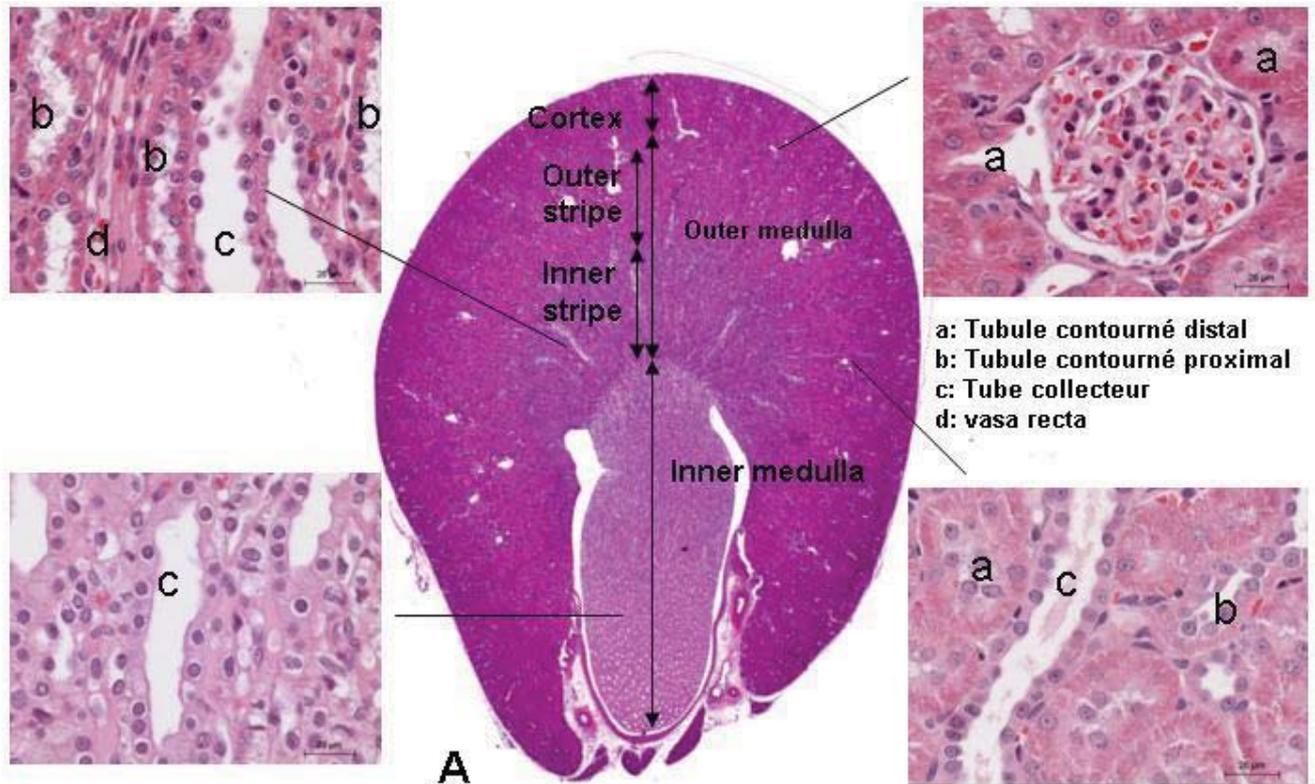
I.1.1 Structure macroscopique

Les reins sont organisés en lobules, chaque lobule est une collection de néphrons qui sont séparés par les raies médullaires. Ils sont recouverts d'une capsule fibreuse.

Le parenchyme rénal est divisé en deux zones concentriques de teintes et de textures différentes : le cortex en périphérie, et la médulla, située plus profondément dans le rein (Mc Gavin and Zachary 2006).

La médulla (*medulla renis*) a un aspect rayonnant : elle est parcourue par des stries radiaires correspondant aux différents tubules rénaux. On peut distinguer deux parties dans cette médulla (figure 1A).

La vascularisation sanguine du rein est assez complexe. Les artères rénales sont des collatérales importantes de l'aorte abdominale qui reçoivent environ un quart du débit cardiaque. Chacune d'elle se divise en plusieurs branches avant le hile du rein puis se ramifient en artères interlobaires dans le sinus rénal (Kierszenbaum 2002). Elles pénètrent dans le parenchyme en direction du cortex, en s'infiltrant entre les pyramides rénales (étape 1, figure 2). Parvenues à la limite cortico-médullaire, elles émettent les artères arciformes qui cheminent le long de cette zone de jonction sans qu'il n'y ait d'anastomose entre elles (étape 2, figure 2).



Caractéristiques cellulaires :

Forme cubique
Bordure en brosse en zone apicale
Cytoplasme granuleux
Nombreuses mitochondries en zone basale

Forme cubique
Nombreuses mitochondries
Invaginations de la membrane basolatérale

Forme aplatie et fine
Pauvre en mitochondrie

Forme cubique
Cytoplasme légèrement granuleux

Figure 1 : les différentes régions du rein et du néphron. A : images de coupe transversale de rein de rat mâle (coloration hémalum éosine).

B : représentation schématique du néphron et des cellules rénales

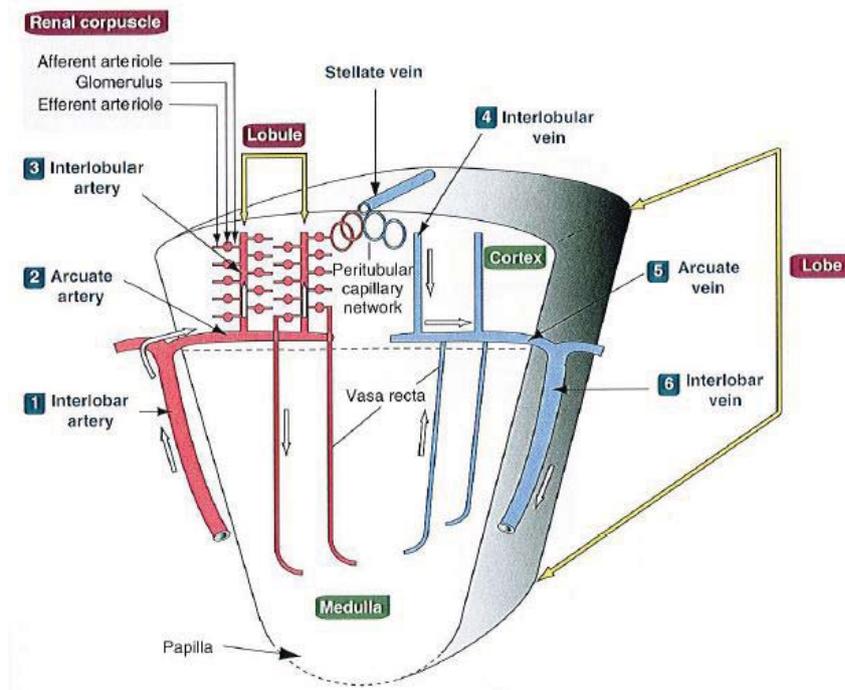


Figure 2: Schéma de la vascularisation rénale (Kierszenbaum, 2002)

De ces rameaux artériels arciformes partent les artères interlobulaires qui s'irradient dans le cortex, en direction de la surface du rein (étape 3, figure 2). Leurs dernières ramifications, les artérioles glomérulaires afférentes, donnent naissance aux glomérules rénaux dans le labyrinthe. Les branches capillaires du glomérule sont reprises par l'artériole glomérulaire efférente qui à son tour se résout en un riche réseau capillaire autour des différents segments tubulaires du néphron.

L'ensemble de ces vaisseaux droits, les « vasa recta » présente une configuration semblable à celle d'une épingle à cheveux dans la mesure où ils évoluent parallèlement au tube urinaire.

Le retour veineux est assuré par les veines interlobulaires (étape 4, figure 2) puis par les veines arciformes, arcs veineux volumineux situés à la limite du cortex et de la médullaire (étape 5, figure 2). Elles se prolongent par les veines interlobaires (étape 6, figure 2) puis par la veine rénale dont le trajet est superposable à celui des artères.

I.1.2 Structure microscopique

Le néphron représente l'unité fonctionnelle du rein : il joue un rôle de filtre plasmatique, participe au maintien de l'équilibre hydroélectrolytique et assure l'élimination des déchets de l'organisme dans l'urine (Lameire 2007). Replié sur lui-même en épingle à cheveux, il est caractérisé structurellement par un corpuscule rénal, encore appelé corpuscule

de Malpighi, un tube contourné proximal, une anse de Henlé avec ses branches descendantes et ascendantes, larges et grêles, et un tube contourné distal (figure 3). Le rat possède 3 000 néphrons par rein.

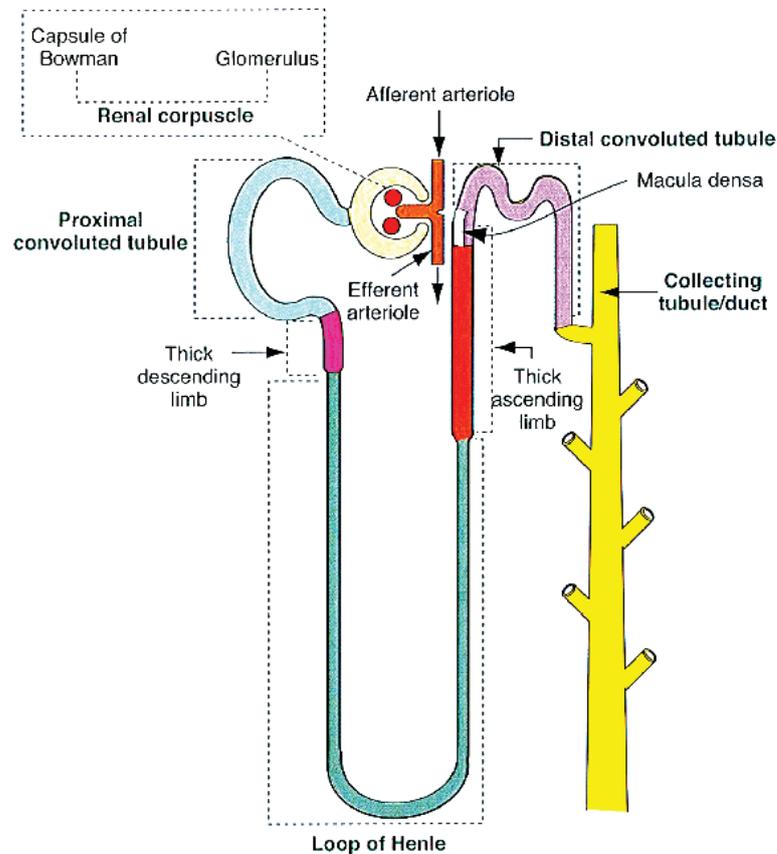


Figure 3: Schéma des tubules rénaux (Kierszenbaum 2002)

I.1.2.1 Filtration glomérulaire

Strictement défini, le glomérule (ou flocculus) est un peloton de quatre à cinq anses capillaires anastomosées entre elles, entre lesquelles sont disposées les cellules conjonctives du mésangium. Le peloton vasculaire est entouré par une membrane, la membrane basale glomérulaire (Lameire and Jacob 2007).

La capsule de Bowman est une enveloppe périphérique, refermée sur le glomérule. Elle est constituée de deux feuillets avec la chambre glomérulaire au milieu. Les podocytes sont les cellules du feuillet viscéral.

La fonction du glomérule est de filtrer le sang des capillaires glomérulaires et de former l'urine primitive, également appelée ultra-filtrat (Mc Gavin and Zachary 2006).

La barrière de filtration des glomérules est composée de trois couches :

- l'endothélium fenêtré des capillaires pourvu de petits pores de 50 à 100 nm, permettant le passage de substances comme l'eau, l'urée, le glucose, les petites protéines ; mais empêche le passage de cellules sanguines et des macromolécules dont le poids moléculaire est supérieur à 68000 Da ;
- la lame basale ne permettant pas le passage de protéines anioniques ;
- les fentes de filtration formées par les podocytes qui empêchent le passage de petites protéines.

De plus il existe dans ce filtre une restriction liée à la charge électrique des glycoprotéines polyanioniques de surface recouvrant les structures de la barrière capillaire. Les molécules chargées positivement ou neutres sont filtrées plus facilement.

I.1.2.2 Système tubulaire

Le système tubulaire est une succession de tubules qui conduisent l'urine du glomérule au tube collecteur (figure 3). Le passage par les tubules rénaux permet notamment la réabsorption d'une grande partie de l'eau filtrée par le glomérule ainsi que la sécrétion et la réabsorption de certaines molécules. Le système tubulaire peut-être divisé en plusieurs parties qui prennent en compte les différences de structure histologique et de fonction des segments concernés (Mc Gavin and Zachary 2006).

- Le tubule proximal : segment le plus long et le plus large du néphron (Lameire and Jacob 2007), il est situé uniquement dans le cortex. Les cellules, les néphrocytes, sont munies d'une bordure en brosse apicale (figure 1), indicatrice d'une fonction d'absorption. Les trois quarts de l'ultrafiltrat glomérulaire sont récupérés dans cette partie du néphron. De cette façon 70% de l'eau, du glucose, du potassium, du sodium et du chlore y sont réabsorbés (Vaubourdolle 2007).
- Les branches grêles de l'anse de Henlé : grâce à sa disposition en épingle à cheveux (figure 1), cette partie joue un rôle fondamental dans le processus de concentration-dilution des urines (Vaubourdolle 2007). Le segment descendant est perméable à l'eau mais moins à l'urée et au chlorure de sodium NaCl, ce qui crée une urine hyper osmotique au niveau de l'anse de Henlé. Le segment ascendant est imperméable à l'eau mais les ions sodium et chlorure sont réabsorbés par des pompes ATPase vers le

milieu interstitiel médullaire, formant une urine hypo osmotique à l'entrée du tubule distal.

- Le tubule distal : Ce tubule comprend à la fois la branche ascendante large de l'anse de Henlé qui remonte de façon rectiligne jusque dans le rayon médullaire du cortex et le tube contourné distal qui revient au contact du glomérule (appareil juxtaglomérulaire) avant de déboucher dans le tube collecteur (figure 1). On retrouve, les caractères de cellules actives, aptes aux échanges entre les milieux urinaires et sanguins. Cette portion tubulaire est relativement perméable à l'eau. La réabsorption des ions sodium du liquide tubulaire a lieu à cet endroit, sous contrôle de l'aldostérone.

- Le tube collecteur : la portion droite draine plusieurs néphrons. Il traverse la partie radiée du cortex et plonge dans la médulla. Plusieurs tubes collecteurs fusionnent ensuite en des tubes plus larges, les conduits papillaires, qui débouchent dans la lumière du bassinot au niveau de l'aire criblée.

I.1.3 Fonction rénale

Elle se résume en cinq points essentiels (Mc Gavin and Zachary 2006) :

- Formation de l'urine et élimination des déchets métaboliques ;
- Régulation acido-basique à travers la récupération des bicarbonates lors de la filtration glomérulaire ;
- Réabsorption hydrique à travers les tubules par l'action concomitante de divers mécanismes : la réabsorption au niveau du tubule proximal et de l'anse de Henlé, l'activité de l'hormone antidiurétique sur le tubule distal, et le gradient de l'urée dans la médulla. Le système tubulaire est capable de récupérer 99% de l'eau filtrée par le glomérule.
- Maintenance de la concentration potassique extracellulaire grâce à la réabsorption passive du tubule proximal et à la sécrétion du tubule distal sous l'influence de l'aldostérone.
- Fonction endocrinienne avec trois axes hormonaux : le système rénine angiotensine, l'érythropoïétine et la vitamine D. L'érythropoïétine est synthétisée dans le rein par les cellules endothéliales juxtaglomérulaires lors d'une hypoxémie, puis elle rejoint le

sang où elle va stimuler la production d'érythrocytes dans la moelle osseuse. La vitamine D est transformée dans le rein en calcitriol, sa forme active. Elle participe entre autre à l'absorption intestinale du calcium. L'angiotensine a un rôle fondamental dans le maintien de la pression artérielle via la volémie plasmatique.

I.2 Néphrotoxicité

I.2.1 Néphropathies d'origine toxique : définition générale

L'insuffisance rénale aigüe (IRA) se définit comme une chute brutale de la fonction rénale, accompagnée d'une accumulation de déchets comme l'urée ou la créatinine plasmatique (Devarajan 2006). Les IRA sont souvent multifactorielles mais on distingue trois catégories principales :

- IRA pré-rénale en réponse à une hypoperfusion du rein sans atteinte primitive du parenchyme rénal ;
- IRA rénale : lésions du parenchyme rénal à l'origine ;
- IRA post-rénale : obstruction du tractus urinaire.

De nombreuses classes médicamenteuses sont néphrotoxiques, les plus concernées sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les aminosides, les produits de contraste iodés, certains hydroxyéthylamidons, les diurétiques de l'anse, la dopamine, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et les antirécepteurs de l'angiotensine II (ARAII), le sévoflurane, la ciclosporine, les chimiothérapies et l'amphotéricine B (Cittanova-Pansard and Jacob 2007). La figure 4 présente des exemples d'agents toxiques utilisés expérimentalement chez le rat.

Le mécanisme de la néphrotoxicité est variable pour ces différents produits. En effet, le rein peut faire l'objet de trois sortes d'agressions par des médicaments toxiques :

- un effet toxique direct dose-dépendant sur les cellules tubulaires rénales ;
- un effet sur la vascularisation rénale, conduisant à une vasoconstriction et à une ischémie rénale ;
- un effet de nature immunologique (Cittanova-Pansard and Jacob 2007; John and Herzenberg 2009).

La première forme est la plus fréquente, les deux autres (glomérulaire et vasculaire) sont plus rares.

I.2.2 Lésions histologiques et agents toxiques

Les agents responsables de toxicité rénale induisent des lésions diverses et il est important dans les études précliniques de faire un examen histologique détaillé pour les décrire et comprendre leur mode d'action sur le rein. Il est souvent délicat pour le pathologiste de définir la lésion primaire à l'origine des autres.

Segment cible du néphron	Lésions observées	Exemples d'agents toxiques
Glomérule	Inflammation, nécrose	protamine, pénicillamine, immunoglobulines
	Vacuolisation	doxorubicine, facteurs de croissance
	Nécrose par effet direct	amphotericine (tubule distal), nystatine, gentamicine (tubule proximal), cisplatine (tubule distale)
	Nécrose par ischémie	cyclosporine (tubule proximal), angiotensine (tubule proximal)
Tubules	Dilatation	IECA, sérotonine
	Obstruction intratubulaire	Ethylène glycol, méthotrexate
	Vacuolisation	dextran
	Cristaux	sulphonamides, quinolones
	Pigment droplets	benzodiazépine
	Hypertrophie	furosémide à dose répétée
	Hyperplasie	cisplatine
Tube collecteur	Nécrose par effet direct	Cisplatine, tétraplatine
Interstitium	Inflammation	AINS, cimétidine, allopurinol, rifampicine, interféron
	Œdème	
Changement vasculaire	Vasomotricité	AINS, IECA, cyclosporine
	Microangiopathie thrombotique	cyclosporine, cisplatine, tamoxifène

Figure 4 : Exemples d'agents néphrotoxiques chez le rat (Greaves 2007)

L'augmentation du poids des reins et la modification de leur couleur ne sont pas spécifiques à certains agents mais s'observent lors de nombreux processus pathologiques (nécrose tubulaire, vacuolisation, lithiase, hypertrophie tubulaire...) (Lane et al. 1998).

Le glomérule est un site de dégénérescence et d'inflammation spontanée. De plus le système immunitaire induit des perturbations à ce niveau du néphron : on parle de glomérulonéphrite d'origine immunitaire (Greaves 2007). Les agents responsables de ce genre de lésions sont cités dans la figure 4. D'autres induisent plutôt des vacuolisations des cellules glomérulaires.

Chez les animaux de laboratoire, l'amyloïdose est une pathologie qui s'observe plutôt chez la souris et le hamster (Greaves 2007). La colchicine est un produit qui induit la formation de dépôts d'amyloïde dans le milieu interstitiel, ce qui crée des obstructions et une hyperplasie de l'épithélium rénal, en particulier au niveau de la papille (tubes collecteurs) (Greaves 2007). On utilise la coloration rouge Congo pour visualiser et caractériser les dépôts d'amyloïde.

On distingue deux groupes d'agents responsables de nécrose tubulaire : ceux qui ont un effet direct sur les cellules tubulaires rénales (très souvent le proximal est le plus atteint) et ceux qui créent une ischémie (l'anse de Henlé est la plus sensible du fait de la vascularisation de cette région du néphron) (Oliver et al. 1951). Sur la figure 4 on retrouve les xénobiotiques concernés. Notons que la tétraplatine, un analogue à la cysplatine, induit ces lésions spécifiquement au niveau de la papille (Greaves 2007). De plus, les agents susceptibles de modifier le flux vasculaires induisent des lésions de nécroses par ischémie. Les infarctus s'observent lors de microthrombus ou embolies des artérioles.

A part la nécrose, les affections du tubule sont diverses : la vacuolisation (souvent réversible), la présence de cristaux (en partie distale ce qui est dû à la concentration des urines (Greaves 2007)), les dépôts de lipofuscine (*pigment droplet*) et les *hyaline droplets* dans les tubules proximaux. Les *hyaline droplets* sont des dépôts protéiques éosinophiles. Le rein est un site de catabolisme de protéines de faible poids moléculaire (l'albumine, les chaînes légères d'immunoglobuline, la parathormone et le glucagon). Ces protéines passent dans le tubule proximal par endocytose (Maack et al. 1979). Les vacuoles se déplacent dans la cellule vers les lysosomes où elles fusionnent. L'hydrolyse peut alors s'effectuer. Les acides aminés résultant de la dégradation rejoignent la circulation sanguine. Si cette balance est modifiée par augmentation du taux protéique filtré ou diminution du catabolisme, il existe une accumulation de protéines formant les *hyaline droplets* dans les lysosomes des cellules

rénales (Greaves 2007). Les rats mâles sont particulièrement prédisposés à ce type de dépôts, probablement dû à la forte concentration en α 2-globulines dans les urines (Greaves 2007).

L'hypertrophie tubulaire est une augmentation de la taille des tubules rénaux en réponse à une augmentation de travail (Greaves 2007): néphrectomie partielle, alimentation riche en protéines ou agent toxique. On la différencie de l'hyperplasie tubulaire où c'est le nombre de cellules qui augmente (Greaves 2007).

La néphrite interstitielle est observé histologiquement par une infiltration inflammatoire, un œdème et/ou une fibrose de l'interstitium (Greaves 2007). La population des cellules inflammatoires permet de classer la lésion d'aigüe (lymphocytes, granulocytes neutrophiles, hématies) ou de chronique (macrophages, monocytes, lymphocytes).

Les agents responsables d'une modification du pH induisent des minéralisations, ou lithiases, au niveau des tubules (Greaves 2007). Souvent la papille est fortement modifiée (nécrose).

Enfin l'hydronéphrose est une dilatation du bassinnet en réponse à une compression de l'uretère (Greaves 2007), souvent par une masse abdominale. On ne l'observe jamais comme effet toxique direct, il s'agit plutôt d'une conséquence néoplasique ou lors de formation de calculs (Greaves 2007).

I.2.3 Les aminosides : un modèle de néphrotoxicité

La toxicité rénale des aminosides est bien connue. Il s'agit d'une toxicité tubulaire directe qui est bien corrélée à la durée d'exposition au produit (Cittanova-Pansard and Jacob 2007). Cette toxicité concerne essentiellement les tubules proximaux, conduisant à une accumulation du produit dans le cortex rénal (Laurent et al. 1983; Giuliano et al. 1986; Sohn et al. 2003; Polat et al. 2006; Nykjaer et al. 2009; Stojiljkovic et al. 2009).

