



Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale



Rôle du facteur de transcription HNF-1 β dans l'intégration des signaux cytokiniques et la régulation des fonctions mitochondriales au cours des insuffisances rénales aiguës et du sepsis

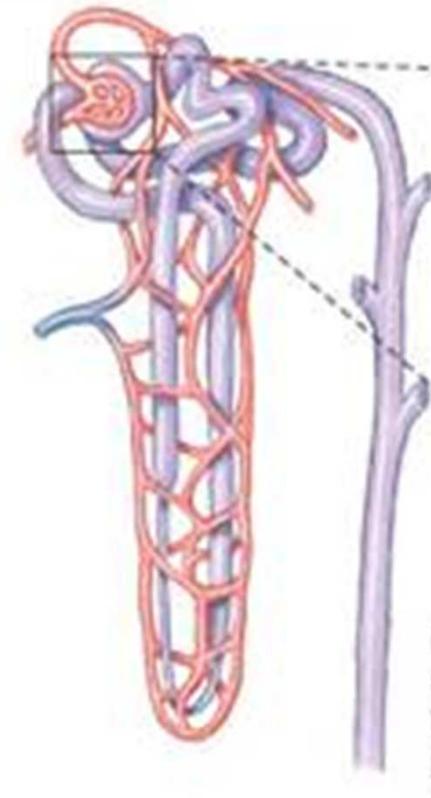
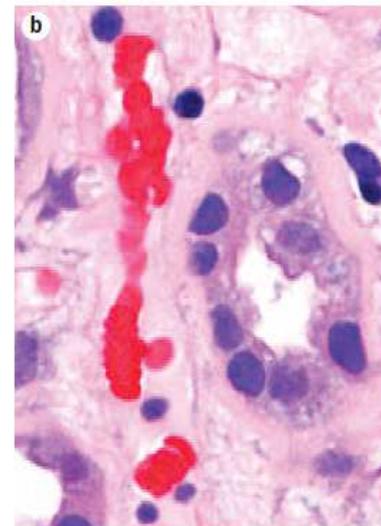
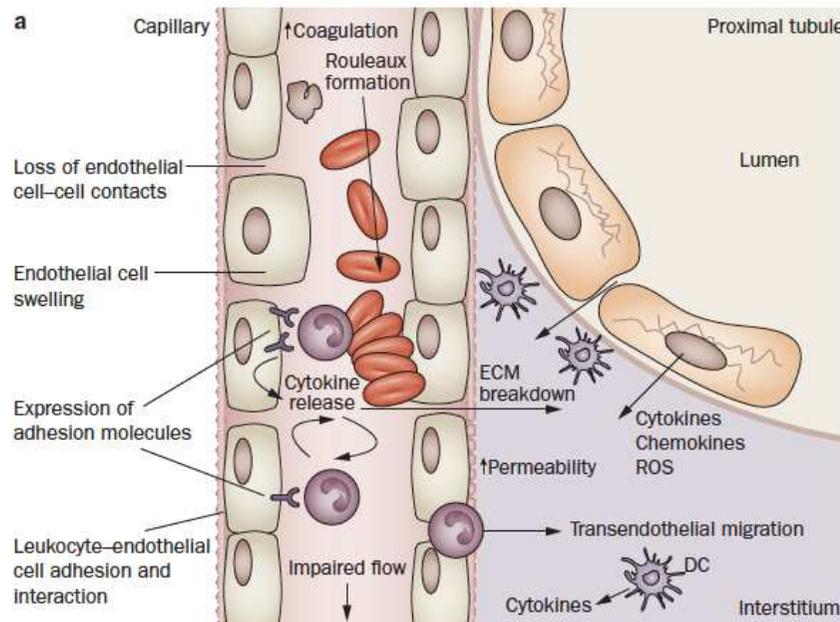
Dr Stanislas FAGUER

Mémoire de DESC Réanimation Médicale

Toulouse, Septembre 2015

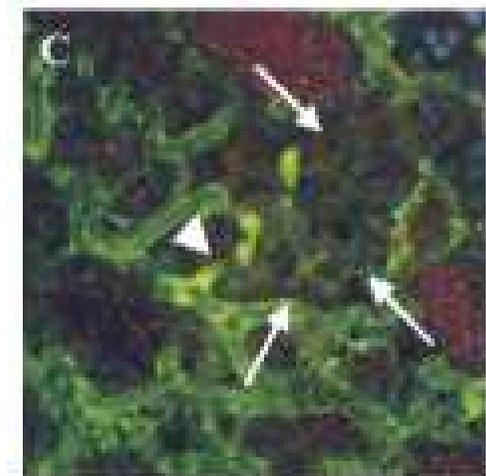
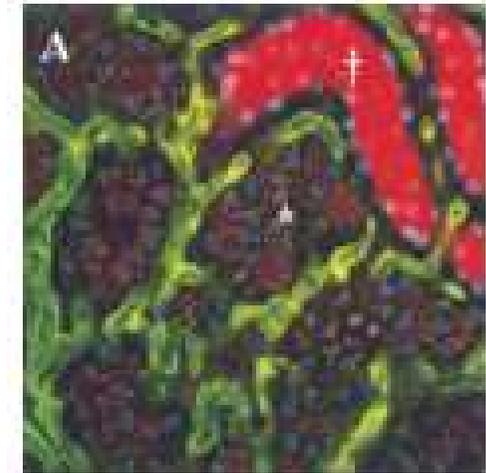
AKI : modèles animaux

- **Dysfonction endothéliale**
- **Inflammation systémique / locale**
- **Dysfonction épithéliale**
- **Inadaptation balance énergétique**



Dysfonction endothéliale

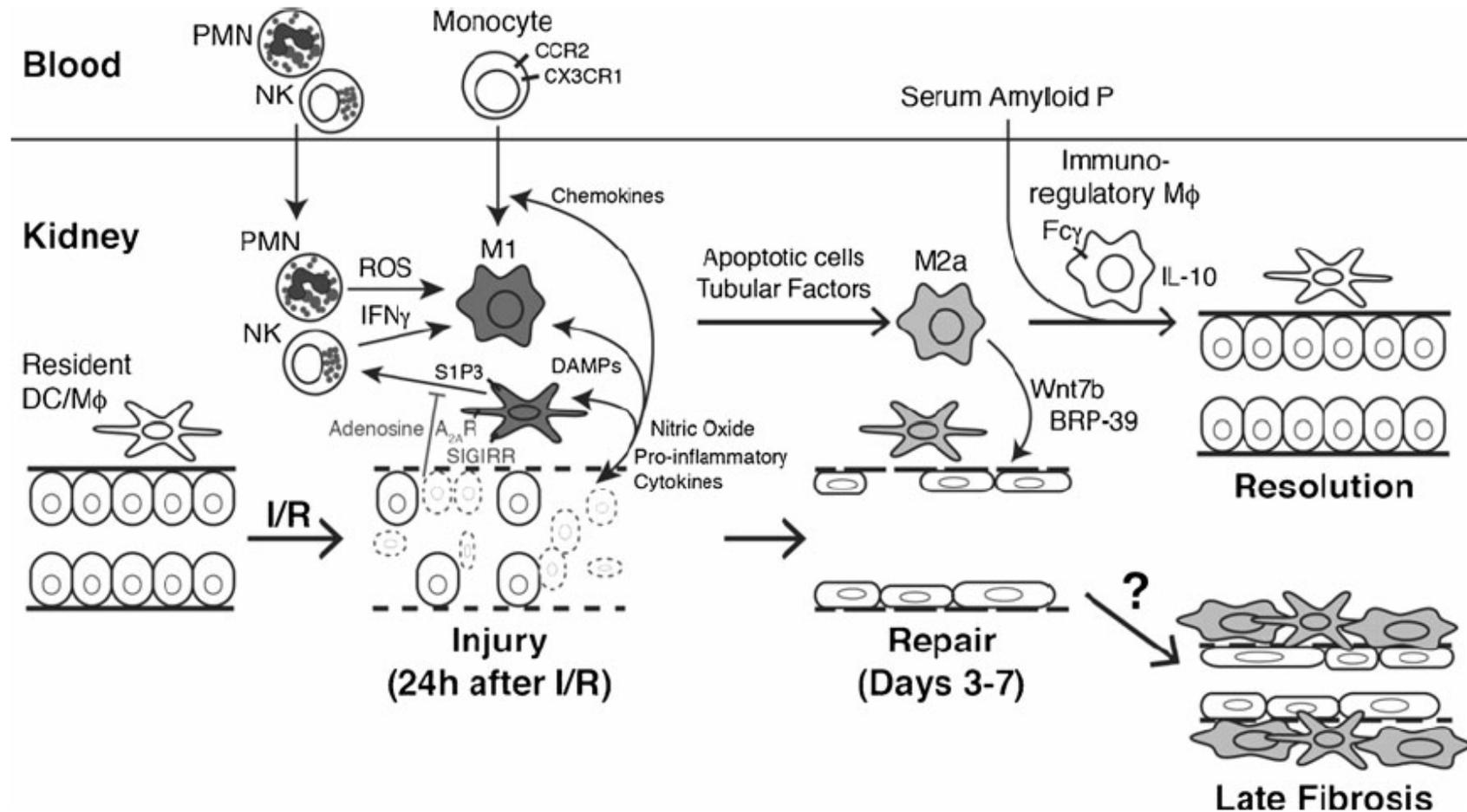
- **Vasoconstriction post-ischémique**
 - ↓ réponse NOS bradykinine / acétylcholine
- **Hyperperméabilité**
 - Altération des jonctions serrées
 - ↑ MMP2/9
- **Apoptose endothéliale**
 - Coagulation, congestion
 - Hypoperfusion focale
 - Shunt cortical
 - > découplage DSR global / DSR effectif
- **Raréfaction capillaire**
 - Défaut de réparation
 - ↓VEGF / ↑ADAMTS1



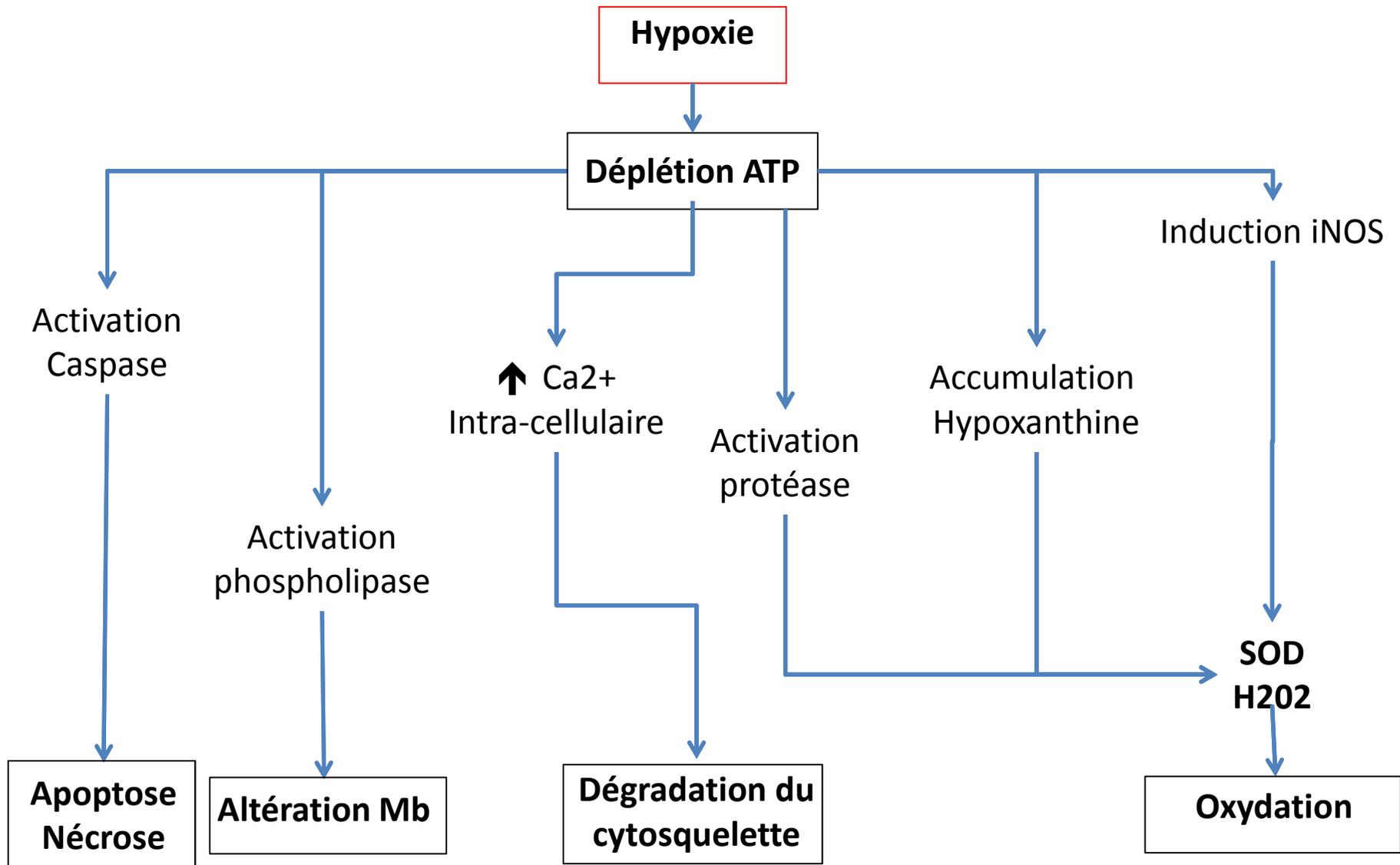
Inflammation (1)

