



Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Médecine



ANNEE 2022

N°

TITRE DE LA THESE

**CARACTERISATION DU ROLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION
STAT5 DANS L'INSUFFISANCE RENALE AIGUE**

THESE
Présentée

A l'UFR des Sciences de Santé de Dijon
Circonscription Médecine

Et soutenue publiquement le 29 Septembre 2022

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

Par Madame Kadiatou BALDET

Née le 7 Février 1992

A Colombes (92)

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à la disposition de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur.

Ceci implique une obligation de citation et de référencement dans la rédaction de vos travaux.

D'autre part, toutes contrefaçons, plagiat, reproductions illicites encourrent une poursuite pénale.

De juridiction constante, en s'appropriant tout ou partie d'une œuvre pour l'intégrer dans son propre document, l'étudiant se rend coupable d'un délit de contrefaçon (au sens de l'article L.335.1 et suivants du code de la propriété intellectuelle). Ce délit est dès lors constitutif d'une fraude pouvant donner lieu à des poursuites pénales conformément à la loi du 23 décembre 1901 dite de répression des fraudes dans les examens et concours publics.

ANNEE 2022

N°

TITRE DE LA THESE

**CARACTERISATION DU ROLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION
STAT5 DANS L'INSUFFISANCE RENALE AIGUE**

THESE

Présentée

À l'UFR des Sciences de Santé de Dijon
Circonscription Médecine

Et soutenue publiquement le 29 Septembre 2022

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

Par Madame Kadiatou BALDET

Née le 7 Février 1992

A Colombes (92)

Année Universitaire 2022-2023
au 1^{er} Septembre 2022

Doyen :
Assesseurs :
Mme Laurence DUVILLARD

M. Marc MAYNADIÉ
M. Pablo ORTEGA-DEBALLON

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

			Discipline
M.	Jean-Louis	ALBERINI	Biophysiques et médecine nucléaire
M.	Sylvain	AUDIA	Médecine interne
M.	Marc	BARDOU	Pharmacologie clinique
M.	Jean-Noël	BASTIE	Hématologie - transfusion
M.	Emmanuel	BAULOT	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Christophe	BEDANE	Dermato-vénérologie
M.	Yannick	BEJOT	Neurologie
M.	Moncef	BERHOUMA	Neurochirurgie
Mme	Christine	BINQUET	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M.	Philippe	BONNIAUD	Pneumologie
M.	Alain	BONNIN	Parasitologie et mycologie
M.	Bernard	BONNOTTE	Immunologie
M.	Olivier	BOUCHOT	Chirurgie cardiovasculaire et thoracique
M.	Belaid	BOUHEMAD	Anesthésiologie - réanimation chirurgicale
M.	Benjamin	BOUILLET	Endocrinologie
M.	Alexis	BOZORG-GRAYELI	Oto-Rhino-Laryngologie
Mme	Marie-Claude	BRINDISI	Nutrition
M.	Alain	BRON	Ophthalmologie
Mme	Mary	CALLANAN (WILSON)	Hématologie type biologique
M.	Patrick	CALLIER	Génétique
Mme	Catherine	CHAMARD-NEUWIRTH	Bactériologie - virologie; hygiène hospitalière
M.	Pierre-Emmanuel	CHARLES	Réanimation
M.	Jean-Christophe	CHAUVET-GELINIER	Psychiatrie d'adultes, Addictologie
M.	Nicolas	CHEYNEL	Anatomie
M.	Alexandre	COCHET	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Luc	CORMIER	Urologie
M.	Yves	COTTIN	Cardiologie
M.	Charles	COUTANT	Gynécologie-obstétrique
Mme	Catherine	CREUZOT-GARCHER	Ophthalmologie
M.	Frédéric	DALLE	Parasitologie et mycologie
M.	Alexis	DE ROUGEMONT	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
M.	Hervé	DEVILLIERS	Médecine interne
Mme	Laurence	DUVILLARD	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Olivier	FACY	Chirurgie générale
Mme	Laurence	FAIVRE-OLIVIER	Génétique médicale
Mme	Patricia	FAUQUE	Biologie et Médecine du Développement
Mme	Irène	FRANCOIS-PURSELL	Médecine légale et droit de la santé
Mme	Marjolaine	GEORGES	Pneumologie
M.	François	GHIRINGHELLI	Cancérologie
M.	Charles	GUENANCIA	Physiologie
M.	Pierre Grégoire	GUINOT	Anesthésiologie – réanimation chirurgicale
M.	Frédéric	HUET	Pédiatrie
Mme	Agnès	JACQUIN	Physiologie
M.	Pierre	JOUANNY	Gériatrie
M.	Philippe	KADHEL	Gynécologie-obstétrique
M.	Sylvain	LADOIRE	Histologie
M.	Gabriel	LAURENT	Cardiologie

M.	Côme	LEPAGE	Hépto-gastroentérologie
M.	Romarc	LOFFROY	Radiologie et imagerie médicale
M.	Luc	LORGIS	Cardiologie
M.	Jean-Francis	MAILLEFERT	Rhumatologie
M.	Cyriaque Patrick	MANCKOUNDIA	Gériatrie
M.	Sylvain	MANFREDI	Hépto-gastroentérologie
M.	Laurent	MARTIN	Anatomie et cytologie pathologiques
M.	David	MASSON	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Marc	MAYNADIÉ	Hématologie – transfusion
M.	Marco	MIDULLA	Radiologie et imagerie médicale
M.	Thibault	MOREAU	Neurologie
Mme	Christiane	MOUSSON	Néphrologie
M.	Paul	ORNETTI	Rhumatologie
M.	Pablo	ORTEGA-DEBALLON	Chirurgie Générale
M.	Pierre Benoit	PAGES	Chirurgie thoracique et vasculaire
M.	Jean-Michel	PETIT	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Christophe	PHILIPPE	Génétique
M.	Lionel	PIROTH	Maladies infectieuses
Mme	Catherine	QUANTIN	Biostatistiques, informatique médicale
M.	Jean-Pierre	QUENOT	Réanimation
M.	Patrick	RAT	Chirurgie générale
M.	Patrick	RAY	Médecine d'urgence
M.	Jean-Michel	REBIBOU	Néphrologie
M.	Frédéric	RICOLFI	Radiologie et imagerie médicale
M.	Paul	SAGOT	Gynécologie-obstétrique
			(Retraite au 1 ^{er} Novembre 2022)
M	Maxime	SAMSON	Médecine interne
M.	Emmanuel	SAPIN	Chirurgie Infantile
M.	Emmanuel	SIMON	Gynécologie-obstétrique
M.	Éric	STEINMETZ	Chirurgie vasculaire
Mme	Christel	THAUVIN	Génétique
M.	Benoit	TROJAK	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
M.	Gilles	TRUC	Oncologie-Radiothérapie
M.	Pierre	VABRES	Dermato-vénérologie
			(Mission temporaire à Londres du 01/09/2021 au 31/08/2023)
M.	Bruno	VERGÈS	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Narcisse	ZWETYENGA	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

PROFESSEURS EMERITES

M.	Laurent	BEDENNE	(01/09/2021 au 31/08/2024)
M.	Jean-François	BESANCENOT	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	Bernard	BONIN	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	Laurent	BRONDEL	(01/09/2021 au 31/08/2024)
M.	François	BRUNOTTE	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	Philippe	CAMUS	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Jean-Marie	CASILLAS-GIL	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	Pascal	CHAVANET	(01/09/2021 au 31/08/2024)
M.	Jean-Pierre	DIDIER	(01/11/2021 au 31/10/2024)
M.	Serge	DOUVIER	(15/12/2020 au 14/12/2023)
M.	Maurice	GIROUD	(01/09/2022 au 31/12/2025)
M.	Henri-Jacques	SMOLIK	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Pierre	TROUILLOUD	(01/09/2020 au 31/08/2023)

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES
PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES MEDICALES**

			Discipline Universitaire
Mme	Lucie	AMOUREUX BOYER	Bactériologie
Mme	Julie	BARBERET	Biologie et médecine du développement et de la reproduction- gynécologie médicale
Mme	Louise	BASMACIYAN	Parasitologie-mycologie
Mme	Shaliha	BECHOUA	Biologie et médecine du développement
(Disponibilité)			
M.	Guillaume	BELTRAMO	Pneumologie
M.	Mathieu	BLOT	Maladies infectieuses
Mme	Marie-Lorraine	CHRETIEN	Hématologie
Mme	Vanessa	COTTET	Nutrition
M.	Damien	DENIMAL	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Valentin	DERANGERE	Histologie
Mme	Ségolène	GAMBERT	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Françoise	GOIRAND	Pharmacologie fondamentale
M.	David	GUILLIER	Anatomie, chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brulologie
M.	Alain	LALANDE	Biophysique et médecine nucléaire
Mme	Stéphanie	LEMAIRE-EWING	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Anne-Sophie	MARIET	Biostatistiques, informatique médicale
M.	Pierre	MARTZ	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Thomas	MOUILLOT	Physiologie
M.	Alain	PUTOT	Gériatrie
(Disponibilité pour convenances personnelles)			
Mme	Claire	TINEL	Néphrologie
M.	Antonio	VITOBELLO	Génétique
M.	Paul-Mickaël	WALKER	Biophysique et médecine nucléaire

PROFESSEUR ASSOCIE DES DISCIPLINES MEDICALES

M.	Ludwig Serge	AHO GLELE	Hygiène hospitalière
M.	Victorin	AHOSSI	Odontologie
M.	Jacques	BEURAIN	Neurochirurgie
M.	Jean-Michel	PINOIT	Pédopsychiatrie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme	Katia	MAZALOVIC	Médecine Générale
Mme	Claire	ZABAWA	Médecine Générale

PROFESSEURS ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Clément	CHARRA	Médecine Générale
M.	Arnaud	GOUGET	Médecine Générale
M.	François	MORLON	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Jérôme	BEAUGRAND	Médecine Générale
Mme	Anne	COMBERNOUX -WALDNER	Médecine Générale
M.	Benoît	DAUTRICHE	Médecine Générale
M.	Alexandre	DELESVAUX	Médecine Générale
M.	Rémi	DURAND	Médecine Générale

M. Olivier MAIZIERES Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Anaïs CARNET Anglais
Mme Catherine LEJEUNE Pôle Epidémiologie
M. Gaëtan JEGO Biologie Cellulaire

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme Marianne ZELLER Physiologie

PROFESSEURS AGREGES de L'ENSEIGNEMENT SECONDAIRE

Mme Marceline EVRARD Anglais
Mme Lucie MAILLARD Anglais

PROFESSEUR CERTIFIE

M. Philippe DE LA GRANGE Anglais

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

M. Mathieu BOULIN Pharmacie clinique
M. François GIRODON Sciences biologiques, fondamentales et cliniques
Mme Evelyne KOHLI Immunologie
M. Antonin SCHMITT Pharmacologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Amélie CRANSAC Pharmacie clinique
M. Philippe FAGNONI Pharmacie clinique
M. Marc SAUTOUR Botanique et cryptogamie

L'UFR des Sciences de Santé de Dijon, Circonscription Médecine, déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

COMPOSITION DU JURY

Président :

Professeur Jean-Michel REBIBOU

Professeur des Universités- Praticien Hospitalier, Chef de service
Service de Néphrologie, CHU Dijon Bourgogne

Membres :

Professeur Jean-Noël BASTIE

Professeur des Universités- Praticien Hospitalier
Service d'Hématologie, CHU Dijon Bourgogne

Docteur Yosu LUQUE, Directeur de thèse

Maitre de Conférence Universitaire- Praticien Hospitalier
Service de Soins Intensifs et Rein Aigu, Hôpital Tenon, Paris

Docteur Claire TINEL

Maitre de Conférence Universitaire- Praticien Hospitalier
Service de Néphrologie, CHU Dijon Bourgogne

Docteur Juliette HADCHOUEL

Directeur de recherche
Unité INSERM 1155, Hôpital Tenon, Paris

SERMENT D'HIPPOCRATE

"Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque."

REMERCIEMENTS

Au Professeur Jean-Michel Rebibou

Vous avez accepté de faire partie de mon jury de thèse et je vous en remercie. Merci pour votre enseignement, votre encadrement et vos précieux conseils dispensés au cours de ces quatre années d'internat.

Au Docteur Yosu Luque

Je suis honorée que tu es accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant que président du jury, merci d'y avoir accordé du temps. Merci pour ton encadrement au cours de mon master 2 et lors de la préparation de cette thèse.

Au Docteur Juliette Hadchouel

Tu as accepté de faire partie de mon jury de thèse et je t'en remercie. Je tiens à te remercier très chaleureusement pour ton encadrement irréprochable pendant mon année de Master 2. Ta rigueur et ton dynamisme ont rendu mon stage extrêmement enrichissant et formateur.

Au Professeur Jean-Noël Bastie

Vous avez accepté de faire partie de mon jury de thèse et je vous en remercie. Merci pour votre encadrement et votre bienveillance. Même si nous avons peu travaillé ensemble, je garde un excellent souvenir de mon semestre d'hématologie à votre contact.

Au Docteur Claire Tinel

Tu as accepté de faire partie de mon jury de thèse et je t'en remercie. Merci pour tes enseignements et ton énergie dans le service. Ta disponibilité et ta bienveillance permet à chaque fois de nous transmettre une nouvelle connaissance.

A l'équipe du laboratoire INSERM 1155 de Tenon

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail, en particulier Aissata, Cyril, Tiffany, Sophie, Souhila, Liliane, Lilia, et Sandrine. Sans vous, cela n'aurait pas été possible ! Vous avez tous contribué à faire de mon stage de Master 2 un souvenir formidable.

A l'équipe de Néphrologie du CHU de Dijon :

Je tiens à remercier chaleureusement les Docteurs Gilbert Zanetta, Samir Boudjeltia, Mathieu Legendre, Pierre-Henri Bonnot, Elise Maréchal, Emmanuelle Kohler, Zara Soltani, Nabil Majbri et Quentin Bernard. J'ai réalisé avec vous mes premiers pas. Merci pour votre patience, de m'avoir transmis les règles et réflexes exigés. Tous, par vos conseils, votre implication et votre expérience m'avez permis de développer mes compétences et ma confiance au fil des semestres. Un grand merci à vous pour ces moments partagés.

Merci aux secrétaires Isabelle, Marielle et Ariane pour leur gentillesse et leur efficacité. Merci à Sabine, notre super diététicienne, pour ton implication et les moments partagés en dehors du service. Merci à toute l'équipe de soignants du service, c'est un plaisir de travailler au quotidien avec une équipe aussi sympa.

A l'équipe de Néphrologie de Chalon-sur-Saône : J'adresse mes remerciements chaleureux aux Docteurs Philippe Dubot, Ayman Abokasem, Magali Louis, Julien Journet, Adel Sahar, Jamal Yazji et Abdelkader Bemrah pour m'avoir encadré lors de mon premier stage.

A l'équipe d'Hématologie du CHU de Dijon : J'ai réalisé dans votre service mon premier stage de CHU, et ce fut l'un des plus marquants de mon internat. J'adresse mes remerciements aux Docteurs Denis Caillot, Ingrid Lafon, Marie-Lorraine Chrétien, Cédric Rossi, Camille Favennec et René-Olivier Casasnovas. Je garde de vous tous le souvenir de médecins dévoués, au service du patient.

A l'équipe de Médecine Interne 2 du CHU de Dijon : J'adresse mes remerciements chaleureux aux Docteurs Géraldine Muller, Romain Bouvet, Alin Turcu, Philippe Bielefed, ainsi qu'aux Professeurs Devilliers et Besancenot, qui m'ont permis de m'initier à la médecine interne dans la bonne humeur.

A l'équipe de Réanimation d'Auxerre :

Je tiens à remercier chaleureusement les Docteurs René-Gilles Patrigeon, Cyrille Edé et Jean-Charles Morawski. J'ai vécu avec vous la première vague du COVID19. Ce fut un moment stressant, mais également très stimulant, et certainement une des périodes les plus formatrices de ma vie d'interne. Un grand merci à vous pour votre patience et votre enseignement.

A l'équipe du service de Soins Intensifs Néphrologiques de Tenon : un immense merci aux Professeur Eric Rondeau, Laurent Mesnard et Hélène Francois, ainsi qu'au Dr Alice Doreille, Camille Petit-Hoang, Cédric Rafat et Hugo Garcia. Vous êtes une équipe formidable, et j'ai adoré travailler à votre contact.

Aux co-internes rencontrés pendant mon parcours : Un grand merci à ma team de co-internes de choc d'hématologie, Andréa, Amandine, Steeve et Philippine : vous m'avez aidé à tenir le cap ! A mes co-internes de Médecine 2 Amélie, Najib, Abdès, Guillaume et Inès pour la bonne ambiance en salle et les apéros bière; A la team de réanimation d'Auxerre Anouck, Elodie, Florian, Tiphaine, Claire et Héloïse : on s'est épaulé pendant ce semestre, et j'en garde un super souvenir ; A la team de l'internat d'Auxerre qui m'a permis de vivre entre 2 gardes un confinement des plus festifs; mention spéciale à Ambre et Elise, pour ces bonnes soirées « sans conséquences» passées ensemble ; A Catherine, pour tous les bons moments passés ensemble depuis le tout premier jour d'internat ! A ma team de co-internes de choc de Tenon : Marie-Camille Lafargue, David de Saint-Gilles, Hugo Toth, Hadrien de Burhen, Sofiane Saly, Giulio : un semestre riche en événements ; je vous souhaite le meilleur ! Et bien sûr mention spéciale à ma team de co-internes de Néphrologie, de spécialité ou de «passage » : Amélie (mention spéciale à ma partenaire numéro 1!), Imane, Léa, Coline, Mélanie, Jean, Mehdi, Jean-Charles, Charline, Jean, Loïc, Hadrien, Alexandra, Romain et tous les autres !

A ma famille adorée

A mes chers parents : vous avez toujours cru en moi et vous m'avez toujours poussé à donner le meilleur de moi-même. Je vous remercie infiniment pour toute l'aide que vous m'avez apporté depuis toujours. Ce succès est le vôtre.

A ma sœur et mon frère : merci pour votre soutien inconditionnel pendant toutes ces années, vous êtes géniaux !

A mes 2 petits neveux adorés Laurène et Edouard, la relève est arrivée !

A toutes mes cousines, qui de loin m'ont toujours soutenues toutes ces années.

A Yannis, le destin a voulu qu'on se rencontre sur les bancs du CUEN, c'était un signe !

Merci pour ces moments partagés et ton soutien. J'espère avoir encore de longues années à passer à tes côtés.

A Mehdi, Zina et Jean-Paul, vous êtes top !

A mes amis de la faculté de médecine Lyon Est

De la 2^{ème} année jusqu'à la préparation aux ECN, vous étiez littéralement ma 2^{ème} famille, et clairement ça n'aurait pas été pareil sans vous !

A Anne-Claire et Benjamin, mes meilleurs amis, je ne compte plus les soirées passées à discuter et refaire le monde. A Aissatou, ma partenaire Erasmus, on a fait connaissance autour d'un fameux voyage à Prague, et depuis on ne s'est plus lâché ! Merci pour ta générosité et ton dynamisme inégalable. A Shivani, merci tous les moments partagés !!

A Victor, Clément, Thomas P, Thomas D, Célia, François-Louis, Alexis, et tous les autres. Que ce soit lors d'une pause-café à la fac, lors d'un débat enflammé au self d'Edouard Herriot ou lors d'une soirée, vous avez tous contribué à faire de mes « années fac » un super souvenir.