- Toxicité

Sur le plan pharmacocinétique, à la phase initiale, les aminosides sont très peu métabolisés et éliminés essentiellement par filtration glomérulaire, puis ils sont réabsorbés et

s'accumulent dans le rein conduisant à une atteinte des cellules tubulaires proximales. Au niveau cellulaire, l'absorption d'aminosides conduit à des modifications caractéristiques morphologiques des lysosomes avec la formation de corps myéloïdes, qui ont été largement étudiés notamment sur des modèles de culture cellulaire. La réabsorption au niveau proximal est sous la dépendance de récepteurs situés au niveau de la bordure en brosse des cellules tubulaires proximales expliquant le caractère saturable du phénomène (Stojiljkovic et al. 2009). Les cellules tubulaires subissent des altérations métaboliques à l'origine d'une diminution de l'ATP intracellulaire (Devarajan 2006).

Une étude réalisée sur rats traités avec de la gentamicine à dose toxique (100mg/kg/j pendant 8 jours) a montré que le traitement provoquait la formation de radicaux libres (Polat et al. 2006). En réagissant avec les constituants de la cellule, ceux-ci auraient des effets toxiques qui se rajoutent à ceux évoqués dans le paragraphe antérieur : oxydation des protéines, peroxydation des lipides, lésions sur l'ADN. En injectant à ces mêmes rats un puissant antioxydant comme l'aminoguanidine, les biologistes ont montré que le taux de radicaux libres mesuré dans le rein diminuait rapidement, ainsi que les concentrations de créatinine et urée plasmatique. De même les lésions histologiques observées dans les tubules rénaux étaient moindres.

Toutes ces modifications métaboliques engendrent une perte de la structure en brosse des cellules et l'induction d'apoptose cellulaire ou encore de nécrose (Devarajan 2006).

- Altérations tissulaires

Au niveau macroscopique, les études faites sur des rats traités à la gentamicine montrent qu'il existe une augmentation de la taille du rein et une décoloration globale (reins plus pâles) (Stojiljkovic et al. 2009) qui s'intensifient en fonction du stade de l'insuffisance rénale aigüe.

Au niveau histologique, la néphrotoxicité engendre une nécrose aigüe des cellules tubulaires (John and Herzenberg 2009) et des processus de dégénération et régénération tubulaire. Les images les plus fréquentes sont celles de nécroses, d'œdème interstitiel et d'obstruction tubulaires par la formation de « casts ». Ces derniers sont des amas protéiques qui viennent obstruer les lumières tubulaires, notamment au niveau des tubules distaux. Les techniques de coloration ont permis de caractériser chimiquement ces amas : il s'agirait essentiellement de la protéine Tamm-Horsfall protein appelée également Uromoduline. Elle est sécrétée par la branche ascendante de Henlé sous forme de monomères. Lors d'IRA,

l'augmentation de la concentration sodique dans les lumières des tubules distaux crée un environnement favorable à la polymérisation de ces monomères, à l'origine des casts (Devarajan 2006). On observe également des infiltrats inflammatoires avec des cellules mononuclées, notamment autour des segments tubulaires lésés (John and Herzenberg 2009).

Il existe des analyses qui permettent de dépister une toxicité rénale et qui sont moins invasives que l'observation directe des lésions. Nous allons voir dans la prochaine partie les biomarqueurs validés utilisés couramment aujourd'hui, ainsi que leurs limites. Puis nous présenterons les nouveaux biomarqueurs de néphrotoxicité en cours de développement.

II- Biomarqueurs de néphrotoxicité

Les biomarqueurs sont définis par le National Institute of Health (NIH, USA) comme des « paramètres biologiques mesurés de façon objective et évalués comme des indicateurs soit de processus biologiques, normaux ou pathologiques, soit de réponses pharmacologiques résultant d'une intervention thérapeutique ».

Un bon marqueur doit pouvoir satisfaire à certains critères : il doit être spécifique aux reins, être libéré le plus précocement possible pour avoir une sensibilité idéale, son dosage doit être rapide et simple.

II.1 Biomarqueurs validés

Les examens réalisés classiquement pour évaluer l'intégrité rénale reposent sur des analyses biochimiques sanguines (urée et créatinine plasmatiques et mesures de divers électrolytes), des analyses biochimiques urinaires avec mesures de la protéinurie et créatininurie et des analyses urinaires classiques (volume, densité urinaire, analyse du culot urinaire). Dans le cas particulier des études pré-cliniques l'évaluation de la toxicité rénale nécessite également un examen histologique (Haschek et al. 2010)

II.1.1 Analyse urinaire

La modification du volume urinaire est un bon indicateur d'une atteinte rénale. Au départ une augmentation du volume urinaire, polyurie, est observée, suivie dans les stades avancés d'un arrêt de diurèse, oligurie ou anurie dans les cas les plus graves. La densité urinaire est également un facteur important qui indique une défaillance rénale, mais qui s'observe lorsqu'au moins 66% des néphrons sont atteints (Kaneko et al. 1997). La protéinurie est la plus fréquente des anomalies urinaires. Elle peut avoir une origine glomérulaire, tubulaire, pré-rénale ou post-rénale (cystite).

II.1.2 Urémie

L'urée est un déchet métabolique synthétisé en majorité par le foie lors du catabolisme protéique. Elle rejoint la circulation sanguine et en temps normal les concentrations d'urée plasmatique et du filtrat glomérulaire sont approximativement égales. L'urée diffuse passivement de la lumière tubulaire rénale au sang (Kaneko et al. 1997).

Une augmentation de l'urée sanguine, peut avoir une origine pré-rénale, rénale ou post-rénale. La première forme est due à une augmentation du catabolisme protéique (hépatotoxiques, myotoxiques, nécroses) ou à une baisse de la perfusion rénale (cardiotoxiques). Une urémie d'origine rénale s'observe quand environ 75% des néphrons ne sont plus fonctionnels (Kaneko et al. 1997).

II.1.3 Créatininémie

La majorité de la créatinine provient de la dégradation de la phosphocréatinine musculaire qui se fait à un taux constant. Cette protéine n'est pas réutilisée. Sans tenir compte de la part rénale, la concentration plasmatique dépend de la masse musculaire et des souffrances musculaires. Elle diffuse de façon plus lente que l'urée, elle n'est pas réabsorbée dans les tubules après la filtration glomérulaire (Kaneko et al. 1997).

Le taux de créatinine étant stable pour une personne donnée (en dehors d'états cataboliques transitoires comme l'effort sportif ou la fièvre) et étant en totalité éliminée par le rein, la créatinine représente un indicateur de la fonction glomérulaire. Malgré tout, ce taux peut doubler chez un individu sportif ou au contraire être très bas chez une personne très maigre ou amputée, ceci malgré une fonction rénale normale.

II.1.4 Autres Modifications

Selon le type d'affection rénale on observe également d'autres perturbations biochimiques : anémie non régénérative lors d'IRC (dû à une diminution de la synthèse de l'hormone érythropoïétine), hyperphosphatémie reflétant la baisse du débit de filtration glomérulaire (appelé également DFG) ; modifications électrolytiques lors d'IRA avec hyperkaliémie, troubles de la calcémie, de la phosphatémie, hyponatrémie et hypochlorémie dû aux lésions tubulaires ; hypoprotéinémie et hypoalbuminémie lors de lésions glomérulaires (Haschek et al. 2010).

Cependant ces paramètres ne sont pas spécifiques à un type d'atteinte rénale et n'ont pas d'utilité dans l'exploration de toxicité rénale. Ils apparaissent plutôt lorsque l'insuffisance rénale subaiguë à chronique s'est installée.

II.1.5 Limites des analyses

La mesure de l'urée et de la créatinine plasmatiques sont des indicateurs peu spécifiques et peu sensibles (Kaneko et al. 1997). La mesure de la créatinine plasmatique ne permet pas d'évaluer les lésions rénales mais uniquement la fonction rénale, or le rein est un organe capable de fonctionner normalement malgré une perte importante de sa masse fonctionnelle (modification de ces paramètres quand perte de 70% de la masse rénale) (Goodsaid et al. 2009). Ces tests ne sont pas assez sensibles.

D'autre part nous avons vu que des facteurs extrarénaux interviennent dans les variations des concentrations d'urée et de créatinine dans le sang, limitant cette fois leurs spécificités. La concentration d'urée peut varier avec l'état d'hydratation, l'alimentation, des lésions gastro-intestinales ou le catabolisme protéique. De même, la créatinine plasmatique varie avec la masse musculaire (Haschek et al. 2010).

Le test le plus sensible et le plus spécifique pour évaluer la filtration glomérulaire est la mesure de la clairance de la créatinine (Kaneko et al. 1997). Mais cela demande des prélèvements d'urine et de sang espacés dans le temps, et faits de manière la plus stérile possible. Dans les études pré-cliniques où le nombre de rongeurs est particulièrement important, ce test est pratiquement impossible à faire en routine.

L'identification et la mise en place de l'utilisation de nouveaux biomarqueurs de néphrotoxicité applicables au cours de la conception du médicament jusqu'à sa mise sur le marché deviennent de plus en plus nécessaires. En effet la néphrotoxicité est une cause importante de rejet de molécules au cours du développement préclinique, car il est essentiel de parvenir à conserver au maximum la bonne santé des personnes intervenant ensuite dans les études cliniques. La toxicité rénale est un facteur limitant important dans l'utilisation d'une large variété de médicaments. Il est donc particulièrement important de découvrir des biomarqueurs fiables permettant de prévoir, de surveiller et de mesurer les effets d'un xénobiotique sur un organisme.

II.2 Les nouveaux biomarqueurs de néphrotoxicité

Ces biomarqueurs doivent répondre à différents critères : être spécifiques des atteintes rénales, sensibles et pouvoir être analysés par une méthode non invasive. Pour être utilisé dans le cadre des études de sécurité, il est également nécessaire que ces biomarqueurs puissent être adaptés aux différentes espèces animales et être directement applicables au cadre clinique (Muller and Dieterle 2009).

II.2.1 Nécessité de nouveaux biomarqueurs pour l'exploration rénale

Le groupe Predictive Safety Testing Consortium (PSTC) est un partenariat créé en 2006 de sociétés publiques et privées dirigé par l'institut Critical Path Institute (CPI). Il rassemble des laboratoires pharmaceutiques tels que Pfizer, Roche, Novartis et sanofi-aventis ainsi que les autorités gouvernementales FDA (Food and Drug Administration) et son homologue européen l'European Medicines Agency (EMA) (Critical-Path-Institute 2006-2010). Ce consortium intervient dans les phases de validation des nouveaux biomarqueurs.

Récemment, les membres du groupe PSTC ont mis en commun leurs données sur trois biomarqueurs rénaux : la cystatin C urinaire, la bêta2-microglobuline urinaire et les protéines totales urinaires (Goodsaid et al. 2009). Ils ont montré que les trois étaient plus spécifiques et plus sensibles que les dosages de créatinine et d'urée.

II.2.2 Biotechnologies et biomarqueurs : généralités

Ces dernières années, les nouvelles technologies en toxicologie ont permis de trouver une série de nouveaux biomarqueurs candidats (Sieber et al. 2009). Les techniques de détection des biomarqueurs sont généralement basées sur l'utilisation de biopuces (technologie microarray) et sur le criblage différentiel à haut débit et à grande échelle d'ADN, d'ARN, de protéines ou de métabolites contenus dans un produit biologique (un tissu, un liquide biologique, ...) issu d'un patient sain et ceux issus de patients malades. En fonction de la nature du biomarqueur recherché, seront appliquées des techniques de génomique, de transcriptomique, de protéomique ou de métabolomique : techniques qui ont largement mis à profit la découverte de cette nouvelle vague de biomarqueurs (Luttrupp et al. 2009).

Ces techniques permettent de connaître le profil d'expression génétique des cellules en réponse à un traitement. Grâce à elles, on peut comprendre le mode d'action d'un xénobiotique (Ozaki et al. 2009). Plusieurs études faites sur le modèle de la gentamicine ont permis de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs intéressants (Vaidya et al. 2008; Ozaki et al. 2009; Zhang et al. 2009).

II.2.3 Nouveaux biomarqueurs

Un consensus a été conclu en juillet 2008 (Critical-Path-Institute 2008) sur sept nouveaux biomarqueurs et encouragent les industries pharmaceutiques à les développer en plus de l'urée et de la créatinine plasmatique.

La liste de nouveaux biomarqueurs qui suit reprend certains de ces sept biomarqueurs et d'autres découverts récemment. La figure 5 est un tableau récapitulatif des neuf biomarqueurs décrits ci-dessous.

II.2.3.1 Kidney Injury Molecule-1 (KIM1)

La protéine KIM1 est spécifique des tubules proximaux rénaux (figure 6). Elle participe à la régulation du système immunitaire lors de lésions tubulaires rénales et au phénomène de régénérescence cellulaire. Certaines études ont montré une augmentation de la concentration en ARNm et en protéines en réponse à des lésions tubulaires (Ichimura et al. 1998). Une fois synthétisée, la protéine se place dans la membrane plasmique, puis le domaine extracellulaire est clivé par une enzyme metalloprotéinase de la matrice extracellulaire et est relarguée dans la lumière tubulaire et dans les urines (Goodsaid et al. 2009). La KIM1 semble être un biomarqueur urinaire très sensible et spécifique pour détecter de façon précoce une insuffisance rénale aiguë induite par un néphrotoxique comme la gentamicine (Sieber et al. 2009).

Une équipe japonaise (Wang et al. 2008) a étudié le changement de l'expression génétique de 48 gènes au niveau du rein, après traitement de cinq néphrotoxiques (gentamicine, bacitracine, vancomycine, cisplatine) qui provoquent des nécroses au niveau des tubules proximaux, puis trois hépatotoxiques pour connaître la spécificité. Vingt quatre gènes sont induits ou réprimés, mais uniquement dix neuf ont été identifiés comme spécifique du rein. Parmi eux on trouve les gènes codant pour la KIM1 (kidney injury molecule 1), la lipocalin 2 (Lcn2) et l'osteopontine (Spp1).

Une équipe de l'hôpital de Boston (Vaidya et al. 2009) a mis au point un test ELISA rapide (Rénastick®) à faire sur les urines pour évaluer la quantité de KIM1. Une bonne corrélation entre l'intensité des bandes et la concentration urinaire en KIM1 a été démontrée pour différents toxiques rénaux (gentamicine, cadmium) chez le rat, mais aussi chez l'homme chez des personnes malades d'insuffisance rénale aiguë.

II.2.3.2 Clusterine

La clusterine est une glycoprotéine synthétisée par plusieurs cellules épithéliales dans de nombreux organes et tissus (la vessie, les reins au niveau du tubule contourné distal, les testicules, la vésicule biliaire) mais aussi par d'autres non épithéliales sécrétrices (cellules synoviales, cellules ovariennes de la granulosa). Ainsi elle est présente en grande quantité dans tous les fluides physiologiques : plasma, lait, urine, sérum, fluide cérébrospinal, sperme. Elle aurait diverses actions sur les organes comme le renouvellement des membranes, le transport de lipides ou la programmation de mort cellulaire. Cependant, il est difficile de savoir si la clusterine est multifonctionnelle ou si elle a une action principale de laquelle découlerait une multitude d'effets physiologiques (Jones and Jomary 2001). En particulier dans le rein, la clusterine serait surexprimée lors d'obstruction urétrale, d'une ischémie rénale ou de rejet de greffe.

Une étude menée au Canada (Zhou et al. 2009) a tenté d'élucider le rôle exact de cette protéine sur un modèle d'ischémie/reperfusion rénale chez des souris de souche sauvage et d'autres déficientes en clusterine. Les chercheurs ont montré que les cellules rénales apoptotiques avaient une concentration intracellulaire de clusterine plus importante. Chez les souris déficientes en clusterine, la proportion de cellules épithéliales tubulaires nécrosées est plus importante, tout comme la valeur des paramètres biochimiques plasmatique urée et créatinine, par rapport aux souris provenant de lignées sauvages. La clusterine aurait un effet protecteur sur les cellules épithéliales tubulaires.

Les travaux de l'équipe de Zhan Shu ont montré qu'un traitement par gavage de 7 jours de cyclosporine A à forte dose (100mg/kg) sur des rats engendrait une modification du profil des protéines plasmatiques avec en particulier une surexpression de la clusterine dans le plasma (Shu et al. 2009). Une étude *in vitro* (Girton et al. 2002) faite sur des cellules rénales épithéliales de tubules proximaux montre que la clusterine a un effet protecteur sur l'effet cytotoxique de la gentamicine.

II.2.3.3 Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocaline (NGAL)

La Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocaline est un petit polypeptide de 25 kDa appartenant à la famille des lipocalines initialement découvertes dans les neutrophiles activés. Elle est présente au niveau de certains épithéliums comme celui des tubules rénaux, où son excrétion est particulièrement augmentée en réponse à une atteinte ischémique ou de l'intégrité cellulaire des épithéliums tubulaires rénaux (Mori and Nakao 2007).

Dans l'étude de Mori (Mori et al. 2005) les chercheurs montrent qu'une injection de NGAL chez les souris atteintes d'insuffisance rénale aigüe d'origine ischémique, protège les tubules rénaux de la mort cellulaire notamment au niveau cortical. La protéine aurait une action avec un sidérophore sur des enzymes protectrices qui inhiberaient la mort cellulaire. Au niveau histologique et biochimique (créatinine plasmatique), la différence entre les souris ayant reçu l'injection de NGAL et les autres est élevée (baisse du taux des amas protéiques « casts » et du niveau de créatinine plasmatique). Dans cette même étude, il a été montré qu'une insuffisance rénale aigüe provoquait une augmentation du taux de NGAL dans les urines et dans le sérum chez les souris et chez l'homme. Mori et son équipe ont prouvé que ce dosage peut être un nouvel outil de diagnostic de nécrose tubulaire.

Un test permettant le dosage de cette protéine dans les urines est commercialisé par les laboratoires Abbot chez l'homme : le test NGAL Urinaire ARCHITECT®. Il s'agit d'un dosage immunologique micro particulaire par chimiluminescence pour la détermination quantitative (NGAL) dans l'urine chez l'homme (Abbot).

L'augmentation de la production de NGAL semble présenter des propriétés auto protectrices. Depuis il a été suggéré que la NGAL avait un rôle dans la multiplication et la différenciation cellulaire comme lors de la maturation et du développement des cellules épithéliales rénales (Lee et al. 2008).

II.2.3.4 Tissue Inhibitor of Metallopeptidase (TIMP-1)

La protéine Timp-1 est, comme son nom l'indique, une enzyme inhibitrice des metalloprotéinases matricielles chargées de dégrader la matrice extracellulaire. Elle se trouve dans tous les tissus des mammifères. Une étude menée sur des enfants atteints de syndrome néphrotique d'origine congénitale et des enfants sains, a montré que le niveau de protéine TIMP1 dans les urines était plus élevé chez les patients malades (Wasilewska and Zoch-Zwierz 2008). Cependant les travaux de Sieber et al. (Sieber et al. 2009) réalisés sur des

urines de rats traités à la gentamicine ont montré qu'il s'agissait d'un biomarqueur urinaire beaucoup moins sensible que d'autres comme les protéines NGAL ou KIM1.

Dans le processus physiopathologique d'une néphrotoxicité, on pense que la TIMP1 participe à la fibrose du rein en inhibant les metalloprotéinases et les enzymes protéolytiques matricielles et en conséquence contribue à engendrer une accumulation de collagène (Sieber et al. 2009).

II.2.3.5 Aquaporines 1 et 2

Les aquaporines (AQP) sont une classe de protéines membranaires qui forment des pores perméables aux molécules d'eau dans toutes les membranes biologiques. Dans le rein, il existe six isoformes différentes. L'AQP 2 est l'isoforme spécifique du rein et se trouve dans les tubes collecteurs. On la trouve dans les vésicules intracellulaires puis au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales principalement et en petite quantité au niveau de la membrane basolatérale. L'AQP1 n'est pas spécifique du rein, on la trouve dans les érythrocytes, les poumons, le cerveau, l'œil et autres tissus. Elle est présente en grande quantité dans les tubules proximaux et dans la branche descendante du tube contourné distal (Lee et al. 2001).

L'AMPC joue un rôle dans la régulation de l'AQP2. En effet l'AMPC intervient à court terme dans le passage de l'AQP2 de la vésicule phospholipidique à la membrane apicale, mais aussi à long terme dans l'expression de l'AQP2 (Sohn et al. 2003).

Une étude menée sur des rats a montré que la gentamicine aurait un effet sur l'expression de l'AQP1 et AQP2 au niveau du rein (Lee et al. 2001). Ainsi au bout de 6 jours de traitement à 20 mg/kg/j on observe une diminution de l'expression de l'AQP2 au niveau du cortex. Cette baisse s'étend à la médulla lorsqu'on augmente les doses à 50 mg/kg/j et 100 mg/kg/j. De plus, on observe une diminution de la synthèse d'AQP1 uniquement dans le cortex et pour des doses de 100 mg/kg/j pendant six jours. Il existe un lien étroit entre la diminution de l'expression des AQP et la diminution de la concentration urinaire de ces mêmes rats traités à la gentamicine.

II.2.3.6 Calbindine-D

Les calbindines-D sont une classe de protéines intracellulaires qui transportent le calcium. On distingue la calbindine 9K et la calbindine 28K. La première sous classe se trouve dans l'intestin, les reins et le cerveau des mammifères et chez le rat on la trouve également dans l'utérus. La calbindine 28K se situe dans les cellules tubulaires distales des néphrons chez les mammifères mais se trouve également dans les entérocytes des oiseaux. Une étude (Sooy et al. 2000) a montré qu'elles auraient également un rôle dans l'absorption du calcium dans les cellules tubulaires en plus du rôle de transporteur. Dans cette même étude, les chercheurs ont remarqué qu'un traitement à base de cyclosporine A (qui provoque des nécroses au niveau de tubules rénaux) engendrait une diminution de la synthèse de cette protéine dans les tubules distaux rénaux (jusqu'à 85% de diminution pour des doses toxiques).

Des équipes ont développé des tests d'immunofluorescence réalisables sur les urines et les reins de rats pour détecter cette protéine (Sourial et al. 2009). En effet, le fait qu'elle se situe dans une petite portion du néphron (tubule distaux) rend ces dosages intéressants car ils permettent de situer des lésions rénales s'ils sont positifs. Ces mêmes tests ont été réalisés chez l'homme.

II.2.3.7 Tamm-Horsfall Protein

La Tamm-Horsfall Protein (THP), connue également sous le nom d'uromoduline, est la protéine urinaire présente en plus grande quantité (jusqu'à 100 mg dans l'urine de 24h). Elle est spécifique du rein et synthétisée uniquement par les cellules rénales au niveau de l'anse de Henlé et du tubule distal (Pressac 2000).

La présence d'une partie glycanique riche en mannose lui confère un rôle protecteur vis-à-vis des agents pathogènes. Une étude menée à l'université d'Oklahoma (Californie), sur des souris dépourvus de THP par recombinaison génétique, a montré que l'uromoduline protégeait l'organisme des infections urinaires dues à *Proteus Mirabilis* (Raffi et al. 2009). D'autres travaux confirment ces résultats en réalisant des études in vitro sur la THP et des fimbriae de souches d'*Escherichia Coli* uropathogènes (Uto et al. 1991; Leeker et al. 1997).

II.2.3.8 Alpha-GST

Les enzymes glutathion-S-transférase (GST) sont une famille de protéines cytoplasmiques, mitochondriales et microsomales. Elles catalysent de nombreuses réactions métaboliques entre le glutathion et les xénobiotiques endogènes et exogènes. Ainsi elles jouent un rôle fondamental dans la détoxification et la biotransformation des substances médicamenteuses (Rodilla et al. 1998). Chaque isoforme est exprimée dans diverses cellules.