- **Adhésion leucocytaire / endothélium**
 - ↑ ICAM1, CX3CL1
- **Activation des cellules tubulaires**
 - TLR4/TLR2 > production de chemokines (TNF α)
 - ↓ Crry et dépôts de C3 membranaire
- **Afflux de cellules inflammatoires**
 - Précoce : PNN, iNKT (INF γ), Macro ϕ (IL6, IL-1 α , IL12p40/70, TNF α)
 - Retardée : LT CD4+
 - Plasticité macrophagique (M1 > M2)

Inflammation (2)



Agression épithéliale (1)



Agression épithéliale (2)

- **Activation de l'apoptose**
- **Nécrose**
- **Autophagie**
 - Activation lysosomale (Lc62), Caspase-3, rôle de l'INF- γ
- **Altération du cytosquelette et de la polarisation**
 - Formation de vésicules membranaires
 - *Obstruction tubulaire*
 - Perte des jonctions serrées / adhérentes
 - *Rétrodiffusion de l'urine primitive*
 - Dépolarisation apico-basale
 - *Mal-adressage de la Na⁺K⁺ATPase*
 - *Transport Na⁺Cl⁻ bi-directionnel*
- **Rétrocontrôle tubulo-glomérulaire**

AKI : la réalité (humaine)

PATHOPHYSIOLOGY of the RENAL BIOPSY www.jasn.org

Acute Tubular Necrosis Is a Syndrome of Physiologic and Pathologic Dissociation

Seymour Rosen* and Isaac E. Stillman†

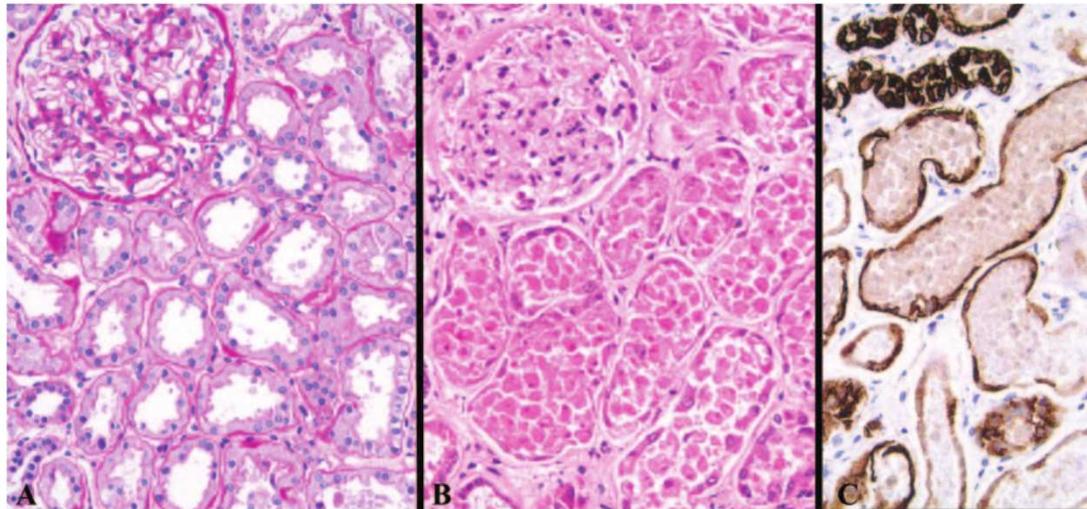


Table 1. Hypothetical schema of hemodynamic dysregulation in acute kidney injury

Hemodynamic State	Compensated	Dysregulation	Total Cessation of Blood Flow
Clinical scenario	Prerenal azotemia	Acute tubular necrosis	Vascular catastrophe
Tubular injury	0	Rare- ↑, focal	↑ ↑ ↑
Biomarkers	0-limited	↑ - ↑ ↑	↑ ↑ ↑
GFR	↓ - ↓ ↓	↓ - ↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓ -0
Clinical frequency	Common	Less common	Rare

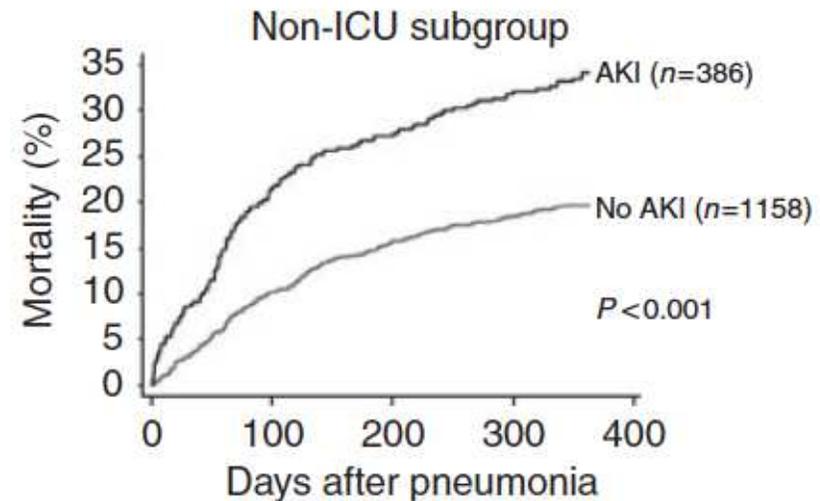
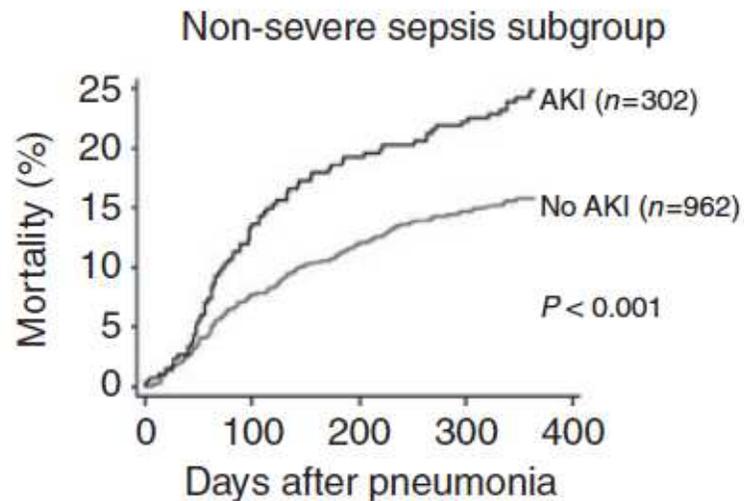
AKI septique : souvent indépendante de l'état hémodynamique

<http://www.kidney-international.org>

original article

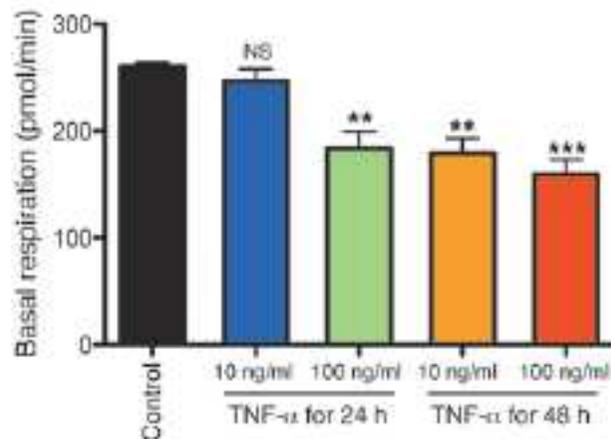
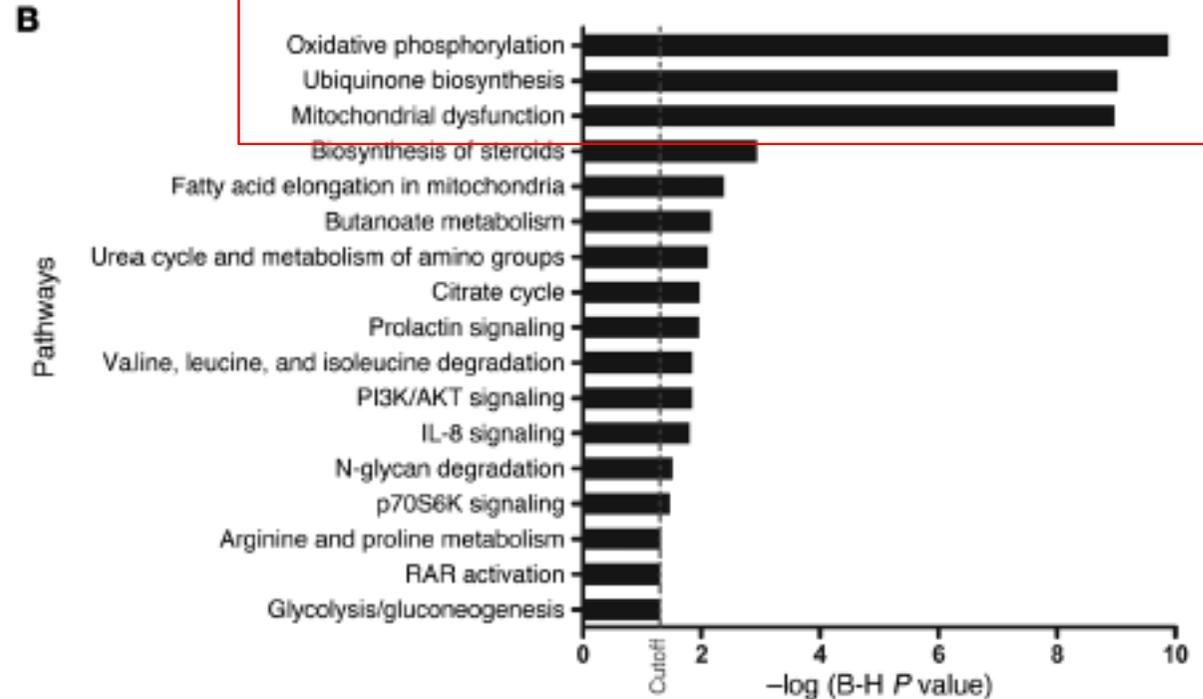
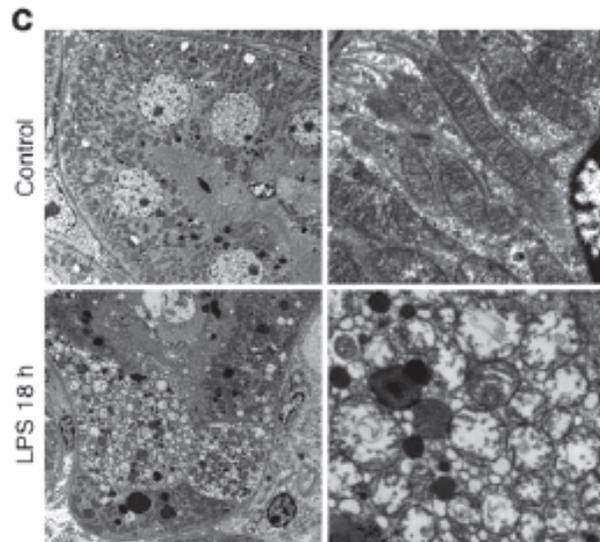
© 2010 International Society of Nephrology