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	16
1. Généralités sur l'insuffisance rénale.....	16
a. Définitions	16
b. Epidémiologie de l'insuffisance rénale aiguë.....	18
2. L'ischémie-reperfusion rénale.....	20
3. La voie de signalisation IL15- γ C-STAT5	22
a. Présentation de la voie JAK-STAT	22
b. La chaîne gamma commune (γ C) aux récepteurs aux interleukines	24
c. Rôle de la chaîne γ C dans les podocytes.....	24
d. Naissance d'un intérêt pour STAT5	26
e. Rôle protecteur de STAT5 dans le tubule	27
4. L'autophagie	27
a. Généralités sur l'autophagie	27
b. Rôle de l'autophagie dans le rein	29
c. Autophagie et STAT5	29
5. Objectifs de travail.....	30
II. MATERIELS ET METHODES	31
1. Animaux	31
2. Génotypage	32
3. Extraction de l'ARN et RT-PCR.....	33
4. Ischémie-Reperfusion	34
5. Sacrifice et fonction rénale	35
6. Culture cellulaire et étude de l'activité autophagique	36
7. Extraction protéique	37

8. Western blot.....	37
9. Coloration au Periodic Acid Schiff et score d'atteinte tubulaire.....	38
10. Cytométrie en flux	39
11. Immunofluorescence	39
12. Analyse Statistique.....	40
III. RESULTATS	41
1. Les conséquences de l'ischémie-reperfusion sont identiques dans les deux groupes de souris.....	41
2. L'expression de Stat5 sur extrait de rein total semble identique dans les deux groupes.....	45
3. <i>STAT5B</i> semble stimuler la prolifération des cellules HEK293.....	49
4. <i>STAT5B</i> semble stimuler l'autophagie dans les cellules HEK293.	52
IV. DISCUSSION	54
V. CONCLUSIONS SIGNEES.....	60
VI. BIBLIOGRAPHIE	61

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURE 1 : Anatomie du néphron sain.....	18
FIGURE 2 : Atteintes tubulaires et endothéliales induites par l'ischémie-reperfusion.....	21
FIGURE 3 : La voie de signalisation JAK-STAT dans les cellules immunitaires.....	23
FIGURE 4 : Représentation schématique des récepteurs aux interleukines.....	24
FIGURE 5 : Activation de la chaîne γ C dans les podocytes humains lors de la glomérulonéphrite à croissants.....	25
FIGURE 6 : Représentation schématique des différentes étapes de l'autophagie	28
FIGURE 7 : Représentation schématique du modèle murin.....	32
FIGURE 8 : Anatomie du hile rénal	34
FIGURE 9 : Coupes de rein contrôle et après ischémie-reperfusion	35
FIGURE 10 : Etapes du protocole d'étude.....	41
FIGURE 11 : Conséquences de l'ischémie-reperfusion après un clampage de 30 minutes.....	42
FIGURE 12 : Conséquences de l'ischémie-reperfusion après un clampage de 25 minutes.....	44
FIGURE 13 : L'expression du facteur de transcription Stat5 est équivalente chez les souris des deux groupes.....	46
FIGURE 14 : Les souris des deux groupes sont porteuses de l'allèle <i>Stat5^{lox}</i> et des transgènes <i>Pax8-rtTA</i> et <i>LC1</i>	47
FIGURE 15 : Le transcrit de la recombinase Cre semble présent dans les groupes de souris recevant ou non de la doxycycline.....	48
FIGURE 16 : Existence d'une contamination des échantillons d'ARN	49
FIGURE 17 : Observation des cellules HEK <i>STAT5B^{+/+}</i> et <i>STAT5B^{-/-}</i> en microscopie optique.....	50
FIGURE 18 : <i>STAT5B</i> semble stimuler la prolifération des cellules HEK293.....	51
FIGURE 19 : Conséquences de l'administration d'interleukine 15 sur l'autophagie.....	53
FIGURE 20 : Conséquences de l'administration d'interleukine 15 sur la régulation de l'autophagie.....	58
TABLEAU I. Amorces utilisées pour le génotypage	33
TABLEAU II : Anticorps primaires utilisés pour les western-blots.....	38

ABBREVIATIONS

- ADPKD : Polykystose Rénale Autosomique Dominante
- ATG : Autophagy Related Gene
- ARN : Acide Ribonucléique
- BRDU : Bromodésoxyuridine
- Chaîne γ C : Chaîne gamma Commune
- CRISPER: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- Cas9 : CRISPER Associated Protein 9
- CQ : Chloroquine
- C57BL/6 : C57 Black 6
- DMEM : Eagle's Minimal Essential Medium
- EBSS : Earle's Balanced Salt Solution
- EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
- GAPDH : Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
- HEK 293 : Human Embryonic Kidney 293
- HSC70 : Heat Shock Cognate 71
- IL : Interleukine
- IRA : Insuffisance Rénale Aiguë
- IRC : Insuffisance Rénale Chronique
- IR : Ischémie-Reperfusion
- JAK : Janus Kinase
- LC3 : Light Chain Protein 3
- NTA : Nécrose Tubulaire Aiguë
- MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1
- PAS : Periodic Acid Schiff
- PBS : Phosphate-Buffered Saline
- PCR : Polymerase Chained Reaction
- rtTA : Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation
- RT : Retro-Transcriptase
- STAT: Signal transducers and Activators of Transcription
- TBS : Tris-Buffered Saline
- VIH : Virus d'Immunodéficience Humaine

I. INTRODUCTION

1. Généralités sur l'insuffisance rénale

a. Définitions

L'insuffisance rénale correspond à une diminution des capacités d'épuration du rein. La Haute Autorité de Santé estime que 7 à 10 % de la population française présente une atteinte rénale (1).

La maladie rénale chronique se définit par la présence, pendant plus de 3 mois, de marqueurs d'atteinte rénale, et/ou d'une insuffisance rénale chronique (2). Les marqueurs d'atteinte rénale peuvent être morphologiques -tels que des reins de petite taille- ou biologiques, comme la présence d'une hématurie, d'une protéinurie ou d'une leucocyturie. De nombreuses maladies peuvent mener à la maladie rénale chronique, telles que l'hypertension, le diabète et les glomérulopathies.

L'insuffisance rénale chronique (IRC) se définit par une altération progressive et irréversible du débit de filtration glomérulaire inférieure à 60ml/min/1,73m² (2). Elle résulte d'un déséquilibre entre le potentiel néphronique, c'est-à-dire le nombre de néphrons fonctionnels à la naissance, et la somme des destructions néphroniques, c'est-à-dire le vieillissement rénal, les maladies rénales et les facteurs associés à la progression de l'IRC.

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) se définit, quant à elle, par une élévation de la créatininémie (supérieure à 26,5 µM en 48 heures ou supérieure à 1,5 fois la valeur de base au cours des 7 derniers jours) et/ou une baisse de la diurèse (inférieure à 0,5 ml/kg/h en 6 heures) selon les critères KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*) de 2012 (3). Il en résulte une perturbation de la balance hydroélectrolytique, pouvant mener à une hyperkaliémie, une acidose ou une hypervolémie aiguës mettant en jeu le pronostic vital du patient. Ceci est particulièrement observé dans de nombreux pays où l'accès à la dialyse est limité.

On distingue trois types d'insuffisance rénale aiguë : fonctionnelle lorsqu'elle est liée à une baisse de la perfusion rénale, obstructive lorsqu'elle est liée à un blocage d'aval du flux urinaire et parenchymateuse lorsqu'elle est liée à une atteinte intrinsèque du parenchyme rénal.

Les insuffisances rénales aiguës parenchymateuses sont dues à des lésions des différents compartiments du rein : glomérulaire, tubulaire, interstitiel ou vasculaire (**FIGURE 1**). Le

glomérule est une masse sphérique de capillaires, dont le sang est apporté par une artériole afférente et drainé par une artériole efférente. La barrière de filtration glomérulaire est composée de trois couches : les cellules endothéliales glomérulaires, la membrane basale glomérulaire et les podocytes. Les podocytes sont des cellules épithéliales situées sur le versant externe de la membrane basale des capillaires glomérulaires et permettant la filtration du sang. L'endothélium est fenestré afin de permettre une perméabilité sélective et la filtration (4). Les cellules mésangiales forment un échafaudage central sur lequel les cellules de la micro-vascularisation reposent.

L'atteinte parenchymateuse aiguë la plus fréquente est la nécrose tubulaire aiguë (NTA), qui correspond à des lésions épithéliales majoritairement du tubule contourné proximal, principalement de cause hypoxique ou toxique (5).

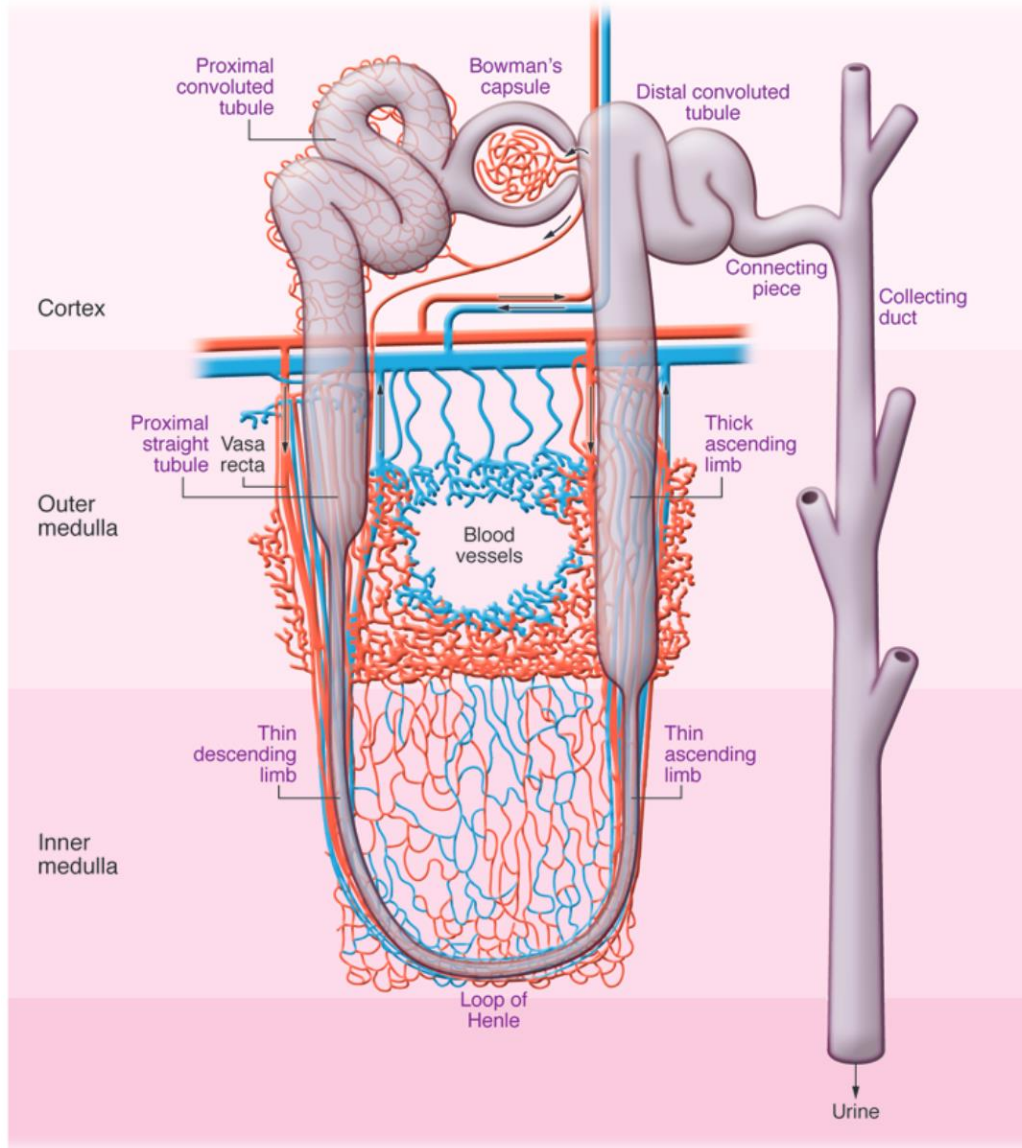


FIGURE 1 : Anatomie du néphron sain avec identification des différentes régions.

La microcirculation artérielle est représentée en rouge ; la microcirculation veineuse en bleu. D'après Bonventre et al, *The Journal of Clinical Investigation* (6).

b. Epidémiologie de l'insuffisance rénale aiguë

De nombreuses études fournissent des données épidémiologiques sur l'insuffisance rénale aiguë. Il existe cependant une importante variabilité d'une étude à l'autre, liée à la définition de l'IRA. En effet, jusqu'en 2012, il n'y avait pas de définition unifiée de l'IRA, rendant les études disparates et difficilement comparables (7). La constante observée est cependant que l'insuffisance rénale aiguë demeure un enjeu de santé publique, car elle reste associée à un fardeau important en termes de morbidité et de mortalité.

La mortalité hospitalière associée à l'insuffisance rénale aiguë a diminué au cours des deux dernières décennies, grâce aux progrès réalisés dans les techniques d'épuration extra-rénale (8).

Néanmoins, la prévalence de l'IRA est en augmentation, pour diverses raisons : vieillissement de la population ; généralisation de la prise de traitements néphrotoxiques comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens ; réalisation de procédures diagnostiques ou thérapeutiques à risque – telles que l'administration de chimiothérapies néphrotoxiques ou les coronarographies – chez des patients plus âgés et comorbides (9).

Elle survient ainsi chez approximativement 20% des patients hospitalisés et 50% des patients en soins intensifs. Elle augmente la durée d'hospitalisation des patients survivants d'autant plus qu'elle est sévère (10).

De plus, l'insuffisance rénale aiguë constitue un facteur de risque indépendant de décès chez les patients hospitalisés, notamment en unités de soins intensifs. Le risque de décès est ainsi augmenté de 23% par rapport aux patients indemnes d'IRA (11).

Enfin, l'insuffisance rénale aiguë constitue un facteur de risque indépendant de maladie rénale chronique (12). En effet, alors que l'on pensait auparavant que l'insuffisance rénale aiguë ne laissait aucune séquelle, il est maintenant bien établi qu'il existe un continuum entre l'IRA et l'IRC. Il est estimé que 20% des patients ne retrouvent pas leur fonction rénale antérieure à la suite d'une IRA (8). Une large étude de registre nord-américaine montre que la survenue d'une insuffisance rénale aiguë multiplie par 28 le risque de développer une maladie rénale de stade 4 ou 5, chez des patients dont le débit de filtration glomérulaire de base est supérieur à 45 ml/min (13).

Le risque est alors l'évolution vers une insuffisance rénale terminale, dont la survie dépend de thérapies coûteuses avec un fort impact sur la qualité de vie des patients, telles que la dialyse (> 60 000€/an et par patient) ou la transplantation rénale (> 15 000€/an et par patient) (14). La dialyse reste par ailleurs associée à une mortalité élevée (15). Les conséquences de l'insuffisance rénale terminale sont d'autant plus dévastatrices dans les pays ayant un accès limité à la dialyse et la transplantation rénale.

Il est donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques issues de pistes de recherche innovantes dans le domaine de l'insuffisance rénale aiguë.

2. L'ischémie-reperfusion rénale

L'ischémie-reperfusion (IR) représente une cause fréquente de nécrose tubulaire aiguë. Elle survient dans de nombreuses situations, par exemple lors d'un état de choc, d'une transplantation rénale ou d'une chirurgie cardiaque avec circulation extra-corporelle. Le tubule proximal est principalement concerné par la nécrose tubulaire car la consommation d'oxygène y est importante ; il est donc particulièrement sensible à l'hypoxie (6).

Les lésions sont initiées par une hypoxie liée à l'hypoperfusion rénale et maintenues par une revascularisation incomplète. Des études ont en effet montré que la reperfusion post-ischémie n'atteint que 40 à 50% du taux de perfusion normal chez l'Homme ainsi que dans des modèles expérimentaux (16).

L'une des premières conséquences de l'ischémie-reperfusion rénale est l'altération de la structure tubulaire, notamment à la jonction cortico-médullaire. Plusieurs lésions sont observées : une dilatation des tubules, une perte de la bordure en brosse et des jonctions inter-cellulaires et une altération de la viabilité cellulaire (**FIGURE 2**). Certaines cellules lésées se détachent et forment des « casts » dans la lumière du néphron. En obstruant le tubule, ces « casts » provoquent une augmentation de la pression intra-tubulaire, contribuant ainsi à la diminution du débit de filtration glomérulaire (6).

L'absence de reprise d'un débit sanguin normal après ischémie pourrait être due à une baisse de production du monoxyde d'azote et une augmentation de l'expression de l'endothéline, favorisant ainsi la vasoconstriction. Cette dernière entraîne une diminution du flux sanguin rénal, ce qui conduit à la stimulation des voies en aval de l'angiotensine II, contribuant ainsi à renforcer la vasoconstriction (16).

L'hypoxie perturbe le métabolisme des cellules tubulaires, contribuant à la génération de dérivés réactifs de l'oxygène. L'IR est également responsable d'une dysfonction endothéliale. En effet, elle perturbe l'interaction entre les cellules endothéliales et augmente la perméabilité microvasculaire. Par ailleurs, l'ischémie-reperfusion induit une augmentation de l'expression endothéliale des molécules d'adhésion ainsi que la sécrétion de cytokines pro-

inflammatoires, comme la monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Ces facteurs, sécrétés aussi par les cellules tubulaires, entraînent une infiltration de neutrophiles polynucléaires, premières cellules immunitaires à s'accumuler dans le rein dans les 24 heures qui suivent l'ischémie. Ensuite, les macrophages s'accumulent en réponse à la sécrétion de MCP-1 par les cellules tubulaires puis enfin les lymphocytes T.

À la suite de cette agression, la réparation du tissu implique une prolifération des cellules tubulaires rénales (17). Si la balance entre signaux pro-inflammatoires et anti-inflammatoires est déséquilibrée, cette réparation peut être pathologique et mener à la fibrose d'une zone du parenchyme rénal, conduisant ainsi au risque de développer une insuffisance rénale chronique.