Le rein possède toutes les isoformes de GSTs, cependant leur proportion est différente dans les parties du néphron. L'alpha-GST est principalement exprimée dans le tubule contourné proximal et un peu dans la partie mince de l'anse de Henlé. On le trouve également dans les hépatocytes. La mu-GST et la pi-GST se trouvent essentiellement dans les cellules pariétales de la capsule de Bowman, dans les podocytes, dans les tubules contournés distaux et le tube collecteur alors que leur présence dans les tubules proximaux est minime (Rodilla et al. 1998). On trouve la pi-GST dans le foie également.

Du fait que leurs emplacements soient différents dans les tubules, ces enzymes représentent des biomarqueurs intéressants de néphrotoxicité qui permettent également de localiser les lésions rénales. Une étude réalisée dans le service de réanimation de l'hôpital Mater Misericordiae de Dublin sur 40 patients atteints de sepsis, a mesuré par méthodes ELISA l'alpha-GST et la pi-GST dans les urines 48h après le diagnostic du syndrome septique (Walshe et al. 2009). Les résultats montrent que l'alpha-GST est augmenté dans les urines des individus ayant développé une insuffisance rénale aiguë (IRA) d'origine septique. Cependant la pi-GST est augmentée également chez les individus malades qui n'ont pas développé d'IRA, mais la hausse est proportionnelle à la gravité des lésions rénales (nécrose). L'étude en déduit que l'isoforme pi-GST n'est pas un biomarqueur prédictif d'IRA mais il suggère que le phénomène septique affecte d'abord les tubules distaux du rein. Cette étude prouve l'intérêt de ce genre de biomarqueurs dans la connaissance de la physiopathologie de l'IRA d'origine septique.

Figure 5 : Tableau récapitulatif des neuf biomarqueurs sélectionnés pour l'étude

	localisation	nature	rôle	Exemples de kits existants
alpha-GST	cellules tubulaires rénales (tubule contourné proximal) et hépatocytes	enzyme (famille des glutathion-S-transférases)	détoxification et biotransformation des xénobiotiques (Rodilla <i>et al.</i> , 1998)	
KIMI (=Haverl)	cellules tubulaires rénales (tubule contourné proximal)	protéine membranaire	régulation du système immunitaire au niveau des cellules tubulaires (Goodsaid <i>et al.</i> , 2009)	kit ELISA sur urines (Vaidya <i>et al.</i> , 2007)
NGAL (=Lcn2)	cellules tubulaires rénales (tubule proximal et distal), adipocytes, macrophages, monocytes	protéine cytoplasmique	effet bactéricide (Mori <i>et al.</i> , 2005)	kit ELISA sur urines, serum, plasma, extraction tissulaire chez rat, souris, chien, singe, porc, homme (BioPorto Diagnostics®)
TIMP1	toutes les cellules (cellules rénales : tubule proximal et distal)	enzyme	inhibitrice des métalloprotéinases matricielles (Wasilewska <i>et al.</i> , 2008)	kit ELISA sur urines (Calbiochem®, RayBio®)
Clusterine	cellules de la vessie, des testicules, des ovaires, de la vésicule biliaire, des reins (tubule proximal et distal) et cellules synoviales	glycoprotéine cytoplasmique et extracellulaire	participation dans le renouvellement des membranes, transport de lipides; effet protecteur sur cellules rénales tubulaires (Zhou, 2009; Girton 2002)	
AQP1	érythrocytes, cellules de nombreux tissus (cerveau, poumons, l'œil), cellules rénales tubulaires (tubule proximal et anse de Henlé)	protéine membranaire	pore perméables aux molécules d'eau dans les membranes (Lee <i>et al.</i> , 2001; Sohn <i>et al.</i> , 2003)	
Uromoduline (=Tamm Horsfall Protein)	cellules rénales (anse de Henlé et tubule distal)	protéine cytoplasmique	bactéricide (Raffi <i>et al.</i> , 2009)	
Calbindin 28K	cellules rénales (tubule distal et tube collecteur), intestin, pancréas, glandes	protéine cytoplasmique	transport du Ca, réabsorption du Ca du tubule vers le sang (Sooy <i>et al.</i> , 2003)	tentatives ELISA urinaire (Sourial 2009)
AQP2	spécifique des cellules rénales du tube collecteur	protéine membranaire	pore perméables aux molécules d'eau dans les membranes (Lee <i>et al.</i> , 2001; Sohn <i>et al.</i> , 2003)	

II.2.4 Identification des différents segments du néphron

Toutes les parties du rein peuvent être la cible des molécules toxiques : le glomérule, l'interstitium, les compartiments vasculaires ou les différents segments tubulaires. L'identification du segment néphrotique atteint par un agent néphrotoxique est une étape délicate pour les pathologistes, et requiert une expérience dans le domaine.

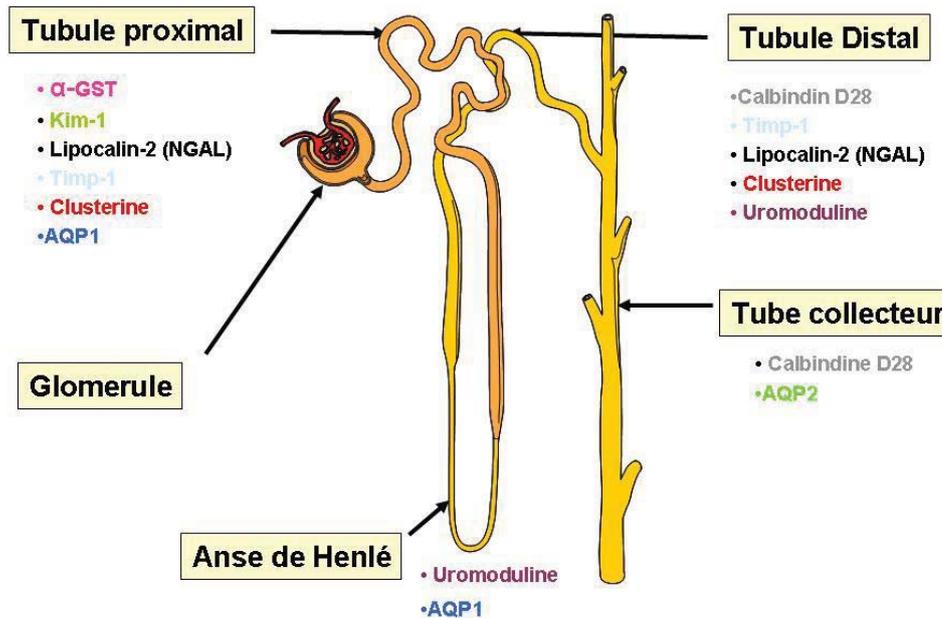


Figure 6 : schéma des différents segments tubulaires et expression des biomarqueurs

L'avantage de pouvoir établir une cartographie du néphron avec ces biomarqueurs (figure 6), est la possibilité de suivre l'évolution des lésions en toxicologie. En effectuant des dosages dans les urines ou le sang, on peut espérer comprendre certains mécanismes à l'origine de la toxicité rénale.

D'autre part, ces biomarqueurs sont aussi bien présents chez les espèces utilisées dans les études précliniques (rats, souris, chiens) que chez l'homme. Il est donc possible d'appliquer à l'homme les observations faites chez l'animal à condition que les mécanismes physiopathologiques soient identiques.

II.3 Les limites de la protéomique

Les nouveaux biomarqueurs cités dans la partie précédente, font appel à des méthodes qui étudient le protéome. Pour cela les techniques utilisées principalement sont l'électrophorèse et la colorimétrie chimique pour la séparation des protéines, puis la spectrométrie de masse pour l'identification des protéines (Ackermann and Berna 2007).

L'ensemble de ces techniques présente plusieurs limites, qui sont associées à l'hétérogénéité des protéines (Ackermann and Berna 2007). L'hétérogénéité chimique est le premier défi pour les techniques d'électrophorèse qui utilisent le point isoélectrique (PI) et la masse moléculaire comme critères de séparation (Wilkins et al. 1998). Le deuxième défi est la différence de solubilité des protéines. Le caractère hydrophobe de certaines protéines biaise les résultats. Enfin la dynamique de l'expression des protéines dans la cellule crée des différences de concentration de cinq ordres de grandeur (Wilkins et al. 1998) entre les protéines plus rares (50 à 100 molécules par cellule) et les plus abondantes (10^7 molécules par cellule) (Wilkins et al. 1998). La gamme d'expression est très étendue, il paraît illusoire de vouloir visualiser et caractériser des protéines minoritaires dans un extrait cellulaire total (Wilkins et al. 1998).

L'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) est un test biochimique de laboratoire largement utilisé qui détecte la présence d'anticorps ou d'antigène dans un échantillon suivi d'une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composé coloré, déterminé par une spectrométrie. Les quelques kits de dosage des nouveaux biomarqueurs en néphrotoxicité utilisent cette méthode ELISA (figure 5).

La principale limite de ce test est le temps excessif exigé pour la préparation des anticorps. Cet aspect est d'autant plus gênant lorsque les tests doivent être faits sur différentes espèces, où il faut à chaque fois fabriquer des anticorps différents.

III. Les ARNm circulants, nouveaux biomarqueurs potentiels

Même si toutes les cellules d'un organisme partagent le même génome, certains gènes ne sont exprimés que dans certaines cellules, à certains périodes de la vie de l'organisme ou sous certaines conditions. Une cellule qui connaît une modification dans son environnement cherche à s'adapter en changeant l'expression de ses gènes. Ainsi lorsqu'un organe est soumis à une substance toxique, les cellules modifient leur expression génique.

III.1 Les avancées techniques en biologie moléculaire

III.1.1 Extraction dans les tissus

La recherche des gènes impliqués dans les processus toxiques précoces devient un enjeu capital pour la compréhension des mécanismes moléculaires intervenant dans ces processus. La toxicologie moléculaire se propose de rechercher, d'étudier et de mesurer l'expression de tels gènes.

Ainsi dans le cas de la toxicité rénale, de nombreuses études ont montrée que les ARN détectés dans les reins peuvent être de nouveaux biomarqueurs très intéressants, spécifiques et sensibles. L'équipe de Lemoine et al. (Soazig and Marc 2003) a prouvé que le dosage d'ARNm de la metallothionine MT-20 spécifique au rein était un biomarqueur sensible d'une contamination au cadmium. La MT-20 est une protéine induite lors de contamination avec des métaux lourds. Après broyage des reins et extraction de l'ARN total, la technique de RT-PCR semi quantitative en temps réel Taqman a permis de mettre en évidence les ARNm spécifiques à la protéine MT-20. Ainsi l'étude montre qu'il existe une forte production d'ARNm lors de contamination au Cadmium alors que sur le broyat des reins provenant de rats sains aucun ARNm spécifique MT-20 n'est détectable.

Cependant ces nouveaux biomarqueurs ne sont pas utilisables en routine car il faut attendre d'avoir les tissus pour pouvoir extraire les ARNm. Cette méthode est inaccessible et trop invasive pendant les essais pré-cliniques.

III.1.2 Extraction dans le sang

L'existence d'acides nucléiques dans la circulation sanguine a été décrite pour la première fois par Mendel et Metais en 1948 (Chan et al. 2003). Cependant leurs travaux sur

les ARN circulants n'ont pas attiré l'attention et ce n'est que 30 ans plus tard que des équipes s'y sont intéressées, notamment dans les études d'oncologie (Chan et al. 2003).

Le plasma contient énormément de ribonucléases ne permettant pas, a priori, la préservation des ARNm circulants et la possibilité de trouver des ARNm extracellulaires a longterm paru limitée. Certaines études ont cependant démontré la présence d'ARNm circulants dans le sang et de l'existence d'une certaine protection par rapport aux RNases plasmatiques. Il semblerait que lors d'apoptose, les cellules se fragmentent formant des débris cellulaires dans la circulation (microparticules) (Morel et al. 2005; Mastronardi et al. 2009). Ces particules de tailles variables, ($< 1\mu\text{m}$ de diamètre), limiterait la dégradation des ARNm par les ribonucléases plasmatiques, ce qui expliquerait la possibilité de les doser dans les fluides biologiques. Toutefois, il existe énormément de facteurs limitant l'extraction des ARNm dans le sang. Les procédures de prélèvements à partir du sang, la stabilisation rapide des ARN, les techniques d'extractions sont toutes des étapes délicates qui influencent directement la qualité et la quantité d'ARNm extraits. Or les résultats de RT-PCR ne sont pas interprétables si ces deux paramètres ne sont pas respectés. Certaines équipes ont montré qu'il était tout de même possible de développer des techniques d'extraction en utilisant plusieurs stabilisants et DNases (Chan et al. 2003).

III.2 Application clinique

III.2.1 Virologie

Le diagnostic d'infection virale est une des plus anciennes utilisations des acides nucléiques circulants dans le sang (ADN ou ARN). Les analyses sont faites sur le sérum par amplification génique. Ces tests sont utilisés couramment pour un grand nombre de virus comme par exemple l'hépatite C (Pawlotsky 1997) ou le VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine). Le virus protège généralement son matériel génétique par des capsides ce qui permet un dosage plus simple que lorsque les ARN sont libres dans les fluides biologiques.

III.2.2 Cancérologie

Les premières recherches en oncologie sur les acides nucléiques ont été menées par Leon et al. qui ont montré que les patients atteints de cancer avait une concentration en ADN circulants plus grande que les personnes saines (Chan et al. 2003). Un grand nombre d'études se sont succédé en se focalisant sur les mutations d'oncogènes et autres caractéristiques spécifiques des ADN tumoraux circulants (Chen et al. 2000; Chan et al. 2003) chez les patients atteints de cancer.

Plus récemment, l'intérêt s'est dirigé vers l'utilisation des ARN comme outil de diagnostic clinique. L'unité d'oncologie de la clinique Puerta de Hierro à Madrid (Silva et al. 2002) a étudié les ARN circulants dans le sérum de patients atteints de carcinomes colorectaux. Ils ont montré qu'il existait des caractéristiques (mutations d'oncogènes, hyperméthylation, altération de microsatellites) similaires entre les ARN circulants et ceux des cellules épithéliales tumorales. D'autre part, ils ont prouvé qu'il existait une corrélation entre le niveau de détection des ces ARN circulants et le degré de gravité du cancer. D'autres équipes ont obtenu des résultats similaires sur des études du cancer du sein chez la femme (Chen et al. 2000) et du poumon (Sato et al. 2008). Les chercheurs pensent que les ARN tumoraux pourraient provenir de cellules tumorales de métastases.

L'équipe italienne de Savino et al. est allée encore plus loin en démontrant que la technique de dépistage du cancer du sein utilisant le dosage d'ARNm du gène HER2, connu pour être surexprimé dans les cellules tumorales des patientes atteintes, par RT-PCR était plus sensible que celle utilisant le dosage de la protéine HER2 par technique ELISA (Savino et al. 2009).

III.2.3 Test pré-natal

Jusqu'à présent, les diagnostics prénataux de maladie génétique fœtale étaient réalisés par des méthodes invasives mettant en danger le fœtus. En 1997, Lo et al. a prouvé la présence d'ADN fœtal dans le plasma maternel en amplifiant des séquences spécifiques du chromosome Y dans le plasma de mère enceinte de fœtus de sexe masculin (Chan et al. 2003). A partir de cette découverte, l'analyse de l'ADN circulant est devenue une excellente approche non invasive de diagnostics prénataux de maladies génétiques (Chan et al. 2003).

Plus tard, une équipe japonaise a exploité de dosage d'ARNm circulants comme test diagnostic pré-natal de pathologie (Zhong et al. 2008). Ils ont remarqué dans de précédentes

études faites sur des patientes enceintes qui déclenchaient des éclampsies précoces (Zhong et al. 2005), que les taux d'ARNm et d'ADN fœtaux étaient augmentés dans le sang. Ils pensent que cette forme d'éclampsie est liée à une augmentation de lésions cellulaires chez le fœtus (Zhong et al. 2005).

III.2.4 Diagnostic maladie métabolique

Durant ces dernières années, les découvertes faites sur l'énorme potentiel de l'analyse des acides nucléiques dans le sang circulant comme outils de pronostic et de diagnostic ont laissé suggérer que la concentration des acides nucléiques plasmatiques (ADN et ARN) reflète le niveau de mort cellulaire (Chan et al. 2003).

C'est le postulat que l'équipe de Hamaoui et al. a exploité pour montrer que l'ARNm de la rhodopsine rétinienne mesuré par RT-PCR était plus élevé chez les diabétiques atteints de rétinopathies (Hamaoui et al. 2004).

III.3 Nouvelle approche : ARNm plasmatiques comme nouveaux biomarqueurs de toxicité

Les ARNm spécifiques de certains tissus qui circulent dans le sang périphérique semblent être le reflet de l'intégrité de ces tissus. Ces découvertes ont inspiré les équipes de Miyamoto et de Wetmore (Miyamoto et al. 2008), (Wetmore et al. 2010) dans l'utilisation d'ARNm spécifiques d'organe circulant dans le sang périphérique comme nouveaux biomarqueurs de toxicité, notamment dans l'identification des organes cibles de certains xénobiotiques (figure 7).

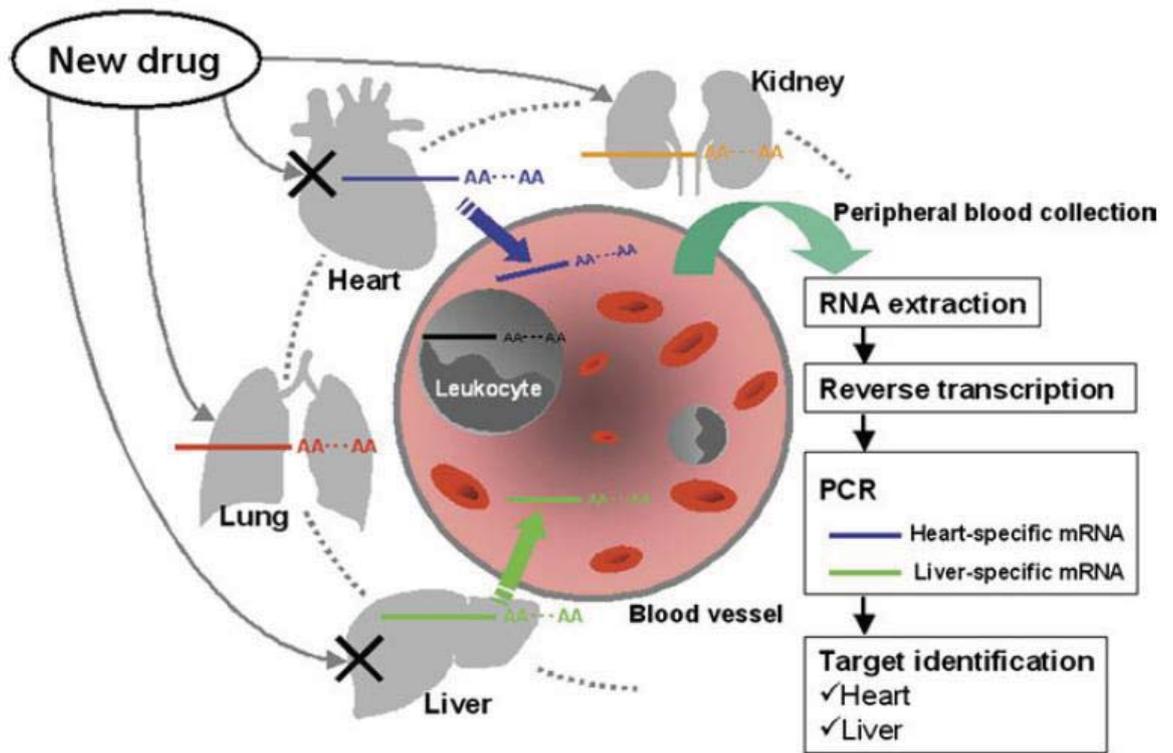


Figure 7 : schéma illustrant le concept de la détection d'ARNm spécifique d'un organe dans le sang circulant comme nouveau biomarqueur de toxicité (exemple du cœur et du foie) (Miyamoto et al. 2008)

L'étude de Miyamoto se focalisa sur la détection d'ARNm spécifiques du foie dans le sang de rats traités avec un toxique hépatique. Pour cela ils choisirent les ARNm de l'albumine et de l' α 1-microglobuline comme biomarqueurs d'hépatotoxicité en utilisant le D-galactosamine et l'acétaminophène comme xénobiotiques hépatotoxiques. Ils ont alors prouvé que ces ARNm étaient détectés dans le sang circulant des animaux traités, et ce de façon précoce (dès 2h après le traitement), avant même les modifications des paramètres hépatiques classiques biochimiques comme ALT ou AST (Miyamoto et al. 2008). Les études menées par l'équipe de Wetmore ont eu des résultats similaires (Wetmore 2010).

Cette approche ouvre de nouvelles pistes dans la recherche de biomarqueurs en toxicologie, avec l'avantage d'être applicable chez l'animal et chez l'homme. En effet les acides nucléiques ont les mêmes propriétés chimiques quelle que soit l'espèce animale, et les techniques mises en place pour une espèce peuvent être utilisés chez une autre du fait que la synthèse des primers pour amplifier une séquence donnée peut être réalisée très facilement dans différentes espèces (à la différence des tests ELISA qui sont spécifiques d'espèces du fait de l'utilisation d'anticorps).

Dans ce projet, nous avons utilisé la même approche que celle décrite dans les études de Miyamoto et de Wetmore mais appliquée à la néphrotoxicité. Pour cela il est primordial de choisir des ARNm présents spécifiquement et majoritairement dans les cellules rénales.

Deuxième partie : expérimentations

Cette deuxième partie présente les différentes expérimentations réalisées pour parvenir à répondre à notre problématique principale. Nous allons dans un premier temps décrire les études préliminaires nécessaires à la mise en place d'un protocole fiable d'extraction d'ARN dans le sang. Puis nous décrivons l'étude principale de néphrotoxicité qui nous a permis d'évaluer une nouvelle approche dans l'utilisation des nouveaux biomarqueurs de toxicité rénale.

I. ETUDES PRELIMINAIRES SUR L'HEPATOTOXICITE

I.1 Objectifs : Mise en place d'un protocole d'extraction

Toute la première partie de notre étude avait pour but la mise au point d'un protocole d'extraction d'ARN à partir du sang, car cette étape était la plus délicate de notre protocole.

Pour cela nous avons cherché à reproduire les résultats des études menées par l'équipe de Miyamoto (Miyamoto et al. 2008) et celle de Wetmore (Wetmore, et al. 2010). Nous avons mis en place une étude sur le modèle de l'acétaminophène (paracétamol), en utilisant les mêmes conditions décrites dans ces articles. Puis nous avons réalisé des prélèvements de sang sur divers tubes (EDTA, héparine, citrate, tubes contenant un stabilisant spécifique) pour savoir lequel de ceux-ci permettait une extraction et une préservation des ARN. Nous avons évalué la quantification des acides nucléiques extraits par l'automate Nanodrop puis nous avons effectué des gels dénaturants pour visualiser la qualité des échantillons. Après plusieurs mois de travail, nous avons décidé de choisir le protocole le plus adapté à notre cas, c'est-à-dire celui qui nous permettait de répondre aux conditions suivantes :

- Une quantité suffisante d'ARN extrait pour effectuer des RT-PCR semi quantitatives ;
- Des extractions nécessitant un faible volume de sang ;
- Un protocole d'extraction simple ;
- Extraction d'ARN de bonne qualité ;
- Possibilité de congeler les échantillons.