Acute kidney injury in non-severe pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival



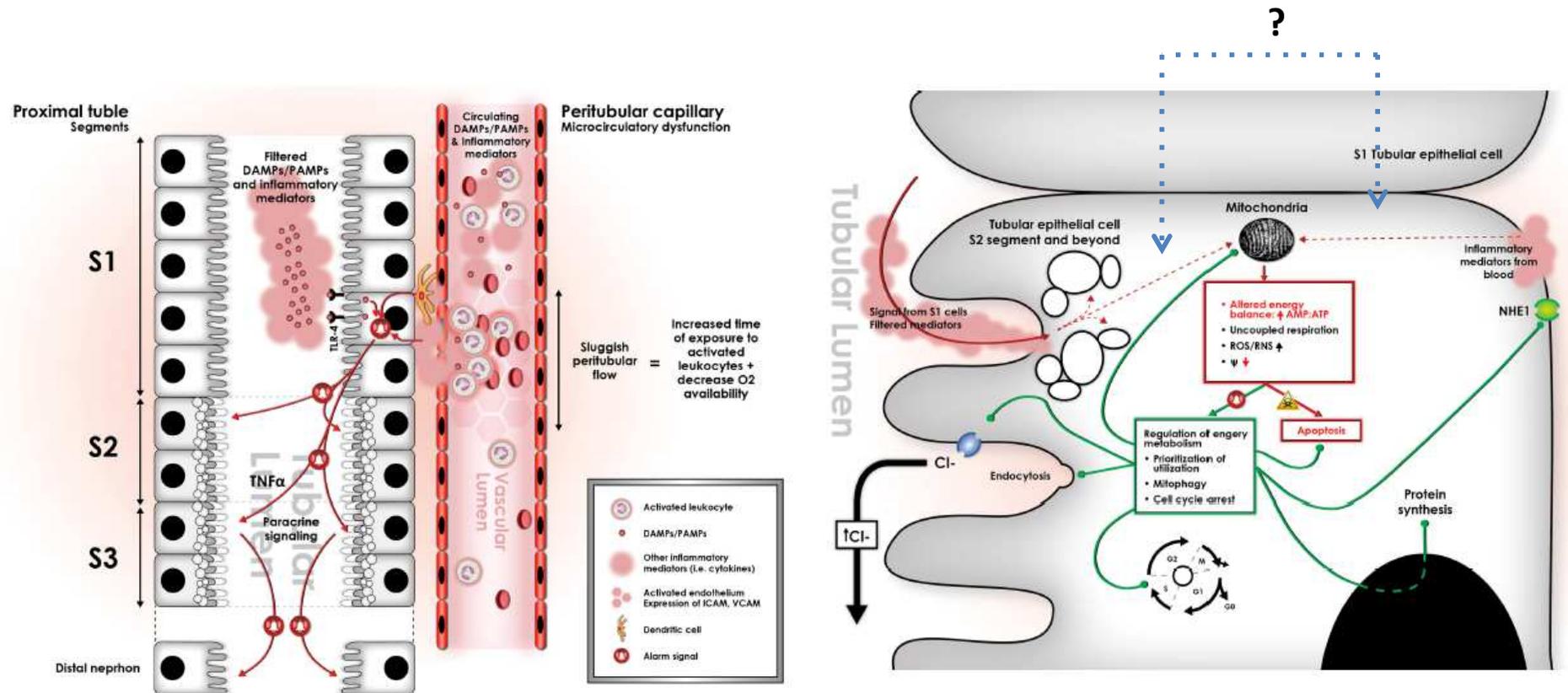


PGC-1 α promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice



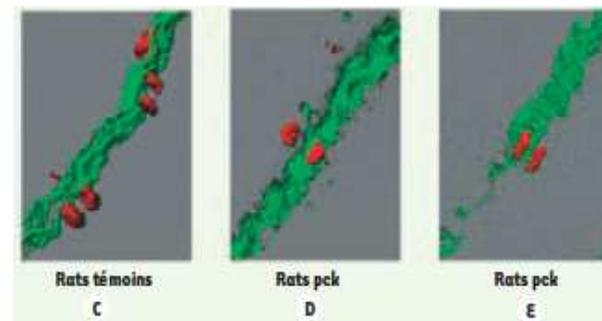
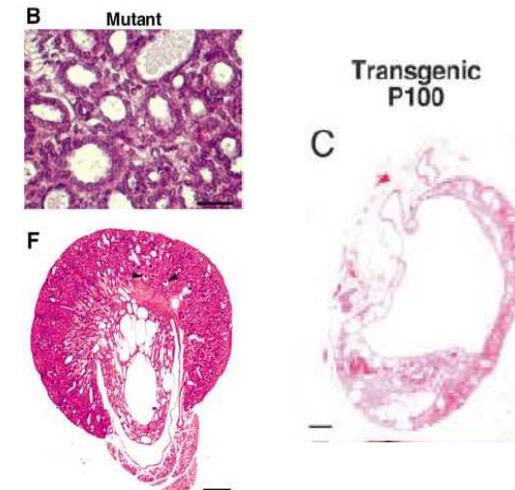
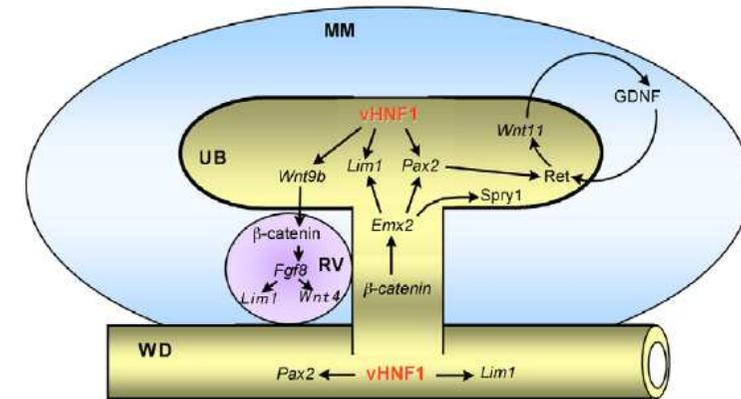
A Unified Theory of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury: Inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics and the tubular cell adaptation to injury

Hernando Gomez, MD^{†,‡}, Can Ince, PhD[†], Daniel De Backer, MD[‡], Peter Pickkers, MD[§],
Didier Payen, MD^{||}, John Hotchkiss, MD^{*}, and John A. Kellum, MD^{*,†}



Le facteur de transcription HNF-1 β

- **Différenciation précoce**
 - ▣ Pro/Mesonephros (*Pax2*)
- **Bourgeon urétéral et tubulogénèse**
 - ▣ Induction (*Pax2*, *Lhx1*, *Wnt9b*)
 - ▣ Control HGF/EGF pathways (*Socs3*)
 - ▣ Planar cell polarisation (*Pkhd1*, *Pkd2*)
- **Spécialisation tubulaire**
 - ▣ Segmentation (*Notch pathways*)
- **Fonction tubulaire / homéostasie**
 - ▣ Magnesium wasting (*Fxyd2*)
 - ▣ Uric acid (? *Umod*, *Urat1* ?)

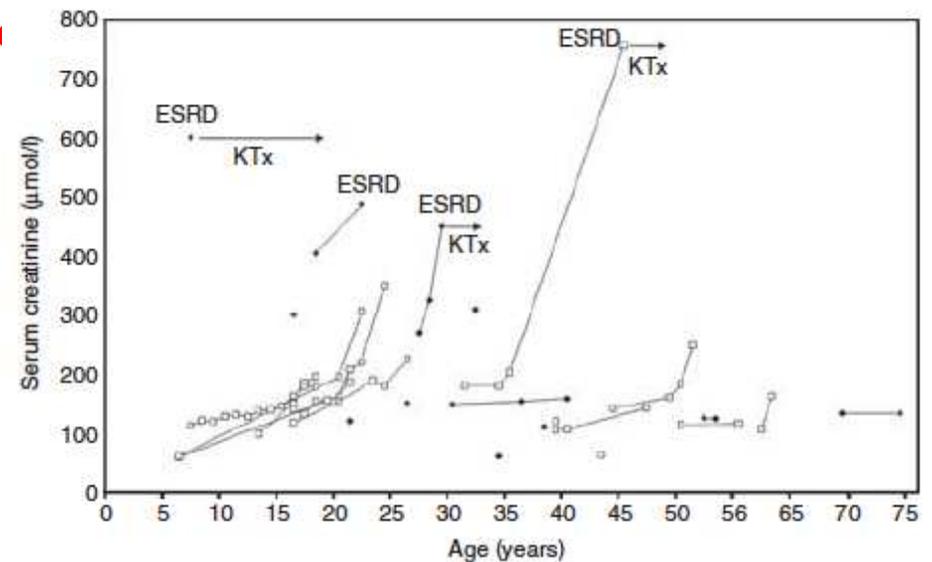
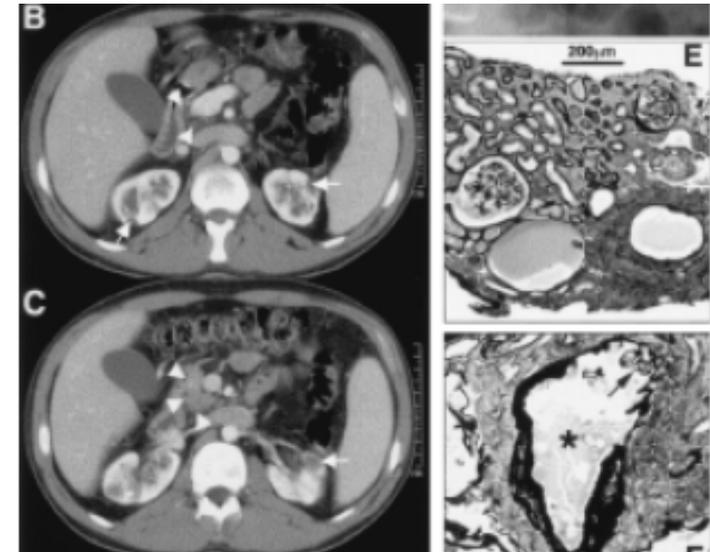


Le facteur de transcription HNF-1 β

- **CAKUT**
 - ▣ Agénésie, hypoplasie
 - ▣ Hypoplasie
 - ▣ Kystes rénaux

- **Fonction tubulaire / homéostasie**
 - ▣ Hypomagnésémie, hypokaliémie
 - ▣ **Parfois tubulopathie proximale + distale**

- **Insuffisance rénale progressive**
 - ▣ NTIC
 - ▣ **Épisodes d'IR rapidement progressive**

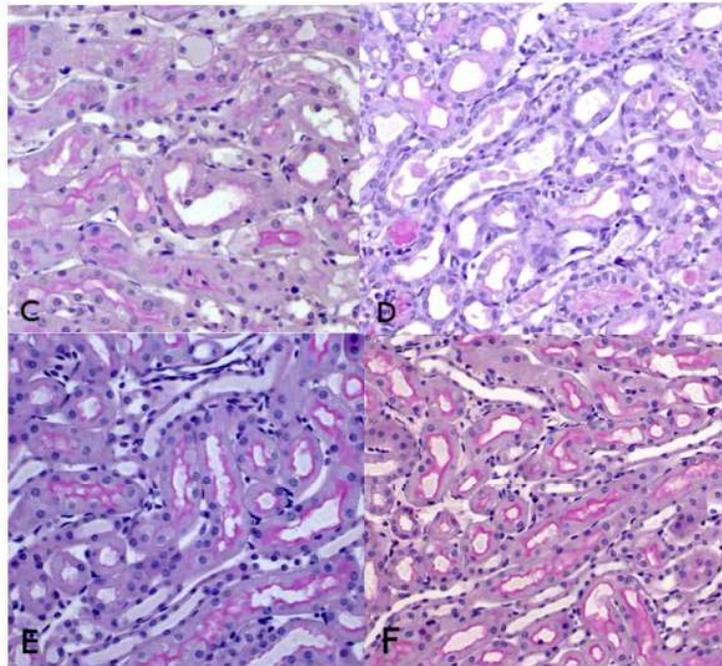


Faguer et al. Kidney Int 2014, Faguer et al. Kidney Int 2011
Faguer et al. AJKD 2007, Adalat et al. JASN 2009