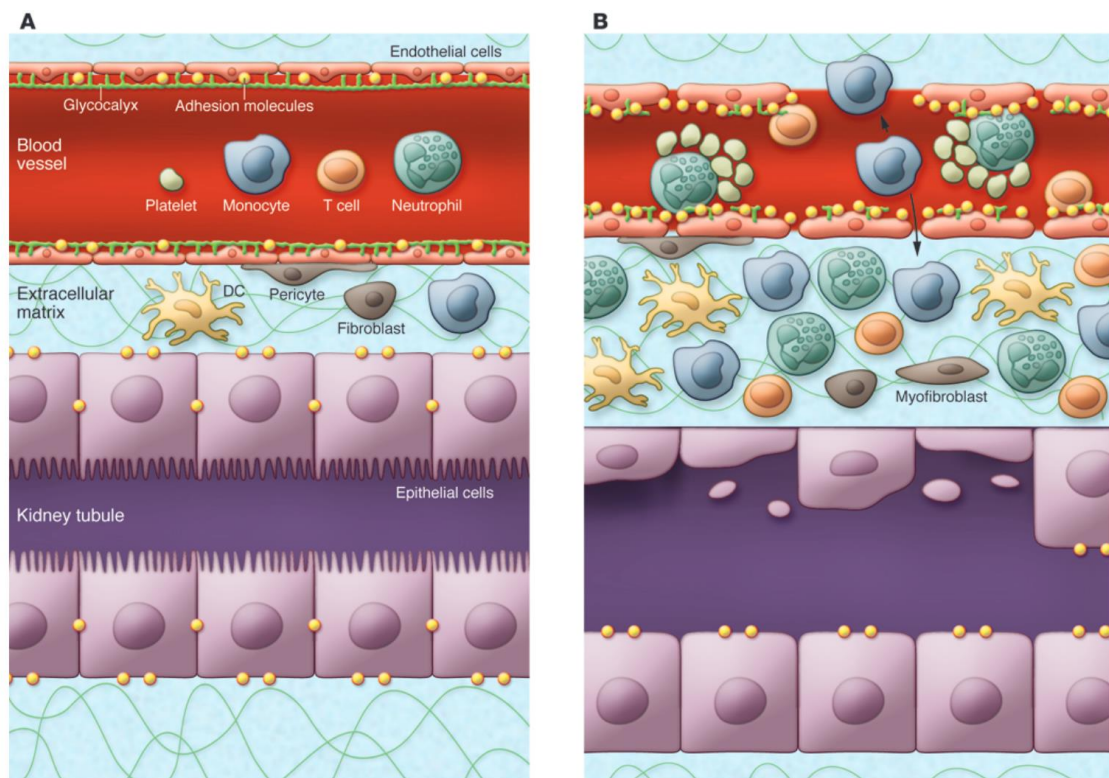


FIGURE 2 : Atteintes tubulaires et endothéliales induites par l'ischémie-reperfusion.

(A) Epithélium tubulaire et endothélium sains. (B) Lésions induites après l'ischémie-reperfusion. D'après Bonventre et al, *The Journal of Clinical Investigation* (6).

3. La voie de signalisation IL15- γ C-STAT5

a. Présentation de la voie JAK-STAT

La voie JAK-STAT est un système de transduction du signal présent dans différents types cellulaires. Son activation déclenche une cascade de phosphorylations permettant la régulation de l'expression de gènes impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires et immunitaires telles que la prolifération, la différenciation, la migration, la survie ou l'apoptose cellulaires (18).

Les protéines STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) sont des facteurs de transcription, agissant comme inhibiteurs ou activateurs de l'expression d'un gène. Les protéines JAK (*Janus Kinase*) sont des protéines kinases, qui permettent la phosphorylation d'un résidu tyrosine. Chez les mammifères, on dénombre actuellement 4 protéines JAK (JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2) et 7 protéines STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6) (18).

L'initiation du signal passe par la liaison de cytokines à leurs récepteurs membranaires, permettant l'activation des protéines JAK, induisant alors l'activation par phosphorylation des protéines STAT cytoplasmiques. Les protéines STAT ainsi activées forment des dimères, qui transloquent dans le noyau et exercent leur action de stimulation de transcription de gènes cibles spécifiques (**FIGURE 3**).

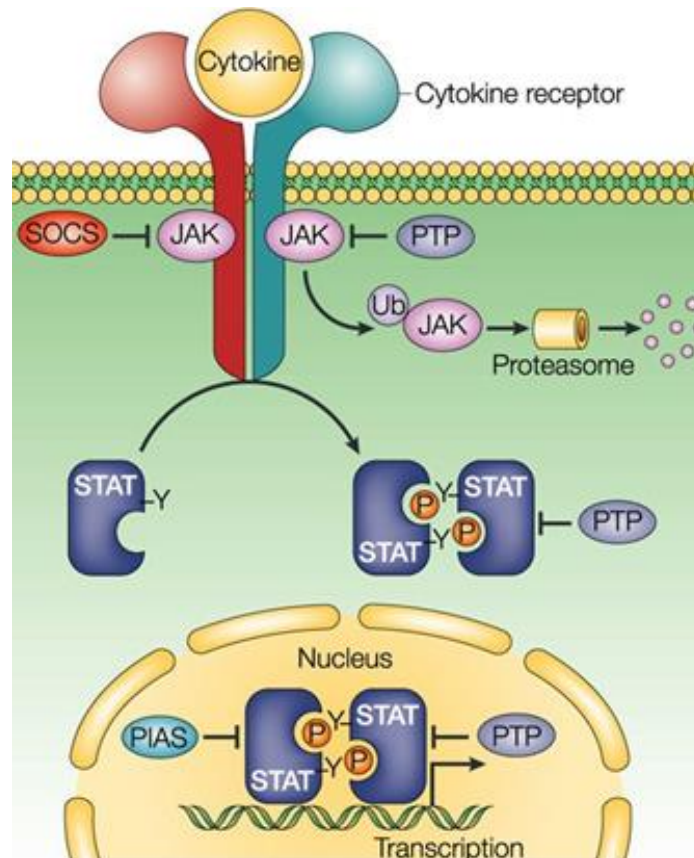


FIGURE 3 : La voie de signalisation JAK-STAT dans les cellules immunitaires.

L'activation des protéines JAK après fixation d'une cytokine à son récepteur permet la phosphorylation des protéines STAT, qui forment des dimères et transloquent dans le noyau pour activer la transcription. D'après Shuai et al, *Nature Reviews Immunology* (18).

Outre les cellules immunitaires où la voie JAK-STAT a été classiquement étudiée, des études plus récentes ont montré un rôle important de cette voie dans la physiopathologie des podocytes, des cellules tubulaires et des cellules mésangiales rénales.

En 2009, une étude a mis en évidence une expression augmentée de l'expression des ARN messagers de STAT1 et STAT3 chez les patients porteurs d'une néphropathie diabétique comparés aux sujets sains. L'expression était augmentée au niveau glomérulaire chez les patients à un stade précoce de la maladie, et au niveau tubulo-interstitiel chez les patients avec une forme tardive. Cela correspond à la physiologie de la néphropathie diabétique qui atteint d'abord le glomérule avant de concerner le compartiment tubulo-interstitiel. De plus, grâce à l'utilisation de souris porteuses d'une inactivation de *Stat3* podocytaire, des travaux ont pu mettre en évidence que son inhibition ralentit la progression de la maladie (19).

La néphropathie liée au VIH (HIVAN) est caractérisée par une hyalinose segmentaire et focale collapsante, une néphrite interstitielle et des dilatations tubulaires microkystiques. Des travaux ont mis en évidence que dans un modèle murin de néphropathie liée au VIH, des souris porteuses d'une inactivation de *Stat3* au niveau rénal présentaient des atteintes moins sévères comparées aux souris contrôle (20). On peut également citer la néphropathie à IgA, où il existe une activation podocytaire de STAT1 et STAT3 (21).

b. La chaîne gamma commune (γ C) aux récepteurs aux interleukines

Parmi les différents ligands pouvant activer la voie JAK-STAT, il y a les interleukines. Elles se fixent à la membrane cellulaire via un récepteur spécifique. Ces récepteurs aux interleukines sont composés de l'association de différentes sous-unités, comme on le voit sur la figure ci-dessous : γ C, IL2R α , IL2R β , IL4R... (**FIGURE 4**).

Parmi ces différentes sous-unités, la chaîne γ C est commune à plusieurs interleukines : les interleukines 2, 4, 7, 9, 15, 21 (22).

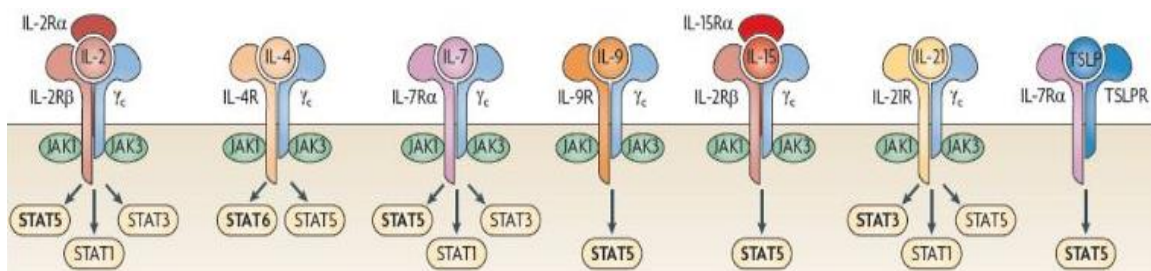


FIGURE 4 : Représentation schématique des récepteurs aux interleukines.

La chaîne γ C (en bleu ciel) est commune aux récepteurs aux interleukines 2, 4, 7, 9, 15 et 21.

c. Rôle de la chaîne γ C dans les podocytes

En 2017, Luque et al. ont démontré les éléments suivants (23) :

- Les souris dépourvues de lymphocytes et exposées à une glomérulonéphrite expérimentale par injection d'anticorps anti-membrane basale glomérulaire ont la capacité de développer une glomérulonéphrite à croissants ;

- Les podocytes de ces souris présentent expression *de novo* de la chaîne γ C. De plus, cette expression est associée à un rôle protecteur comparé aux souris contrôle, avec notamment une baisse de l'urémie, de la protéinurie et des lésions histologiques ;
- L'interleukine 15 (IL15) est sécrétée de façon abondante dans le parenchyme rénal, indépendamment des lymphocytes.

Ces travaux apportent l'information nouvelle que les cellules rénales ont la possibilité intrinsèque de moduler les lésions rénales glomérulaires au cours des glomérulonéphrites inflammatoires, et ce indépendamment des lymphocytes. De plus, jusqu'alors, la présence de la chaîne γ C n'avait jamais été décrite au niveau podocytaire.

Enfin, ils ont également pu démontrer que chez l'Homme, il existe une expression *de novo* podocytaire de la chaîne γ C lors de la glomérulonéphrite à croissant, grâce à un marquage en immunohistochimie (**FIGURE 5**) et en immunofluorescence.

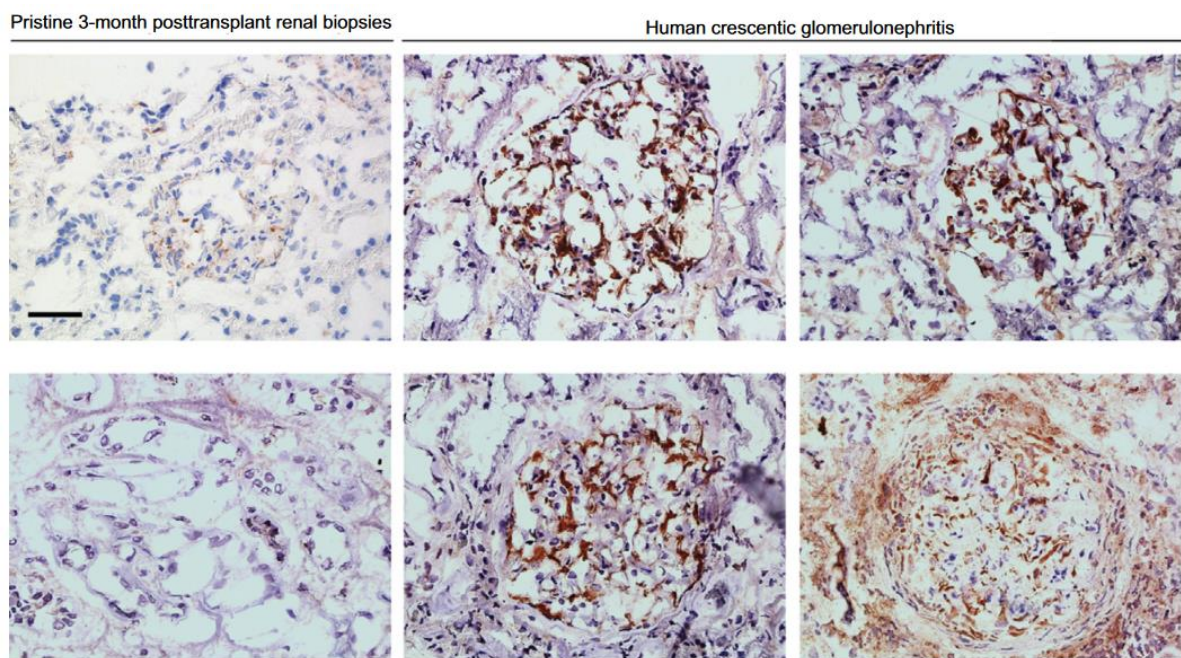


FIGURE 5 : Activation de la chaîne γ C dans les podocytes humains lors de la glomérulonéphrite à croissant.

Images représentatives de l'expression glomérulaire de γ C par immunohistochimie, sur des coupes de greffon rénal normal à 3 mois de greffe (à gauche, 2 cas) et sur des coupes de glomérulonéphrite à croissants (à droite, 4 cas). D'après Luque et al., *Kidney International* (23).

d. Naissance d'un intérêt pour STAT5

Le facteur de transcription STAT5 existe sous deux isoformes, STAT5A et STAT5B. Ces 2 protéines sont identiques à quasiment 90% au niveau des acides aminés (24). STAT5 est exprimé de façon ubiquitaire dans quasiment tous les types cellulaires, mais son rôle est surtout connu dans les cellules immunitaires, où il exerce de nombreuses fonctions, comme la régulation de la prolifération, de la survie et de la différenciation cellulaires.

Dans les cellules immunitaires, STAT5 est activé en aval de la fixation de l'interleukine 15 à son récepteur, via sa liaison à la sous-unité γ C.

Dans les cellules rénales, STAT5 est faiblement exprimé chez l'Homme en situation physiologique. Des travaux réalisés par l'équipe d'accueil ont montré qu'il existe une activation de STAT5B par phosphorylation chez l'Homme en situation pathologique, sur des coupes de rein de patients atteints de hyalinose segmentaire et focale, comparées à des reins sains.

Afin de déterminer le rôle de STAT5 au niveau glomérulaire, l'équipe d'accueil a généré une lignée de souris porteuses d'une inactivation podocytaire du gène *Stat5*. Dans les deux modèles de glomérulopathies étudiés (glomérulonéphrite toxique par injection d'anticorps anti-membrane basale glomérulaire et podocytopathie toxique à l'adriamycine), ces souris mutantes développent une protéinurie plus sévère que leurs contrôles (Niasse et al., en préparation).

Ces données sont donc en faveur d'un rôle protecteur de STAT5 podocytaire dans les glomérulopathies inflammatoires et non inflammatoires. STAT5 pouvant être activé par l'IL15, via sa liaison à la sous-unité γ C, l'équipe d'accueil a testé l'effet d'une administration d'IL15 dans le contexte d'une glomérulopathie toxique chez la souris. Elle a ainsi montré que l'administration d'IL15 réduit l'albuminurie de façon significative dans le modèle.

Le rôle de l'interleukine 15 au niveau rénal a été étudié dans d'autres travaux. Shinozaki et al. ont montré que l'IL15 et ses récepteurs sont exprimés dans les cellules épithéliales tubulaires (8). L'IL15 limiterait l'apoptose tubulaire et la sécrétion de la chimiokine pro-inflammatoire MCP-1 lors d'une agression rénale aiguë (25).

La voie de signalisation γ C-STAT5 podocytaire serait donc activée au cours de l'agression podocytaire afin de maintenir la survie et la différenciation podocytaire. L'interleukine 15, qui

est déjà étudiée dans d'autres pathologies (mélanome, cancer du rein), pourrait être un activateur de cette voie.

e. Rôle protecteur de STAT5 dans le tubule

Parallèlement au rôle protecteur de STAT5 dans les maladies glomérulaires, l'équipe d'accueil s'est intéressée à son rôle au niveau tubulaire.

Le rôle de STAT5 dans l'épithélium tubulaire a été mis en évidence par les travaux de Fragiadaki et al. dans la polykystose rénale autosomique dominante. En effet, ils ont montré l'implication de STAT5 dans la prolifération des cellules tubulaires, favorisant la prolifération des kystes (26). Dans cette même maladie, des travaux ont montré que STAT3 réduit l'expression de cytokines pro-inflammatoires et l'infiltration des cellules immunes (27).

L'équipe du laboratoire a montré qu'il existe une activation de STAT5B tubulaire chez l'Homme lors de nécrose tubulaire aigue. De plus, dans un modèle murin de néphropathie à la cisplatine, les souris porteuses d'une inactivation tubulaire de *Stat5* présentent une fonction rénale dégradée et des marqueurs de lésion histologique plus sévères, en comparaison aux souris contrôles. Ces éléments sont en faveur d'un rôle protecteur de STAT5 également dans l'insuffisance rénale aigue d'origine tubulaire mais sont à confirmer.

Les mécanismes sous-jacents de l'effet protecteur de STAT5 ne sont pas encore déterminés. Une des hypothèses que j'ai été amenée à tester est celle d'une activation de l'autophagie.

4. L'autophagie

a. Généralités sur l'autophagie

L'autophagie correspond à un mécanisme cellulaire physiologique de dégradation d'organelles, protéines et macromolécules (28).

En situation physiologique, il existe un niveau basal d'autophagie essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire. L'autophagie peut être activée en situation de stress telles que le jeûne, l'hypoxie, la privation en nutriment et le stress oxydatif, qui sont autant de mécanismes impliqués dans l'insuffisance rénale aigue (29). Cette activation de l'autophagie permet l'élimination d'éléments oxydés ou ubiquitinés et leur recyclage dans des structures permettant la production d'énergie.

Des études récentes ont mis en évidence le rôle pivot de l'autophagie au niveau cellulaire. Des anomalies de régulation de l'autophagie sont impliquées dans le développement de nombreuses pathologies, comme les cardiomyopathies, les maladies infectieuses, la maladie de Crohn, le lupus érythémateux disséminé, le cancer et les pathologies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer, Parkinson et Huntington (30).

L'autophagie débute avec la formation d'une structure à double membrane, l'autophagosome, qui va encapsuler une partie du cytoplasme contenant le matériel à dégrader. Il va ensuite fusionner avec le lysosome pour former un autolysosome dont le contenu sera dégradé (FIGURE 6).

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour étudier l'autophagie. L'une d'elle est de quantifier l'abondance de la protéine light chain protein 3 (LC3), présente sur la membrane de l'autophagosome pendant tout le processus.

Plusieurs éléments peuvent activer ou inhiber le flux autophagique, comme le jeûne (activation de l'autophagie), et la chloroquine (blocage de l'autophagie en aval par inhibition de la fusion entre autophagosome et lysosome) (31). Les protéines ATG (*Autophagy Related Gene*) sont indispensables à l'activité autophagique.

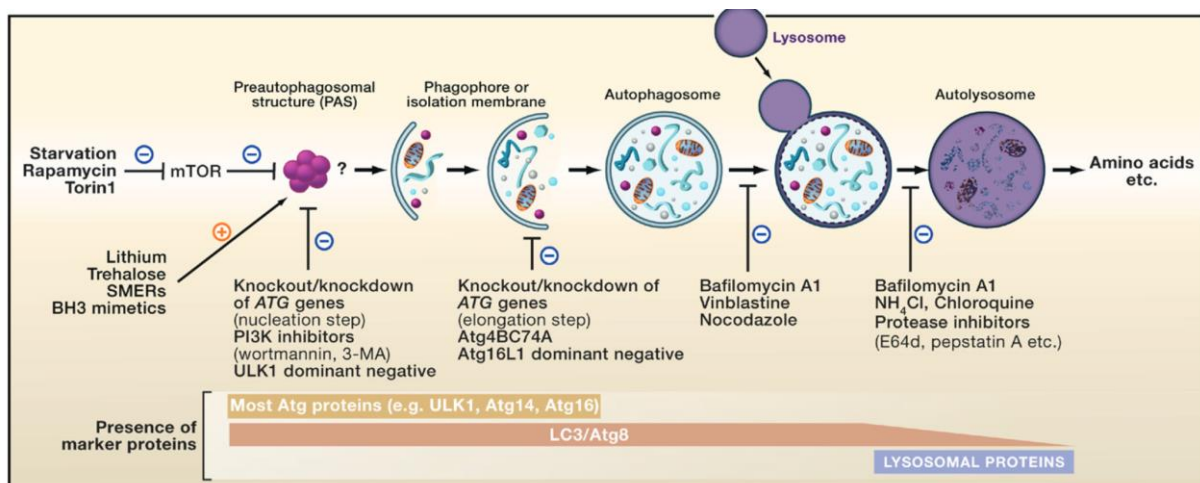


FIGURE 6 : Représentation schématique des différentes étapes de l'autophagie.