I.2 Matériel et méthode : cinétique de dosage des ARNm d'albumine avec un seul traitement à l'acétaminophène

I.2.1 Animaux

L'étude est réalisée sur des rats mâles Sprague Dawley (élevage Charles River, L'Arbresle, France) âgés de 7 à 8 semaines. Les animaux sont hébergés dans des cages avec sol en polysulfate au nombre de 2 à 3 par cage dans une animalerie avec des conditions définies : une température ambiante de 21 à 23°C, alternance de cycles 12h jour/12h nuit, une hygrométrie de 40 à 70% et un flux d'air contrôlé à 10-15 changements par heure. L'alimentation (SAFE, Augy, France) sous forme de granulés et l'eau sont distribués *ad libitum*.

Les animaux sont acclimatés dans l'animalerie pendant une semaine avant le début du traitement. Les expériences sont menées dans le respect des principes éthiques. Tous les protocoles expérimentaux réalisés sur les animaux sont soumis au préalable au CEPAL (Comité d'Ethique Pour les Animaux de Laboratoire), comité interne à Sanofi-Aventis R&D.

Les animaux sont répartis en deux lots de la façon suivante :

Lots	Dose (mg/kg)	Nombre d'animaux	Nom du premier animal
		mâles	mâles
1	0	20	1
2	2000	20	21

Figure 8 : doses et animaux correspondants à chaque lot

I.2.2 Traitement

Afin de reproduire un modèle d'hépatotoxicité, nous avons utilisé l'acétaminophène dissout dans une solution contenant 0.6% méthylcellulose/0.5% polysorbate 80. Chaque animal du lot traité (lot 2) a reçu un seul traitement à la dose de 2000 mg/kg (figure 8). Les rats du lot témoin ont reçu uniquement le véhicule.

I.2.3 Prélèvements

Les prélèvements sont effectués à cinq temps différents après le traitement. Les rats sont systématiquement euthanasiés et les prises de sang ont été faites à l'aorte abdominale.

Les temps après traitement sont déterminés en prenant T0 comme le temps du traitement reçu par l'animal. La figure 9 représente les animaux de chaque lot prélevés selon les cinq temps après traitement : 2h, 6h, 14h, 24h et 48h.

Temps après traitement		Animaux	
J1	2h	lot 1	rats 1 à 4
		lot 2	rats 21 à 24
	6h	lot 1	rats 5 à 8
		lot 2	rats 25 à 28
J2	14h	lot 1	rats 17 à 20
		lot 2	rats 37 à 40
	24h	lot 1	rats 9 à 12
		lot 2	rats 29 à 32
J3	48h	lot 1	rats 13 à 16
		lot 2	rats 33 à 36

Figure 9 : répartition des animaux selon le temps de prélèvement

Pour chaque rat, au moment de l'autopsie, du sang est prélevé à l'aorte abdominale dans un tube hépariné (1,3 mL de sang) pour les analyses biochimiques ainsi qu'un tube spécifique (500 µL dans chaque tube) contenant des stabilisants d'ARN.

I.2.4 Analyse biochimique plasmatique

Le sang prélevé sur tube hépariné est centrifugé pour séparer le plasma. Les paramètres suivants sont analysés le jour même des prélèvements avec l'automate Cobas 6000 (Roche): AST (Aspartate aminotransférases), ALT (Alanine aminotransférases), GGT (Gamma glutamyltransférases), bilirubine, protéines totales, albumine, urée et créatinine.

I.2.5 Anatomie pathologique et examens histologiques

Pour chaque animal, le foie est fixé entièrement dans le formol. Les échantillons (lobe latéral droit, lobe médian droit et lobe latéral gauche) sont inclus en paraffine puis les blocs sont conservés. Les lames histologiques sont préparées et colorées à l'hémalun éosine.

L'évaluation des lésions histologiques est réalisée par un pathologiste ; ces lésions ont été classées en fonction de leur sévérité : minime (grade 1), faible (grade 2), modérée (grade 3), marquée (grade 4) ou sévère (grade 5). Trois paramètres différents sont observés et notés :

la diminution du glycogène dans les hépatocytes, la nécrose cellulaire et l'infiltration de cellules inflammatoires.

I.2.6 Extraction et quantification des ARN

La méthode suit le plan présenté ci-dessous en figure 10. Nous allons détailler ici la première et la dernière étape. Les autres se trouvent en annexe 1 et 2.

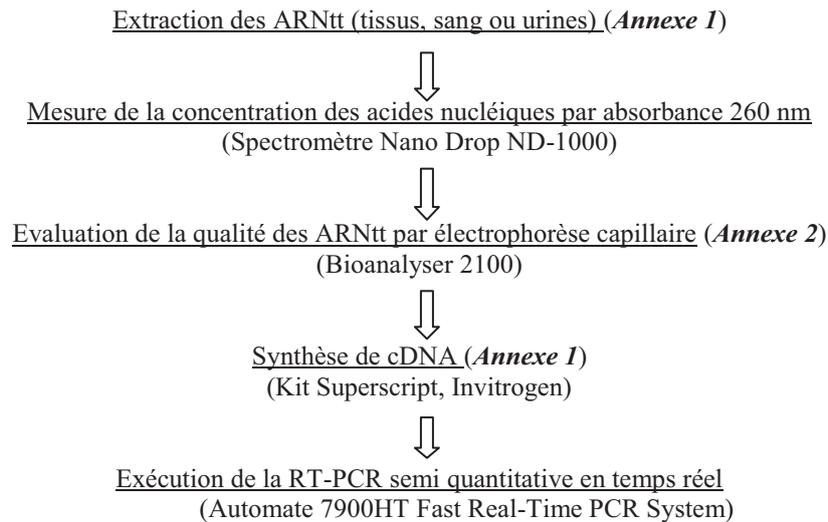


Figure 10 : Les différentes étapes pour quantifier les ARNm

Extraction des ARNtt à partir du sang : pour chaque rat, un échantillon de 0.5 ml de sang est récolté dans des tubes contenant des stabilisants d'ARN. Les tubes sont laissés à température ambiante pendant 2h minimum puis congelés à -20°C. Ils sont décongelés postérieurement pour l'extraction d'ARN.

I.2.7 RT-PCR semi quantitative en temps réel Taqman

A partir du cDNA, nous avons quantifié la présence d'ARNm du gène de l'albumine dans le sang. Nous avons en plus mesuré l'expression d'un gène de référence « house keeping » (exprimé de la même façon dans toutes les cellules), nécessaire pour pondérer les résultats (explication en annexe 3). Pour cela nous avons utilisé des sondes commandées chez Applied Biosystems. Les quantités de cDNA utilisées pour les RT-PCR de chacun des gènes ont été déterminées préalablement par des gammes de concentration. Pour cela nous avons utilisé les foies de rats témoins.

I.2.8 Analyse des résultats

Analyses statistiques des données biochimiques : nous avons utilisé le logiciel S@T-Tox pour mettre en évidence la significativité des résultats.

Analyses des données de la RT-PCR : à la différence de l'étude principale effectuée sur la néphrotoxicité avec la gentamicine (deuxième partie), nous avons représenté les résultats en données brutes c'est-à-dire avec les valeurs des Ct obtenus par la RT-PCR.

I.3 Résultats

I.3.1 Biochimie et histologie

Les données sont représentées sous forme d'un tableau (figure 11) reprenant les moyennes de chaque lot en fonction du temps des prélèvements. Les résultats individuels sont en annexe 4.

Résultats biochimiques : les paramètres hépatiques AST et ALT du lot traité sont significativement augmentés par rapport au lot contrôle à partir de 14h après le traitement. Tous les autres paramètres ne sont pas modifiés par le traitement.

Résultats histologiques : le tableau de la figure 11 reprend les moyennes des grades évalués sur les différentes lames. La figure 12 présente des photos de lames de foie de rats traités et témoins. Les premières lésions visibles chez les animaux traités sont observées 14h après le traitement (baisse du contenu en glycogène, nécrose d'hépatocytes, et inflammation en région centrolobulaire). Aux temps 24 et 48 heures on observe une nécrose de plus en plus étendue (grade 3,8 à 48h du traitement) et une infiltration de cellules inflammatoires modérée.

		Grade histologique												
	Animal	GGT U/L	ALAT U/L (22-42)	ASAT U/L (49-155)	albumine g/L (40.7-44.9)	globuline g/L (17.7-21.8)	protéines totales g/L (62.4-77.1)	bilirubine μ mol/L (0.8-3.2)	urée (mmol/L) (VU : 3.6-5.8)	Créatinine (μ mol/L) (VU : 20-37)	Decreased glycogen	necrosis	inflammation	
t2h	control	0,0	35,8	75,8	39,0	18,8	57,8	0,3	4,0	22,2	0	0	0	
	traités 2000mg/kg	21	0,0	39,5	89,5	42,5	21,3	63,8	0,0	2,6	17,1	0	0	0
		23	0,0	39,5	89,5	42,5	21,3	63,8	0,0	2,6	17,1	0	0	0
		24	0,0	39,5	89,5	42,5	21,3	63,8	0,0	2,6	17,1	0	0	0
24		0,0	39,5	89,5	42,5	21,3	63,8	0,0	2,6	17,1	0	0	0	
t6h	control	0,0	31,3	70,8	39,0	18,3	57,3	0,2	2,8	19,2	0	0	0	
	traités 2000mg/kg	25	0,0	43,8	85,3	44,3	22,0	66,3	0,0	3,4	20,7	0	0	0
		26	0,0	43,8	85,3	44,3	22,0	66,3	0,0	3,4	20,7	0	0	0
		27	0,0	43,8	85,3	44,3	22,0	66,3	0,0	3,4	20,7	0	0	0
28		0,0	43,8	85,3	44,3	22,0	66,3	0,0	3,4	20,7	0	0	0	
t14h	control	0,0	38,3	72,8	40,5	19,3	59,8	0,5	5,0	23,1	0	0	0	
	traités 2000mg/kg	37	0,0	51,25*	140,75*	44,3	21,5	65,8	1,1	6,1	21,9	1,8	1,3	1,0
		38	0,0	51,25*	140,75*	44,3	21,5	65,8	1,1	6,1	21,9	1,8	1,3	1,0
		39	0,0	51,25*	140,75*	44,3	21,5	65,8	1,1	6,1	21,9	1,8	1,3	1,0
40		0,0	51,25*	140,75*	44,3	21,5	65,8	1,1	6,1	21,9	1,8	1,3	1,0	
t24h	control	0,0	32,5	77,8	39,8	18,0	57,3	0,0	4,9	24,6	0	0	0	
	traités 2000mg/kg	29	0,0	146*	1001,5*	42,5	19,8	62,3	1,4	5,3	28,4	3,0	2,8	2,3
		30	0,0	146*	1001,5*	42,5	19,8	62,3	1,4	5,3	28,4	3,0	2,8	2,3
		31	0,0	146*	1001,5*	42,5	19,8	62,3	1,4	5,3	28,4	3,0	2,8	2,3
32		0,0	146*	1001,5*	42,5	19,8	62,3	1,4	5,3	28,4	3,0	2,8	2,3	
t48h	control	0,0	34,0	71,0	40,0	19,0	59,0	0,0	4,2	26,0	0	0	0	
	traités 2000mg/kg	33	0,0	345,75*	1367,25*	37,8	19,0	56,8	2,0	3,6	22,1	3,5	3,8	2,8
		34	0,0	345,75*	1367,25*	37,8	19,0	56,8	2,0	3,6	22,1	3,5	3,8	2,8
		35	0,0	345,75*	1367,25*	37,8	19,0	56,8	2,0	3,6	22,1	3,5	3,8	2,8
36		0,0	345,75*	1367,25*	37,8	19,0	56,8	2,0	3,6	22,1	3,5	3,8	2,8	

Figure 11 : résultats des analyses biochimiques plasmatiques et des observations histologiques (moyennes pour chaque sous groupe)

(* = $p < 0.05$ vs contrôle)

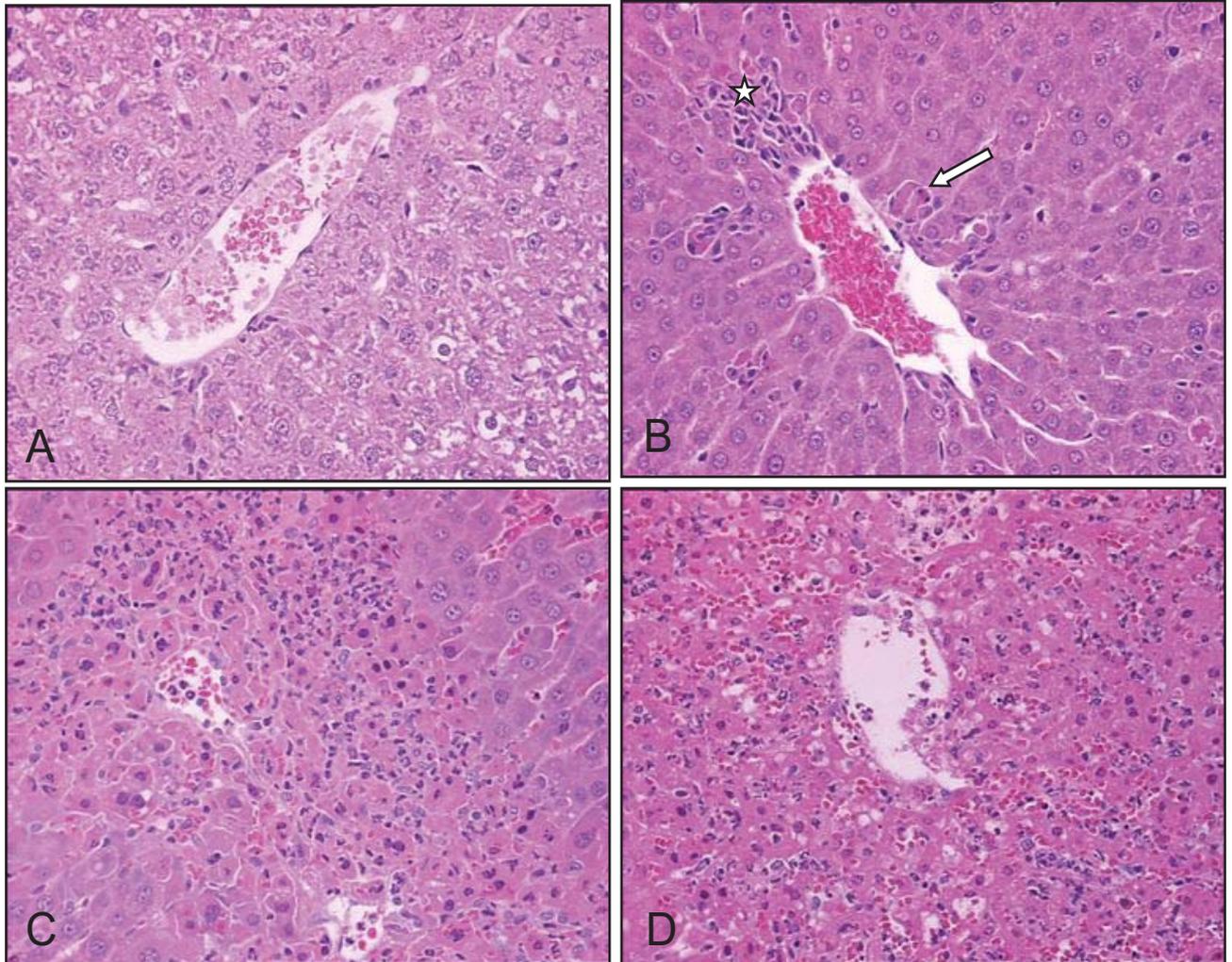


Figure 12 : illustration des lésions hépatiques (objectif 20)

- A: foie de rat témoin; les hépatocytes sont chargés en glycogène (aspect vacuolisé)
- B: foie d'un rat traité à 14h, baisse du contenu en glycogène, nécrose minime hepatocytaire de cellules isolées en région centrolobulaire (flèche) et infiltration de cellules inflammatoires (étoile)
- C: foie d'un rat traité à 24h, nécrose et inflammation modérée à marquée
- D: foie d'un rat traité à 48h, nécrose sévère et inflammation

I.3.2 Dosage des ARNm d'albumine dans le sang

Evaluation de la quantité et de la qualité des extractions (table en annexe 5): le Nanodrop a mesuré des concentrations en acides nucléiques comprises entre 36,5 et 1303 ng/ μ l pour les échantillons de sang. La valeur RIN (RNA Integrity Number) calculée par le logiciel 2100 Expert de l'automate Bioanalyser correspond à une note sur 10 qui prend en compte la qualité des ARN évalués (Annexe 2). Ils varient entre 5,7 et 9 pour les extractions sur sang total, ce qui correspond à un résultat satisfaisant (résultats complets en annexe 5).

Quantification des ARN des lots traités : Nous n'avons pas réussi à doser les ARNm d'albumine chez les animaux témoins donc nous n'avons pas pu utiliser la méthode des $\Delta\Delta$ Ct comme dans l'étude suivante sur la néphrotoxicité (explication en annexe 3). Le tableau 13 présente les données brutes du nombre de cycles d'amplification nécessaire pour détecter l'ARNm du gène d'intérêt (valeur Ct). La donnée « >40 » signifie que les ARNm n'ont pas pu être détectés par l'automate après les 40 cycles d'amplification de la réaction Taqman.

Les ARNm de l'ACTB (gène de référence) sont dosés chez tous les animaux, avec un nombre de cycle situé entre 18 et 22. Ce sont des valeurs normales de dosage d'ARNm de ce gène.

Les ARNm de l'albumine ne sont pas détectés chez les animaux témoins, mais commencent à être dosables dans le sang des animaux traités à partir de 6h après le traitement (pour un animal seulement), cependant les dosages ne sont clairement significatifs que 14h après le traitement.

		Animaux	Taqman Ct	
			ACTB	Albumine
t2h	control	1	21,24	>40
		2	21,19	>40
		3	21,25	>40
		4	21,33	>40
	traités 2000mg/kg	21	20,96	>40
		22	20,41	>40
		23	20,71	>40
		24	21,00	>40
t6h	control	5	21,97	>40
		6	21,89	>40
		7	21,55	>40
		8	21,93	>40
	traités 2000mg/kg	25	22,03	>40
		26	21,71	>40
		27	21,87	39,79
		28	21,77	>40
t14h	control	17	21,77	>40
		18	21,32	>40
		19	21,48	>40
		20	20,41	>40
	traités 2000mg/kg	37	20,69	37,03
		38	21,16	39,20
		39	20,84	38,50
		40	21,20	39,48
t24h	control	9	21,02	>40
		10	22,87	>40
		11	21,46	>40
		12	20,99	>40
	traités 2000mg/kg	29	20,53	>40
		30	21,44	31,53
		31	20,21	34,74
		32	21,51	38,42
t48h	control	13	21,17	>40
		14	21,49	>40
		15	21,29	>40
		16	21,29	>40
	traités 2000mg/kg	33	19,35	35,40
		34	18,92	34,12
		35	18,03	33,30
		36	18,48	35,59

Figure 13 : valeurs des Ct pour chaque échantillon (en gris : échantillons dont les ARNm d'albumine ont été détectés dans le sang)

II. ETUDE PRINCIPALE

II.1 Objectifs

Le modèle de néphrotoxicité que nous avons recherché est celui qui provoque une nécrose des cellules rénales pour obtenir des ARNm circulants exprimés dans celles-ci. Pour cela nous avons utilisé le modèle de néphrotoxicité induite par un traitement à la gentamicine, d'une part parce que nous connaissons actuellement le mécanisme cytotoxique qu'il induit sur le rein et d'autre part pour avoir le même modèle que les études réalisées dans le cadre du consortium dans les phases de validation des biomarqueurs en néphrotoxicité.

II.2 Matériels et méthodes

II.2.1 Animaux

L'étude est réalisée sur des rats mâles Sprague Dawley (élevage Charles River, L'Arbresle, France) âgés de 7 à 8 semaines. Les animaux sont hébergés dans les mêmes conditions que l'étude avec l'acétaminophène (voir paragraphe I.2.1). Ils sont distribués de manière aléatoire en trois lots différents de quinze rats (figure 14).

II.2.2 Traitement

Pour reproduire le modèle de néphrotoxicité, nous avons utilisé la gentamicine dissoute dans une solution de chlorure de sodium à 0.9 % et administrée par injection sous-cutanée avec un volume de 5 mL/kg, une fois par jour. Nous avons utilisé deux doses différentes (figure 14) pour obtenir différents stades lésionnels. Pour les témoins (lot 1), un volume équivalent de chlorure de sodium à 0.9 % a été administré par voie sous-cutanée.

Lots	Dose (mg/kg/j)	Nombre d'animaux		Nom du premier animal
		mâles	mâles	mâles
1	0	15	15	1
2	25	15	15	16
3	75	15	15	31

Figure 14 : doses et animaux correspondants à chaque lot

L'étude comporte trois durées de traitement différentes. A la fin de chacune des trois, cinq rats par lot sont euthanasiés le lendemain, soit 15 rats à chaque fois, de la façon suivante :

- Traitement de 3 jours : autopsies à J4
- Traitement de 5 jours : autopsies à J6
- Traitement de 10 jours : autopsies à J11

Le tableau de la figure 15 présente les rats autopsiés selon les trois périodes de traitement.

Jour d'autopsies	Numéro de lot	Animaux
J4	Lot 1	rats 1 à 5
	Lot 2	rats 16 à 20
	Lot 3	rats 31 à 35
J6	Lot 1	rats 6 à 10
	Lot 2	rats 21 à 25
	Lot 3	rats 36 à 40
J11	Lot 1	rats 11 à 15
	Lot 2	rats 26 à 30
	Lot 3	rats 41 à 45

Figure 15 : numéros des rats par lots et par période de traitement

II.2.3 Prélèvements

A chaque temps de prélèvement, cinq rats de chaque lot (figure 15) sont euthanasiés par exsanguination à l'aorte abdominale après anesthésie générale sous isoflurane.

Pour chaque rat, au moment de l'autopsie, du sang est prélevé à l'aorte abdominale dans un tube hépariné (1,3 mL de sang) pour les analyses biochimiques ainsi que dans deux tubes spécifiques (500 µL dans chaque tube) contenant des stabilisants d'ARN. De plus, la veille des autopsies, 500 µL d'urine est prélevée dans un tube contenant les stabilisants à ARN, après une surcharge hydrique de 10 ml par rat. Enfin un prélèvement d'urine a été réalisé sur toute la nuit précédant l'autopsie dans des cages à diurèse.

II.2.4 Analyses biochimiques plasmatiques

Le sang prélevé sur tube hépariné est centrifugé pour séparer le plasma. Les paramètres suivants sont analysés le jour même des prélèvements avec l'automate Cobas 6000 (Roche): urée, créatinine.

II.2.5 Analyse urinaire

Après avoir mesuré le volume total récolté sur la nuit précédant les autopsies, l'analyse qualitative des urines est réalisée avec l'automate Clinitek 500. Des paramètres biochimiques sont également dosés sur les urines avec l'automate Cobas 6000 (Roche) : créatinine et protéines totales.

II.2.6 Anatomie pathologique et examens histologiques

Pour chaque animal, les reins sont prélevés de la façon suivante : les deux reins sont pesés après leurs prélèvements puis une coupe longitudinale du rein droit est congelée à -80°C dans l'azote liquide (papillotes d'aluminium) ; le reste du rein droit et le rein gauche entier sont fixés dans le formol. Les échantillons sont inclus en paraffine puis des lames histologiques sont préparées et colorées à l'hémalum éosine. L'ensemble des lames de rein est analysé par le pathologiste de l'étude. Les lésions observées ont été classées en : minime (grade 1), faible (grade 2), modérée (grade 3), marquée (grade 4) ou sévère (grade 5).

II.2.7 Extraction et quantification des ARN

La méthode suit le plan présenté dans l'étude sur l'acétaminophène en figure 10.