Objectifs

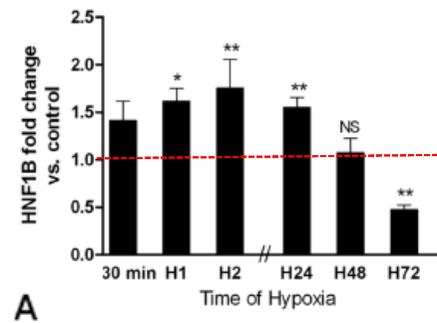
- Mieux caractériser les mécanismes moléculaires liant les signaux de dangers extra-cellulaires (cytokines, DAMPS, PAMPS, hypoxie) et la réponse métabolique et transcriptionnelle des cellules tubulaires rénales en contexte de choc endotoxinique et de rhabdomyolyse.
- Préciser le rôle du facteur de transcription HNF-1 β dans le maintien de l'homéostasie épithéliale et la fonction mitochondriale à l'état basal et après agression rénale aiguë

Hnf-1 β Transcription Factor Is an Early Hif-1 α -Independent Marker of Epithelial Hypoxia and Controls Renal Repair

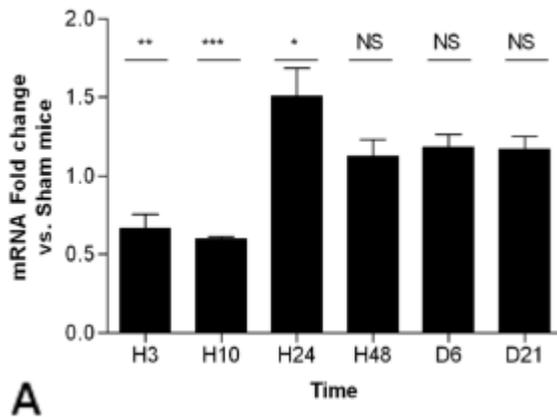
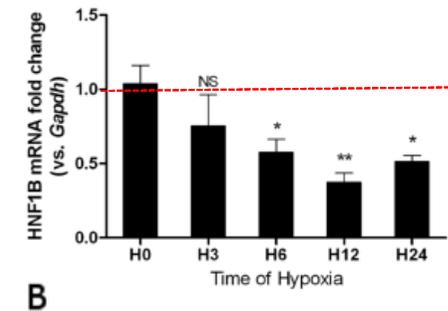


Hypoxie / HNF-1 β

Protein

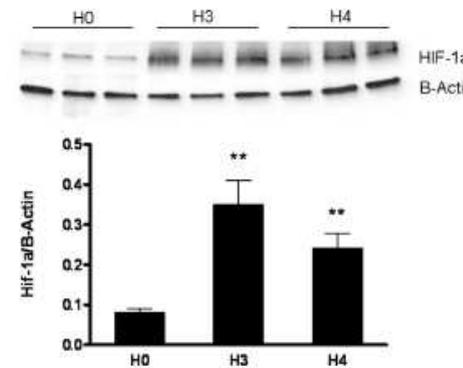


mRNA

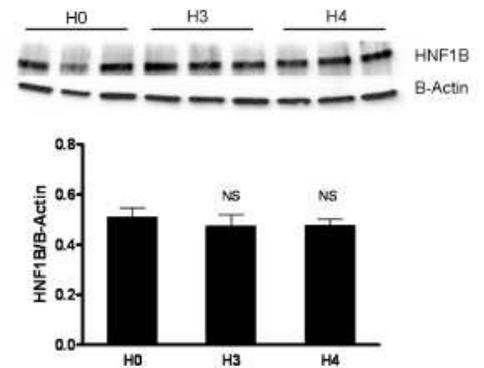


Inhibiteurs PHD

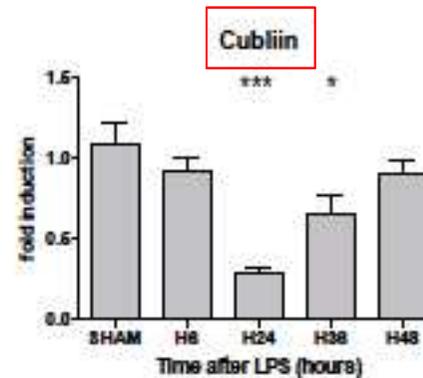
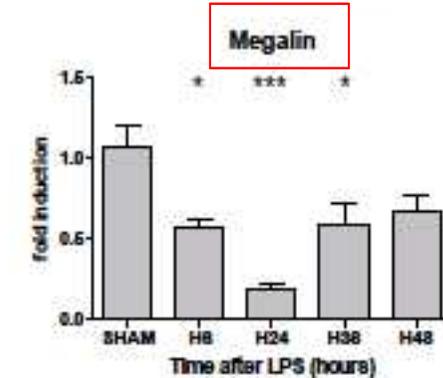
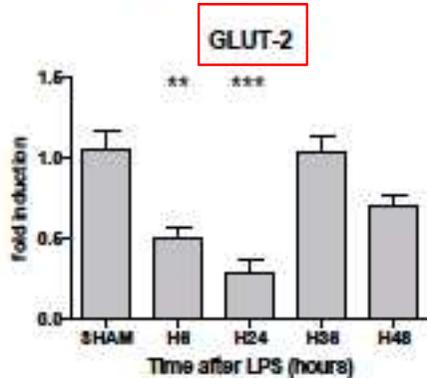
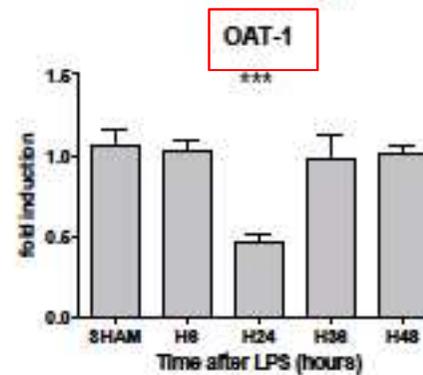
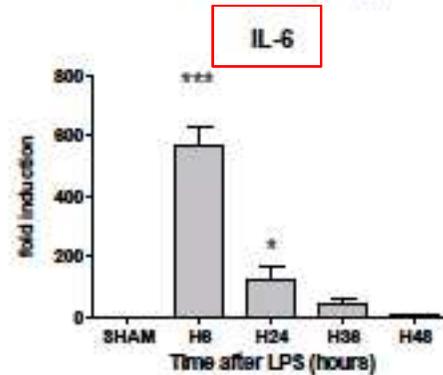
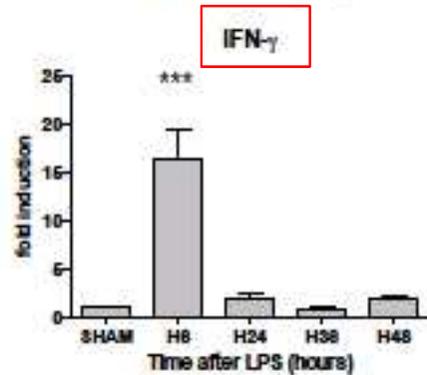
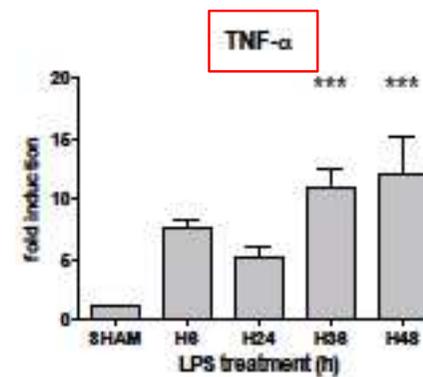
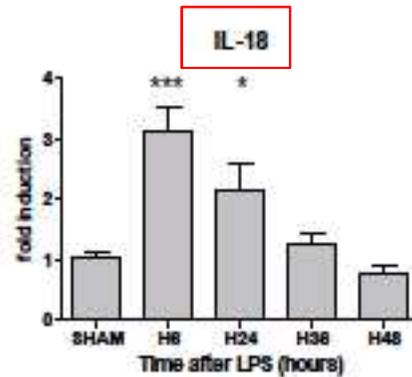
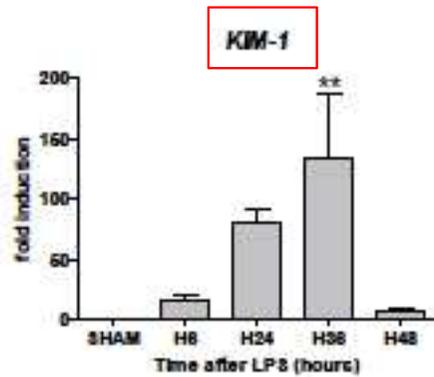
HIF-1 α



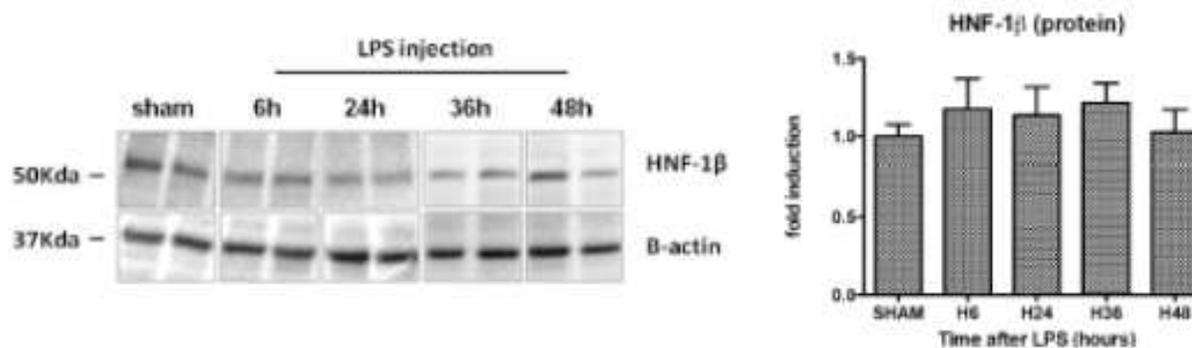
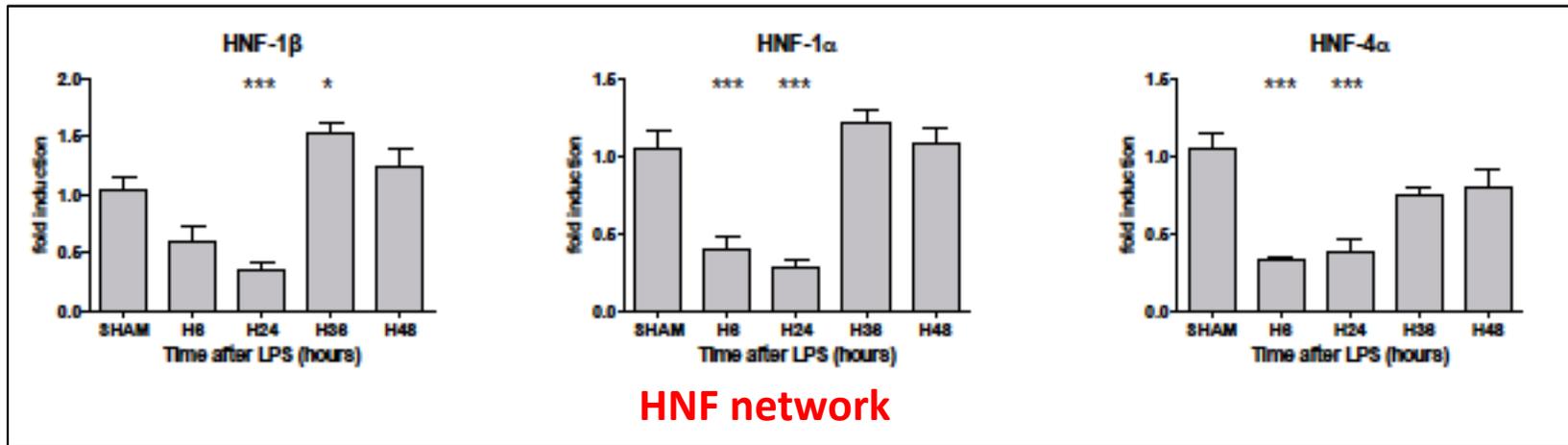
HNF-1 β