La membrane d'isolation va séquestrer le contenu cytoplasmique à dégrader, formant un autophagosome. L'autophagosome va fusionner avec un lysosome, formant un autolysosome dont le contenu sera dégradé. Sont également représentés les éléments pouvant activer l'autophagie (comme le jeûne) ou l'inhiber (comme la chloroquine). La protéine light chain protein 3 (LC3) est présente sur la membrane de l'autophagosome pendant tout le processus et est fréquemment utilisée comme marqueur d'autophagie. D'après Mizushima et al, *Cell* (28).

b. Rôle de l'autophagie dans le rein

L'activité autophagique n'est pas équivalente dans tous les segments du rein. En effet, plus une cellule est différenciée et donc avec une faible capacité de prolifération, plus l'autophagie est importante (29).

Les cellules tubulaires proximales consomment beaucoup d'énergie pour la réabsorption d'eau et d'électrolytes, et l'autophagie semble alors importante pour couvrir leurs besoins énergétiques et pour le recyclage des mitochondries (30). En revanche, les cellules tubulaires distales, qui ont un volume d'échange plus faible, dépendent moins de l'autophagie pour leur homéostasie. Dans les podocytes, cellules très différenciées, l'autophagie joue également un rôle important dans l'homéostasie et le maintien des fonctions cellulaires (32).

Plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle protecteur de l'autophagie dans l'insuffisance rénale aiguë .

Au niveau tubulaire, Liu et al. ont montré que les souris porteuses d'une inactivation d'*Atg5* (gène clé de la formation de l'autophagosome) spécifique de l'épithélium tubulaire proximal développent une glycosurie et altèrent leur fonction rénale. En revanche, les souris porteuses d'une inactivation d'*Atg5* spécifique de l'épithélium tubulaire distal ont une augmentation de marqueurs du stress oxydant mais pas d'altération de leur fonction rénale (33). Ceci est en faveur d'un rôle plus important de l'autophagie au niveau tubulaire proximal que distal, comme mentionné précédemment.

De plus, Jiang et al. ont montré qu'il existe une activation protectrice de l'autophagie dans le tubule proximal dans un modèle murin de néphropathie à la cisplatine chez des souris C56BL/6 (34).

Au niveau glomérulaire, l'équipe de Yi a généré une lignée de souris porteuses d'une inactivation podocytaire du gène *Atg7*, un autre gène clé de l'autophagie. Ces souris, exposées à une néphropathie à l'adriamycine, développaient une insuffisance rénale plus sévère que les souris sauvages (32).

c. Autophagie et STAT5

En 2019, un premier travail a pu établir un lien entre l'autophagie et la voie de signalisation JAK-STAT. En effet, Shi et al. ont démontré que l'inhibition de STAT5 restaure l'autophagie dans les cellules mésangiales sénescents (35).

Nos données préliminaires montrent que l'administration d'interleukine 15 restaure l'autophagie *in vivo*, dans un modèle de néphropathie toxique à l'adriamycine. L'axe IL15- γ C-STAT5 pourrait donc exercer un rôle protecteur en modulant l'activité autophagique des podocytes.

5. Objectifs de travail

Le premier objectif de mon projet a été de tester le rôle protecteur de STAT5 dans un modèle d'insuffisance rénale aiguë tubulaire, l'ischémie-reperfusion (IR). Pour cela, j'ai utilisé des souris porteuses d'une inactivation de *Stat5* spécifique de l'épithélium tubulaire et inducible par la doxycycline (*Pax8-rtTA ;LC1 ;Stat5^{lox/lox}*).

Le deuxième objectif de mon projet a été de caractériser le rôle de STAT5B dans la régulation de l'autophagie. J'ai pour cela utilisé des cellules embryonnaires humaines de rein (lignée HEK293), sauvages ou porteuses d'une délétion spécifique de *STAT5B* obtenue grâce au système CRISPR-Cas9.

II. MATERIELS ET METHODES

1. Animaux

Nous avons utilisé des souris *Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}*.

Ces animaux sont issus d'une part du système de recombinaison Cre-LoxP. La Cre est une recombinase, c'est-à-dire une enzyme permettant d'effectuer des recombinaisons spécifiques. Elle va permettre la recombinaison entre elles de séquences LOXP : les deux séquences vont alors se fusionner (36).

Ils sont issus d'autre part du système de régulation par la tétracycline. La régulation par la tétracycline est une méthode d'expression génique inductible, dans laquelle la transcription est activée ou désactivée de manière réversible en présence de l'antibiotique tétracycline ou de l'un de ses dérivés, ici la doxycycline (37).

Ces souris sont donc capables de réaliser une inactivation des gènes *Stat5a* et *Stat5b* spécifique de l'épithélium tubulaire, après induction par la doxycycline. Elles ont été générées en croisant des souris homozygotes *Stat5^{lox/lox}* (fournies gracieusement par L.Hennighausen) de fond génétique C57BL/6 avec des souris *Pax8-rtTA;LC1* (**FIGURE 7**).

Les souris double-transgéniques *Pax8-rtTA;LC1* sont issues du croisement de souris *Pax8-rtTA* de fond génétique mixte C57BL/6:DBA (38) avec des souris homozygotes *LC1* de fond génétique mixte C57BL/6:BALB/C (39). *Pax8* est un gène exprimé spécifiquement dans les tubules rénaux. La protéine rtTA est issue de la fusion des protéines VP16 (protéine de l'herpès virus) et rTetR (protéine répresseur de la tétracycline). Ces souris expriment la protéine transactivatrice de la tétracycline (rtTA) sous le contrôle du promoteur du gène *Pax8* et permettent la synthèse de la recombinase Cre sous induction par la doxycycline dans le tubule rénal (38) et donc l'excision des gènes *Stat5a/b*.

Un groupe de souris *Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}* a été traité par doxycycline pendant 17 jours (0.2 mg/ml dans une solution de sucrose à 2,5%). L'autre groupe de souris de la même lignée a été traité par sucrose seul, servant de contrôle. Une période de wash-out d'une semaine a été réalisée afin de s'affranchir des effets résiduels de la recombinase Cre et de la doxycycline.

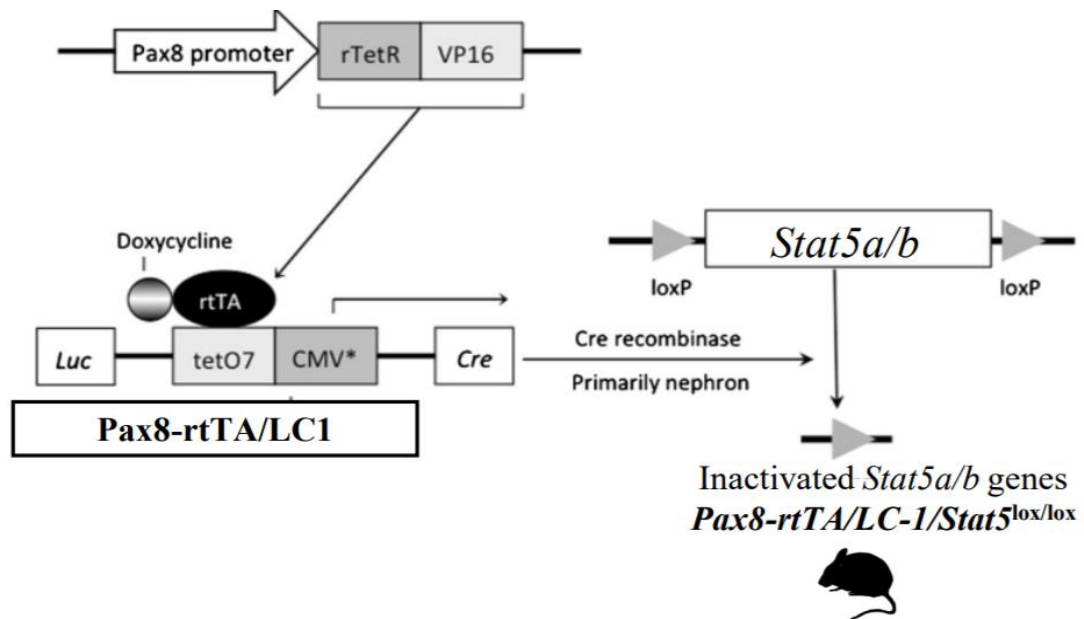


FIGURE 7 : Représentation schématique du modèle murin.

Les souris *Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}* sont issues du croisement de souris homozygotes *Stat5^{lox/lox}* avec des souris *Pax8-rtTA;LC1*. Les souris *Pax8-rtTA;LC1* expriment la protéine transactivatrice de la tétracycline (rtTA) sous le contrôle du promoteur du gène *Pax8* et permettent la synthèse de la recombinaise Cre sous induction par la doxycycline dans le tubule rénal. La protéine rtTA se fixe sur la séquence d'ADN tetO7 uniquement en présence de doxycycline. La séquence tetO7 répond à la liaison de rtTA en induisant l'expression de la recombinaise Cre.

2. Génotypage

Le génotype des souriceaux est déterminé à l'âge de 10 jours par PCR sur de l'ADN génomique extrait à partir d'une biopsie de queue. Pour extraire l'ADN, les biopsies sont incubées dans 200µl d'un tampon de lyse (DirectPCR Lysis Reagent, Viagen Biotech) contenant 200µg/ml de protéinase K (Thermo Fischer Scientific) pendant une nuit à 56°C. La protéinase K est ensuite inactivée par incubation à 95°C pendant 5 minutes. 0,5µl d'ADN sont ensuite utilisés pour identifier le génotype des souris par PCR.

Pour la détection de *Pax8LC1* et de la recombinaise Cre, le programme suivant a été utilisé :

- une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes
- 35 cycles composés chacun de : 1) une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes ; 2) une étape d'hybridation à 55°C pendant 45 secondes ; 3) une étape d'élongation à 72°C pendant 1 minute

- une dernière étape d'élongation à 72°C pendant 7 minutes

Pour la détection de l'allèle *Stat5^{lox}*, le même cycle a été utilisé avec quelques modifications : 40 cycles ont été réalisés, et la température d'hybridation était de 60°C.

Les produits de PCR obtenus sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. La séquence des amorces utilisées est indiquée dans le **Tableau I**.

Allèle	Nom	Séquence	Taille de l'amplicon
Tg Pax8-rtTa	ST1	5'-CCATGTCTAGACTGGACAAGA-3'	550 pb
	ST2	5'-CTCCAGGCCACATATGATTAG-3'	
Tg LC1	Cre3	5'-TCGCTGCATTACCGGTCGATGC-3'	400 pb
	Cre4	5'-CCATGAGTGAACGAACCTGGTCG-3'	
Allèle <i>Stat5⁺</i>	S5fl1685	5'-GAAAGCATGAAAGGGTTGGAG-3'	480 pb
	S5fl1842	5'-AAGTTATCTCGAGTTAGTCAGG-3'	
Allèle <i>Stat5^{lox}</i>	S5del1686	5'-AGCAGCAACCAGAGGACTAC-3'	200 pb
	S5fl1842	5'-AAGTTATCTCGAGTTAGTCAGG-3'	

TABLEAU I. Amorces utilisées pour le génotypage (Tg : Transgène)

3. Extraction de l'ARN et RT-PCR

Après un broyage mécanique du segment de rein, l'ARN total est extrait à l'aide du réactif TRIreagent® (Molecular Research Center, Inc) suivant le protocole du fournisseur. La concentration d'ARN est déterminée au spectrophotomètre NanoDrop™ puis 1µg d'ARN total est reverse-transcrit (Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RTqPCR, ThermoScientific) selon les instructions du fournisseur. La PCR et son analyse ont ensuite été effectuées selon le protocole ci-dessus. La séquence des amorces utilisées pour amplifier l'ADN complémentaire (ADNc) de la recombinaison Cre sont les suivants :

- Cre-s 5'-CCTGCATTACCGGTCGATGCAACGA-3'
- Cre-as 5'-GTGGCAGATGGCGCGCAACACCATT-3'

La taille de l'amplicon est 752 pb.

4. Ischémie-Reperfusion

Les souris sont anesthésiées par administration d'un mélange de kétamine (0,1mg/g) et de xylazine (0,01mg/g) par voie intra-péritonéale. L'animal est maintenu sur une plaque thermostatée à 37°C pendant l'ensemble de la procédure. Les manipulations sont faites par une approche dorsale, moins traumatisante.

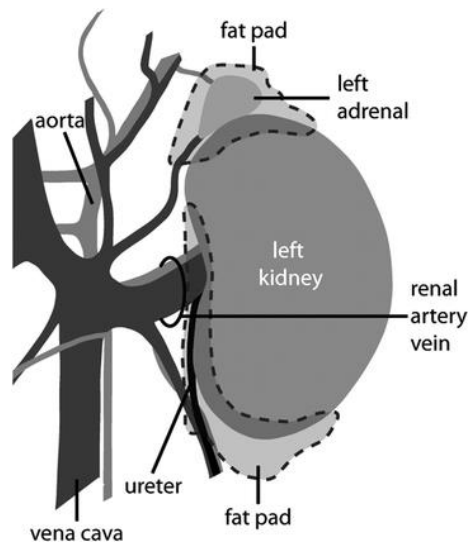


FIGURE 8 : Anatomie du hile rénal (simplifiée ici).

L'arbre vasculaire rénal est en étroite relation avec l'uretère, les graisses périphériques et la glande surrénale. Le cercle noir correspond à la position du clamp.

Le rein droit est exposé grâce à une incision du flanc droit au niveau dorsal, postérieurement au volet costal. La veine et l'artère rénales ainsi que l'uretère sont ligaturées puis le rein est excisé (**FIGURE 8**). La plaie est recousue (plan musculaire puis plan cutané) avec du fil de soie 4.0. Ce rein contrôle est coupé en quatre. Deux quarts sont incubés dans une solution de Formol pendant une nuit avant d'être inclus en paraffine pour l'analyse en histologie et immunofluorescence. Les deux autres quarts sont congelés immédiatement dans de l'azote liquide pour l'analyse de l'expression génique ou protéique.

Le rein gauche est exposé de la même façon. L'uretère est séparé de l'artère et de la veine rénale. Le flux sanguin rénal est interrompu pendant 30 ou 25 minutes par clampage du pédicule vasculaire avec un clamp atraumatique. La plaie est ensuite recousue comme décrit ci-dessus.



FIGURE 9 : Coupes de rein contrôle et après ischémie-reperfusion.
D'après Lee et al, Anatomy & Cell Biology (40).

5. Sacrifice et fonction rénale

24 heures après la chirurgie, les souris sont anesthésiées par le mélange kétamine-xylazine décrit ci-dessus. 500µl de sang sont prélevés dans le sinus rétro-orbitaire dans des tubes enduits d'EDTA. Ces échantillons sont centrifugés à 2 000g pendant 5 minutes afin de prélever le plasma, qui est ensuite conservé à -80°C.

L'animal est ensuite mis à mort par dislocation cervicale. Le rein gauche est coupé en quatre et conditionné selon le même protocole que le rein contrôle, présenté ci-dessus (**FIGURE 9**). Une biopsie de queue est effectuée pour vérifier le génotype des animaux par PCR, selon le protocole décrit ci-dessus. Les concentrations d'urée et de créatinine plasmatiques sont mesurées par une réaction enzymatique au Konelab (Thermo Fischer Scientific).

6. Culture cellulaire et étude de l'activité autophagique

Le laboratoire d'accueil a généré des cellules de la lignée HEK293 porteuses d'une délétion spécifique de *STAT5B* grâce au système CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- CRISPER Associated Protein 9). Ce complexe permet de couper ou d'apporter des modifications ciblées au matériel génétique des cellules.

Ces cellules *STAT5B*^{-/-}, ainsi que des cellules humaines rénales embryonnaires contrôles HEK293 *STAT5*^{+/+}, ont été cultivées en étuve à 37°C sous 5% de CO₂ dans un milieu composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco™) contenant 10% de sérum de veau fœtal (FBS, Gibco™) et 1% d'une solution antibiotique (Penicillin-Streptomycin 10 000 U/ml, Gibco™).

Pour étudier le flux autophagique des cellules, nous avons choisi d'étudier l'abondance de LC3, en situation d'inhibition et d'activation de l'autophagie. Nous avons ainsi constitué 4 groupes, chez qui nous avons effectués les traitements suivants sur des cellules à 80% de confluence :

- GROUPE 1 « EBSS » avec stimulation de l'autophagie par le jeûne : culture dans une solution de sel équilibrée de Earle sans acide aminé (EBSS, Gibco™) pendant 1h ou 2h, à 37°C (31) ;
- GROUPE 2 « CHLOROQUINE » avec inhibition de l'autophagie : culture dans une solution de chloroquine (CQ) à 100µM en milieu DMEM, pendant 1h à 37°C, afin d'inhiber la formation des autolysosomes (31) ;
- GROUPE 3 « EBSS + CQ » : culture dans une solution de chloroquine à 100uM en milieu EBSS, pendant 1h à 37°C ;
- GROUPE 4 « contrôle » : culture en milieu DMEM.

Après incubation dans ces différentes conditions, les cellules sont lavées deux fois au PBS, récoltées puis centrifugées à 2 000rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite éliminé. Les culots cellulaires sont conservés à -80°C ou utilisés immédiatement pour l'extraction protéique.

7. Extraction protéique

Un quart de rein issu des souris IR est broyé pendant 2 x 30 secondes (Retsch® MM300) dans 150µl d'un tampon de lyse RIPA (RIPA Lysis Buffer System, Santa Cruz Biotechnologies) contenant 10mM de Fluorure de Sodium (NaF, Santa Cruz), 200mM de Phenylmethanesulfonyl Fluorure (PMSF, Santa Cruz), 100mM d'Orthovanadate de Sodium (Santa Cruz) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Protease inhibitor cocktail, Santa Cruz). Les culots cellulaires sont quant à eux mis en suspension et lysés dans 30µL du même tampon. Les lysats sont laissés en incubation sur glace pendant 30 minutes. Le lysat est centrifugé pendant 15 minutes à 4 000g à 4°C pour éliminer les débris cellulaires et nucléaires. Le surnageant est ensuite collecté et la concentration est déterminée grâce à un test au Bradford (Protein Assay, Bio-Rad) ou au BCA (Thermo Scientific Pierce).