Extraction des ARNtt à partir des reins : pour l'extraction des ARNtt du tissu, nous avons prélevé environ 100 mg du rein droit (congelé dans la papillote d'aluminium) dans des tubes PreCellys (tubes spécifiques remplis de billes en céramique) contenant 1 mL de Trizol® (Invitrogen), en prenant soin d'avoir chacune des différentes parties histologiques. Ce réactif a la propriété de stabiliser les ARN contre les ribonucléases tissulaires. Nous avons extrait ainsi les reins choisis de façon aléatoire présentés dans la figure 16.

<i>Lots (doses)</i>	<i>Durée du traitement</i>	<i>Numéro de l'animal (extraction ARN sur rein droit)</i>
Lot 1 (0mg/kg/j)	3 jours (autopsie J4)	5
	5 jours (autopsie J6)	7
	10 jours (autopsie J11)	13
Lot 2 (25 mg/kg/j)	3 jours (autopsie J4)	17 et 18
	5 jours (autopsie J6)	22 et 23
	10 jours (autopsie J11)	26 et 29
Lot 3 (75 mg/kg/j)	3 jours (autopsie J4)	31 et 34
	5 jours (autopsie J6)	37 et 40
	10 jours (autopsie J11)	41 et 44

Figure 16 : Numéro des animaux utilisés pour extraction ARN des reins

Les grandes étapes peuvent se résumer de la façon suivante :

- a. Extraction liquide-liquide (chloroforme)
- b. Précipitation de l'ARN (Isopropanol)
- c. Lavage de l'ARN à l'éthanol 75%
- d. Dissolution de l'ARN dans de l'eau RNase-free
- e. Traitement à la DNase avec les colonnes RNeasy (kit RNeasy mini, QIAGEN)

Extraction des ARNt à partir du sang : pour chaque rat, un échantillon de 0.5 ml de sang est récolté dans des tubes contenant des stabilisants d'ARN. Les tubes sont laissés à température ambiante pendant 2h minimum puis congelés à -20°C. Ils sont décongelés postérieurement pour l'extraction d'ARN selon un protocole spécifique défini lors des études préliminaires.

II.2.8 RT-PCR semi-quantitative en temps réel TaqMan

A partir du cDNA, nous avons quantifié la présence d'ARNm dans le rein et le sang de neuf gènes choisis préalablement comme biomarqueurs potentiels (figure 2). Nous avons en plus mesuré l'expression de trois gènes de référence « house keeping » (exprimé de la même façon dans toutes les cellules), nécessaire pour pondérer les résultats (explication en annexe 3). Pour cela nous avons utilisé des sondes commandées chez Applied Biosystems. Les quantités de cDNA utilisées pour les RT-PCR de chacun des gènes ont été déterminées

préalablement par des gammes de concentration, comme pour l'étude à l'acétaminophène. Pour cela nous avons utilisé les reins de rats témoins des études préliminaires.

II.2.9 Analyse des résultats

Analyses statistiques des données biochimiques : pour cela nous utilisons le logiciel S@T-Tox.

Analyses des données de la RT-PCR : Nous avons utilisé la méthode de calcul de $\Delta\Delta C_t$ décrite en annexe 2.

II.3 Résultats

II.3.1 Biochimie et histologie

Les résultats biochimiques (figure 17): le volume urinaire est le premier paramètre qui change à six jours de traitement pour les deux lots. Il en est de même pour les protéines urinaires qui augmentent de plus de 50 % au sixième jour pour le lot traité à 25 mg/kg/j.

Les dosages de l'urée et de la créatinine plasmatique sont significativement modifiés seulement au onzième jour pour les deux lots traités (25 et 75 mg/kg/j).

		Plasma										Urines									
		Biochimie plasmatique										Biochimie urinaire									
Animaux		urée			créatinine plasmatique			Volume urinaire				créatinine urinaire			Prot. Tot. urinaires						
		concentration (VU: 3,1-6,3)	Moyenne (mmol/L)	% control	concentration (µmol/L) (VU: 17-47)	Moyenne (µmol/L)	% control	Volume (ml)	Moyenne (ml)	% control	concentration (µmol)	Moyenne (µmol)	% control	concentration (g/L)	Moyenne (g/L)	% control					
J4	control	1	4,84		24,10			13				55,30					3				
		2	4,22		20,70			18				64,90					6				
		3	3,99	4,41	-	25,08			9	13,00	-		38,80	55,13	-			3			
		4	4,48			29,40			15				65,70					6			
		5	4,52			25,60			11				51,10					4			
	traités 25 mg/kg/j	16	3,69		22,10			3				9,80					1				
		17	4,52		20,90			16				45,20					4				
		18	3,73	4,29	-3	24,10	23,34	-7	15	12,00	-8		56,70	48,78	-21		4				
		19	5,18			27,30			12				49,70				3				
		20	4,34			22,30			15				57,50				4				
J6	control	31	5,43		24,90			20				62,90					6				
		32	4,75		26,80			16				51,20					6				
		33	6,08	5,27	20	30,70	26,74	7	16	17,10	32	64,00	59,02	7			6				
		34	6,05			28,90			15				52,70					6			
		35	4,05			22,40			20				64,30					6			
	traités 75 mg/kg/j	6	3,94		21,90			11				56,90					3				
		7	4,33		26,50			10				43,80					4				
		8	3,81	3,95	-	19,10	23,68		11	11,80	-		50,20	50,79	-		2				
		9	3,18			21,10			12				48,80				2				
		10	4,48			29,80			15				54,20				5				
J11	traités 25 mg/kg/j	21	4,42		24,70			15				53,20					3				
		22	4,32		24,60			13				50,10					6				
		23	4,8	4,54	15	27,50	24,74	4	16	14,4*	22	65,90	54,15	7			7				
		24	4,87			22,70			11			38,00					3				
		25	4,28			24,20			17			63,60					6				
	traités 75 mg/kg/j	36	4,35		27,00			13				54,00					4				
		37	4,45		26,10			21				60,20					9				
		38	4,73	4,45	13	29,70	28,08	19	15	16,4*	39	57,20	57,78	14			6				
		39	5,02			29,70			16			56,90					7				
		40	3,68			27,90			17			60,10					5				
control	11	3,94		20,80			16				40,50					4					
	12	4,5		27,90			11				57,80					5					
	13	3,79	3,93	-	21,90	20,90		8	10,50	-	43,10	40,90	-			2					
	14	3,5			15,70			13			56,10					4					
	15	3,93			18,20			5			7,00					1					
traités 25 mg/kg/j	26	4,99		28,50			17				66,20					6					
	27	5,37		28,70			18				58,30					6					
	28	5,12	5,72*	45	27,20	29,90*	43	17	17,2*	64	62,50	61,56	51			6					
	29	7,23			35,80			18			68,00					4					
	30	5,89			29,30			17			52,90					7					
	traités 75 mg/kg/j	41	16,1		90,60			18				51,50					14				
		42	9,8		61,80			24				68,50					17				
		43	15,72	14,626*	272	70,40	81,48*	290	22	18,7*	78	54,70	55,80	36			13				
		44	19,58			115,40			14			46,90					9				
		45	11,93			69,20			17			57,40					11				

Figure 17 : résultats biochimiques plasmatiques et urinaires (* = p<0.05 vs contrôle)

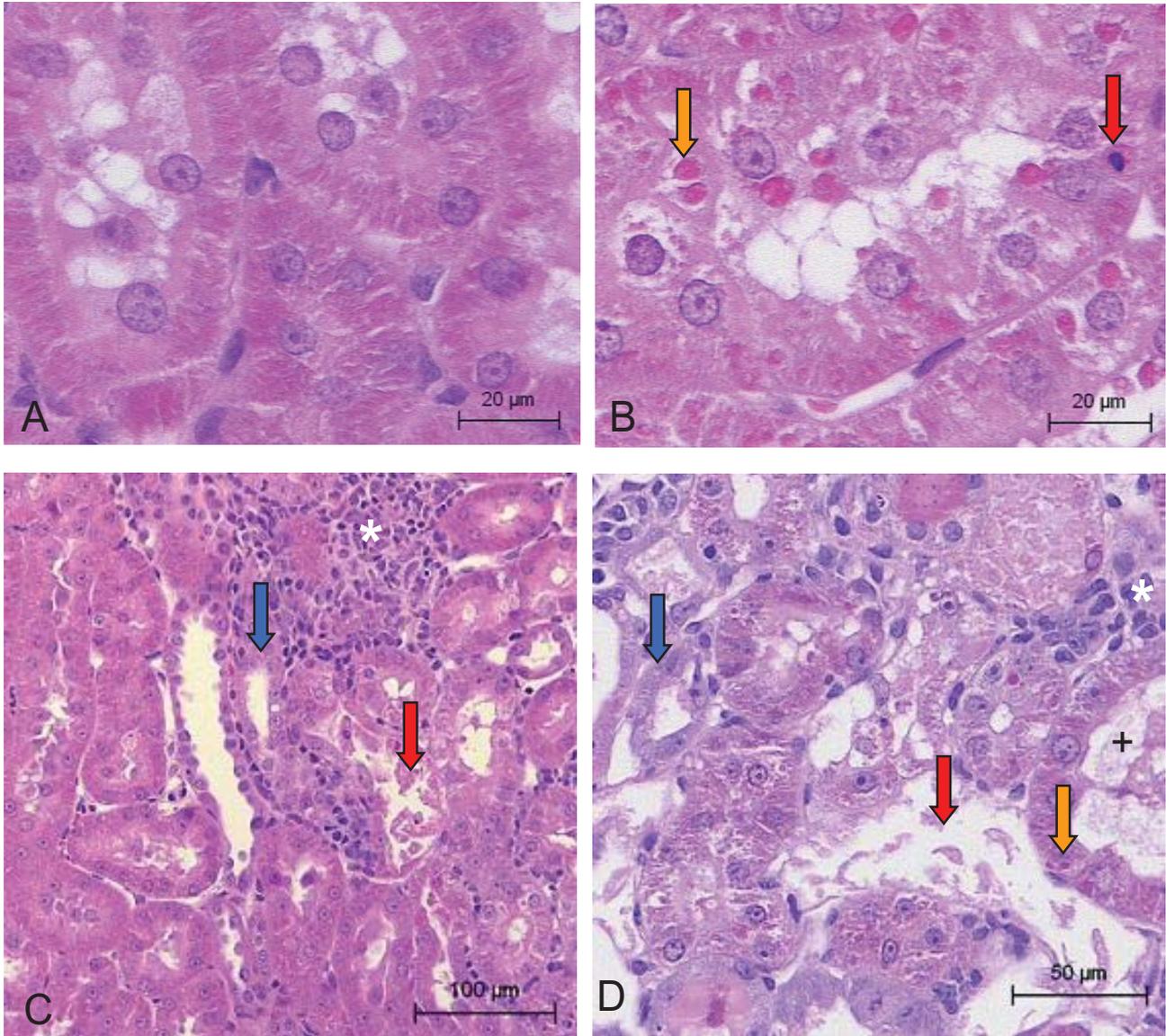


Figure 18a - illustrations des lésions corticales rénales

A: Rat controle - tubes contournés proximaux.

B: Rat traité: 75 mg/kg/jour, J4 - accumulation de "hyaline droplets" (flèche orange) et rares cellules tubulaires apoptotiques (flèche rouge).

C: Rat traité: 25 mg/kg/jour, J11 - inflammation (*), nécrose aigüe (flèche rouge) et basophilie tubulaire (flèche bleue)

D: Rat traité: 75 mg/kg/jour, J11 - inflammation (*), nécrose aigüe (flèche rouge) et basophilie tubulaire (flèche bleue), "hyaline droplets" (flèche orange), dilatation tubulaire (+)

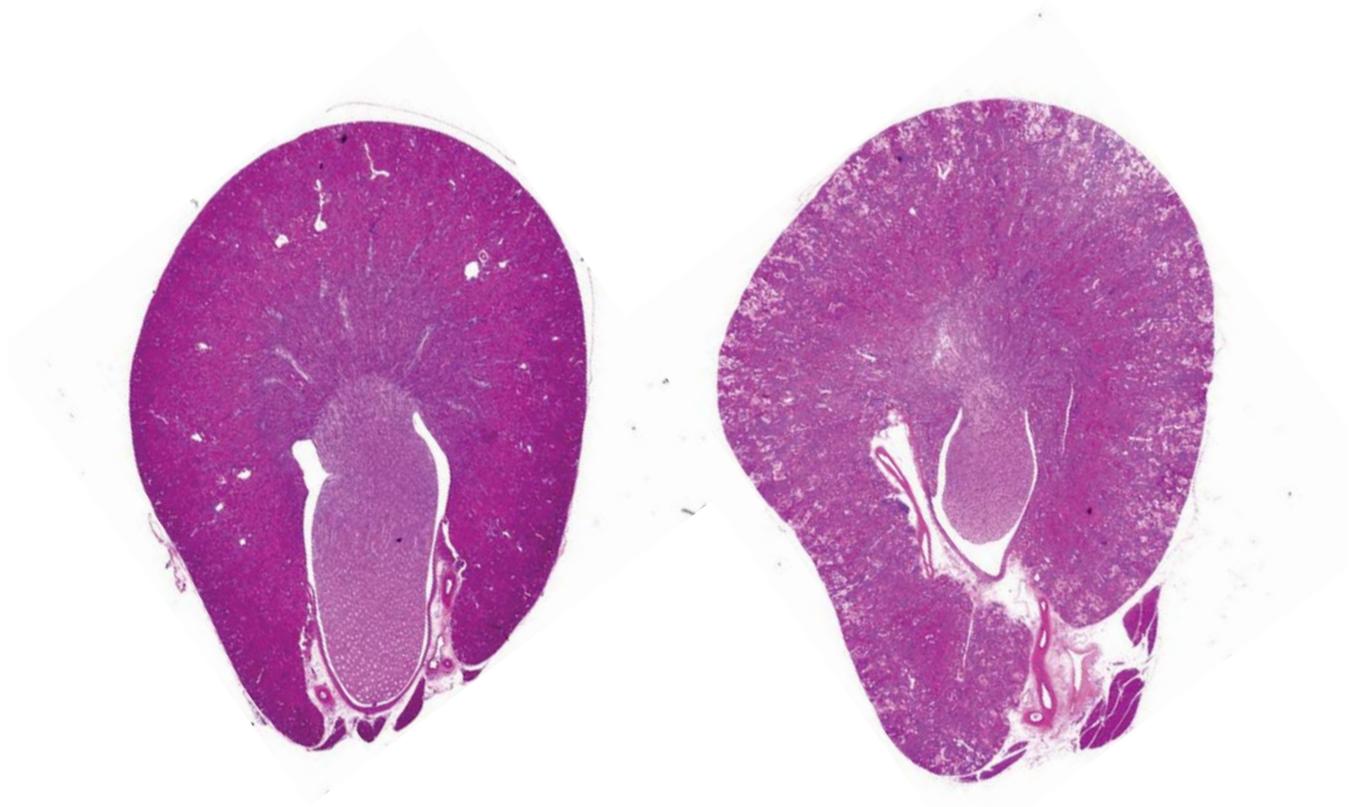


Figure 18b - illustrations des lésions corticales rénales

A: Rat controle.

B: Rat traité: 75 mg/kg/jour, J11 – Illustration de l'étendue des lésions corticales diffuses

Les résultats histologiques (images microscopiques sur les figures 18a et 18b, bilan des lésions sur la figure 20) : les observations faites sur les lames histologiques montrent des lésions tissulaires différentes selon la dose et la durée du traitement. A la dose de 25 mg/kg/j nous observons dès le quatrième jour quelques « hyaline droplets » (dépôts protéiques éosinophiles) dans le cytoplasme des cellules des tubes contournés. Ils sont en plus grande quantité au sixième jour et un animal parmi les cinq présente quelques foyers de nécrose tubulaire. Au onzième jour nous observons ces foyers chez les cinq animaux traités, en quantité minimale à faible (grade 1 à 2) mais également une basophilie faible à modérée, quelques tubules dilatés et une infiltration de cellules inflammatoires modérée minimale à faible. A la dose de 75 mg/kg/j la nécrose tubulaire apparaît légèrement dès le quatrième jour, avec également des « hyaline droplets » en quantité supérieure (grade 2 à 3). Au sixième jour, on observe les mêmes lésions mais en plus grande quantité, avec une basophilie des cellules tubulaires. Au onzième jour, la nécrose tubulaire prédomine chez tous les animaux (grade 4) associée à une basophilie marquée (grade 4), mais également l'inflammation et la dilatation tubulaire (grade 2 à 3). Des protéines « casts » sont également visibles en quantité minimale à faible.

II.3.2 Dosage des ARNm

Evaluation de la quantité et de la qualité des extractions (table en annexe 6): le Nanodrop a mesuré des concentrations en acides nucléiques comprises entre 2220 et 3510 ng/ μ l pour les extractions faites à partir des reins, et entre 117 et 926 ng/ μ l pour les échantillons plasmatiques. La valeur RIN (RNA Integrity Number) calculée par le logiciel 2100 Expert de l'automate Bioanalyser correspond à une note sur 10 qui prend en compte la qualité des ARN évalués (Annexe 2). Ils varient entre 6.1 et 8.7 pour les extractions tissulaires et entre 7.2 et 8.5 pour les plasmatiques (résultats complets en annexe 6).

Quantification des ARN des lots traités : Pour chacune des trois durées de traitement et chaque dose utilisée, nous avons représenté en forme d'histogramme à échelle inversée les valeurs des $\Delta\Delta$ Ct pour les gènes étudiés ici (figure 19). Dans le sang, trois gènes n'ont pas été quantifiables : *Umod*, *Aqp2* et *Calb*. Nous pouvons décrire plusieurs points :

- Traitement à 25 mg/kg/j (figure 19a)

Dans les reins, au quatrième jour de traitement, seul le gène *Lcn2* est significativement modifié : son expression est augmentée. Puis au sixième, uniquement le gène de *Havcr1*

(KIM-1). Ce n'est qu'au onzième que l'on remarque un réel changement d'expression : les gènes *Lcn2*, *Clus*, *Havcr1* (KIM-1) sont plus exprimés alors que celui de la *Calb* est inhibé.

Pour le sang, à cette dose, on remarque que les valeurs absolues des $\Delta\Delta Ct$ ne sont pas assez élevées pour être interprétables.

- Traitement à 75 mg/kg/j (figure 19b):

Dans les reins, dès le quatrième jour, cinq gènes sont plus fortement exprimés : *Havcr1* (KIM-1), *Lcn2*, *Clus* et *α -gst*, alors que *Calb* est significativement inhibé. D'ailleurs nous remarquons que pour trois d'entre eux (*Lcn2*, *Clus* et *α -gst*) les $\Delta\Delta Ct$ redeviennent nuls au sixième jour. Au onzième, les mêmes cinq gènes du départ se démarquent dans le même sens, *Umod* vient s'ajouter (déjà au sixième jour) en étant inhibé.

Pour le sang, nous observons des modifications dès le quatrième jour avec une augmentation presque significative de l'expression de *α -gst* ($\Delta\Delta Ct = -1.45$). Au sixième jour, seul le *Lcn2* est modifié en étant inhibé. Au onzième jour trois transcrits sont détectés en plus grande quantité dans le sang : *Havcr-1* (KIM-1), *Timp1* et *Clus*.

On observe un effet dose : les biomarqueurs ont une valeur absolue du $\Delta\Delta Ct$ plus importante avec le traitement à 75 mg/kg/j par rapport à 25 mg/kg/j.

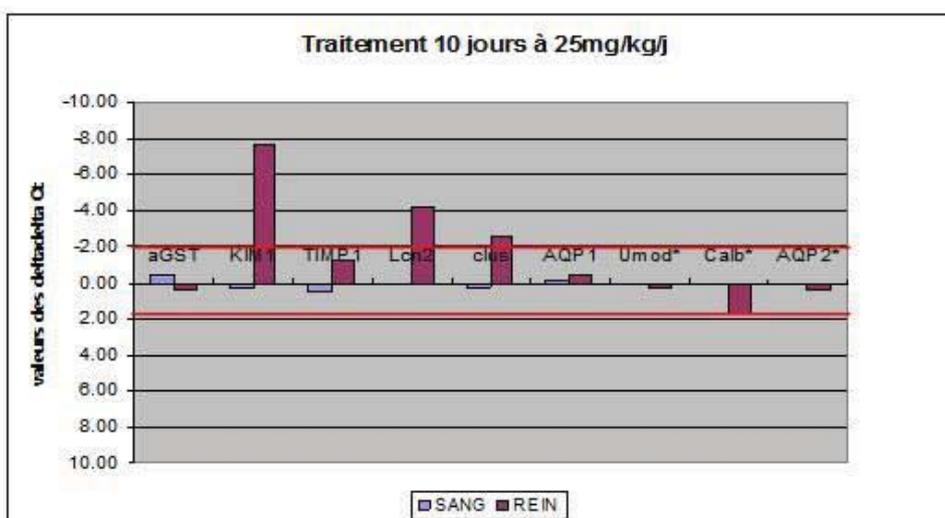
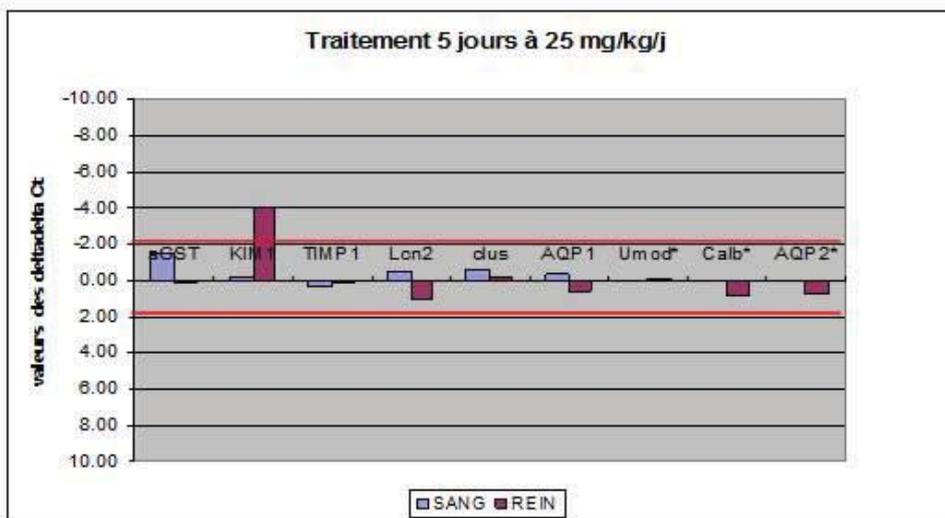
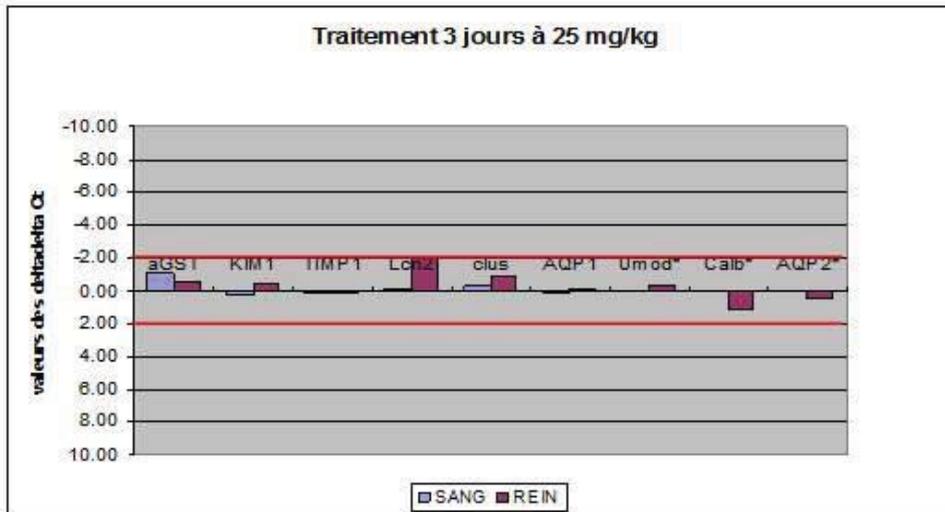