Evaluation d'un modèle murin d'AKI septique

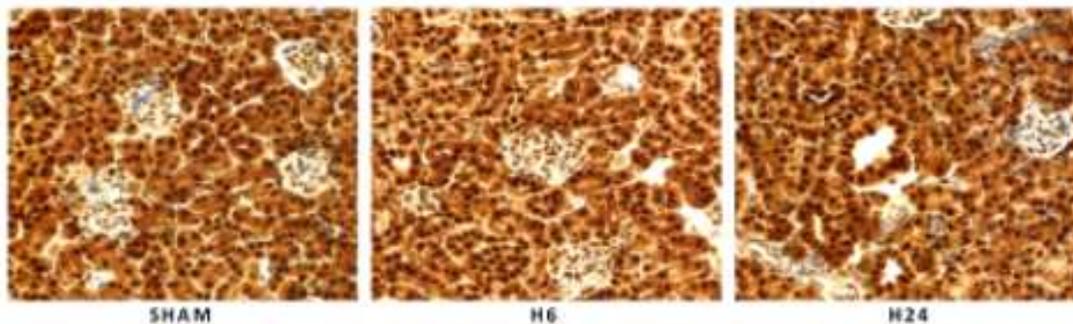


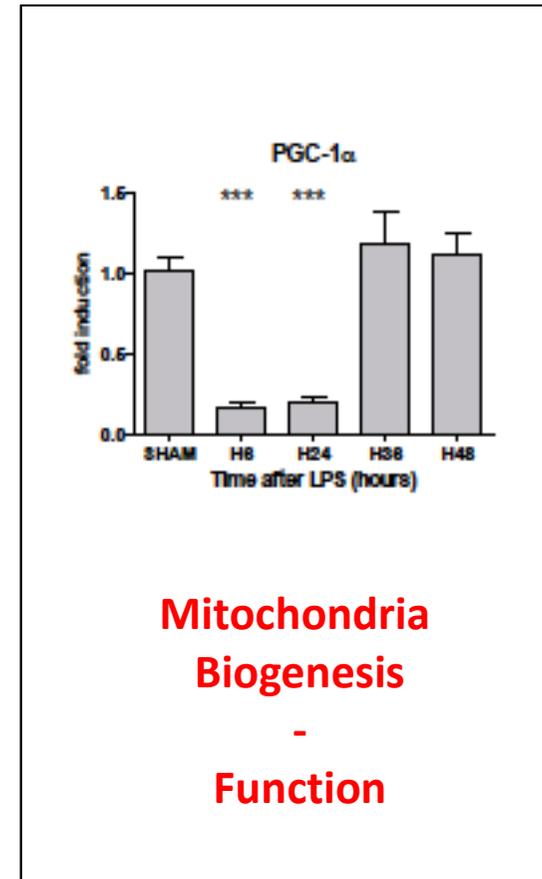
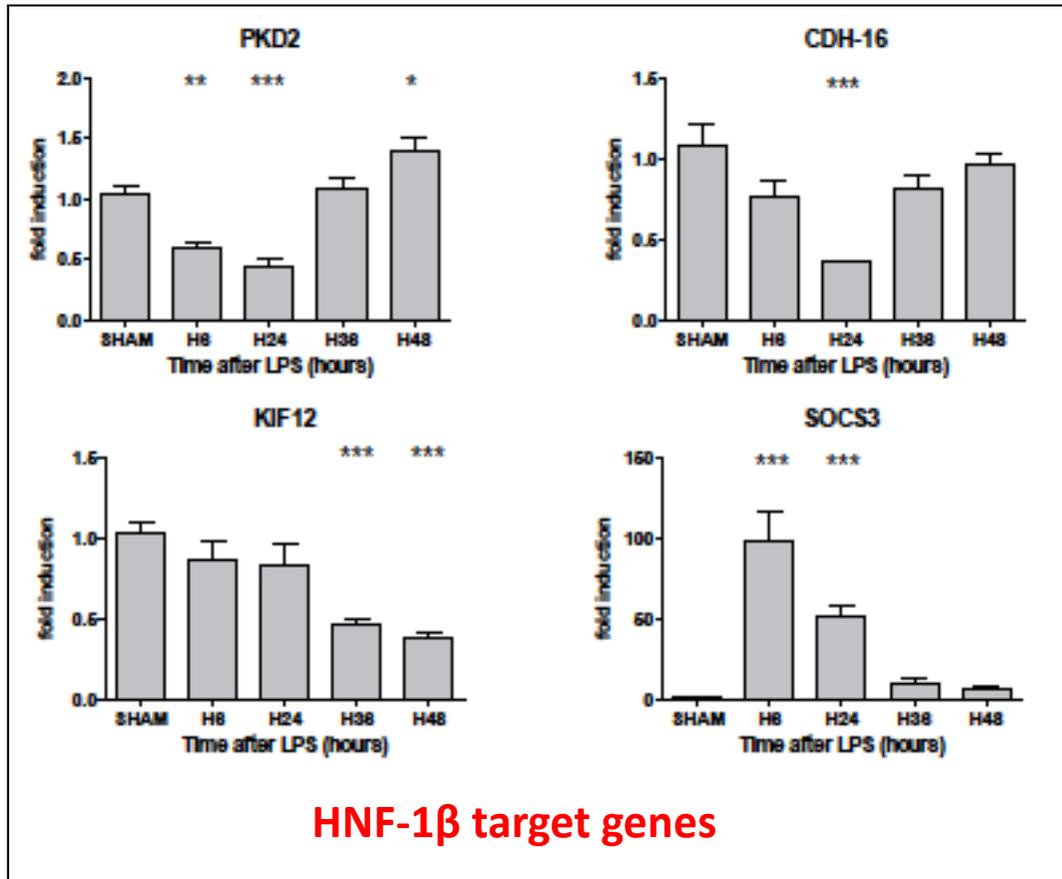
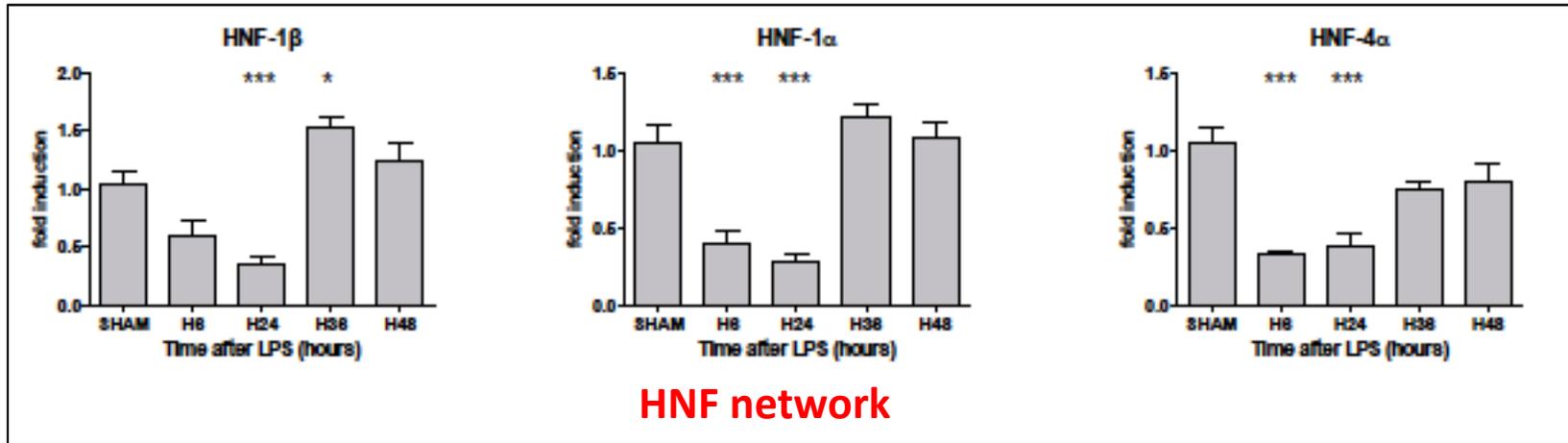
Evaluation d'un modèle murin d'AKI septique



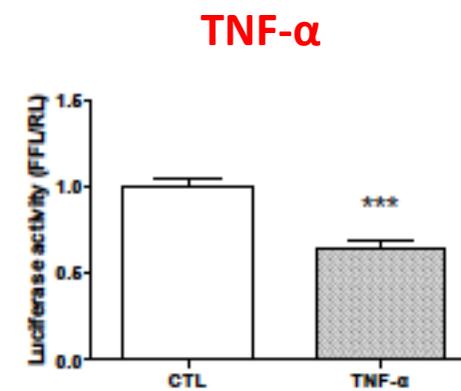
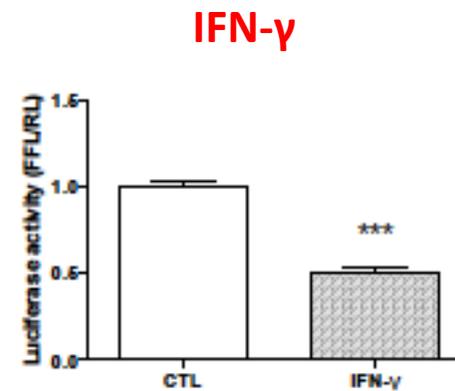
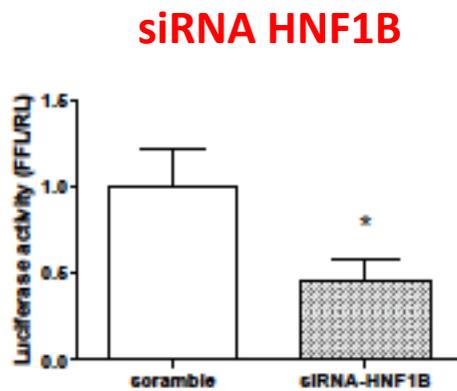
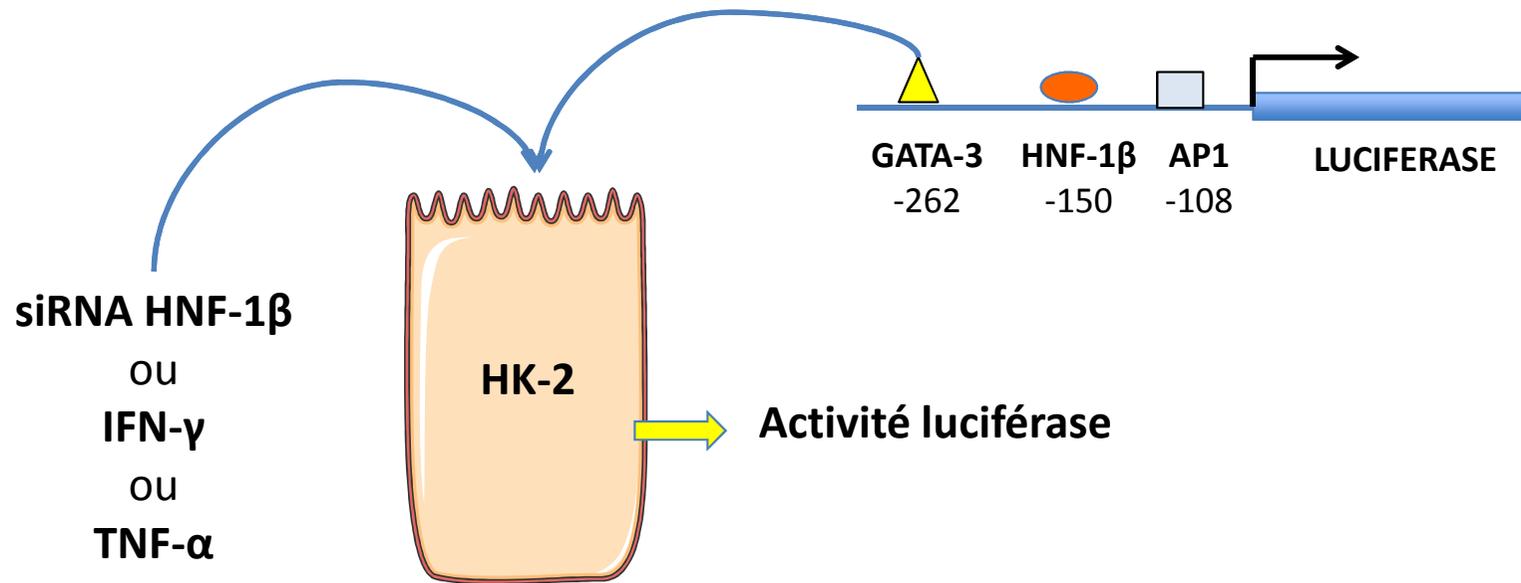
Protéine:

- Pas d'anomalie d'expression
- Pas d'anomalie de localisation sub-cellulaire

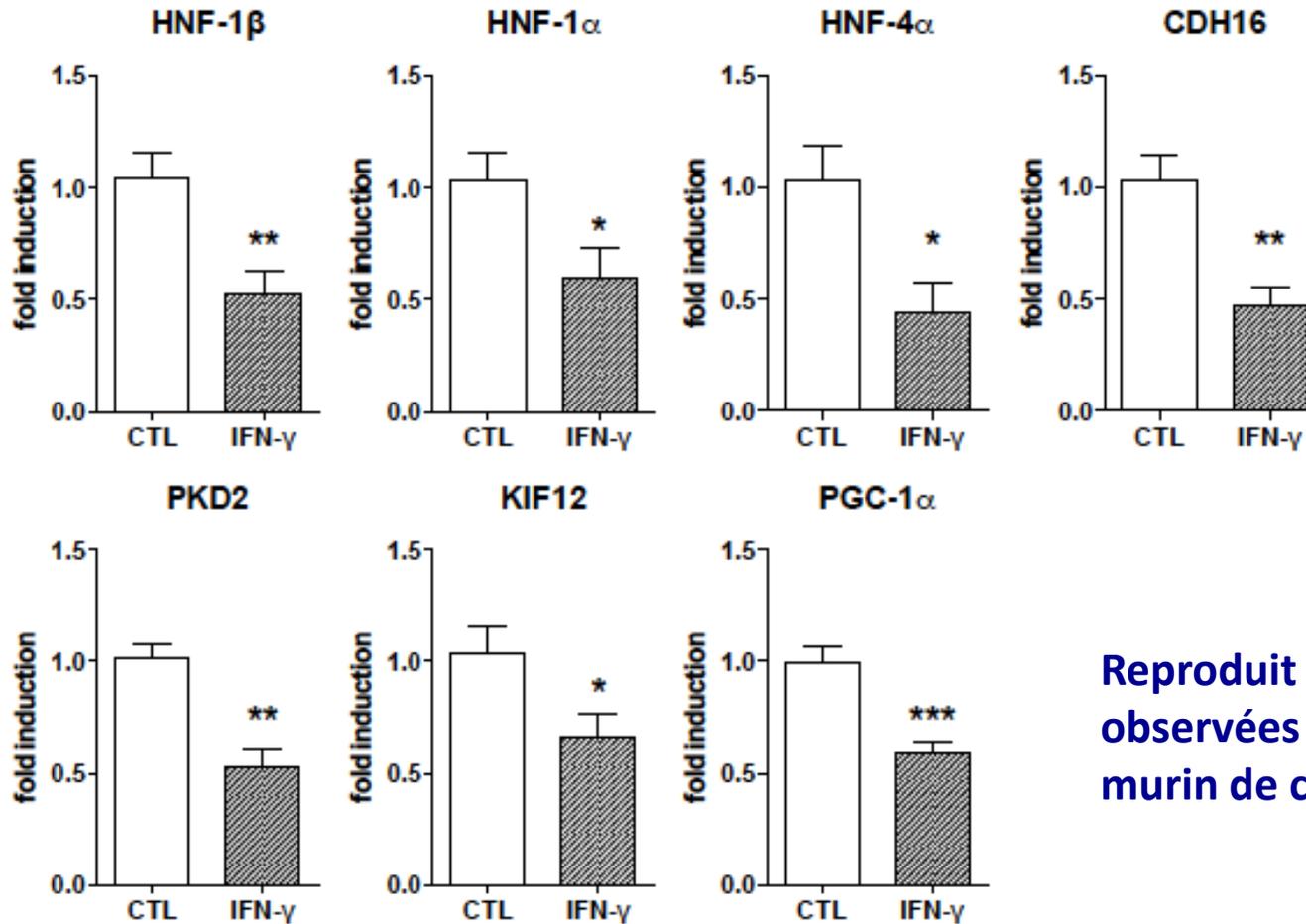




Confirmation de l'inhibition de l'activité transcriptionnelle d'HNF-1 β

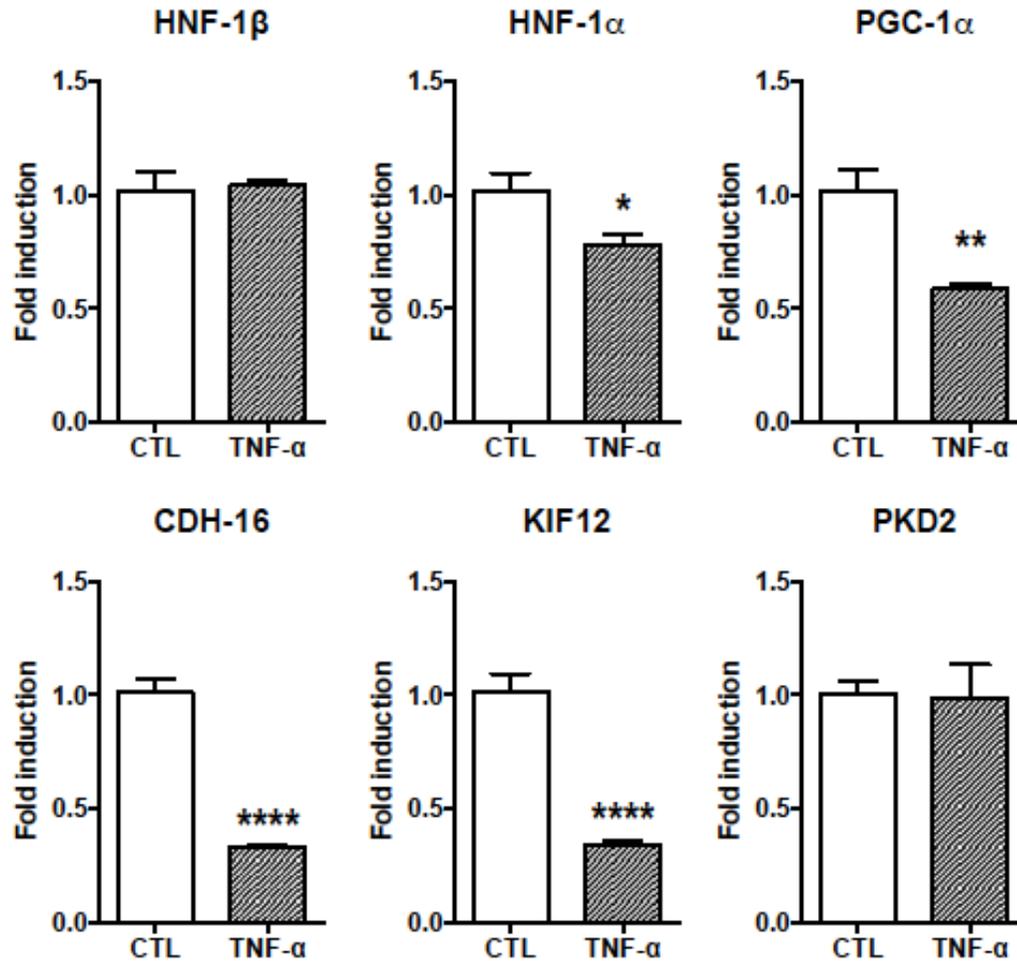


Impact de l'IFN- γ sur l'activité transcriptionnelle d'HNF-1 β



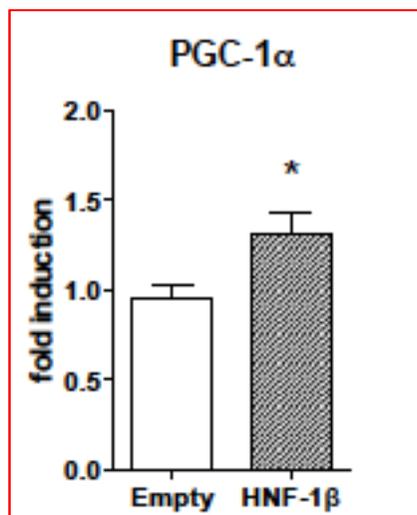
Reproduit les anomalies observées dans le modèle murin de choc endotoxinique

Impact du TNF- α sur l'activité transcriptionnelle d'HNF-1 β



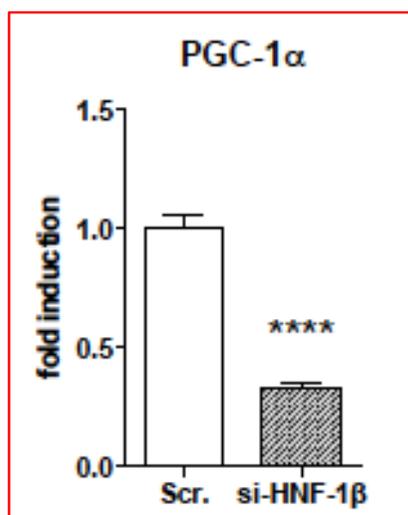
Reproduit les anomalies observées dans le modèle murin de choc endotoxinique

Modulation d'*HNF1B* et expression de PGC-1 α



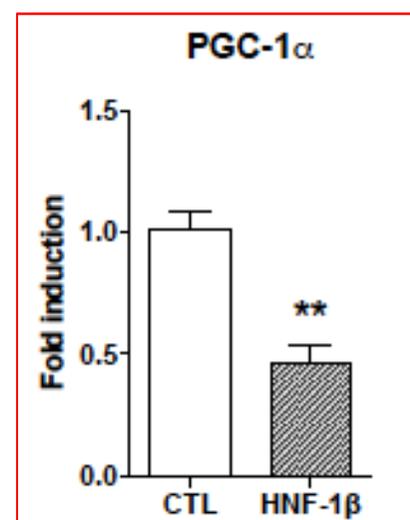
Cellules HEK293
Lignée humaine
Rein embryonnaire

Plasmide *HNF1B*



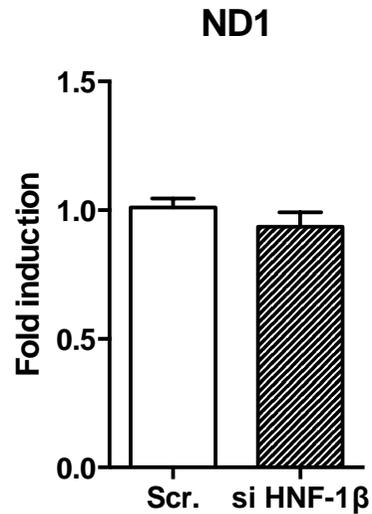
Cellules HK-2
Lignée humaine
Tube proximal

siRNA anti-*HNF1B*

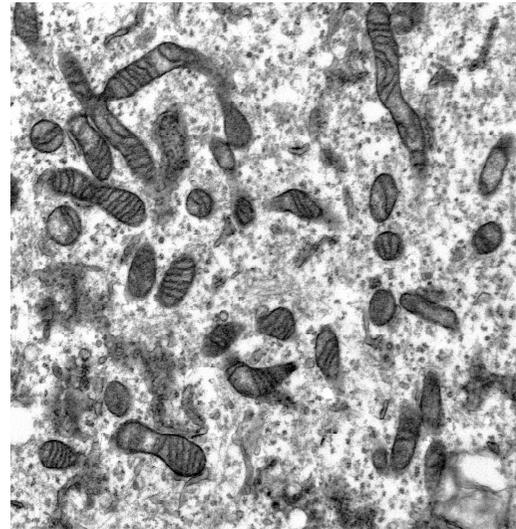


**Patient 34 ans avec
une mutation
d'*HNF1B***

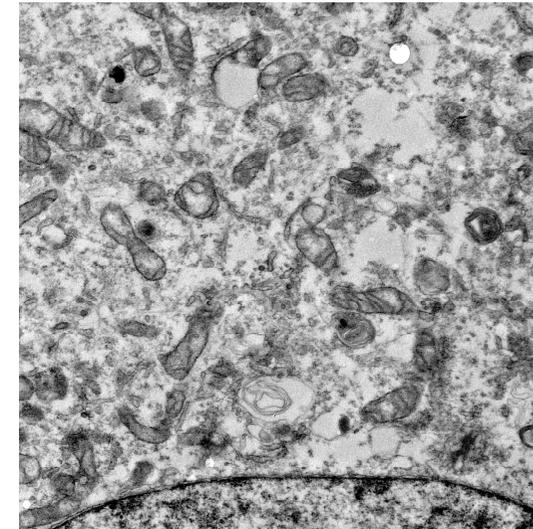
Inhibition d'*HNF1B*: impact sur la fonction mitochondriale