8. Western blot

Pour l'expression de LC3-II dans les cellules HEK : Les protéines sont dénaturées par ajout d'un tampon dénaturant (NuPAGE® LDS Sample Buffer contenant 2,5mM de β -mercaptoéthanol) pendant 5 minutes à 95°C. Pour chaque échantillon, 15µg de protéines sont chargés et séparés sur des gels de polyacrylamide à gradient 4-20%. Les membranes sont bloquées dans une solution de BSA 5% diluée dans du TBS 1X contenant 0,1% de Tween (TBST) pendant 2 heures à température ambiante et sous agitation puis incubées dans une solution TBST-BSA contenant l'anticorps primaire anti-LC3-II (Cell Signalling, 3868), dilué au 1/1000^{ème} toute la nuit à 4°C. Les protéines de référence sont l'alpha-tubuline (ab6160, Abcam dilué au 1/2000^{ème}) et la GAPDH (ab8245, Abcam dilué au 1/80 000^{ème}). Ces anticorps sont dilués respectivement au 1/2000^{ème} et au 1/80000^{ème} dans une solution TBST-lait.

Pour l'expression de STAT5 dans les reins de souris : Les protéines sont dénaturées par ajout d'un tampon dénaturant (NuPAGE® LDS Sample Buffer et *Sample Reducing Agent*, ThermoFischer Scientific) pendant 10 minutes à 70°C. Pour chaque échantillon, 20ug de protéines sont chargés et séparés sur des gels SDS-polyacrylamide à 12%. Après migration, les protéines sont transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes sont bloquées grâce à une solution de lait 5% dans du TBST pendant 2 heures à température ambiante et sous agitation. Les membranes sont ensuite incubées en présence de l'anticorps primaire anti-STAT5 (ab16276, Abcam) dilué au 1/1 000^{ème} dans la solution TBST-lait toute la

nuit à 4°C. Les protéines de référence utilisées sont la GAPDH (ab181602, Abcam) et l'HSC70 (ab51052, Abcam). Ces anticorps sont dilués respectivement au 1/80000^{ème} et au 1/500^{ème} dans une solution TBST-lait.

Dans les trois cas, les membranes sont ensuite lavées 3 x 10 minutes dans du TBST puis incubées dans une solution de TBST-lait contenant l'anticorps secondaire adéquat couplé à la peroxydase (Amersham GE Healthcare), dilué au 1/5 000^{ème} pendant 2h à température ambiante sous agitation. Le kit ECL Western Prime Blotting (Cytiva) est utilisé pour détecter les bandes. Les membranes sont ensuite analysées grâce au système PXi (New Compact Gel Documentation System, Syngene). Les bandes ont été quantifiées grâce au logiciel ImageJ. Les différents anticorps utilisés sont présentés dans le **Tableau II**.

Anticorps	Référence	Dilution	Solution
Anti-LC3	#3868, Cell Signalling	1/1000 ^{ème}	TBST-BSA
Anti-STAT5	ab16276, Abcam	1/1000 ^{ème}	TBST-Lait
Anti-alpha-tubuline	ab6160, Abcam	1/2000 ^{ème}	TBST-Lait
Anti-GAPDH	ab8245, Abcam	1/80000 ^{ème}	TBST-Lait
Anti-HSC70	ab51052, Abcam	1/2000 ^{ème}	TBST-Lait

Tableau II : Anticorps primaires utilisés pour les western blots

9. Coloration au Periodic Acid Schiff et score d'atteinte tubulaire

Des coupes de rein de 4 µm sont colorées au Periodic Acid Schiff (PAS). Pour cela, les lames sont déparaffinées et hydratées comme indiqué ci-dessus puis placées dans une solution d'acide périodique 1% pendant 15 minutes. Après lavage dans de l'eau, elles sont ensuite mises dans le réactif de Schiff (DiaPath) pendant 30 minutes et passées dans une solution d'hématoxyline puis de carbonate de Lithium pour marquer les noyaux.

Pour chaque souris, plusieurs champs non chevauchants de la zone cortico-médullaire sont photographiés au microscope puis un score composite, qualitatif et quantitatif, est attribué à chaque échantillon.

Les critères qualitatifs sont : présence d'une dilatation tubulaire, présence de débris intra-tubulaires (« casts »), nécrose cellulaire avec disparition de la bordure en brosse, présence de cellules tubulaires atypiques avec un cytoplasme vacuolisé.

Pour l'aspect quantitatif, on évalue le pourcentage d'atteinte tubulaire de la coupe : 0 si absence de lésion, 1 si une partie de la jonction cortico-médullaire est atteinte, 2 si toute la jonction cortico-médullaire est atteinte, 3 si le cortex est atteint, 4 s'il y a en plus des lésions d'infarctus caractérisées par une effusion de globules rouges.

10. Cytométrie en flux

Les cellules HEK293 sont incubées dans des flasques avec 10µM de Bromo-desoxy-uridine (BrdU) pendant 1h à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées au PBS 1X puis au PBS 1X contenant 9mM d'EDTA. Elles sont ensuite centrifugées et le surnageant éliminé. Le culot cellulaire est fixé dans de l'éthanol 70% pendant 30 minutes sur glace puis incubé 30 minutes dans une solution à 2M d'acide chlorhydrique à température ambiante. Les cellules sont lavées 1 fois au PBS IX, puis incubées à nouveau 30 minutes avec un anticorps monoclonal anti-BrdU couplé à la fluorescéine et dilué au 1/10^{ème} (14-5071-8, BU20A eBioscience™). Enfin, 200 µl d'une solution de Iodure de propidium et de RNase est ajoutée (PI/RNase Staining Buffer, BD Pharmingen). L'incorporation de BrdU par les cellules au cours de la phase de réplication de l'ADN est par la suite détectée par immunofluorescence en cytométrie de flux (MACSQuant Analyser, Miltenyi Biotec).

11. Immunofluorescence

Les reins (contrôles et ischémiés) préalablement fixés dans une solution de Formol sont déshydratés puis inclus dans la paraffine. Des coupes de 4 µm sont effectuées puis un marquage de la protéine p62 en immunofluorescence est réalisé. Pour cela, les lames sont déparaffinées par incubation dans du xylène pendant 3x 10 minutes puis hydratées par incubation dans des bains de concentration décroissante d'éthanol pendant 5 minutes.

Les sites antigéniques sont ensuite démasqués grâce à un tampon Citrate pH6 (Solution Antigen Retrieval, Dako) dans le TintoRetriever Pressure Cooker (Bio SB) pendant 20 minutes.

Les lames sont perméabilisées 10 minutes dans une solution de TBS1X Triton 0,2%. Le blocage des sites antigéniques non spécifiques est réalisé grâce à une incubation dans une solution de TBST contenant 3% de BSA pendant 30 minutes à température ambiante. Les lames sont ensuite incubées dans la solution de blocage contenant l'anticorps primaire anti-p62 (GP62-C, Progen), dilué au 1/400^{ème}, toute la nuit à 4°C.

Le lendemain, les coupes sont lavées 3 fois 10 minutes au TBST, puis mises en contact avec l'anticorps secondaire adéquat dilué au 1/500^{ème} dans la solution de blocage. Un marquage des noyaux au DAPI est réalisé pendant 5 minutes. Les lames sont mises en contact avec du Noir Soudan 0,1% pendant 30 secondes pour atténuer le bruit de fond. Après rinçage à l'eau courante, les lames sont ensuite montées en milieu aqueux (Permafluor et lame Menzel #1,5 Diamant) puis conservées à 4°C.

12. Analyse Statistique

Pour les expériences in vitro, les comparaisons entre plus de deux groupes ont été effectuées par une analyse de variance de Kurskal-Wallis, suivie de tests de comparaisons multiples de Dunn. Pour les expériences in vivo, le test de Student a été utilisé. Tous les tests sont bilatéraux et une p-value < 0.05 est considérée comme significative. Les analyses ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism v6.

III. RESULTATS

1. Les conséquences de l'ischémie-reperfusion sont identiques dans les deux groupes de souris.

Afin d'étudier les conséquences de l'inactivation de *Stat5* sur l'IRA induite par ischémie-reperfusion, nous avons constitué deux groupes de souris.

Un groupe était constitué de 7 souris de la lignée *Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}* qui ont reçu une administration de sucrose et de doxycycline, afin d'induire l'expression de la recombinaise Cre et permettre l'inactivation de *Stat5*. Un autre groupe était constitué de 7 souris de la même lignée et ont reçu une administration de sucrose seul, servant de contrôle.

Après une semaine de wash-out, l'ischémie-reperfusion a été induite par néphrectomie du rein droit suivie du clampage de l'artère rénale gauche pendant 30 minutes (**FIGURE 10**).

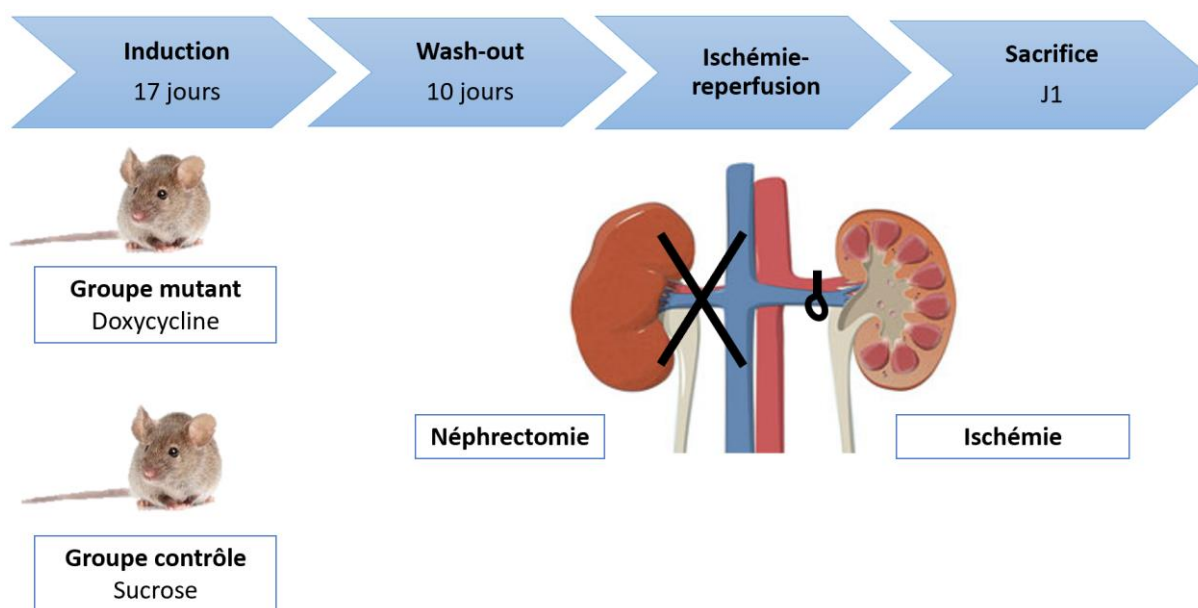


FIGURE 10 : Etapes du protocole d'étude

Le groupe mutant (7 souris) a été traité par doxycycline pendant 17 jours afin de permettre l'inactivation spécifique de *Stat5* au niveau tubulaire. Le groupe contrôle (7 souris) a été traité par sucrose seul. Une période de wash-out de 10 jours a été réalisée. L'ischémie-reperfusion a ensuite été réalisée dans les 2 groupes, par néphrectomie du rein droit suivie du clampage du rein gauche. Les souris ont ensuite été sacrifiées à 24h.

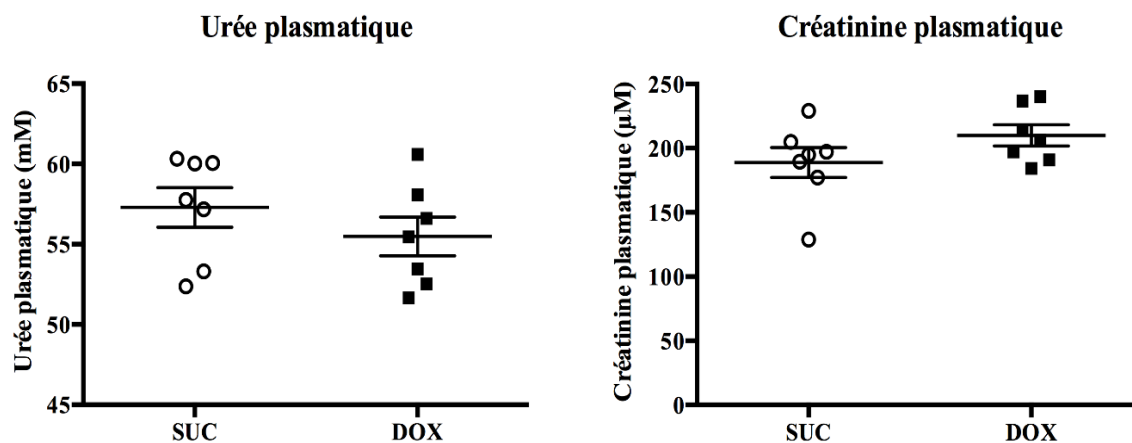
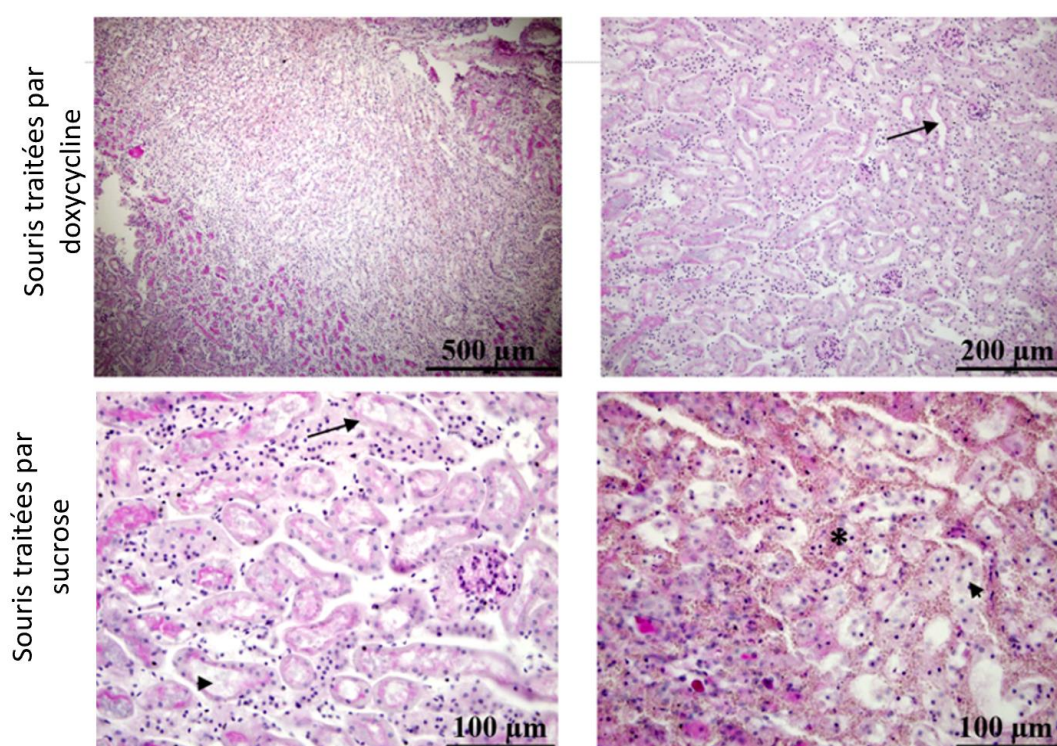
A**B**

FIGURE 11 : Conséquences de l'ischémie-reperfusion après un clampage de 30 minutes.

A. Concentration d'urée (mmol/L) et créatinine plasmatiques (μmol/L) après un clampage de 30 minutes chez les souris *Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}* traitées par doxycycline (« DOX ») ou par sucrose (« SUC »). N=7 dans chaque groupe. $p>0,05$, test de Student. **B.** Images représentatives de coupes de la jonction cortico-médullaire colorées à l'acide périodique de Schiff chez des souris *Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}* traitées ou non par doxycycline, après ischémie-reperfusion. Les flèches noires indiquent des tubules nécrotiques. Les têtes de flèche indiquent la présence de casts. L'astérisque indique une infiltration d'hématies.

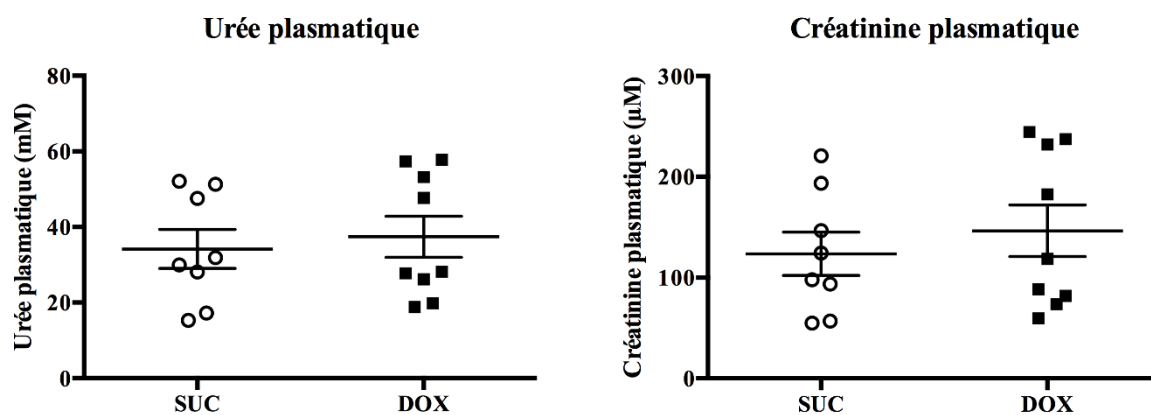
Nous avons tout d'abord évalué la fonction rénale par une mesure de l'urée et de la créatinine plasmatique à 24h de l'ischémie (**FIGURE 11A**). Nos résultats montrent que les deux groupes de souris présentaient une insuffisance rénale sévère caractérisée par une hausse élevée de l'urée et de la créatinine plasmatiques, mais il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes.

Nous avons ensuite réalisé une analyse du parenchyme rénal afin d'évaluer l'atteinte histologique (**FIGURE 11B**). Nous avons pour cela réalisé des coupes de 4 µm colorées au Periodic Acid Schiff. De nombreuses lésions étaient observées dans les deux groupes, telles qu'une dilatation tubulaire, la présence de *casts* et une infiltration tubulo-interstitielle de globules rouges. Cependant il n'y avait à nouveau pas de différences entre les groupes.

Afin de réduire la sévérité de l'atteinte ischémique pour permettre de mettre en évidence une potentielle aggravation entre les deux groupes, nous avons sélectionné une deuxième cohorte de souris, pour réaliser un clampage plus court de 25 minutes (**FIGURE 12**). Le groupe traité par doxycycline était constitué de 9 souris et le groupe contrôle de 8 souris. A 24h, l'élévation de l'urée et de la créatinine plasmatiques était effectivement moins importante chez ces souris, par rapport à celles ayant subi un clampage de 30 minutes. Cependant, il n'y avait à nouveau pas de différence entre les deux groupes. En effet, dans le groupe mutant, la créatininémie moyenne était de 146 µmol/L contre 123 µmol/L dans le groupe sauvage ; l'urémie moyenne était de 37 mmol/L contre 34 mmol/L dans le groupe contrôle.