Figure 19a : Représentation des $\Delta\Delta C_t$ des biomarqueurs à 25 mg/kg/j
 (* : ARN non détectés dans le sang)

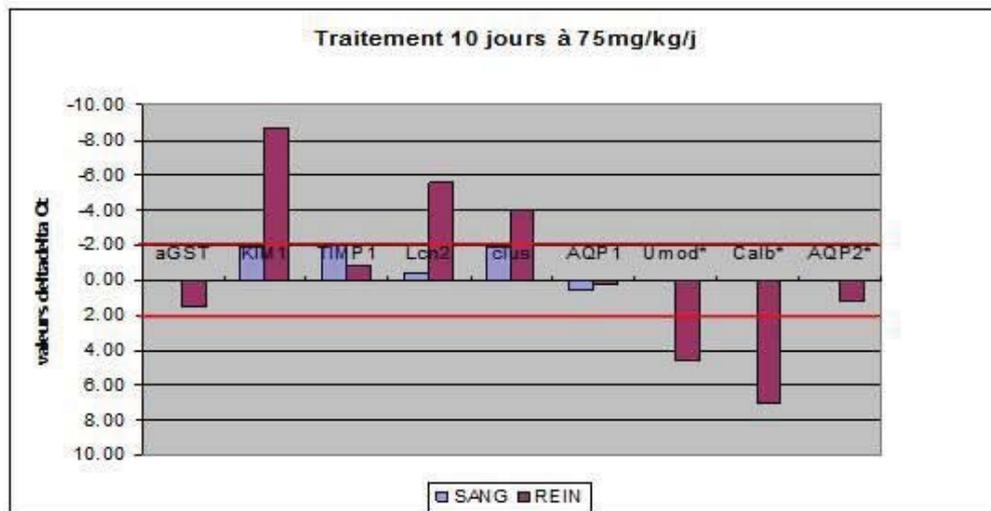
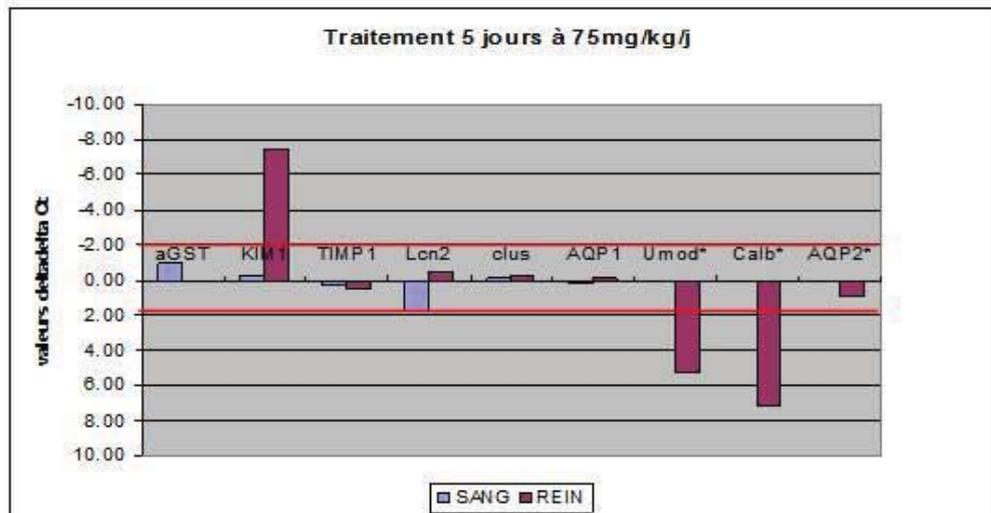
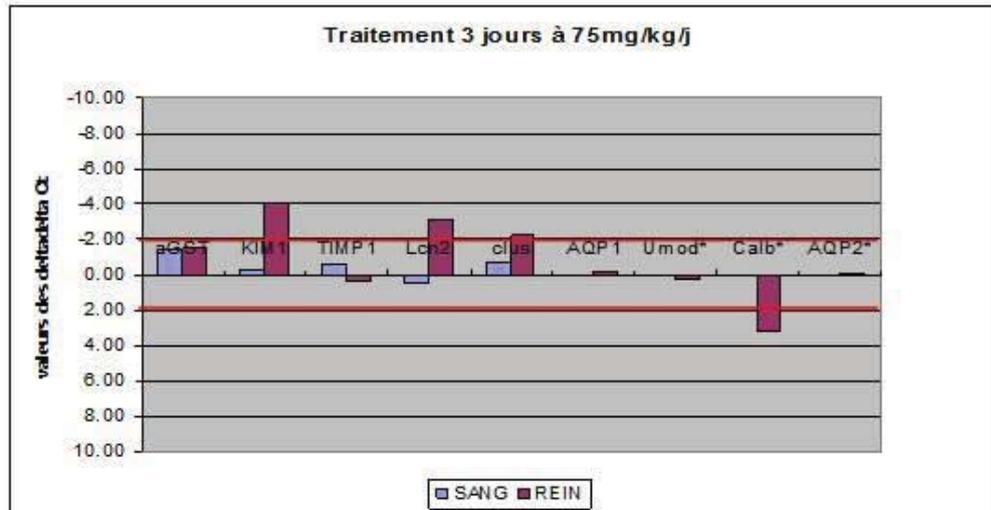


Figure 19b : Représentation des $\Delta\Delta C_t$ des biomarqueurs à 75 mg/kg/j
 (* : ARN non détectés dans le sang)

	Modifications biochimiques (en % d'augmentation par rapport au lot control)	Lésions histologiques grades	Quantification des ARNm tissulaires des reins	Quantification des ARNm circulants sanguins
J4	Lot 2 (25 mg/kg/j) <i>Aucune modification significative</i>	hyaline droplets 1	<u>Augmentation</u> : Lcn-2	<i>Aucune modification significative</i>
	Lot 3 (75 mg/kg/j) <i>Aucune modification significative</i>	hyaline droplets nécrose tubulaire 2.2 1	<u>Augmentation</u> : Kim-1, Lcn-2, Clus, α-GST <u>Diminution</u> : Calb	<u>Augmentation</u> : α-GST
J6	Lot 2 (25 mg/kg/j) Volume urinaire : + 22 % Prot. Urinaires : + 53 %	hyaline droplets 1.2	<u>Augmentation</u> : Kim-1	<u>Augmentation</u> : α-GST
	Lot 3 (75 mg/kg/j) Volume urinaire : + 39 % Prot. Urinaires : + 88 %	hyaline droplets nécrose tubulaire basophilie débutante 2.8 1 0.6	<u>Augmentation</u> : Kim-1 <u>Diminution</u> : Calb, Umod	<u>Diminution</u> : Lcn2
J11	Lot 2 (25 mg/kg/j) Volume urinaire : + 64 % Prot. Urinaires : + 90 % Urée : + 45 % Créatinine : + 43 %	hyaline droplets nécrose tubulaire basophilie dilatation tubulaire inflammation 0.6 1.4 2.4 1.2 1.2	<u>Augmentation</u> : Kim-1, Lcn-2, Clus <u>Diminution</u> : Calb	<i>Aucune modification significative</i>
	Lot 3 (75 mg/kg/j) Volume urinaire : + 78 % Prot. Urinaires : + 316 % Urée : + 272 % Créatinine : + 290 %	hyaline droplets nécrose tubulaire basophilie dilatation tubulaire inflammation protéines "casts" 3 4 4 3 2.6 1.6	<u>Augmentation</u> : Kim-1, Lcn-2, Clus <u>Diminution</u> : Calb, Umod	<u>Augmentation</u> : Kim-1, Timp-1, Clus

Figure 20 : Synthèse des modifications observées par lots traités en biochimie, histologie et quantification d'ARNm dans les reins et le sang

III. DISCUSSION

III.1 Etude préliminaire sur l'hépatotoxicité

Notre objectif premier était de doser les ARNm circulants sanguins comme biomarqueurs de toxicité tissulaire. Tout d'abord, nous avons montré qu'il était possible d'extraire des ARN du sang total à partir des expérimentations préliminaires portant sur l'induction de lésions hépatiques avec le paracétamol. Les données obtenues des dosages de l'ARNm de l'albumine dans le sang ont été très similaires à celles publiées par d'autres équipes (Miyamoto et al. 2008) ; Wetmore et al. 2010). En effet, les ARNm de l'albumine sont détectés uniquement chez les animaux traités et seulement à partir de 14h après le traitement. On s'aperçoit également que le nombre de cycles diminue avec le temps, ce qui signifie que les ARNm d'albumine sont en plus grande quantité chez les animaux prélevés plus longtemps après le traitement. Ces résultats sont en accord avec les données histologiques où l'on observe une nécrose de plus en plus étendue entre 14 et 48 heures. Ces données confirmeraient le fait que les ARNm contenus dans les cellules sont déversés dans le milieu extracellulaire lors de mort cellulaire. Les ARNm du gène house-keeping (ACTB) ont été dosés chez tous les animaux avec une valeur Ct moyenne dans les valeurs normales (Livak and Schmittgen 2001). On peut en déduire que les échantillons extraits sont de bonne qualité et sont fiables.

Dans les résultats obtenus 14h après le traitement, les paramètres biochimiques hépatiques ALAT et ASAT sont significativement augmentés chez les rats traités par rapport aux témoins (voir figure 11). Les observations histologiques montrent les premières modifications tissulaires chez les animaux traités. D'autre part, les ARNm d'albumine sont déjà dosables chez les animaux traités.

De plus nous avons détecté des ARNm d'albumine chez un animal sur quatre prélevés 6h après le traitement, cependant le nombre de cycles est très proche de 40 donc peu interprétable.

Ces premiers résultats nous ont permis de valider en interne notre méthode de dosage et d'extraction des ARNm à partir du sang. Nous avons eu des résultats comparables à ceux obtenus dans les études de Miyamoto et Wetmore. En réalisant une cinétique de prélèvements nous avons obtenu des résultats précoces (dès 6h après le traitement) mais surtout significatif

à partir de 14h. D'autre part nous avons montré que les ARNm d'albumine étaient toujours dosables dans le sang des rats traités 48h après le traitement (voir figure 13).

Nous avons alors envisagé cette approche dans le cadre de la toxicité rénale et mis en place l'étude principale sur la néphrotoxicité.

III.2 Etude principale

Corrélations et comparaison des résultats biochimiques, histologiques et du dosage des ARNm dans les reins

Le tableau de la figure 20 synthétise les résultats obtenus en pathologie clinique (dosages biochimiques sur plasma et urine), en histologie (type de lésions observées) et en biologie moléculaire (biomarqueurs choisis) pour les deux lots traités par rapport aux lots contrôles.

- Corrélations à J4

Les premières modifications sont observées en histologie dès le quatrième jour de traitement, alors que les dosages biochimiques sanguins sont modifiés seulement après dix jours, pour les deux doses. Ces résultats sont en accord avec les études déjà réalisées sur la néphrotoxicité induite par la gentamicine (Goodsaid et al. 2009 ; Sohn et al. 2003 ; Polat et al. 2006). L'observation directe des lésions tissulaires rénales au microscope est la technique la plus sensible pour dépister les effets néphrotoxiques de la gentamicine (Goodsaid et al. 2009; Haschek et al. 2010). Les premières lésions observées en histologie pour les deux lots traités sont les *hyaline droplets*. Ces dépôts protéiques éosinophiles pourraient correspondre à une accumulation de protéines dans les lysosomes des cellules rénales due à une modification métabolique. En effet le rein est un site de catabolisme de protéines de faible poids moléculaire (l'albumine, les chaînes légères d'immunoglobuline, la parathormone et le glucagon). Ces protéines passent dans le tubule proximal par endocytose (Maack et al. 1979). Les vacuoles se déplacent dans la cellule vers les lysosomes, où elles fusionnent pour que s'effectue l'hydrolyse. Les acides aminés résultant de la dégradation rejoignent la circulation sanguine. Si cette balance est modifiée par augmentation du taux protéique filtré ou diminution du catabolisme, il existe une accumulation de protéines formant les *hyaline droplets* dans les lysosomes des cellules rénales (Greaves 2007). Les aminosides entraînent une toxicité tubulaire directe (Cittanova-Pansard and Jacob 2007). Ils sont très peu métabolisés et éliminés essentiellement par filtration glomérulaire, puis ils sont réabsorbés et

s'accumulent dans le rein conduisant à une atteinte des cellules tubulaires proximales (Laurent et al. 1983; Giuliano et al. 1986; Sohn et al. 2003; Polat et al. 2006; Nykjaer et al. 2009; Stojiljkovic et al. 2009). Les cellules tubulaires subissent des altérations métaboliques à l'origine d'une diminution de l'ATP intracellulaire (Devarajan 2006).

Les résultats des dosages d'ARNm effectués sur les reins à 25 mg/kg/j montrent une augmentation significative de l'expression du gène *Lcn2* codant pour la protéine NGAL (voir figure 19a). Les études de Mori ont montré que son excrétion urinaire est particulièrement augmentée en réponse à une atteinte ischémique ou de l'intégrité cellulaire des épithéliums tubulaires rénaux (Mori and Nakao 2007). L'augmentation de la production de NGAL semble présenter des propriétés auto protectrices (Lee et al. 2008), elle aurait une action avec un sidérophore sur des enzymes qui inhiberaient la mort cellulaire (Mori and Nakao 2007; Lee et al. 2008). Les dosages effectués sur les reins des animaux traités à 75 mg/kg/j montrent une augmentation également de la quantité d'ARNm de *Kim-1*, de *clusterine* et d' α -*gst*. KIM-1 est une protéine qui aurait une fonction de récepteur membranaire, et qui interviendrait dans des mécanismes de reconnaissance de lipoprotéines oxydées et induirait la phagocytose de cellules nécrotiques par les cellules épithéliales voisines (Ichimura et al. 1998 ; Bonventre 2009). Cela pourrait expliquer la corrélation entre les observations histologiques (nécrose tubulaire) et l'augmentation progressive de la quantité d'ARNm de Kim-1 dans le rein lors du traitement. L' α -GST est une enzyme de détoxification et biotransformation des xénobiotiques ; son augmentation correspond probablement à des mécanismes de défense des cellules rénales (Rodilla et al. 1998).

La clusterine est une glycoprotéine qui participe au renouvellement des membranes. Justement au niveau cellulaire, l'absorption d'aminosides conduit à des modifications caractéristiques morphologiques des lysosomes, les corps myéloïdes (enroulements membranaires qui témoignent d'une accumulation de phospholipides dans les lysosomes), qui ont été largement étudiés sur des modèles de culture cellulaire (Laurent et al. 1983; Giuliano et al. 1986; Sohn et al. 2003; Polat et al. 2006; Nykjaer et al. 2009; Stojiljkovic et al. 2009). Cet aspect expliquerait l'augmentation de l'expression de *clusterine* dans les dosages effectués dans les reins du lot 3 (75 mg/kg/j).

Enfin la diminution de la quantité d'ARNm de la Calbindine à 75 mg/kg/j pourrait s'expliquer par le ralentissement du métabolisme suite à la toxicité cellulaire de la gentamicine. La Calbindine intervient dans le transport du calcium du tubule vers le sang (Sooy et al. 2000). Il s'agit d'une protéine constitutive des cellules tubulaires qui n'a pas de rôle clé dans les mécanismes de défense cellulaire.

- Corrélations à J6

Au bout de cinq jours de traitement, les résultats de la quantification des ARNm des reins montrent que certains gènes qui étaient surexprimés au quatrième jour ne le sont plus au sixième jour (lot 2 et lot 3). C'est le cas des gènes *Lcn2*, *Clus* et *α -gst* (figures 19 et 20). Ces trois gènes interviennent dans les mécanismes de défense des cellules rénales, au niveau de la biotransformation pour l'enzyme α -GST (Rodilla et al. 1998) ou au niveau protection cellulaire pour NGAL (Mori and Nakao 2007) et Clusterine (Girton et al. 2002). Il semblerait que le métabolisme des cellules tubulaires rénales soit plus atteint et plus ralenti à ce stade du traitement. D'ailleurs, les résultats histologiques et biochimiques confirment cette hypothèse. L'augmentation des *hyalines droplets* dans les reins des deux lots traités (voir figure 20) semble illustrer une atteinte plus importante du métabolisme cellulaire. De plus, quelques images de lésions de nécroses tubulaires (grade 1) s'observent dans le lot 3. Les dosages biochimiques urinaires montrent une augmentation significative du volume (+39%) et des protéines urinaires (+88%), traduisant une perturbation de la fonction rénale à 5 jours de traitement à la gentamicine pour les deux doses utilisées.

- Corrélations à J11

Au onzième jour de traitement, l'augmentation des dosages biochimiques de la créatinine et de l'urée plasmatiques montre que les animaux traités des lots 2 et 3 sont en insuffisance rénale (Devarajan 2006). Dans les observations histologiques, les reins des animaux traités à 75 mg/kg/j sont très atteints (nécrose tubulaire de grade 4) mais présentent également des images de régénérescence cellulaire. D'ailleurs les protéines « casts » ne sont présentes que chez ces animaux. Ce sont des amas protéiques qui viennent obstruer les lumières tubulaires, notamment au niveau des tubules distaux. Certaines équipes ont utilisé des techniques de coloration pour caractériser chimiquement ces amas (Devarajan 2006) : il s'agirait essentiellement de la protéine Tamm-Horsfall appelée également uromoduline, utilisée dans notre étude comme biomarqueur. Elle est synthétisée sous forme de monomères par les cellules de l'anse de Henlé et des tubules distaux (voir figure 5) et posséderait des propriétés protectrices vis-à-vis des agents pathogènes biologiques (Raffi et al. 2009). Lors de défaillance fonctionnelle rénale, l'augmentation de la concentration sodique dans les lumières des tubules distaux crée un environnement favorable à la polymérisation de ces monomères, à l'origine des « casts » (Devarajan 2006). Les dosages d'ARNm de l'uromoduline dans les reins des animaux du lot 3 à J11 montrent une diminution significative ($\Delta\Delta Ct = 4.56$ voir

figure 19b), présente déjà à J6 pour ce même lot. Cette diminution est probablement le reflet du ralentissement du métabolisme cellulaire que nous avons expliqué précédemment. Il s'agit d'une protéine constitutive n'intervenant probablement pas dans les mécanismes de protection cellulaire à un xénobiotique toxique. Il en est de même pour la calbindine qui est sous exprimée à partir du cinquième jour de traitement dans le lot 3.

Modification de l'expression des ARNm du rein en fonction de la durée du traitement

Le tableau de la figure 21 reprend les changements significatifs des dosages des ARNm des biomarqueurs sélectionnés en fonction du temps, de la dose et de la localisation (rein ou sang).

Doses	Quantification d'ARNm	J4	J6	J11
25 mg/kg/j	reins	Lcn2 +	Kim1 +	Kim1 +++ Lcn2 ++ Clus + Calb -
	Sang		α-GST +	
75 mg/kg/j	reins	Kim1 ++ Lcn2 + Clus + Calb -	Kim1 +++ Umod --- Calb --	Kim1 +++ Lcn2 ++ Clus ++ Calb - Umod -- α-GST -
	Sang	α-GST +	Lcn2 -	Kim1 + Timp1 + Clus +

+: $\Delta\Delta Ct < -2$ ++: $\Delta\Delta Ct < -4$ +++: $\Delta\Delta Ct < -6$
 -: $\Delta\Delta Ct > 2$ --: $\Delta\Delta Ct > 4$ ---: $\Delta\Delta Ct > 6$

Figure 21 : Synthèse des biomarqueurs significatifs dans le rein et le sang chez les lots traités en fonction des durées de traitements

Pour les quantifications d'ARN réalisées sur les reins, nous pouvons remarquer que trois groupes de gènes se démarquent :

- ceux qui ont une modification (augmentation ou diminution) progressive dépendante de la durée du traitement : *Havcr1* (KIM-1), *Calb*, *Umod* (figure 19) ;
- ceux dont l'expression est augmentée au début et en fin de traitement (J4 et J11 seulement): *Clus* et *Lcn2* ;
- ceux dont l'expression est peu ou pas significativement modifiée lors du traitement: *Aqp1*, *Timp1* et *Aqp2*.

L'interprétation des données obtenues pour *Clus* et *Lcn2* est délicate. On peut faire l'hypothèse d'une diminution transitoire du métabolisme cellulaire liée à la toxicité de la gentamicine ; en effet une diminution de l'ATP intracellulaire a été démontrée avec ce traitement (Devarajan 2006). Les augmentations d'expression de *Clus* et *Lcn2* observées à J11 pourrait alors être associées à la régénérescence de l'organe (basophilie tubulaire) ; ce qui reste à démontrer par immunohistochimie par exemple.

Les ARNm circulants sanguins

Le dosage des ARNm circulants n'a permis de noter des modifications significatives que lorsque la nécrose tissulaire était bien présente dans le tissu chez les animaux traités par rapport aux contrôles (figure 20). Or les paramètres biochimiques urée et créatinine sont déjà modifiés. Le seul biomarqueur intéressant d'un point de vue prédictif serait α -GST qui est modifié dès J4 avec le traitement à 75 mg/kg/jour. Cependant l' α -GST est aussi synthétisée dans le foie et il faudrait s'assurer que les transcrits dosés proviennent bien du rein. Pour cela on pourrait effectuer une immuno-histochimie sur les foies et les reins congelés des mêmes animaux traités pour l' α -GST, afin de savoir s'il existe également une augmentation de l'expression de cette enzyme dans les hépatocytes. Si tel est le cas, on ne peut pas considérer que les ARNm dosés dans le sang proviennent bien des cellules rénales, il ne s'agirait pas d'un biomarqueur intéressant, car non spécifique.

Trois transcrits n'ont pas pu être détectés dans le sang : ceux de *Umod*, *Calb* et *Aqp2* (figure 19). Ils ne s'expriment que dans les portions distales du néphron (anse de Henlé, tubule distal et tube collecteur) (figure 6). Cela pourrait être expliqué par le fait que ces gènes sont inhibés dans les dosages tissulaires des reins ($\Delta\Delta C_t$ calculés pour les reins en figure 18 qui sont supérieurs à 0).

***Dosages des ARNm sanguins versus dosages immunologiques des protéines urinaires :
Comparaison avec une étude du consortium (Guffroy et al. 2010)***

Nous avons comparé nos résultats avec ceux d'une étude réalisée dans le cadre du consortium HESI. Celle-ci a été réalisée sur le même protocole que notre étude, mais les biomarqueurs ont été mesurés directement dans les urines à J4 et J11 par des techniques immunologiques (kit ELISA ou multiplex). Au quatrième jour de traitement, ils ont mesuré une augmentation – à la limite du seuil de significativité - des protéines α -GST ($\times 2,4$), NGAL ($\times 2,6$) et calbindine ($\times 3,9$). Nos résultats sont en accord pour les deux premières protéines (augmentation des ARNm de α -GST, NGAL), par contre nous avons mesuré une diminution de la quantité d'ARNm de calbindine chez les animaux traités, ce qui n'est pas en accord avec l'augmentation dans les dosages urinaires de la protéine. A J11, les quantités de protéines dosées dans les urines sont multipliées par plus de 10 pour KIM1, clusterine, calbindine, α -GST, NGAL, TIMP1 et d'autres biomarqueurs. Dans les dosages tissulaires nous retrouvons une augmentation de l'expression de ces gènes sauf pour ceux de calbindine et α -GST. Nous pouvons expliquer ces différences par le fait que les ARNm ont une demi-vie très courte par rapport aux protéines.