Control



siRNA HNF1B



Génome mitochondrial

Quantité d'ADNm identique

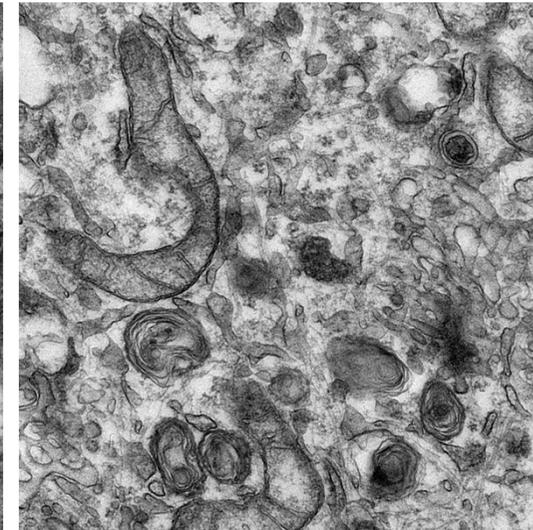
Microscopie électronique

Mitochondries gonflées

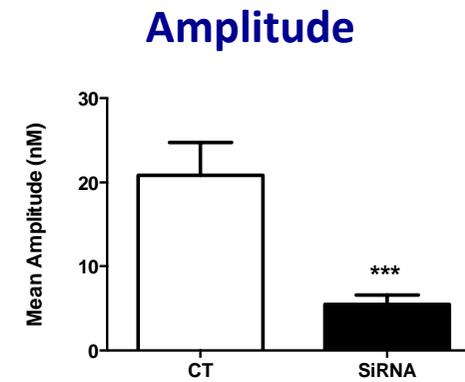
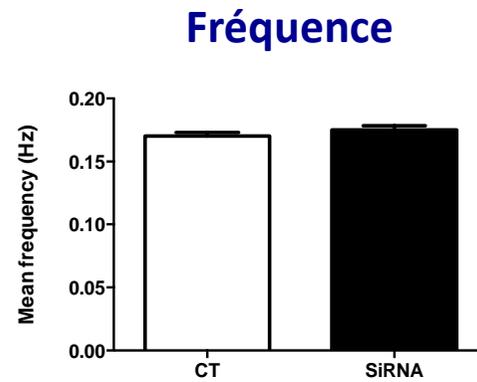
Pertes de crêtes

Fission

Autophagolysosomes



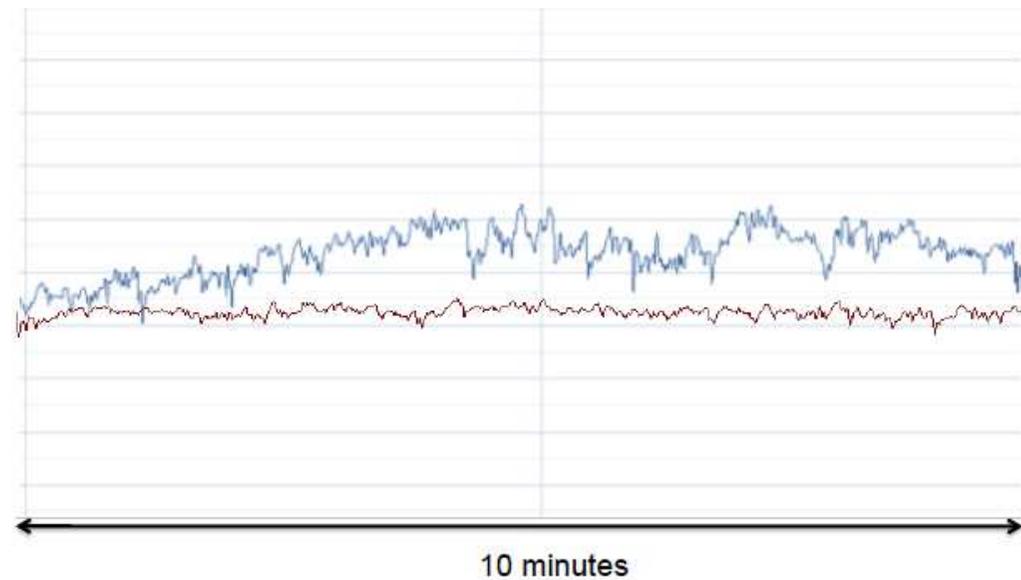
Inhibition d'*HNF1B*: production H2O2



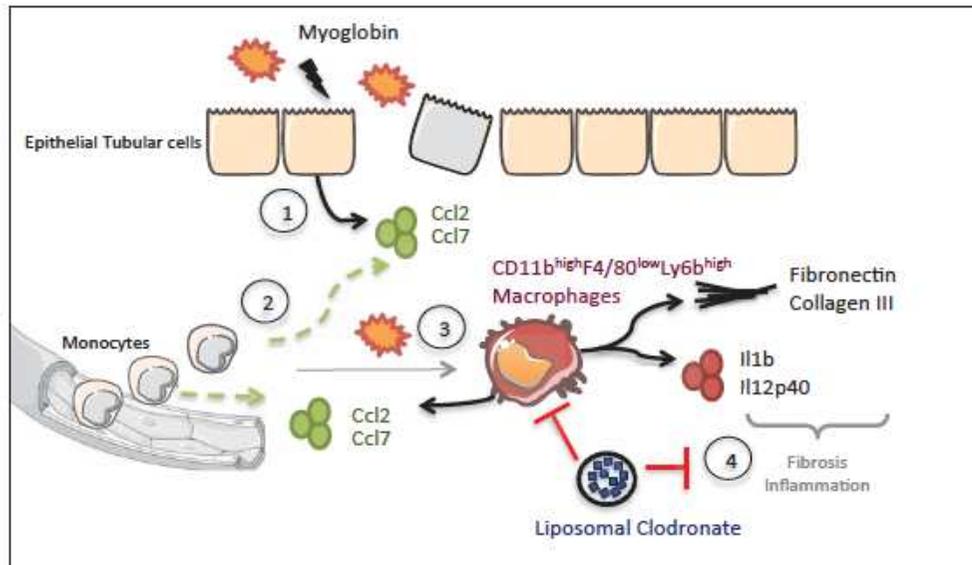
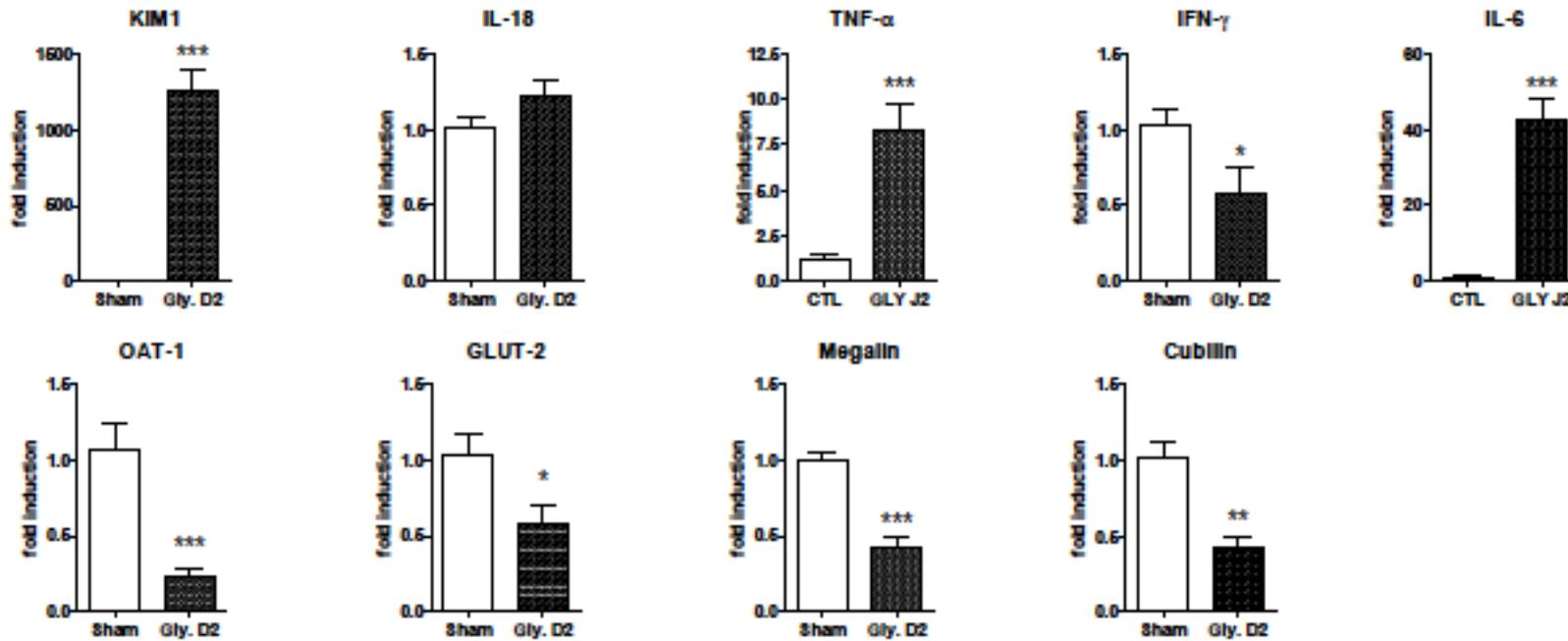
Anomalie de production d'H2O2 (ROS)

Base moindre

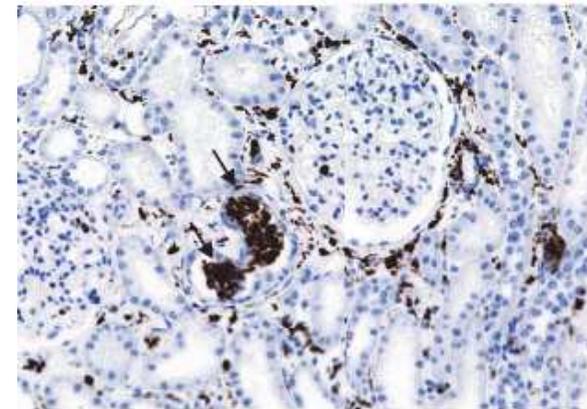
Amplitude moindre



Modèles murins de rhabdomyolyse

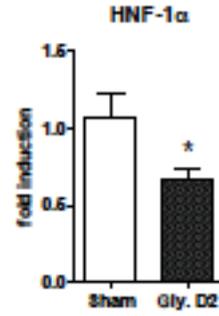
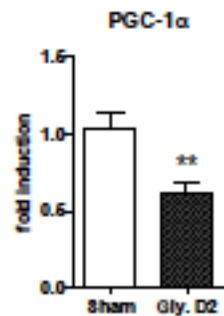
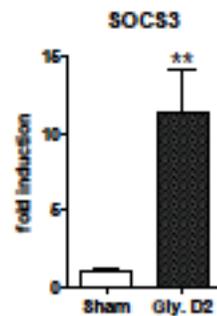
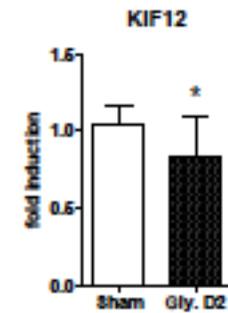
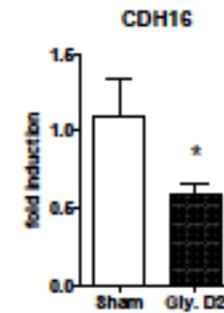
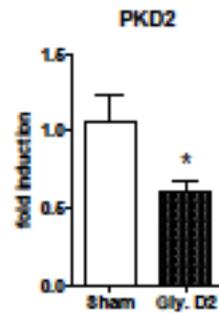
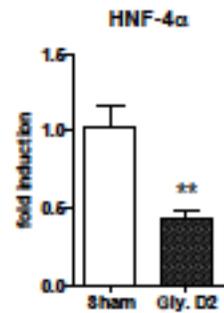
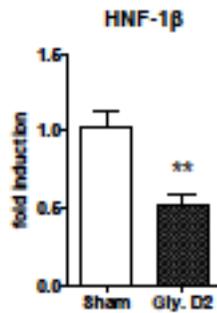