Ces résultats suggèrent que l'inactivation de *Stat5* tubulaire ne modifie pas les conséquences de l'ischémie rénale chez la souris dans le modèle de l'ischémie-reperfusion, à la fois sur le plan histologique et sur le plan fonctionnel. Ces résultats sont ainsi en désaccord avec ceux obtenus lors d'expériences préliminaires. En effet, les souris porteuses d'une inactivation tubulaire de *Stat5* et exposées à une néphropathie à la cisplatine présentaient des lésions moins sévères que les souris du groupe contrôle.

A



B

Statut des souris	Créatinine ($\mu\text{mol/L}$)	Urée (mmol/L)
Sucrose	194	48
Sucrose	221	52
Sucrose	147	51
Sucrose	98	32
Sucrose	55	17
Sucrose	57	15
Sucrose	124	30
Sucrose	94	28
Doxycycline	232	57
Doxycycline	119	28
Doxycycline	82	28
Doxycycline	60	19
Doxycycline	244	58
Doxycycline	88	26
Doxycycline	237	53
Doxycycline	74	20
Doxycycline	183	48

FIGURE 12 : Conséquences de l'ischémie-reperfusion après un clampage de 25 minutes

A. Concentrations d'urée (mmol/L) et créatinine plasmatique ($\mu\text{mol/L}$) après un clampage de 25 minutes chez les *souris Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}* traitées par doxycycline (« DOX », N=8) ou par sucrose (« SUC », N=9). $p > 0,05$, test de Student. Chaque point correspond à un échantillon et les barres représentent la moyenne \pm sem. **B** Détail des valeurs pour chaque souris.

2. L'expression de Stat5 sur extrait de rein total semble identique dans les deux groupes.

Devant ces résultats discordants, nous avons souhaité vérifier le bon fonctionnement de notre construction génétique, en vérifiant l'inactivation du gène *Stat5* par le système induit par la doxycycline. Pour cela, nous avons quantifié l'abondance protéique de Stat5 dans le rein.

Nous avons ainsi réalisé un western blot sur extrait protéique de rein total des souris des 2 séries (30 minutes et 25 minutes). Nos résultats montrent que, pour les deux séries, il n'y avait pas de différence significative d'expression de Stat5 entre les 2 groupes (**FIGURE 13**). Les protéines GAPDH et HC70 ont été utilisées comme contrôle.

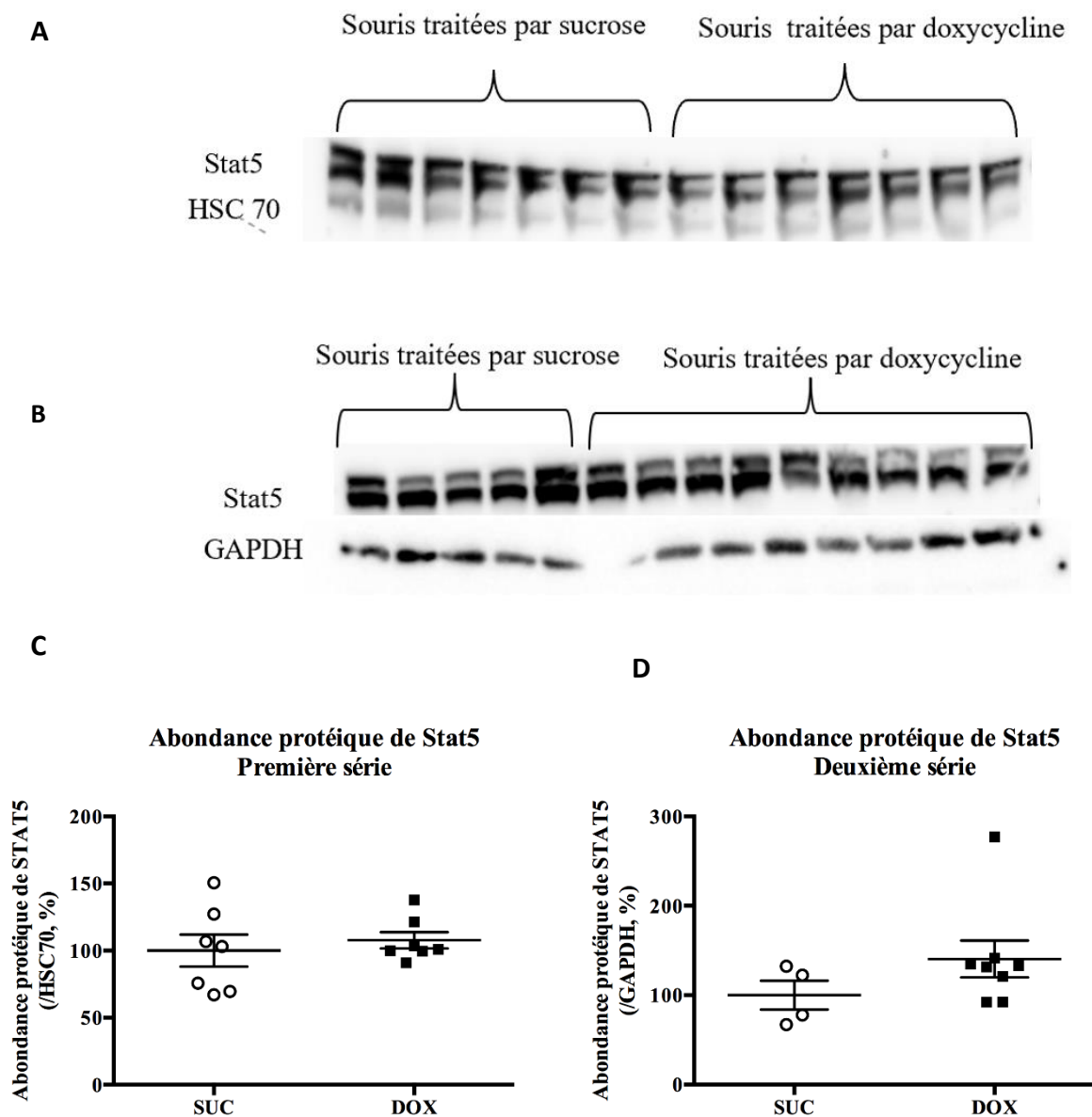


FIGURE 13 : L'expression du facteur de transcription Stat5 est équivalente chez les souris des deux groupes.

A. Western blot des protéines Stat5 (100kDa) et HSC70 (70kDa) sur extraits protéiques de reins issus des souris *Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}* de la première série, traitées par sucrose (« SUC ») ou doxycycline (« DOX »). N=7 dans chaque groupe. **B.** Western blot des protéines Stat5 et GAPDH (40 kDa) sur extraits protéiques de reins issus des souris *Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}* de la deuxième série, traitées par doxycycline (N=8) ou par sucrose (N=4). **C.** Expression relative de Stat5/HSC70. **D.** Expression relative de Stat5/GAPDH. Chaque point correspond à un échantillon et les barres représentent la moyenne \pm sem.

Face à ce résultat inattendu, nous avons alors souhaité vérifier que les différents éléments de la construction génétique étaient présents. Nous avons donc vérifié que les souris étaient bien porteuses de l'allèle *Stat5^{lox}* et des transgènes *Pax8-rtTA* et *LC1*. Pour cela, nous avons réalisé une PCR de génotypage sur les biopsies de queues de souris. Nos résultats montrent que les souris des deux groupes étaient bien porteuses de l'allèle *Stat5^{lox}* à l'état homozygote et des transgènes *Pax8-rtTA* et *LC1* (FIGURE 14).

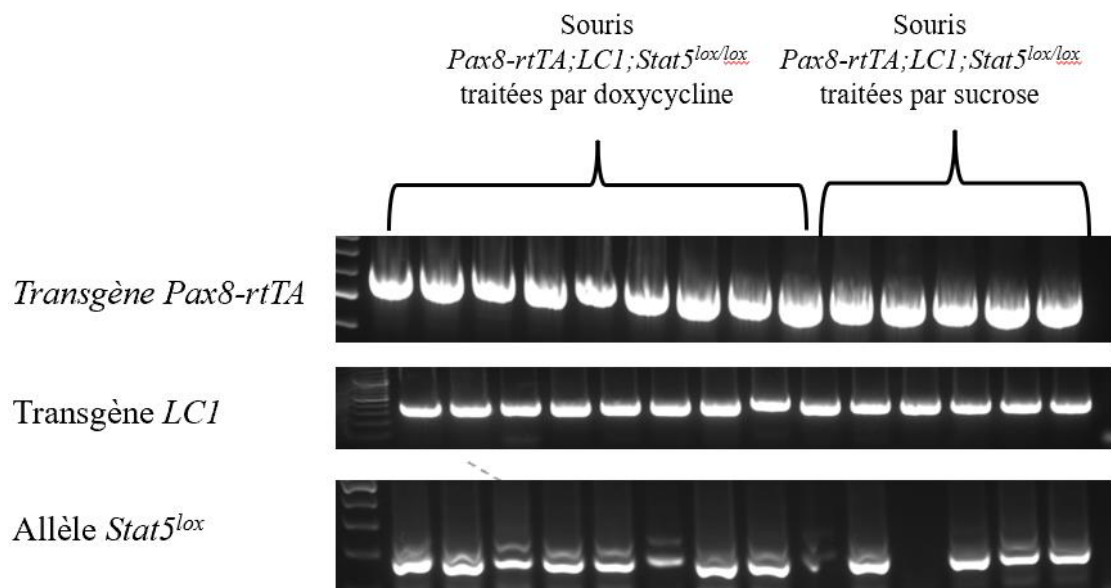


FIGURE 14 : Les souris des deux groupes sont porteuses de l'allèle *Stat5^{lox}* et des transgènes *Pax8-rtTA* et *LC1*.

PCR de génotypage de l'allèle *Stat5^{lox}* et des transgènes *Pax8-rtTA* et *LC1*, sur biopsies de queues des souris *Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}* traitées par doxycycline (N=9) ou par sucrose (N= 5). Les PCR des échantillons des puits n°9 et n°11 ont été renouvelés et montrent bien la présence de l'allèle *Stat5^{lox}*. Les résultats montrés sont représentatifs de l'ensemble des souris étudiées.

Nous avons alors vérifié que les souris induites par doxycycline étaient capables d'exprimer la recombinase Cre. Pour cela, nous avons constitué une troisième cohorte de souris *Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}* afin de caractériser l'expression du transcrit de la recombinase Cre par RT-PCR.

Dans cette 3^{ème} cohorte, 5 souris ont reçu du sucrose seul et 13 souris ont reçu de la doxycycline. Nous n'avons cette fois-ci pas réalisé de période de wash-out, car celle-ci annulerait l'expression de la Cre. Nous avons de plus sélectionné des souris d'âge différents (5 animaux âgés de 9 semaines, 4 âgés de 8 semaines, 3 âgés de 6 semaines et 5 âgés de 6 semaines). En effet, des travaux ont montré que l'efficacité de la recombinaison Cre peut varier en fonction de l'âge des animaux.

De façon surprenante, nous avons observé une expression de la recombinaison Cre dans les souris traitées par doxycycline mais également dans les souris contrôles (**FIGURE 15**). Cependant, et même si cette RT-PCR n'est pas quantitative, l'expression dans le groupe traité semble plus importante que dans le groupe contrôle.

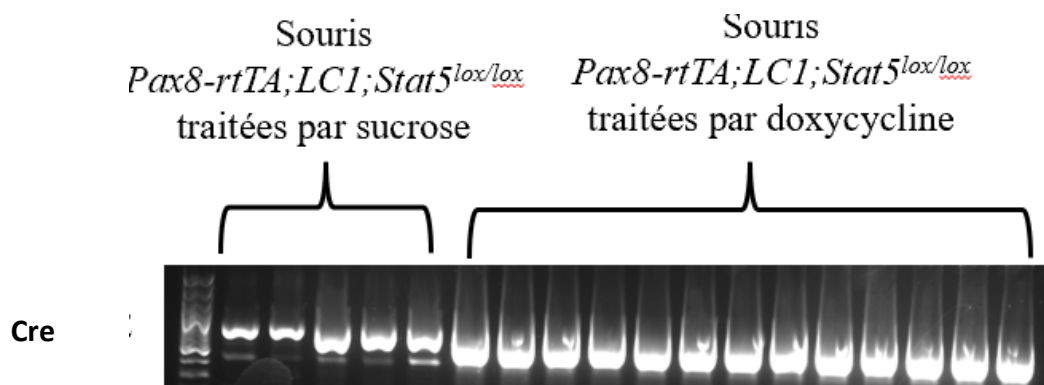


FIGURE 15 : Le transcrit de la recombinaison Cre semble présent dans les groupes de souris recevant ou non de la doxycycline.

RT-PCR de la recombinaison Cre sur rein total chez les souris Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox} traitées par sucrose (N=5) ou par doxycycline (N=13).

Face à ce résultat imprévu obtenu en **FIGURE 15**, nous avons émis l'hypothèse que l'amplification observée dans le groupe traité par sucrose était due à une contamination des ARN par de l'ADN, qui serait survenue lors de la technique de RT-PCR.

Nous avons donc effectué une PCR pour amplifier la recombinaison Cre sur les mêmes échantillons d'ARN, avec un nouveau traitement à la DNase I mais sans reverse-transcription. La PCR ne permettant d'amplifier que l'ADN, cela permettrait de mettre en évidence l'ADN contaminant.

Nos résultats montrent qu'il existe bien une contamination des échantillons d'ARN par de l'ADN génomique puisqu'une amplification est observée dans les deux groupes (**FIGURE 16**). Il est donc possible que l'amplification de la Cre observée après reverse-transcription des ARNs du groupe traité par le sucrose soit due uniquement à une amplification de l'ADN contaminant.

La validité de notre construction génétique étant remise en question, d'autres travaux sont donc nécessaires pour conclure sur le rôle de STAT5 dans l'ischémie-reperfusion chez la souris.



FIGURE 16 : Existence d'une contamination des échantillons d'ARN par de l'ADN génomique.

Réalisation d'une PCR sur les échantillons d'ARN des souris *Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}* traitées par sucrose (N=5) ou par doxycycline (N=13). Les ARN ont été traités à la DNase sans reverse-transcription.

3. *STAT5B* semble stimuler la prolifération des cellules HEK293.

En culture cellulaire, nous avons observé de manière empirique une différence de prolifération entre les 2 lignées de cellules HEK293 *STAT5B^{+/+}* et HEK293 *STAT5B^{-/-}*.

Afin de mieux mettre en évidence cette différence, nous avons ensemencé un nombre précis de cellules de chaque génotype (150 000, 200 000 et 300 000) dans chaque puit et avons pris des photographies au microscope optique à lumière blanche 24h et 48h après ensemencement (**FIGURE 17**).

A titre d'exemple, à 24h et pour un ensemencement à 150 000 cellules par puits, la confluence des cellules HEK293 *STAT5B*^{+/+} était d'environ 60% alors qu'elle n'était que d'environ 20% pour les cellules HEK293 *STAT5B*^{-/-}.

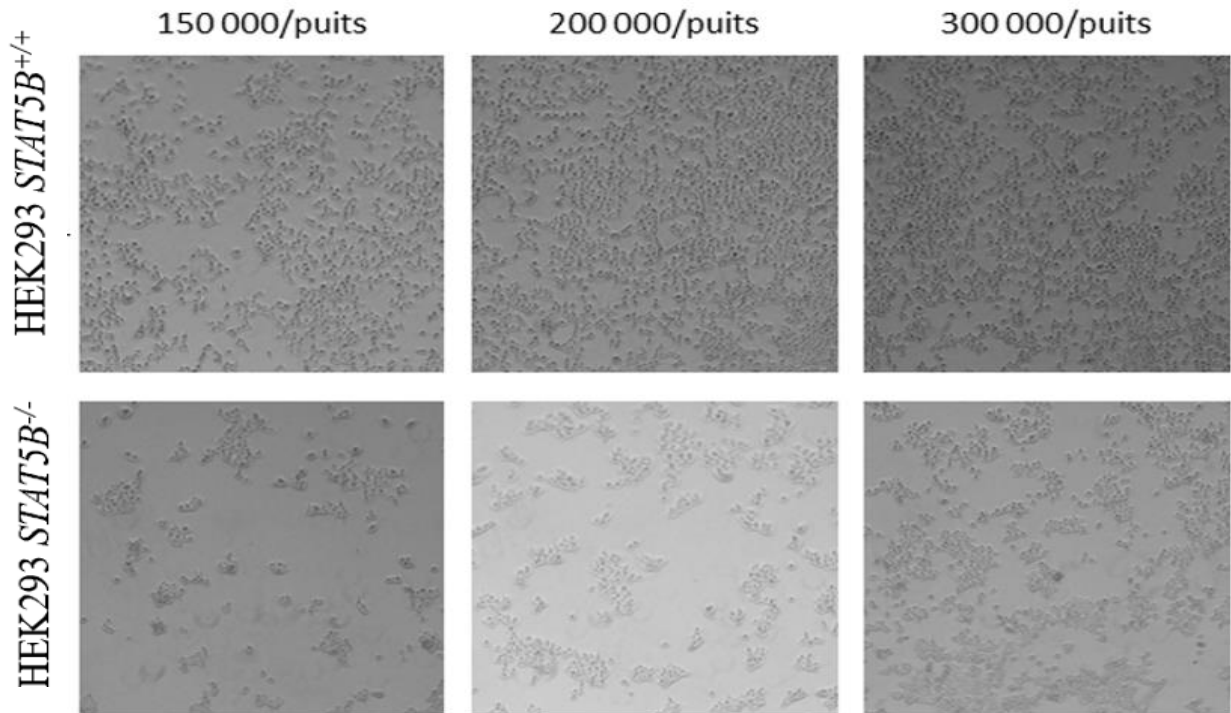


FIGURE 17 : Observation des cellules HEK *STAT5B*^{+/+} et *STAT5B*^{-/-} en microscopie optique. Observation des cellules HEK *STAT5B*^{+/+} et *STAT5B*^{-/-} en microscopie optique 24 heures après ensemencement avec le nombre de cellules indiquées. Résultats représentatifs de deux expériences indépendantes.

Afin de s'assurer que cette observation n'était pas seulement un phénomène attribuable à un effet dépendant de l'opérateur lors du processus de congélation ou de décongélation, un échantillon de cellules HEK293 *STAT5B*^{-/-} différent du premier mais issu de la même souche a été décongelé (ci-après nommé HEK *STAT5B*^{-/-}.2). Nous avons à nouveau pu constater que les cellules HEK293 *STAT5B*^{-/-}.2 prolifèrent moins vite que les cellules HEK293 *STAT5B*^{+/+} à ensemencement identique.

Afin de caractériser plus précisément ce défaut de prolifération, nous avons quantifié le pourcentage de cellules en prolifération grâce à la détection de l'incorporation de BrdU par cytométrie en flux. Pour chaque échantillon (HEK293 *STAT5*^{+/+}, HEK293 *STAT5B*^{-/-}, HEK *STAT5B*^{-/-}.2), nous avons réalisé cette quantification en duplicat. Une condition de contrôle négatif (cellules *STAT5B*^{+/+} incubées sans BrdU) a également été réalisée (**FIGURE 18**).