Dans tous les cas, il semble que les dosages urinaires des biomarqueurs par des techniques d'immunodétections soient plus prédictifs que les dosages de leur ARNm.

Limites de notre modèle d'étude sur la néphrotoxicité

- Choix de la gentamicine

Dans les études réalisées sur la toxicité hépatique induite par le paracétamol (Miyamoto et al. 2008 ; Wetmore et al. 2010), la détection des ARNm d'albumine dans le sang est observable en moins de 24h du fait d'une nécrose hépatocytaire aigüe. Or dans notre étude, cette nécrose est observable histologiquement au quatrième jour seulement à un grade 1 (figure 20). Au onzième jour les images de nécrose se superposent déjà avec les phénomènes régénératifs.

Actuellement, la gentamicine est largement utilisée dans les études de recherche de nouveaux biomarqueurs en néphrotoxicité (Parikh and Devarajan 2008 ; Ozaki et al. 2009 ; Sieber et al. 2009; Zhang et al. 2009). Cependant dans notre cas, elle ne semble pas être une bonne molécule pour engendrer une nécrose aigüe rapide. Il faudrait comparer les données avec un autre modèle de néphrotoxicité: par exemple un traitement à la cisplatine, agent

toxique qui attaque les tubules distaux et les tubes collecteurs (nécrose tubulaire aigüe) (Greaves 2007).

- Le rein, interface entre deux milieux

Le rein est un organe complexe avec de nombreux échanges entre le sang et les urines (Kierszenbaum 2002). Lors de nécrose cellulaire, le contenu cytoplasmique est majoritairement déversé dans la lumière des tubules rénaux (figure 18a) ; la quantité d'ARNm qui passe dans le compartiment sanguin reste inconnue. Différemment, dans les expérimentations portant sur l'hépatotoxicité, il a été démontré que des fragments de cytoplasme contenant de l'ARNm de l'albumine se déversaient directement dans le sang (Wetmore et al. 2010).

IV. PERSPECTIVES

Maintenant que nous avons mis au point un protocole d'extraction fiable des ARNm libres dans le sang circulant, nous pouvons imaginer l'utilisation future chez l'animal des ARNm spécifiques d'un organe comme nouveau biomarqueur de toxicité. Il reste encore à prouver sa prédictivité par rapport aux autres analyses déjà utilisées pour chaque type d'organe étudié. Par rapport aux autres techniques immunologiques de dosages protéiques, il s'agit d'un outil très intéressant car il permet de s'affranchir des problèmes de la synthèse des anticorps monoclonaux spécifiques à chaque espèce. Il faut continuer à développer ce nouvel outil, en utilisant d'autres modèles de toxicité sur d'autres organes.

Direction de l'Enseignement et de la Vie Universitaire

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Melle Fanny GIMIE

a été admis(e) sur concours en : 2005

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 09/09/2010

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussignée, Martine CLAUW, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

autorise la soutenance de la thèse de :

Melle Fanny GIMIE

intitulée :

« Evaluation des ARNm circulant sanguins comme nouveaux biomarqueurs de néphrotoxicité chez le rat »

Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Martine KOLF-CLAUW



Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Christian VIRENQUE



Vu le **11 OCT. 2010**
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Gilles FODDART



Bibliographie

- Abbot. NGAL urinaire ARCHITECT. from <http://www.abbott.fr/abbott/>.
- Ackermann, B. L. and M. J. Berna (2007). Coupling immunoaffinity techniques with MS for quantitative analysis of low-abundance protein biomarkers. *Expert Rev Proteomics* 4(2): 175-86.
- Bonventre, J. V. (2009). Kidney injury molecule-1 (KIM-1) : a urinary biomarker and much more. *Nephrol Dial Transplant* 24:3265-3268.
- Chan, A. K., R. W. Chiu and Y. M. Lo (2003). Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis. *Ann Clin Biochem* 40(Pt 2): 122-30.
- Chen, X. Q., H. Bonnefoi, M. F. Pelte, J. Lyautey, C. Lederrey, S. Movarekhi, P. Schaeffer, H. E. Mulcahy, P. Meyer, M. Stroun and P. Anker (2000). Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 6(10): 3823-6.
- Cittanova-Pansard, M.-L. and L. Jacob (2007). Insuffisances rénales aiguës toxiques (dont la chimiothérapie). *L'insuffisance rénale aiguë*. Springer. Paris, Springer: 177-196.
- Critical-Path-Institute. Predictive Safety Testing Consortium (PSTC).2006-2010, from <http://www.c-path.org/pstc.cfm>.
- Critical-Path-Institute. FDA and EMEA conclude that new renal safety biomarkers are qualified for specific regulatory purposes.2008, from <http://www.c-path.org/>.
- Devarajan, P. (2006). Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 17(6): 1503-20.
- Girton, R. A., D. P. Sundin and M. E. Rosenberg (2002). Clusterin protects renal tubular epithelial cells from gentamicin-mediated cytotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 282(4): F703-9.
- Giuliano, R. A., G. A. Verpooten and M. E. De Broe (1986). The effect of dosing strategy on kidney cortical accumulation of aminoglycosides in rats. *Am J Kidney Dis* 8(5): 297-303.
- Goodsaid, F. M., M. Blank, F. Dieterle, P. Harlow, E. Hausner, F. Sistare, A. Thompson and J. Vonderscher (2009). Novel biomarkers of acute kidney toxicity. *Clin Pharmacol Ther* 86(5): 490-6.
- Greaves, P. (2007). *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies (third edition)*. Amsterdam, Editor.
- Guffroy, M., J. Beaufils, T. Gury, R. Masson, J. Gautier1, E. Pham, E. Harpur and S. Pettit (2010). Poster, Evaluation of gender as a variable in renal biomarker response in rats given a nephrotoxic dose of gentamicin. Society of toxicology, Alfortville.
- Hamaoui, K., A. Butt, J. Powrie and R. Swaminathan (2004). Concentration of circulating rhodopsin mRNA in diabetic retinopathy. *Clin Chem* 50(11): 2152-5.
- Haschek, W. M., M. A. Wallig and C. Rousseaux (2010). Clinical pathology. *Fundamentals of toxicologic pathology (second edition)*. Elsevier. London, Elsevier: 43-65.
- Haschek, W. M., M. A. Wallig and C. Rousseaux (2010). Kidney and lower urinary tract. *Fundamentals of toxicologic pathology (second edition)*. Elsevier. London, Elsevier: 261-318.
- Ichimura, T., J. V. Bonventre, V. Bailly, H. Wei, C. A. Hession, R. L. Cate and M. Sanicola (1998). Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 273(7): 4135-42.
- John, R. and A. M. Herzenberg (2009). Renal toxicity of therapeutic drugs. *J Clin Pathol* 62(6): 505-15.
- Jones, S. E. and C. Jomary (2001). Clusterin. *The Internal Journal of Biochemistry and Cell Biology* 34:427-431.
- Kaneko, J. J., J. W. Harvey, M. L. Bruss and D. R. Finco (1997). Kidney function. *Clinical biochemistry of domestic animals (fifth edition)*. A. Press. San Diego, A. Press: 441-484.
- Kaneko, J. J., J. W. Harvey, M. L. Bruss and W. F. Loeb (1997). Clinical biochemistry of laboratory rodents and rabbits. *Clinical biochemistry of domestic animals (fifth edition)* A. Press. San Diego, A. Press: 845-855.
- Kaneko, J. J., J. W. Harvey, M. L. Bruss, J. R. Turk and S. W. Casteel (1997). Clinical Biochemistry in toxicology. *Clinical biochemistry of domestic animals (fifth edition)* A. Press. San Diego, A. Press: 829-843.

- Kierszenbaum, A. L. (2002). *Histology and cell biology : an introduction to pathology (second edition)*. Saint Louis, Editor.
- Lameire, N. and L. Jacob (2007). *Physiologie rénale. L'insuffisance rénale aigüe*. Springer. Paris, Springer: 49-66.
- Lane, P. H., L. D. Tyler and P. G. Schmitz (1998). Chronic administration of furosemide augments renal weight and glomerular capillary pressure in normal rats. *Am J Physiol* 275(2 Pt 2): F230-4.
- Laurent, G., P. Maldague, M. B. Carlier and P. M. Tulkens (1983). Increased renal DNA synthesis in vivo after administration of low doses of gentamicin to rats. *Antimicrob Agents Chemother* 24(4): 586-93.
- Lee, J., K. S. Yoo, D. G. Kang, S. W. Kim and K. C. Choi (2001). Gentamicin decreases the abundance of aquaporin water channels in rat kidney. *Jpn J Pharmacol* 85(4): 391-8.
- Lee, J. H., K. C. Kye, E. Y. Seo, K. Lee, S. K. Lee, J. S. Lim, Y. J. Seo, C. D. Kim and J. K. Park (2008). Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in calcium-induced keratinocyte differentiation. *J Korean Med Sci* 23(2): 302-6.
- Leeker, A., B. Kreft, J. Sandmann, J. Bates, G. Wasenauer, H. Muller, K. Sack and S. Kumar (1997). Tamm-Horsfall protein inhibits binding of S- and P-fimbriated *Escherichia coli* to human renal tubular epithelial cells. *Exp Nephrol* 5(1): 38-46.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25:402-408.
- Luttrupp, K., B. Lindholm, J. J. Carrero, G. Glorieux, E. Schepers, R. Vanholder, M. Schalling, P. Stenvinkel and L. Nordfors (2009). Genetics/Genomics in chronic kidney disease--towards personalized medicine? *Semin Dial* 22(4): 417-22.
- Maack, T., V. Johnson, S. T. Kau, J. Figueiredo and D. Sigulem (1979). Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: a review. *Kidney Int* 16(3): 251-70.
- Mastronardi, M., H.-A. Mostefai, R. Soleti, A. Agouni, R. Andriantsitohaina and M.-C. Martinez (2009). E007 Differential effects of microparticules from human apoptotic T lymphocytes and from human apoptotic monocytes in endothelial cells. *Archives of cardiovascular diseases* 102(1): S50.
- Mc Gavin, M. D. and J. F. Zachary (2006). *Pathologic basis veterinary (fourth edition)*. New York, Editor.
- Miyamoto, M., M. Yanai, S. Ookubo, N. Awasaki, K. Takami and R. Imai (2008). Detection of cell-free, liver-specific mRNAs in peripheral blood from rats with hepatotoxicity: a potential toxicological biomarker for safety evaluation. *Toxicol Sci* 106(2): 538-45.
- Morel, O., N. Morel, B. Hugel, L. Jesel, S. Vinzio, B. Goichot, B. Bakouboula, L. Grunebaum, J. M. Freyssinet and F. Toti (2005). [The significance of circulating microparticles in physiology, inflammatory and thrombotic diseases]. *Rev Med Interne* 26(10): 791-801.
- Mori, K., H. T. Lee, D. Rapoport, I. R. Drexler, K. Foster, J. Yang, K. M. Schmidt-Ott, X. Chen, J. Y. Li, S. Weiss, J. Mishra, F. H. Cheema, G. Markowitz, T. Suganami, K. Sawai, M. Mukoyama, C. Kunis, V. D'Agati, P. Devarajan and J. Barasch (2005). Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 115(3): 610-21.
- Mori, K. and K. Nakao (2007). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int* 71(10): 967-70.
- Muller, P. Y. and F. Dieterle (2009). Tissue-specific, non-invasive toxicity biomarkers: translation from preclinical safety assessment to clinical safety monitoring. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5(9): 1023-38.
- Nykjaer, A., H. Schambye, A. H. Pedersen and H. Nielsen (2009). Assessing low-dose gentamicin-induced kidney injury in rats by analysis of urine. *J Pharmacol Toxicol Methods* 60(3): 316-20.
- Oliver, J., D. M. Mac and A. Tracy (1951). The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury; renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode. *J Clin Invest* 30(12:1): 1307-439.
- Ozaki, N., K. A. Matheis, M. Gamber, T. Feidl, T. Nolte, A. Kalkuhl and U. Deschl (2009). Identification of genes involved in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats - A toxicogenomic investigation. *Exp Toxicol Pathol* 55.

- Parikh, C. R. and P. Devarajan (2008). New biomarkers of acute kidney injury. *Crit Care Med* 36(4 Suppl): S159-65.
- Pawlotsky, J.-M. (1997). Actualités des tests moléculaires dans la prise en charge des malades ayant une hépatite chronique virale C. *Revue française des laboratoires* 1997(292): 69-70.
- Polat, A., H. Parlakpınar, S. Tasdemir, C. Colak, N. Vardi, M. Ucar, M. H. Emre and A. Acet (2006). Protective role of aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Acta Histochem* 108(5): 365-71.
- Pressac (2000). La protéine de Tamm-Horsfall. *Annales de biologie clinique* 58(2): 167-76.
- Raffi, H. S., J. M. Bates, Jr., Z. Laszik and S. Kumar (2009). Tamm-horsfall protein protects against urinary tract infection by proteus mirabilis. *J Urol* 181(5): 2332-8.
- Rodilla, V., A. A. Benzie, J. M. Veitch, G. I. Murray, J. D. Rowe and G. M. Hawksworth (1998). Glutathione S-transferases in human renal cortex and neoplastic tissue: enzymatic activity, isoenzyme profile and immunohistochemical localization. *Xenobiotica* 28(5): 443-56.
- Sato, A., N. Sueoka-Aragane, J. Saitoh, K. Komiya, T. Hisatomi, R. Tomimasu, S. Hayashi and E. Sueoka (2008). Establishment of a new method, transcription-reverse transcription concerted reaction, for detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a biomarker of lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 134(11): 1191-7.
- Savino, M., P. Parrella, M. Copetti, R. Barbano, R. Murgo, V. M. Fazio, V. M. Valori, M. Carella, M. Garrubba and S. A. Santini (2009). Comparison between real-time quantitative PCR detection of HER2 mRNA copy number in peripheral blood and ELISA of serum HER2 protein for determining HER2 status in breast cancer patients. *Cell Oncol* 31(3): 203-11.
- Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nature Protocols* 3(6): 1101:1108.
- Shu, Z., X. Pu, X. Xiong, Q. Li, Y. Wang and S. Zhai (2009). Differential expression of plasma proteins in cyclosporine A-induced rat acute nephrotoxicity. *Biosci Biotechnol Biochem* 73(3): 592-8.
- Sieber, M., D. Hoffmann, M. Adler, V. S. Vaidya, M. Clement, J. V. Bonventre, N. Zidek, E. Rached, A. Amberg, J. J. Callanan, W. Dekant and A. Mally (2009). Comparative analysis of novel noninvasive renal biomarkers and metabolomic changes in a rat model of gentamicin nephrotoxicity. *Toxicol Sci* 109(2): 336-49.
- Silva, J. M., R. Rodriguez, J. M. Garcia, C. Munoz, J. Silva, G. Dominguez, M. Provencio, P. Espana and F. Bonilla (2002). Detection of epithelial tumour RNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advanced stages and circulating tumour cells. *Gut* 50(4): 530-4.
- Soazig, L. and L. Marc (2003). Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. *Mar Pollut Bull* 46(11): 1450-5.
- Sohn, E. J., D. G. Kang and H. S. Lee (2003). Protective effects of glycyrrhizin on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Pharmacol Toxicol* 93(3): 116-22.
- Sooy, K., J. Kohut and S. Christakos (2000). The role of calbindin and 1,25dihydroxyvitamin D3 in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9(4): 341-7.
- Sourial, S., M. Marcusson-Stahl and K. Cederbrant (2009). Meso scale discovery and luminex comparative analysis of calbindin D28K. *J Biomed Biotechnol* 2009187426.
- Stojiljkovic, N., S. Veljkovic, D. Mihailovic, M. Stojiljkovic, M. Radenkovic, G. Rankovic and P. Randjelovic (2009). Protective effects of pentoxifylline treatment on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Ren Fail* 31(1): 54-61.
- Uto, I., T. Ishimatsu, H. Hirayama, S. Ueda, J. Tsuruta and T. Kambara (1991). Determination of urinary Tamm-Horsfall protein by ELISA using a maleimide method for enzyme-antibody conjugation. *J Immunol Methods* 138(1): 87-94.
- Vaidya, V. S., G. M. Ford, S. S. Waikar, Y. Wang, M. B. Clement, V. Ramirez, W. E. Glaab, S. P. Troth, F. D. Sistare, W. C. Prozialeck, J. R. Edwards, N. A. Bobadilla, S. C. Mefferd and J. V. Bonventre (2009). A rapid urine test for early detection of kidney injury. *Kidney Int* 76(1): 108-14.
- Vaidya, V. S., S. S. Waikar, M. A. Ferguson, F. B. Collings, K. Sunderland, C. Gioules, G. Bradwin, R. Matsouaka, R. A. Betensky, G. C. Curhan and J. V. Bonventre (2008). Urinary Biomarkers for Sensitive and Specific Detection of Acute Kidney Injury in Humans. *Clin Transl Sci* 1(3): 200-208.

- Vaubourdolle, M. (2007). *Hématologie Biochimie (troisième édition)*. Rueil-Malmaison, Editor.
- Walshe, C. M., F. Odejayi, S. Ng and B. Marsh (2009). Urinary glutathione S-transferase as an early marker for renal dysfunction in patients admitted to intensive care with sepsis. *Crit Care Resusc* 11(3): 204-9.
- Wang, E. J., R. D. Snyder, M. R. Fielden, R. J. Smith and Y. Z. Gu (2008). Validation of putative genomic biomarkers of nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 246(2-3): 91-100.
- Wasilewska, A. M. and W. M. Zoch-Zwierz (2008). Urinary levels of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in nephrotic children. *Pediatr Nephrol* 23(10): 1795-802.
- Wetmore, B. A., D. J. Brees, R. Singh, P. B. Watkins, M. E. Andersen, J. Loy and R. J. Thomas (2010). Quantitative Analyses and Transcriptomic Profiling of Circulating Messenger RNAs as Biomarkers of Rat Liver Injury. *Hepatology* 00000:000.
- Wilkins, M. R., E. Gasteiger, J. C. Sanchez, A. Bairoch and D. F. Hochstrasser (1998). Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis* 19(8-9): 1501-5.
- Zhang, J., P. L. Goering, P. Espandiari, M. Shaw, J. V. Bonventre, V. S. Vaidya, R. P. Brown, J. Keenan, C. G. Kilty, N. Sadrieh and J. P. Hanig (2009). Differences in immunolocalization of Kim-1, RPA-1, and RPA-2 in kidneys of gentamicin-, cisplatin-, and valproic acid-treated rats: potential role of iNOS and nitrotyrosine. *Toxicol Pathol* 37(5): 629-43.
- Zhong, X. Y., S. Gebhardt, R. Hillermann, K. C. Tofa, W. Holzgreve and S. Hahn (2005). Parallel assessment of circulatory fetal DNA and corticotropin-releasing hormone mRNA in early- and late-onset preeclampsia. *Clin Chem* 51(9): 1730-3.
- Zhong, X. Y., W. Holzgreve and D. J. Huang (2008). Isolation of cell-free RNA from maternal plasma. *Methods Mol Biol* 444:269-73.
- Zhou, W., Q. Guan, C. C. Kwan, H. Chen, M. E. Gleave, C. Y. Ngan and C. Du (2009). Loss of Clusterin Expression Worsens Renal Ischemia Reperfusion Injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 99.

Annexes

Annexe 1 : Protocoles expérimentaux : Extraction des ARN des tissus, Traitements à la DNase et Synthèse du cDNA

Extraction ARNtt à partir de tissus

1/ A partir d'organes prélevés et conservés à -70°C

Les prises d'essais sont pesées (100 mg environ) directement dans chaque tube **Precellys**® contenant 1 ml de **Trizol**®.

Tissu	Espèce	Type de bille		Protocole utilisé / Precellys 24		
Foie	rat	céramique	CK28	6500 RPM	30 sec	-
Rein	rat	céramique	CK28	6500 RPM	30 sec	-

Les échantillons sont mis en attente à température ambiante (5 minutes environ)

2/ Addition de 0,2 mL de **1-bromo-3-chloro propane** par tube (tubes **Precellys** 2ml)

Agitation forte pendant 15 secondes. Laisser reposer 2 à 3 minutes.

Centrifugation 15 minutes à 10000 rpm (8°C). Le milieu est alors séparé en deux phases bien distinctes.

Transfert de la phase aqueuse dans un nouveau **tube sec DNase-RNase-free** de 1,5 ml (environ 0,6 ml).

3/ Addition de 0,6 ml d'**isopropanol**

Mix par retournement des tubes. Incubation des échantillons pendant 10 minutes à température ambiante.

Centrifugation 5 minutes à 8000 rpm (8°C). Formation d'un culot blanc. Enlever le surnageant.

4/ Addition de 1,0 ml d'**éthanol 75%**

Décoller le culot par vortexage. Centrifugation 5 minutes à 7500 rpm (8°C).

Enlever le surnageant le plus complètement possible.

5/ Addition d'eau **RNase-free** préchauffée à 50 °C (entre 200 et 500µL)

Incubation des échantillons pendant 15 minutes environ. Homogénéisation par pipetage.

ARNs stockés à -20°C puis à -70°C (long terme) ou au réfrigérateur pour quelques heures.

Traitement DNase des extractions ARN des tissus (kit RNeasy QIAGEN®)

(Les réactifs RLT, RPE, RW1, RDD sont fournis avec le kit d'extraction QIAGEN® RNeasy)

1- Purification de l'ARN total avec les colonnes RNeasy® :

Ajouter 350 µl RLT et 250 µl éthanol (100%) à 100 µl d'ARN
Mélanger et verser dans une colonne RNeasy
Centrifuger à 12000 g pendant 15 secondes
Rincer la colonne 2 fois avec 500 µl de tampon RPE
Changer le tube sous la colonne après avoir centrifugé la colonne à 12000 g pendant 2 minutes
Eluer avec 55 µl d'eau RNase-free
Eluer de nouveau avec 35 µl d'eau RNase-free

2- Traitement à la DNase :

Préparer le mix suivant pour chaque échantillon :

10X tampon DNase	Ambion	10 µl
DNase 2 U/µl	Ambion	1 µl
RNasin 40 U/µl	Promega	1 µl

Ajouter 10 µl de ce mix par échantillon. Incuber à 37°C pendant 30 minutes.

3- Filtration des ARN par la colonne RNeasy :

Ajuster le volume d'ARN à 100µL avec de l'eau RNase free
Ajouter 350 µl de tampon RLT et 250 µl d'éthanol (100%) à 100 µl d'ARN
Mélanger et verser dans une colonne RNeasy , centrifuger à 12000 g pendant 15 secondes
Rincer la colonne avec 350 µl de tampon RW1. Ajouter 80 µl de DNase I préalablement préparé dans le tampon RDD sur la colonne, incuber pendant 20 minutes
Ajouter 350 µl de tampon RW1 sur la colonne, centrifuger à 12000 g pendant 15 secondes
Rincer la colonne deux fois avec 500 µl de tampon RPE
Changer le tube sous la colonne après avoir centrifugé à 12000 g pendant 2 minutes.
Eluer avec 50 µl d'eau RNase-free, incuber pendant 1 minute
Centrifuger pour récupérer les 50 µL de l'éluât et de nouveau centrifuger.

Synthèse des ADNc

(les réactifs random hexamers, dNTP, tampon 10X, MgCl₂, DTT, RNaseout, RNaseH et Superscript II sont fournis avec le kit superscript®)

Principe : Les ARN sont « rétro transcrits » en ADNc qui serviront ensuite de matrices pour réaliser le Taqman. La réaction de synthèse d'ADNc est catalysée par une enzyme (la Supertranscript) dégradant l'ARN durant la réaction. L'utilisation d'un mélange de sondes *primers* non spécifiques, « random hexamers » pour amorcer la réaction, permet de synthétiser les ADNc correspondant à l'ensemble des ARN présents dans les échantillons.