Rhabdomyolyse F4/80



Bellière *et al.* JASN 2015

Modèles murins de rhabdomyolyse



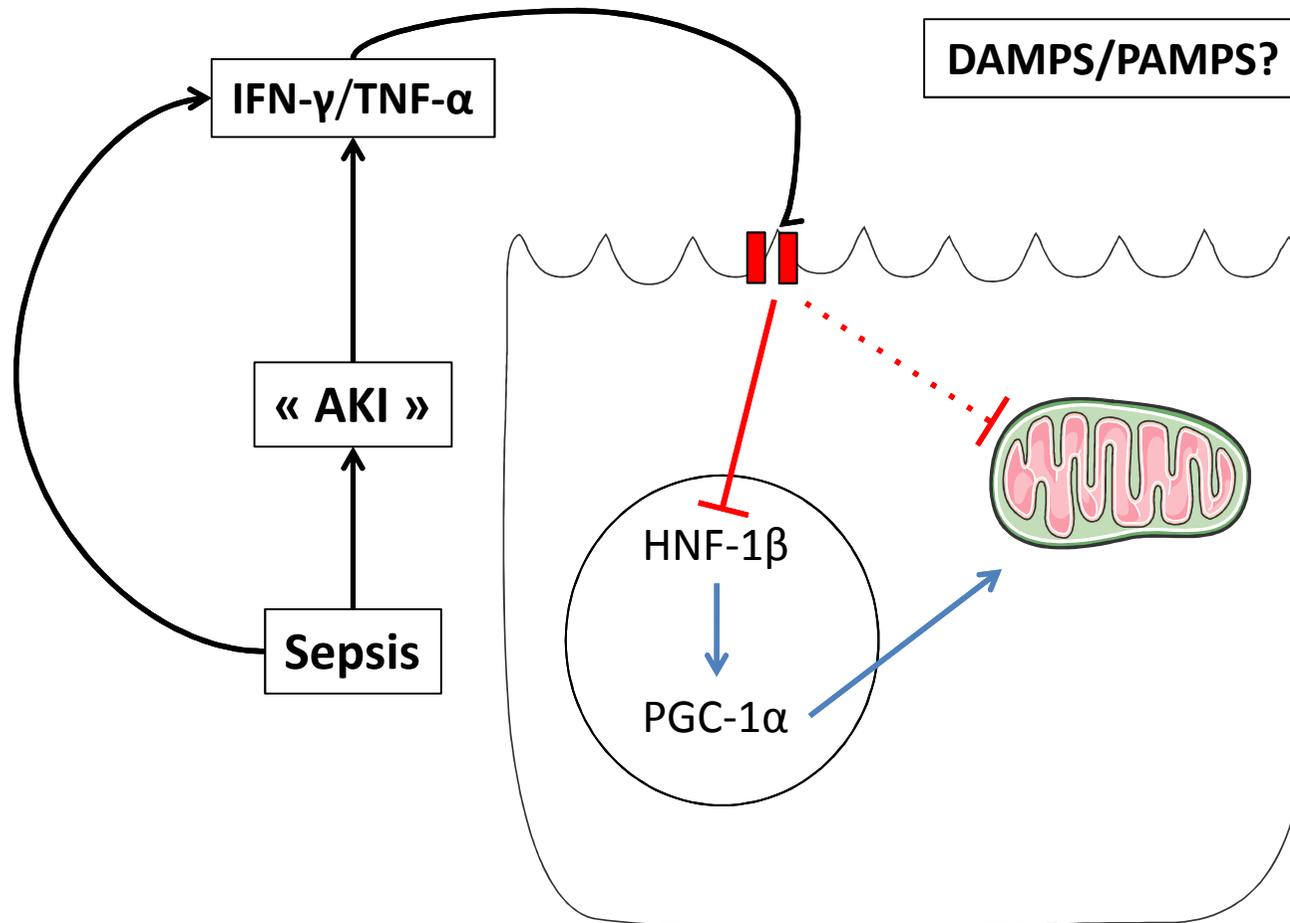
En résumé (1)

- **Au cours des AKI, en particulier septiques, on observe une inhibition de l'expression des gènes cibles du facteur de transcription HNF-1 β**
- **Cette inhibition est concomitante des phases inflammatoires caractérisées par une hyperproduction d'IFN- γ et de TNF- α**
- ***In vitro*, les modifications d'expression des gènes cibles d'HNF-1 β observée au cours des AKI sont reproduites par l'application isolée de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ et de TNF- α , ceux ci inhibant directement l'activité transcriptionnelle d'HNF-1 β**

En résumé (2)

- ***In vitro* et *in vivo*, la modulation de l'expression d'HNF-1 β induit une variation concomitante de l'expression de PGC-1 α**
- ***In vitro*, l'inhibition d'HNF-1 β est associée à des anomalies en faveur d'une majoration de l'autophagie et d'une dysfonction mitochondriale incluant une anomalie de production de ROS (H₂O₂), éléments identifiés dans la majorité des AKI observées chez l'homme et chez l'animal**

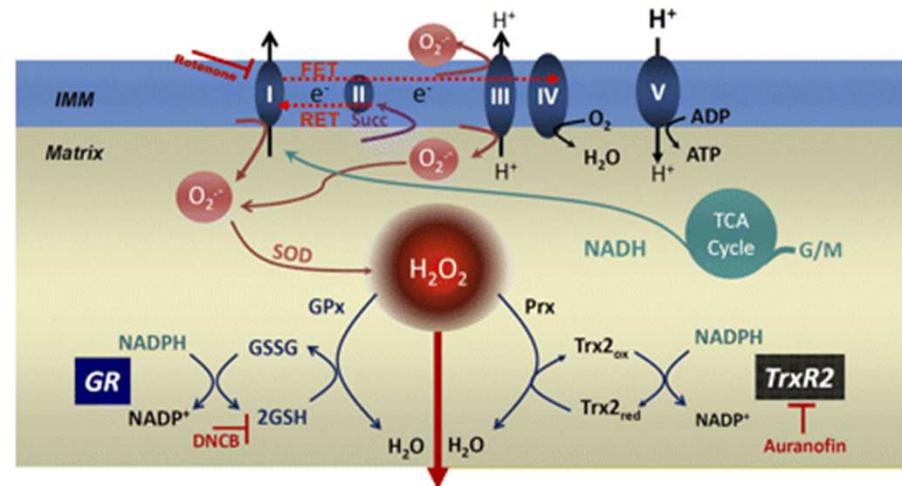
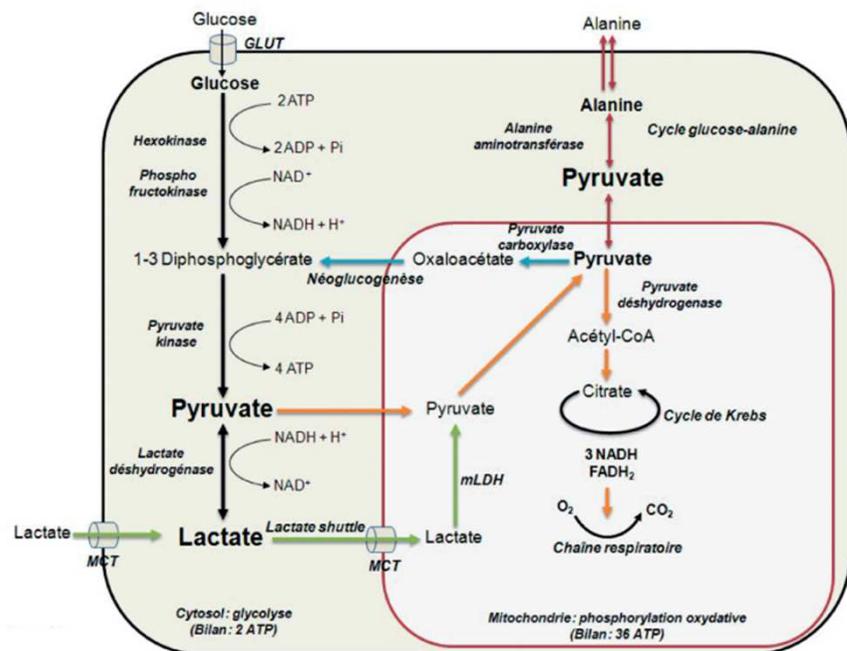
Discussion



- Dysfc mitochondriale
- Autophagie
- Dysfonction cellulaire?
- Protection cellulaire?
- \downarrow ROS (H2O2)

Perspectives

- Développement d'un modèle murin d'inactivation conditionnelle limitée au tube proximal
 - Croisement souris $Hnf1b^{Lox/Lox}$ x $Kap2-iCre^{+/+}$
 - Etat basal, AKI (LPS, Rhabdomyolyse, I/R)
 - Métabolomique urinaire et Imagerie fonctionnelle (TEP/Spectroscopie)



Perspectives

- **Développement d'un modèle murin d'invalidation conditionnelle limitée au tube proximal**
 - Croisement souris $Hnf1b^{Lox/Lox}$ x $Kap2-iCre^{+/+}$
 - Etat basal, AKI (LPS, Rhabdomyolyse, I/R)
 - Métabolomique urinaire et Imagerie fonctionnelle (TEP/Spectroscopie)
- **Approche comparative homme / modèles murins**
 - Cohorte de patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque programmée (CEC) > métabolome urinaire

Perspectives

- **Développement d'un modèle murin d'invalidation conditionnelle limitée au tube proximal**
 - Croisement souris $Hnf1b^{Lox/Lox}$ x $Kap2-iCre^{+/+}$
 - Etat basal, AKI (LPS, Rhabdomyolyse, I/R)
 - Métabolomique urinaire et Imagerie fonctionnelle (TEP/Spectroscopie)
- **Approche comparative homme / modèles murins**
 - Cohorte de patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque programmée (CEC) > métabolome urinaire
- **Rôle systémique?**
 - Expression dans les épithéliums tubulaires (pancréas, cholangiocytes, alvéoles)
 - Rôle dans le syndrome de défaillance multiviscérale?
 - Modèle d'invalidation extra-rénale et de choc septique

Remerciements

- **INSERM U1048 (I2MC, Toulouse)**
 - Audrey Casemayou, Jean-Loup Bascands, Joost Schanstra
- **Département de Néphrologie et Transplantation d'organes (Hôpital Rangueil, CHU de Toulouse)**
 - Dr Olivier Cointault (unité de réanimation)
 - Pr Dominique Chauveau, Dr Antoine Huart
- **Département d'Anesthésie et Réanimation (Hôpital Purpan, CHU de Toulouse)**
 - Dr Arnaud Mari, Dr Nicolas Mayeur
- **Institut Cochin (Paris):** Marco Pontoglio
- **University of Texas - Southwestern Medical center, (Dallas, USA):** Pr Peter Igarashi
- **Faculté Paris – Descartes, INSERM U970, HEGP (Paris):** Pr Bertrand Tavitian