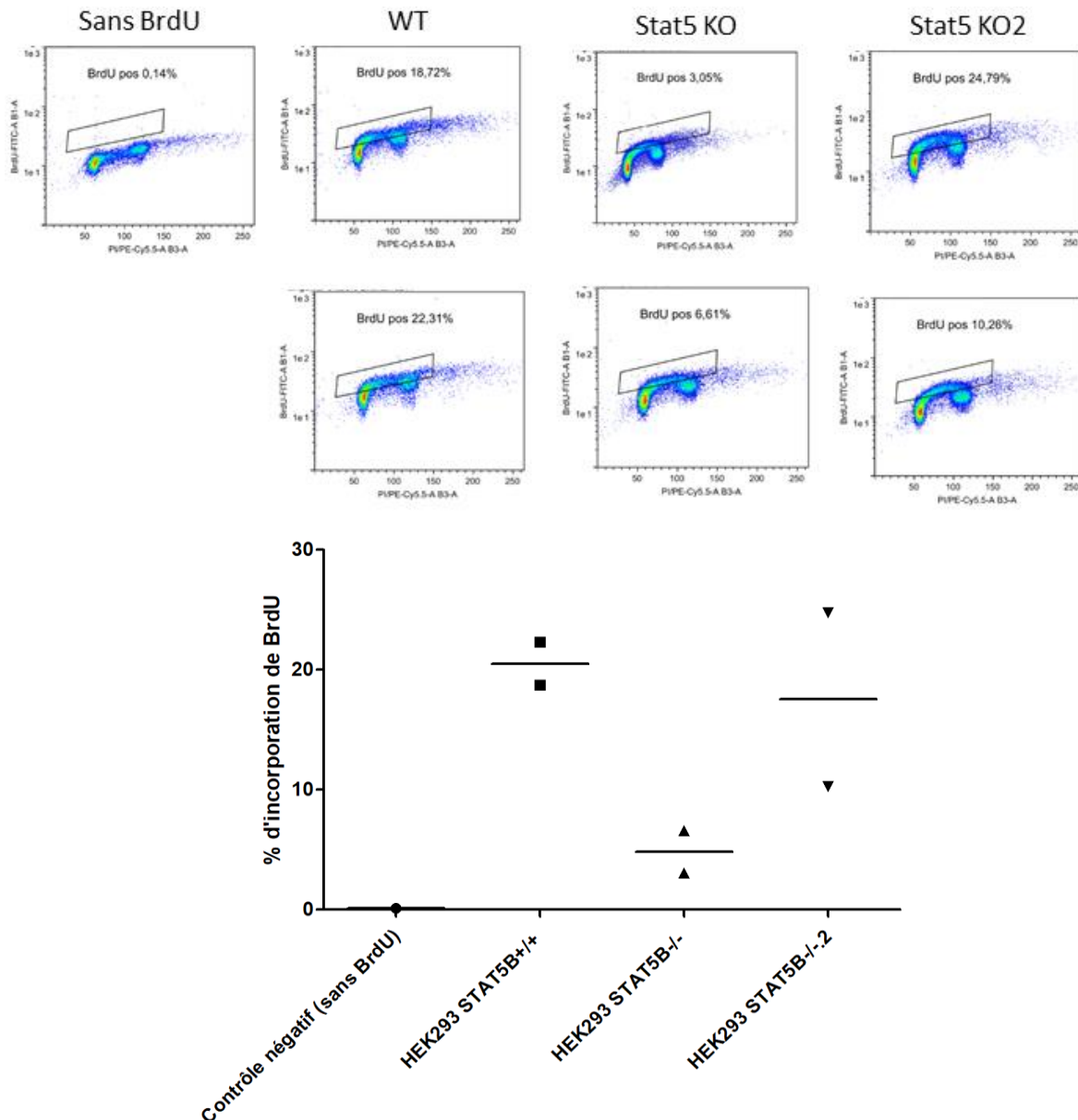


FIGURE 18 : *STAT5B* semble stimuler la prolifération des cellules HEK293.

Cytométrie en flux mesurant l'incorporation de BrdU, dans les cellules HEK293 *STAT5*^{+/+}, HEK293 *STAT5B*^{-/-} (1^{ère} décongélation) et HEK *STAT5B*^{-/-}.2 (2^{ème} décongélation). Chaque échantillon a été analysé en duplicat. Le pourcentage indiqué est celui de cellules BrdU-positives.

Nos résultats montrent que le pourcentage moyen de cellules *STAT5B*^{+/+} ayant incorporé du BrdU est 20,52%. Celui des cellules *STAT5B*^{-/-} et *STAT5B*^{-/-}.2 est 4,83% et 17,53%, respectivement. Ces résultats suggèrent donc que *STAT5B* stimule la prolifération des cellules HEK293.

4. *STAT5B* semble stimuler l'autophagie dans les cellules HEK293.

Afin de caractériser le rôle de *STAT5B* sur l'activité autophagique des cellules HEK293, nous avons quantifié l'expression de LC3-II par western blot dans les différentes lignées cellulaires sous l'effet d'un activateur de l'autophagie (jeûne par incubation en milieu EBSS), d'un inhibiteur de la formation des autolysosomes (chloroquine), et sous l'action conjointe de ces deux traitements.

La protéine LC3 (light chain complex 3) est une protéine de 17kDa. La forme cytosolique de LC3 (LC3-I) se conjugue à la phosphatidyl-éthanolamine pour former LC3-II recrutée à la membrane de l'autophagosome. LC3-I et LC3-II sont détectées par 2 bandes distinctes. L'intensité de la bande LC3-II reflète l'activité autophagique (28).

Comme attendu, l'abondance de LC3-II augmente après incubation dans de l'EBSS ou en présence de CQ dans les cellules *STAT5B*^{+/+}. En revanche, les cellules *STAT5B*^{-/-}.2 présentent une augmentation de l'abondance de LC3-II sous chloroquine mais pas sous EBSS (**FIGURE 19A-C**). Ce résultat suggère donc que l'absence de *STAT5* est un frein à l'activation de l'autophagie.

La même expérience a été donc été menée en utilisant les cellules HEK293 *STAT5B*^{-/-} issues de l'autre décongélation, afin de voir si l'on obtenait des résultats similaires.

De façon surprenante, ces cellules présentent cette fois-ci une augmentation de l'expression de LC3II en présence d'EBSS comparable à celle observée pour les cellules *STAT5B*^{+/+} (**FIGURE 19B-D**).

Des expériences complémentaires sont donc nécessaires pour conclure sur le rôle de *STAT5B* dans la régulation du flux autophagique.

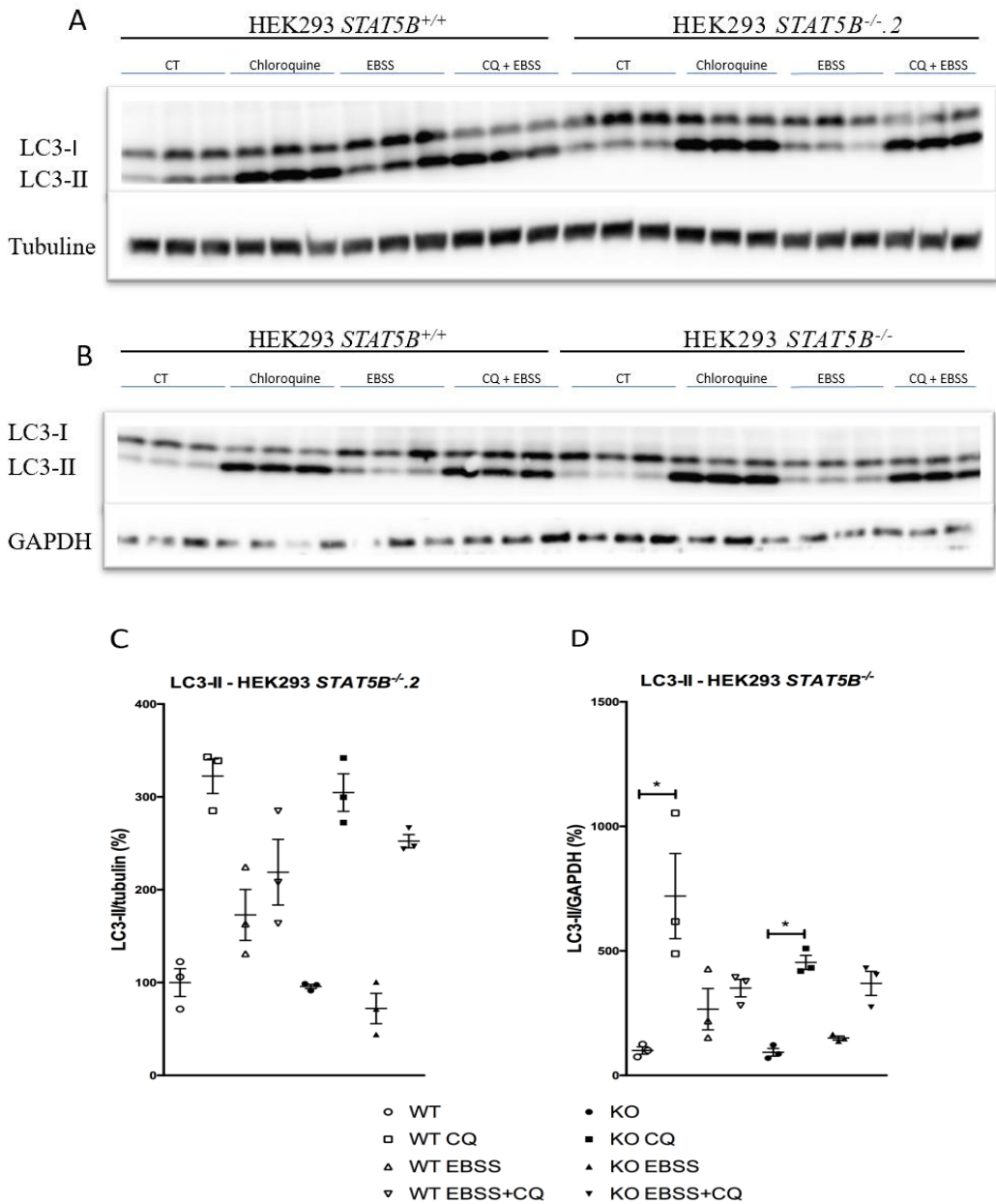


FIGURE 19 : Conséquences de l'inactivation de *STAT5B* dans les cellules HEK293 sur le flux autophagique.

A. Western blot des protéines LC3-I, LC3-II (17 et 15kDa, respectivement) et tubuline (50kDa) sur extraits protéiques des cellules HEK293 *STAT5*^{+/+} et HEK 293 *STAT5B*^{-/-}.2, en condition contrôle (CT), de jeûne (EBSS), inhibition de l'autophagie (CQ) ou les deux.

B. WB des protéines LC3-II et GAPDH (40kDa) dans les cellules HEK293 *STAT5*^{+/+} et HEK293 *STAT5B*^{-/-} dans les mêmes conditions. **C.** Abondance relative de LC3-II/Tubuline. **D.** Abondance relative de LC3-II/GAPDH. Chaque point correspond à un échantillon et les barres représentent la moyenne \pm sem. * $p < 0,05$ Analyse de variance de Kruskal-Wallis, suivie de tests de comparaisons multiples de Dunn.

IV. DISCUSSION

Le premier objectif de mon projet a été de tester le rôle protecteur de STAT5 dans un modèle d'insuffisance rénale aiguë tubulaire, l'ischémie-reperfusion (IR). Pour cela, j'ai utilisé des souris porteuses d'une inactivation de *Stat5* spécifique de l'épithélium tubulaire et inducible par la doxycycline (*Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}*). Un groupe de souris a été traité par doxycycline. L'autre groupe de souris a été traité par sucrose seul, servant de contrôle. L'ischémie-reperfusion a été induite par néphrectomie du rein droit suivie du clampage de l'artère rénale gauche. A 24h du sacrifice, j'ai effectué une analyse de la fonction rénale par dosage d'urée et de créatinine plasmatique et une analyse histologique.

Le deuxième objectif de mon projet a été de caractériser le rôle de STAT5B dans la régulation de l'autophagie. J'ai pour cela utilisé des cellules embryonnaires humaines de rein de la lignée HEK293, sauvages ou porteuses d'une délétion spécifique de *STAT5B* obtenue grâce au système CRISPR-Cas9. J'ai effectué une étude d'incorporation du BrdU par cytométrie de flux. J'ai ensuite étudié l'activité autophagique des cellules en les traitant par un inhibiteur de l'autophagie (la chloroquine) et un activateur de l'autophagie (le milieu de jeûne EBSS). J'ai étudié par western-blot l'abondance de LC3-II, reflet de l'activité autophagique.

Nous n'avons pas mis en évidence de rôle protecteur de STAT5 dans l'insuffisance rénale aiguë induite par ischémie-reperfusion chez les souris *Pax8;LC1;Stat5^{lox/lox}*. Cependant, nos résultats montrent également que l'expression de *Stat5* n'est pas diminuée chez les souris traitées par doxycycline. *In vitro*, mes travaux ont mis en évidence une incorporation plus faible du BrdU dans les cellules HEK293 *STAT5B^{-/-}* comparées aux HEK293 *STAT5B^{+/+}*, ce qui suggère que *STAT5B* favorise la prolifération cellulaire dans les cellules HEK293. De plus, l'étude du flux autophagique montre que *STAT5B* pourrait stimuler l'autophagie.

La force de notre travail résidait dans l'utilisation de souris transgéniques porteuses d'une inactivation inducible de *Stat5* et spécifique de l'épithélium tubulaire. Notre modèle génétique murin est cependant remis en question et ne permet pas de conclure formellement sur le rôle de STAT5 dans l'ischémie-reperfusion.

En effet, nos western blots montrent que l'expression protéique de STAT5 est identique dans les groupes de souris traitées ou non par doxycycline. La PCR de génotypage sur queues de souris a cependant confirmé que les souris étaient bien porteuses des transgènes *Pax8-rtTA* et *LC1* ainsi que de l'allèle *Stat5^{lox}*.

Nous avons formulé plusieurs hypothèses pouvant expliquer ce résultat.

Une première hypothèse est qu'il peut exister une méthylation des transgènes *Pax8-rtTA* ou *LC1* au fur et à mesure des générations de souris, pouvant conduire à une baisse ou une perte de l'expression de la recombinaise Cre (41). En effet, les souris *Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}* ont été générées par de précédents étudiants en Master dans le laboratoire plusieurs mois auparavant. A ce moment-là, ils avaient pu mettre en évidence une diminution de l'expression de Stat5 après administration de doxycycline. Cette observation est donc en faveur de cette première hypothèse.

Nous avons donc vérifié l'expression de la recombinaise Cre dans nos groupes de souris par RT-PCR, qui a montré une expression de la Cre non seulement dans le groupe recevant de la doxycycline mais également dans celui ne recevant que du sucrose.

Cela amène à deux nouvelles hypothèses : ce résultat peut être dû soit à une expression constitutive de la recombinaise Cre chez les souris *Pax8;LC1;Stat5^{lox/lox}*, indépendante de la présence de doxycycline (ce qui n'a pas été décrit dans la littérature), soit à une contamination des échantillons d'ARN par de l'ADN génomique, et ce malgré le traitement par la DNase I.

Le résultat de la **Figure 9** montre qu'il existe effectivement une contamination par de l'ADN. Ceci montre que la RT-PCR peut difficilement être utilisée pour quantifier l'expression de la Cre dans nos échantillons d'ARN. Nous avons donc essayé de mettre en évidence la recombinaise Cre par d'autres techniques. Nous avons tenté de réaliser des analyses en immunofluorescence et en immunohistochimie avec un anticorps dirigé contre la Cre, mais nous n'avons pas réussi à obtenir de signal, malgré l'utilisation de différents protocoles de laboratoire. L'expression correcte de la recombinaise Cre dans le néphron uniquement après administration de doxycycline reste donc à confirmer.

Une autre hypothèse est qu'il existe des variations d'efficacité de la recombinaise Cre en fonction de l'âge des souris. En effet, les travaux de l'équipe d'Edith Hummler (Université de Lausanne, Suisse) indiquent que l'inactivation du gène codant la sous-unité α du canal ENaC induite par la doxycycline dans le tubule rénal à l'aide des transgènes *Pax8-rtTA* et *LC1* est efficace chez des souris de 3 semaines mais pas chez des souris âgées de plus de 6 semaines (Edith Hummler, communication personnelle). Ceci a motivé notre volonté d'utiliser des souris d'âge différent dans la 3^{ème} cohorte de souris. Nous avons en effet administré de la doxycycline à des souris âgées de 3-4 semaines ou 2 mois. Une perspective serait de mesurer l'expression de Stat5 dans ces différents groupes de souris.

Le western blot Stat5 a été réalisé sur extrait de rein total et n'est donc pas représentatif de l'expression de Stat5 dans l'épithélium tubulaire. Nous avons réalisé d'autres expériences pour déterminer l'expression de Stat5 spécifiquement dans le tubule des souris. Nous avons tenté de réaliser un immunomarquage de Stat5 sur coupe de reins de souris. Nous avons testé plusieurs anticorps dirigés contre les deux isoformes de Stat5, phosphorylées ou non. Les résultats ne sont cependant pas concluants. Nous avons également essayé de mettre en évidence Stat5 par immunofluorescence, selon différents protocoles, sans succès non plus. Une autre possibilité serait de réaliser un western blot de Stat5 sur tubules proximaux microdisséqués ou cellules tubulaires proximales isolées.

Plusieurs techniques existent pour induire une ischémie-reperfusion chez la souris. Un clampage bilatéral des pédicules rénaux peut être effectué, mais des travaux ont montré que cela augmentait fortement la variabilité pour une même expérience (42). L'ischémie unilatérale précédée de la néphrectomie contralatérale permet d'obtenir une meilleure reproductibilité des résultats et d'utiliser le rein droit comme contrôle négatif de l'expérience. Notre première série d'expérience réalisée avec un clampage de 30 minutes montrait que cette durée d'ischémie était trop importante puisqu'elle a induit des lésions très sévères. Cette sévérité très importante a pu masquer les effets de l'inactivation de STAT5 puisque nous nous attendions à une aggravation des lésions induites par l'ischémie en absence de STAT5.

Dans la littérature, il n'existe pas de durée parfaitement définie pour la durée du clampage (42). Chaque expérimentateur doit définir ses propres conditions expérimentales. En effet, le temps nécessaire pour obtenir des lésions significatives varie en fonction du fond génétique, de la lignée, de l'âge et du sexe de la souris. Par exemple, pour des souris mâles Balb/c âgées de 8 semaines, une augmentation de la sévérité de l'atteinte rénale est évidente dès une augmentation de la durée d'ischémie de 2 minutes (43).

Notre groupe contrôle était constitué de souris *Pax8;LC1;Stat5^{lox/lox}* qui ont reçu du sucre seul. Ceci induit l'inconvénient qu'un groupe de souris est exposé à la doxycycline mais pas l'autre. On ne peut donc théoriquement pas exclure un effet propre de la doxycycline dans nos résultats. Un autre groupe contrôle possible aurait été constitué de souris de la lignée *Stat5^{lox/lox}* qui auraient également reçus de la doxycycline ; ainsi les deux groupes auraient été exposés au traitement.

Cependant, les concentrations de doxycycline utilisées sont faibles et ne sont pas sensées induire de phénotype rénal (38).

Mes résultats suggèrent que STAT5B pourrait stimuler la prolifération des cellules HEK293. En effet, les expériences *in vitro* ont mis en évidence une incorporation plus faible du BrdU dans les cellules HEK293 *STAT5B*^{-/-} comparées aux HEK293 *STAT5B*^{+/+}, ce qui suggère que STAT5B favorise la prolifération cellulaire dans les cellules HEK293.