Protocole expérimental (Kit superscript®)

- 1 - Assécher les échantillons au speed vac
- 2 - Ajouter les random hexamers :

	Pour un échantillon
random hexamers	4 μ L
dNTP 10mm	1 μ L
eau DEPC	5 μ L

Quantité : 10 μ L mix /échantillon. Incuber pendant 5 minutes à 65°C puis sur glace >1 min

3 - Ajouter le mix suivant

Tampons/produits	Pour un échantillon
tampon 10X	2 μ L
MgCl ₂ 25mM	4 μ L
DTT 0.1M	2 μ L
RNaseOUT	1 μ L

Quantité : 9 μ L mix/échantillon

Incuber à 25°C pendant 2 minutes dans le bloc chauffant programmé, puis mettre sur pause le temps d'ajouter l'enzyme Superscript ou l'eau pour les -RT.

4 - Ajouter 1 μ L Superscript II (sauf les tubes - RT : 1 μ L eau DEPC)

Mettre en route le bloc chauffant programmé de la façon suivante

25°C 10min 42°C 50min 70°C 15min

5 - Ajouter 1 μ L RNase H

Laisser incuber à 37°C pendant 20 minutes (bloc chauffant programmé) puis placer dans la glace.

6 - Ajustement du volume réactionnel (21 μ L) après synthèse pour avoir une concentration de 50ng cDNA/ μ L

Annexe 2 : Electrophorèse capillaire (Bioanalyser)

Principe : le Bioanalyser est un système à biopuces (fournies par Agilent) servant à l'analyse des protéines ou acides nucléiques (ARN ou ADN) par chromatographie sur capillaire. Il donne un résultat similaire à celui obtenu par gel d'agarose. En plus de donner une évaluation qualitative de l'échantillon prenant en compte différents paramètres (comme le pourcentage de 18S + 28S), l'appareil donne aussi sa concentration.

Protocole expérimental simplifié

Préparation du gel :

- Prélever 550 μL de gel (fourni parmi les réactifs) sur une colonne fournie dans le kit
- Centrifuger à 1500 g pendant 10 minutes à température ambiante.
- Prélever 65 μL de gel filtré dans un tube de 0.5 mL fourni dans le kit avec 1 μL de réactif Dye (réactif fourni). Ce tube est conservé à température ambiante à l'abri de la lumière et doit être "vortexé" pendant 10 secondes avant chaque utilisation.

Préparation des échantillons :

- Les ARN doivent avoir une concentration en acides nucléiques entre 25 et 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$ pour les puces Nano. Il est donc nécessaire de faire une mesure Nanodrop avant le Bioanalyser.
- Pour chaque échantillon, prélever 2 μL dans un tube propre *RNase-free*.
- Dénaturer pendant 2 minutes à 70°C (puis déposés sur glace) sur un bloc chauffant ou dans un bain-marie.

Préparation de la puce :

- Placer la nouvelle puce dans la Chip Priming Station avant de la remplir.
- Déposer 9 μL de gel dans le puits « G » de la puce et pressuriser avec la Chip Priming Station (de façon à répartir le gel sur toute la surface de la puce pour la migration des échantillons).
- Déposer 9 μL de gel dans les deux autres puits G.
- Déposer 5 μL de Nano marker (réactif fourni) dans tous les puits.
- Déposer 1 μL de Ladder dans son puits (il s'agit d'un réactif qui étalonne la réaction).

- Déposer 1 μL de chaque échantillon dans les autres puits.

S'il y a moins de 12 échantillons, ajouter 1 μL d'eau dans les puits ne contenant pas d'échantillon de façon à ce que tous les volumes soient les mêmes.

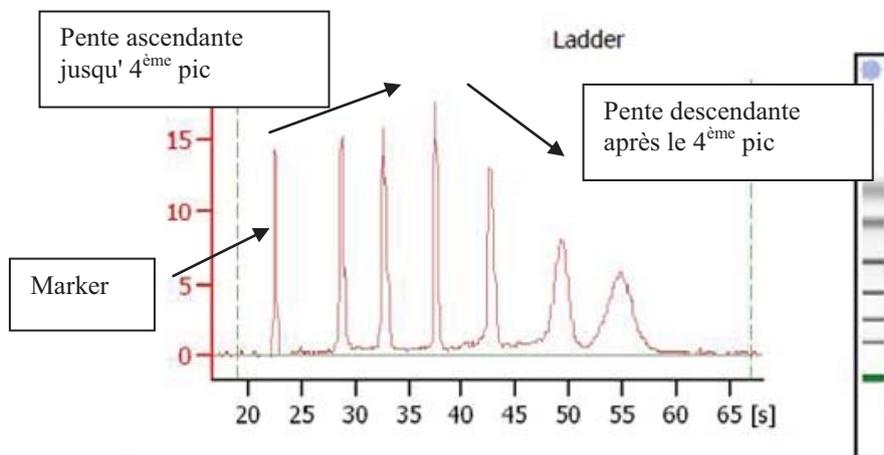
- Vortexer la puce pendant une minute à 2400 rpm sur le vortex prévu à cet effet et fourni avec l'appareil.
- Placer la puce dans le Bioanalyzer préalablement nettoyer avec des puces de nettoyage l'une contenant du RNase Zap®, l'autre de l'eau RNases free et lancer l'automate.



Préparation de la puce Nano marker et mise en route du Bioanalyser

Analyse des résultats : le logiciel 2100 Expert présente les résultats sous forme de spectre individuel, (pics), ou sous une forme comparable à un gel (électrophorégramme).

Avant de s'intéresser aux échantillons, il faut analyser en premier le spectre du Ladder (contrôle de la réaction) : sa forme générale avec des pics bien résolus, le nombre et la distribution entre eux.

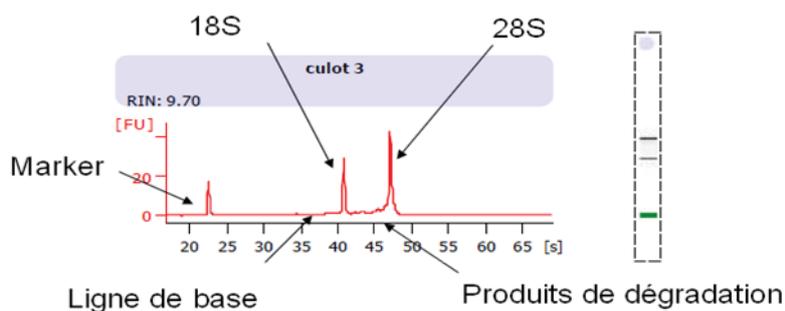


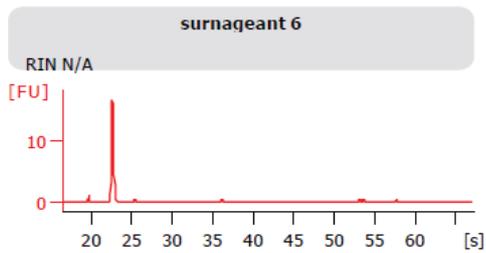
Spectre du Ladder

Si le contrôle est de bonne qualité, on peut interpréter les spectres des échantillons.

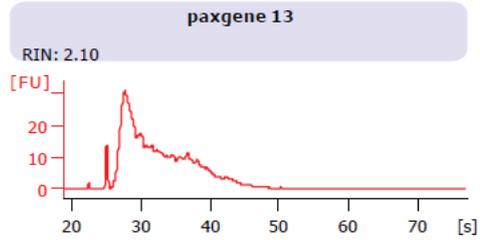
Les deux pics principaux correspondent à ceux des ARN 18S et 28S qui constituent en théorie 90 % des ARN totaux. La taille et la finesse des pics ainsi que la linéarité de la ligne de base nous indiquent la qualité des échantillons.

Un échantillon qui ne présente aucun pic, ou une ligne de base décollée signifie que les ARN extraits sont dégradés.





Echantillon ne contenant pas assez d'ARN



Echantillon entièrement dégradé

Exemples de graphes

Valeur RIN : le logiciel fournit également une note entre 1 et 10 nommée RIN (RNA Integrity Number) qui est un facteur d'intégrité de l'ARN total qui prend en compte tous les événements de dégradation. Selon les résultats, on interprète de la façon suivante :

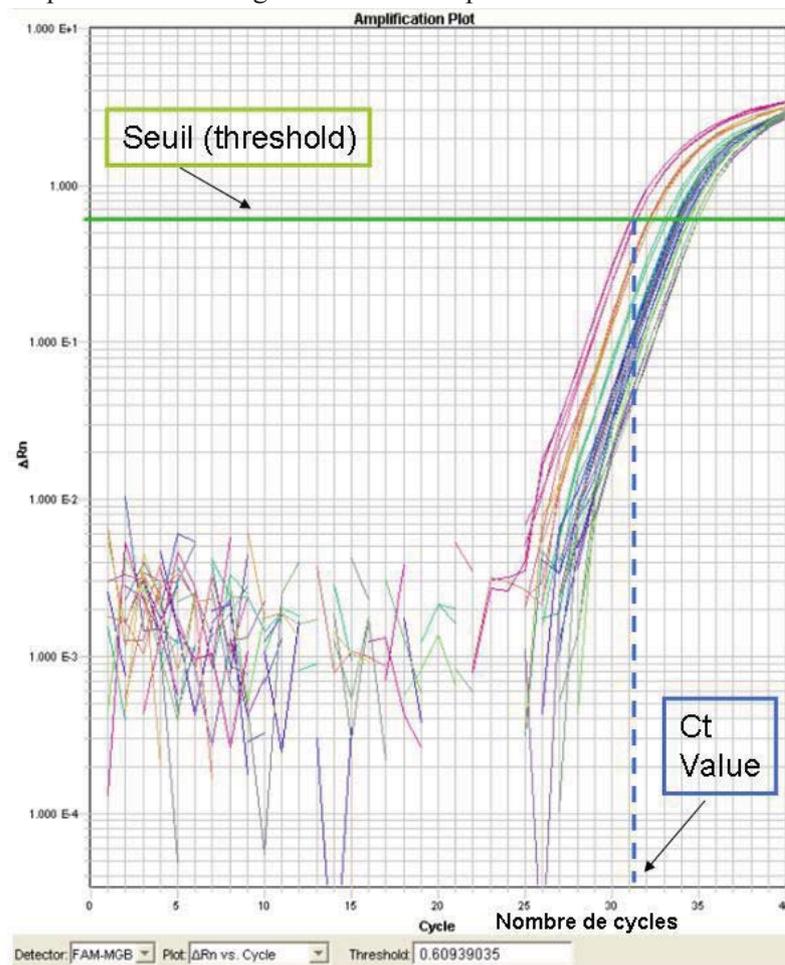
- entre 9 et 10 : qualité excellente
- entre 7 et 8 : qualité correcte
- entre 6 et 7 : qualité moyenne
- inférieur à 6 : mauvaise qualité
- N/A : non interprétable (souvent absence d'ARN dans l'échantillon)

Annexe 3 : Interprétation des résultats Taqman : calcul du $\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen 2001; Schmittgen and Livak 2008)

Définition du Ct : A la fin de la RT-PCR semi quantitative en temps réel (méthode Taqman), on obtient un graphique où chaque tracé correspond au signal fluorescent au cours des 40 cycles d'amplification effectués pour chaque puits de la plaque Taqman.

Dans la méthode Taqman, c'est le moment où le signal sort du bruit de fond et entre en phase exponentielle qui est significatif. Ce moment correspond à un certain nombre de cycles d'amplifications et est appelé Ct value (Threshold Cycles). Pour déterminer ce Ct, on définit un seuil correspondant à un niveau de fluorescence suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle mais suffisamment élevé pour être au-dessus du bruit de fond.

Ainsi plus le gène amplifié est représenté dans l'échantillon, plus le signal sortira tôt du bruit de fond et plus la détection sera précoce. Pour un gène fortement exprimé la valeur du Ct sera donc petite.



Exemple de représentation graphique des résultats de RT-PCR TaqMan

Définition du gène house-keeping : il s'agit d'un gène constitutif qui est exprimé en permanence dans toutes les cellules d'un organisme. L'expression d'un tel gène est théoriquement peu ou pas modifiée lors d'un traitement. Une modification de l'expression du gène house-keeping étudié, peut être due à une toxicité induite par le traitement. Il est choisi de sorte que son expression soit la plus

stable possible dans les conditions expérimentales. On peut citer le gène codant pour la bêta actine, la *G3pdh* ou encore le *18S*. Lorsque l'on réalise une RT-PCR pour estimer la quantité de transcrite d'un gène, on fait systématiquement la même manipulation avec un gène house keeping adapté pour pouvoir interpréter les résultats et tenir compte, le cas échéant, de la toxicité due au traitement. Dans notre cas, nous avons utilisé le gène de la bêta actine pour les amplifications des extractions tissulaires et le gène du 18S lors de l'étude des échantillons sanguins.

Calcul du $\Delta\Delta Ct$: on utilise la formule suivante (Livak and Schmittgen 2001):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Traité}} - \Delta Ct_{\text{Control}}$$

$\Delta Ct_{\text{Traité}}$ = Ct gène d'intérêt – Ct gène house-keeping pour l'échantillon traité

$\Delta Ct_{\text{Contrôle}}$ = Ct gène d'intérêt – Ct gène house-keeping pour l'échantillon contrôle

Pour un gène étudié nous obtenons une valeur positive ou négative qui représente la différence de quantité d'ADNc, soit d'ARNm exprimés dans les tissus ou circulant dans le sang, d'un échantillon provenant d'un individu traité par rapport à un sain. Pour notre étude, nous avons choisi les seuils suivant :

- $-2 < \Delta\Delta Ct < 2$: pas de différences significatives d'expression du gène d'intérêt en fonction du traitement
- $\Delta\Delta Ct > 2$: diminution de la quantité d'ARNm du gène d'intérêt par le traitement
- $\Delta\Delta Ct < -2$: augmentation de la quantité d'ARNm du gène d'intérêt par le traitement

Annexe 4 : données individuelles biochimiques et histologiques de l'étude sur l'acétaminophène

	Animaux	Biochimie										Histologie		
		GGT U/L	ALAT U/L (22-42)	ASAT U/L (49-155)	albumine g/L (40.7-44.9)	globuline g/L (17.7-21.8)	protéines totales g/L (62.4-77.1)	bilirubine µmol/L (0.8- 3.2)	urée (mmol/L) (VU : 3.6- 5.8)	Créatinine (µmol/L) (VU : 20-37)	Decreased glycogen	necrosis	inflammation	
t2h	control	1	0	34	69	39	18	57	0	4.37	23.1	0	0	0
		2	0	40	85	39	18	57	1	3.83	19.6	0	0	0
	traités 2000mg/kg	3	0	34	76	39	18	57	0	3.53	19.8	0	0	0
		4	0	35	73	39	21	60	0	4.1	26.2	0	0	0
t6h	control	21	0	38	97	40	18	58	0	3.32	16.3	0	0	0
		22	0	38	91	40	22	62	0	2.31	16.8	0	0	0
		23	0	37	77	44	22	66	0	2.42	18.9	0	0	0
		24	0	45	93	46	23	69	0	2.28	16.5	0	0	0
	traités 2000mg/kg	5	0	33	66	39	16	55	0	3.18	18.1	0	0	0
		6	0	30	70	38	19	57	0.9	1.98	16.9	0	0	0
		7	0	33	80	38	20	58	0	2.96	21.4	0	0	0
		8	0	29	67	41	18	59	0	2.98	20.3	0	0	0
t14h	control	25	0	44	89	44	25	69	0	3.57	23.9	0	0	0
		26	0	34	86	46	22	68	0	3.53	19.8	0	0	0
		27	0	50	83	43	21	64	0	3.54	21.3	0	0	0
		28	0	47	83	44	20	64	0	3.07	17.9	0	0	0
	traités 2000mg/kg	17	0	32	71	39	20	59	0	5.56	23.8	0	0	0
		18	0	38	75	41	21	62	1	4.38	19.7	0	0	0
		19	0	47	73	40	19	59	0	5.27	24	0	0	0
		20	0	36	72	42	17	59	0.9	4.88	24.9	0	0	0
t24h	control	37	0	56	143	45	21	66	1.8	6.71	21.9	1	0	0
		38	0	60	199	46	22	68	1.3	5.44	23.3	3	2	1
		39	0	31	64	42	23	65	0	6.48	20.3	1	1	1
		40	0	58	157	44	20	64	1.4	5.7	22	2	2	2
	traités 2000mg/kg	9	0	31	79	41	20	57	0	4.22	25.1	0	0	0
		10	0	33	77	39	16	55	0	5.08	24.3	0	0	0
		11	0	31	83	38	18	56	0	5.47	23.8	0	0	0
		12	0	35	72	41	20	61	0	4.79	25.2	0	0	0
t48h	control	29	0	50	112	40	20	60	1	5.41	28.6	3	2	2
		30	0	380	2800	45	20	65	1.6	5.4	30.3	3	4	3
		31	0	66	259	43	18	61	1.4	4.05	24.1	3	2	2
		32	0	88	835	42	21	63	1.5	6.32	30.7	3	3	2
	traités 2000mg/kg	13	0	31	68	40	20	60	0	4.58	24.4	0	0	0
		14	0	37	77	39	20	59	0	3.82	28.3	0	0	0
		15	0	36	70	41	19	60	0	4.32	25.8	0	0	0
		16	0	32	69	40	17	57	0	4.1	25.4	0	0	0
traités 2000mg/kg	33	0	241	1344	37	20	57	1.8	4.34	24.3	4	4	3	
	34	0	449	1230	38	14	52	2.2	3.26	22.2	3	4	3	
	35	0	117	695	39	20	59	2.1	3.83	19.7	3	3	2	
	36	0	576	2200	37	22	59	1.8	3.04	22	4	4	3	

Annexe 5 : Résultats de biologie moléculaire de l'étude à l'acétaminophène

		Animaux	Nanodrop ng/μL	Bioanalyseur RIN (note sur 10)
t2h	control	1	432,76	8,2
		2	997,68	8,4
		3	1011,68	8
		4	765,64	8,3
	traités 2000mg/kg	21	1021,00	8,3
		22	441,72	8,2
		23	1131,48	8,4
		24	750,40	8,3
t6h	control	5	438,72	7,9
		6	689,84	8
		7	543,84	8,2
		8	308,68	7,5
	traités 2000mg/kg	25	737,20	8
		26	623,00	8,2
		27	617,68	7,7
		28	688,64	8,1
t14h	control	17	1302,64	8,1
		18	947,60	8,4
		19	570,16	8,2
		20	150,68	8,3
	traités 2000mg/kg	37	377,12	8,1
		38	561,40	8,2
		39	816,76	8,1
		40	1272,88	7,3
t24h	control	9	314,16	8,1
		10	673,76	7
		11	342,88	8
		12	1037,80	7,9
	traités 2000mg/kg	29	279,76	8
		30	614,92	6,5
		31	434,36	8
		32	265,56	5,7
t48h	control	13	629,60	9
		14	716,00	8,9
		15	444,12	8
		16	753,28	8,2
	traités 2000mg/kg	33	50,40	6,7
		34	39,28	7,2
		35	45,80	7,7
		36	36,48	7,4

Annexe 6 : Résultats de biologie moléculaire de la gentamicine

Jour d'autopsi	Lots	Numéro des animaux	Biologie moléculaire			
			Nanodrop ng/μl		Bioanalyser	
			extraction sang	extraction reins	extraction sang	extraction reins
J4	controls	1	809,84	-	7,2	-
		2	734,56	-	8	-
		3	638,36	-	8	-
		4	586,88	-	8	-
		5	636,11	2407,48	8,2	6,8
	traités 25 mg/kg/j	16	622,52	-	7,5	-
		17	426,88	2867,43	7,8	8
		18	682,49	2403,91	8,5	8,1
		19	446,12	-	7,6	-
		20	813,72	-	7,8	-
	traités 75 mg/kg/j	31	633,36	2338,24	7,9	8,3
		32	377,48	-	7,9	-
		33	559,36	-	7,7	-
		34	339	2220,97	7,8	8,1
		35	412,57	-	8,2	-
J6	controls	6	595,04	-	7,8	-
		7	584,76	2391,03	7,9	7,7
		8	448,88	-	6,5	-
		9	778,84	-	8,1	-
		10	776,29	-	8,5	-
	traités 25 mg/kg/j	21	782,97	-	8,3	-
		22	808,96	3198,63	7,7	7,6
		23	563,36	2881,85	7,7	7,9
		24	647,28	-	8	-
		25	695,84	-	7,9	-
	traités 75 mg/kg/j	36	807,44	-	7,9	-
		37	388,6	2291,55	8	7,6
		38	600,04	-	7,6	-
		39	713,08	-	8	-
		40	738,17	2425,01	8,3	8
J11	controls	11	574,56	-	8	-
		12	367,96	-	7,8	-
		13	349,6	2472,75	8,1	7,8
		14	435,88	-	7,7	-
		15	576,08	-	8	-
	traités 25 mg/kg/j	26	567,56	3489,07	7,5	8
		27	926,16	-	7,9	-
		28	738,88	-	8	-
		29	746,63	3117,65	8,4	8
		30	870,44	-	8	-
	traités 75 mg/kg/j	41	117,55	2768,6	8,1	6,1
		42	124,32	-	8,3	-
		43	142,12	-	8	-
		44	119,04	3506,85	7,9	8,7
		45	131,84	-	7,6	-

Toulouse, 2010

Nom : GIMIE

Prénom : Fanny

Titre : Evaluation des ARNm circulants sanguins comme nouveaux biomarqueurs de néphrotoxicité chez le rat.

Résumé :

Lors du développement de nouveaux médicaments, leur toxicité est très fréquemment la cause de l'arrêt des projets. Notre étude a évalué le dosage sanguin d'ARNm spécifiques d'organes par RT-PCR comme nouvel outil pour le développement de biomarqueurs. Chez des rats traités à l'acétaminophène à 2000 mg/kg, la détection d'ARNm de l'albumine a été possible dès 14h après administration, associée à une nécrose hépatocellulaire minime et une faible augmentation des enzymes AST et ALT. Chez des rats traités à la gentamicine à 25 ou 75 mg/kg/j pendant 3, 5 ou 10 jours, les ARNm de neuf protéines rénales ont été dosés. Dès 3 jours, la détection de l'ARNm de l' α -*gst*, dont la spécificité reste à établir, a été possible ; à 10 jours les ARNm des gènes *kim-1*, *timp-1* et *clus* ont été modifiés et associés à une néphrotoxicité. Ces résultats nous ont permis de valider une technique de dosage des ARNm sanguins en tant que biomarqueurs de toxicité tissulaire.

Mots clés : ARNm, biomarqueurs, hépatotoxicité, néphrotoxicité, rats, RT-PCR, sang.

Title: Evaluation of mRNAs in blood from rats as novels biomarkers of nephrotoxicity.

Abstract :

During drug development, many projects are limited by drug induced toxicity. Our study evaluated organ specific mRNAs blood detection by RT-PCR as a novel approach in biomarkers development. As early as 14h after the administration of acetaminophen at a dose of 2000 mg/kg, we detected *albumin* mRNA associated with minimal hepatocellular necrosis and minimally increased AST and ALT values. The mRNAs of nine kidney proteins were detected in rats treated with gentamicin at 25 or 75 mg/kg/d during 3, 5 or 10 days. Three days after the beginning of the treatment, α -*gst* mRNA was detected, but the specificity remains to be established; after ten days, *kim-1*, *timp-1* and *clus* mRNA were modified and associated with kidney toxicity. These preliminary results allowed us to validate the measurement of blood mRNA as a potential biomarker of tissue injury.

Keywords: biomarkers, blood, hepatotoxicity, mRNA, nephrotoxicity, rats, RT-PCR.