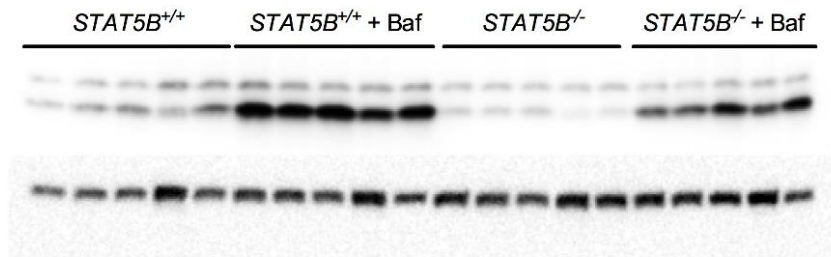
Ces résultats sont en accord avec les travaux de Fragiadaki, qui ont montré l'implication de STAT5 dans la prolifération des cellules tubulaires, dans le contexte de la polykystose rénale autosomique dominante (26). En effet, STAT5 est activé dans les cellules épithéliales qui bordent les kystes et stimule la transcription du gène codant la Cycline D1. STAT5 pourrait donc jouer un rôle dans la prolifération des cellulaires tubulaires lors de la formation des kystes, en aval de l'hormone de croissance, dont la sécrétion est anormalement augmentée chez les patients polykystiques.

A la suite d'une insuffisance rénale aiguë, comme l'a montré l'équipe de Humphreys (17), il existe une stimulation de la prolifération des cellules tubulaires proximales qui participe à la réparation de l'épithélium. Le rôle pro-prolifératif de STAT5B, néfaste dans le contexte de la polykystose, pourrait donc favoriser la réparation de l'épithélium lors d'une insuffisance rénale aiguë. Cette prolifération pourrait donc être protectrice dans le cadre d'une insuffisance rénale aiguë d'origine tubulaire. Cette hypothèse, qui ne faisait pas partie des hypothèses de départ lors de la préparation de notre projet, sera à explorer par des expériences supplémentaires.

Nous avons obtenu ici des résultats discordants sur le rôle de STAT5 dans la régulation de l'autophagie.

Suite à mon départ, l'équipe d'accueil a pu obtenir des données *in vivo* pour compléter les résultats *in vitro* sur le rôle stimulateur de Stat5 sur l'autophagie, grâce à des extraits de souris *Stat5*^{+/+} et *Stat5*^{-/-} soumises à un modèle murin de néphropathie à l'adriamycine et traitées ou non par Interleukine 15 : l'expression de LC3II augmente d'avantage chez les souris mutantes que chez les souris sauvages. Cela suggère que l'administration d'interleukine 15 permet de restaurer l'autophagie, via une activation de Stat5.

A



B

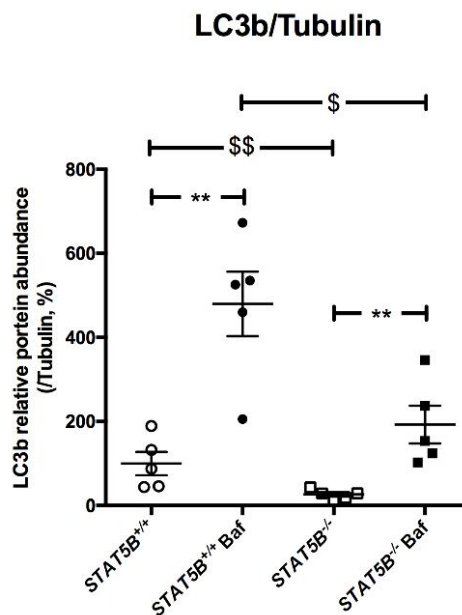


FIGURE 20 : Conséquences de l'administration d'interleukine 15 sur la régulation de l'autophagie

A. Western blot sur extrait de rein total des protéines LC3a, LC3b (17 et 15kDa, respectivement) et tubuline (50kDa) sur extraits protéiques des souris *STAT5^{+/+}* et *STAT5^{-/-}* porteuses d'une néphropathie à l'adriamycine et traitées ou non par Interleukine 15 (Baf) : l'expression de LC3b augmente d'avantage chez les souris mutantes que chez les souris sauvages. **B.** Expression relative des expressions de LC3b et tubuline dans les différents groupes.

Nos travaux suggèrent un rôle protecteur de STAT5. Dans le podocyte, le rôle de STAT3 a été d'avantage étudié, avec mise en évidence d'un rôle délétère, comme dans la néphropathie diabétique, la néphropathie induite par le VIH et le modèle murin de glomérulonéphrite toxique (21). Il pourrait donc exister au niveau podocytaire une balance STAT5/STAT3, STAT5 étant protecteur et STAT3 délétère.

Cette balance STAT5/STAT3 est décrite dans les cellules immunitaires. En effet, lors du développement lymphocytaire, les deux isoformes de STAT5 participent à la différenciation et à la survie des lymphocytes T régulateurs. De plus, STAT5 inhibe la différenciation du lymphocyte Th17. Pour rappel, le lymphocyte Th17 est un élément clé de l'inflammation locale, agissant grâce à l'action de cytokines pro-inflammatoires qu'il sécrète (44). Son rôle est impliqué dans le développement de maladies inflammatoires comme le psoriasis, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou la polyarthrite rhumatoïde (45). A l'inverse, STAT3 est indispensable à la différenciation des lymphocytes Th17 et inhibe la différenciation des lymphocytes T régulateurs.

Le rôle protecteur de STAT5 pourrait passer par différents mécanismes en cas d'agression glomérulaire. Les expériences réalisées ici montrent que STAT5 pourrait induire une activation de l'autophagie. Des travaux effectués par le laboratoire d'accueil suggèrent que STAT5 pourrait réguler des voies métaboliques en modulant le stress oxydatif. STAT5 pourrait également induire l'activation directe de voies anti-apoptotiques comme Bcl2 ou Bclxl et inhiber l'activité de STAT3.

Le facteur de transcription STAT5 peut être activé par l'IL15, via sa liaison à la sous-unité γ C. Si nous confirmons le rôle protecteur de STAT5 dans l'insuffisance rénale aiguë, nous pourrions répéter les expériences d'administration d'interleukine 15 chez la souris.

L'équipe du laboratoire a déjà pu mettre en évidence que l'administration d'IL15 chez la souris a un rôle protecteur au niveau rénal. L'agoniste de l'IL15 ou ALT803 est déjà commercialisé et est en cours d'étude dans le domaine de l'oncologie. Dans nos résultats préliminaires, l'injection d'IL15 est associée au développement d'une splénomégalie chez la souris. Nous pourrions alors déterminer la dose minimale d'interleukine 15 à administrer dans différents modèles de néphropathies pour limiter les effets sur le système immunitaire.

Une meilleure connaissance des mécanismes de survie de l'épithélium rénal peut conduire au développement de thérapies ciblées permettant de réduire la gravité des lésions et donc le pronostic. Les agonistes de ces voies de survie comme l'IL-15 ou d'autres dans le futur pourraient avoir un effet bénéfique dans diverses pathologies rénales impliquant l'épithélium glomérulaire ou tubulaire.

V. CONCLUSIONS SIGNÉES

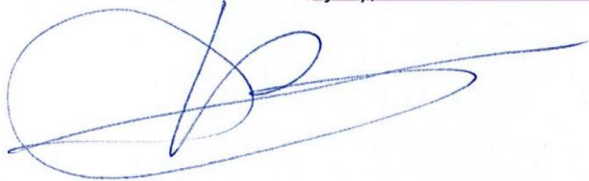
Le facteur de transcription STAT5 existe sous deux isoformes STAT5A et STAT5B. Notre équipe a pu montrer qu'il existe une activation de STAT5B dans les glomérulopathies chez l'Homme et la souris, qui exerce un rôle protecteur. Cette activation a également été observée dans les tubules proximaux en conditions pathologiques. Le rôle protecteur de STAT5 pourrait être lié à une activation de l'autophagie.

Le premier objectif de mon projet a été de tester le rôle protecteur de STAT5 dans un modèle d'insuffisance rénale aiguë tubulaire, l'ischémie-reperfusion. Pour cela, j'ai utilisé des souris porteuses d'une inactivation de *Stat5* spécifique de l'épithélium tubulaire et inducible par la doxycycline (*Pax8-rtTA;LC1;Stat5^{lox/lox}*). Le deuxième objectif de mon projet a été de caractériser le rôle de STAT5B dans la régulation de l'autophagie. J'ai pour cela utilisé des cellules embryonnaires humaines de rein (lignée HEK293), sauvages ou porteuses d'une délétion spécifique de *STAT5B* obtenue grâce au système CRISPR-Cas9.

Mes résultats montrent que 24h après ischémie, la fonction et la structure rénales sont affectées de façon équivalente dans les souris porteuses d'une délétion de *Stat5* et les souris contrôles. Cependant, nos résultats montrent également que l'expression de *Stat5* n'est pas diminuée dans les souris traitées par doxycycline, remettant en cause la validité de notre modèle d'étude. De plus, *in vivo*, STAT5 stimule la prolifération cellulaire et pourrait stimuler l'autophagie.

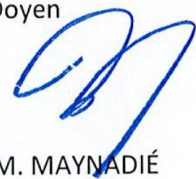
En conclusion, l'hypothèse d'un rôle protecteur de STAT5 dans l'insuffisance rénale aiguë est à confirmer par des expériences supplémentaires.

Le Président du jury,



Professeur Jean-Michel REBIBOU

Vu et permis d'imprimer
Dijon, le 26 Août 2024
Le Doyen



Pr. M. MAYNADIÉ

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. Nathalie P. Guide du parcours de soins – Maladie rénale chronique de l'adulte (MRC). 2021;85.
2. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int.* juill 2011;80(1):17-28.
3. Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clin Pract.* 2012;120(4):c179-184.
4. Smeets B, Moeller MJ. Parietal epithelial cells and podocytes in glomerular diseases. *Semin Nephrol.* juill 2012;32(4):357-67.
5. Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. Acute kidney injury. *Lancet.* 23 nov 2019;394(10212):1949-64.
6. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* nov 2011;121(11):4210-21.
7. Lameire NH, Levin A, Kellum JA, Cheung M, Jadoul M, Winkelmayer WC, et al. Harmonizing acute and chronic kidney disease definition and classification: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. *Kidney Int.* sept 2021;100(3):516-26.
8. Hoste EAJ, Kellum JA, Selby NM, Zarbock A, Palevsky PM, Bagshaw SM, et al. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* oct 2018;14(10):607-25.
9. Ronco F, Tarantini G, McCullough PA. Contrast induced acute kidney injury in interventional cardiology: an update and key guidance for clinicians. *Rev Cardiovasc Med.* 30 mars 2020;21(1):9-23.
10. Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol.* nov 2005;16(11):3365-70.
11. Clec'h C, Gonzalez F, Lautrette A, Nguile-Makao M, Garrouste-Orgeas M, Jamali S, et al. Multiple-center evaluation of mortality associated with acute kidney injury in critically ill patients: a competing risks analysis. *Crit Care.* 2011;15(3):R128.
12. Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N Engl J Med.* 3 juill 2014;371(1):58-66.
13. Hsu CY, McCulloch CE, Fan D, Ordoñez JD, Chertow GM, Go AS. Community-based incidence of acute renal failure. *Kidney Int.* juill 2007;72(2):208-12.

14. Fiches sur les pathologies [Internet]. [cité 13 août 2021]. Disponible sur: <https://assurance-maladie.ameli.fr/etudes-et-donnees/entree-par-theme/pathologies/cartographie-assurance-maladie/donnees/fiches-pathologies/fiches-pathologies>
15. Thierry A, Séverac F, Hannedouche T, Couchoud C, Do VH, Tiple A, et al. Survival advantage of planned haemodialysis over peritoneal dialysis: a cohort study. *Nephrol Dial Transplant*. 1 août 2018;33(8):1411-9.
16. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. juin 2006;17(6):1503-20.
17. Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, Mugford JW, Soeung S, Duffield JS, et al. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell*. 6 mars 2008;2(3):284-91.
18. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*. nov 2003;3(11):900-11.
19. Berthier CC, Zhang H, Schin M, Henger A, Nelson RG, Yee B, et al. Enhanced expression of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway members in human diabetic nephropathy. *Diabetes*. févr 2009;58(2):469-77.
20. Gu L, Dai Y, Xu J, Mallipattu S, Kaufman L, Klotman PE, et al. Deletion of podocyte STAT3 mitigates the entire spectrum of HIV-1-associated nephropathy. *AIDS*. 24 avr 2013;27(7):1091-8.
21. Pace J, Paladugu P, Das B, He JC, Mallipattu SK. Targeting STAT3 signaling in kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1 juin 2019;316(6):F1151-61.
22. Leonard WJ, Lin JX, O'Shea JJ. The γ c Family of Cytokines: Basic Biology to Therapeutic Ramifications. *Immunity*. 16 avr 2019;50(4):832-50.
23. Luque Y, Cathelin D, Vandermeersch S, Xu X, Sohier J, Placier S, et al. Glomerular common gamma chain confers B- and T-cell-independent protection against glomerulonephritis. *Kidney Int*. mai 2017;91(5):1146-58.
24. Grimley PM, Dong F, Rui H. Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine Growth Factor Rev*. juin 1999;10(2):131-57.
25. Shinozaki M, Hirahashi J, Lebedeva T, Liew FY, Salant DJ, Maron R, et al. IL-15, a survival factor for kidney epithelial cells, counteracts apoptosis and inflammation during nephritis. *J Clin Invest*. avr 2002;109(7):951-60.
26. Fragiadaki M, Lannoy M, Themanns M, Maurer B, Leonhard WN, Peters DJM, et al. STAT5 drives abnormal proliferation in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*. mars 2017;91(3):575-86.

27. Viau A, Baaziz M, Aka A, Mazloun M, Nguyen C, Kuehn EW, et al. Tubular STAT3 Limits Renal Inflammation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* mai 2020;31(5):1035-49.
28. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 5 févr 2010;140(3):313-26.
29. Kaushal GP, Shah SV. Autophagy in acute kidney injury. *Kidney Int.* avr 2016;89(4):779-91.
30. Decuypere JP, Ceulemans LJ, Agostinis P, Monbaliu D, Naesens M, Pirenne J, et al. Autophagy and the Kidney: Implications for Ischemia-Reperfusion Injury and Therapy. *Am J Kidney Dis.* oct 2015;66(4):699-709.
31. Musiwaro P, Smith M, Manifava M, Walker SA, Ktistakis NT. Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells. *Autophagy.* sept 2013;9(9):1407-17.
32. Yi M, Zhang L, Liu Y, Livingston MJ, Chen JK, Nahman NS, et al. Autophagy is activated to protect against podocyte injury in adriamycin-induced nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1 juill 2017;313(1):F74-84.
33. Liu S, Hartleben B, Kretz O, Wiech T, Igarashi P, Mizushima N, et al. Autophagy plays a critical role in kidney tubule maintenance, aging and ischemia-reperfusion injury. *Autophagy.* 1 mai 2012;8(5):826-37.
34. Jiang M, Wei Q, Dong G, Komatsu M, Su Y, Dong Z. Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury. *Kidney Int.* déc 2012;82(12):1271-83.
35. Shi M, Yang S, Zhu X, Sun D, Sun D, Jiang X, et al. The RAGE/STAT5/autophagy axis regulates senescence in mesangial cells. *Cell Signal.* oct 2019;62:109334.
36. Sauer B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods.* avr 1998;14(4):381-92.
37. Das AT, Tenenbaum L, Berkhout B. Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Curr Gene Ther.* 2016;16(3):156-67.
38. Traykova-Brauch M, Schönig K, Greiner O, Miloud T, Jauch A, Bode M, et al. An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice. *Nat Med.* sept 2008;14(9):979-84.
39. Schönig K, Schwenk F, Rajewsky K, Bujard H. Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo. *Nucleic Acids Res.* 1 déc 2002;30(23):e134.
40. Lee SH, Choi J, Kim H, Lee DH, Roh GS, Kim HJ, et al. FK506 reduces calpain-regulated calcineurin activity in both the cytoplasm and the nucleus. *Anat Cell Biol.* juin 2014;47(2):91-100.

41. Verkest A, Bourout S, Debaveye J, Reynaert K, Saey B, den Brande IV, et al. Impact of differential DNA methylation on transgene expression in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) events generated by targeted sequence insertion. *Plant Biotechnol J.* juill 2019;17(7):1236-47.
42. Shiva N, Sharma N, Kulkarni YA, Mulay SR, Gaikwad AB. Renal ischemia/reperfusion injury: An insight on in vitro and in vivo models. *Life Sci.* 1 sept 2020;256:117860.
43. Hesketh EE, Czopek A, Clay M, Borthwick G, Ferenbach D, Kluth D, et al. Renal ischaemia reperfusion injury: a mouse model of injury and regeneration. *J Vis Exp.* 7 juin 2014;(88).
44. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* nov 2005;6(11):1133-41.
45. Zambrano-Zaragoza JF, Romo-Martínez EJ, Durán-Avelar M de J, García-Magallanes N, Vibanco-Pérez N. Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. *Int J Inflam.* 2014;2014:651503.

TITRE DE LA THESE : Caractérisation du rôle du facteur de transcription STAT5 dans l'Insuffisance rénale aiguë

AUTEUR : KADIATOU BALDET

Introduction : Le facteur de transcription STAT5 existe sous deux isoformes STAT5A et STAT5B. Il peut être activé par l'interleukine 15, via la sous-unité γC commune aux récepteurs aux interleukines. L'équipe du laboratoire a pu montrer qu'il existe une activation de STAT5 chez l'Homme dans la hyalinose segmentaire et focale et dans la nécrose tubulaire aiguë. De plus, il existe une activation protectrice de STAT5 dans 2 modèles murins de glomérulopathies et dans un modèle murin de néphropathie à la cisplatine. Le rôle protecteur de STAT5 pourrait être lié à une activation de l'autophagie, permettant ainsi l'élimination d'éléments oxydés ou ubiquitinés.

Objectifs : Déterminer le rôle de STAT5 au cours d'une insuffisance rénale aiguë induite par ischémie-reperfusion chez la souris et dans la régulation de l'autophagie.

Méthodes : *In vivo*, j'ai utilisé un modèle murin d'inactivation de Stat5 spécifique de l'épithélium tubulaire et inducible par la doxycycline. L'insuffisance rénale aiguë a été induite par clampage de l'artère rénale précédée d'une néphrectomie controlatérale. *In vitro*, j'ai utilisé des cellules embryonnaires humaines de rein (lignée HEK293), sauvages ou porteuses d'une délétion spécifique de STAT5B obtenue grâce au système CRISPR-Cas9.

Résultats : 24h après ischémie, la fonction et la structure rénales sont affectées de façon équivalente dans les souris porteuses d'une délétion de Stat5 et les souris contrôles. Cependant, nos résultats montrent également que l'expression de Stat5 n'est pas diminuée chez les souris traitées par doxycycline, remettant en cause la fiabilité de notre construction génétique. De plus, STAT5 joue un rôle dans la prolifération cellulaire et l'autophagie.

Conclusion : L'hypothèse d'un rôle protecteur de STAT5 dans l'insuffisance rénale aiguë ischémique est à confirmer par des expériences supplémentaires. Si ce rôle est confirmé, l'utilisation d'agonistes de cette voie comme l'interleukine 15 pourrait avoir un effet bénéfique dans diverses pathologies rénales impliquant l'épithélium glomérulaire ou tubulaire.

MOTS-CLES : STAT5, insuffisance rénale aiguë, ischémie-reperfusion, autophagie