



- Déshydratation, NF- κ B et COX2: mécanisme de survie des cellules interstitielles de la médulla rénale

Résumé

Le groupe de Matthew Breyer (Université Vanderbilt, Nashville, Tennessee, Etats-Unis), qui depuis plus de vingt ans se consacre à l'étude des prostaglandines rénales, vient d'apporter de nouveaux éléments concernant le rôle de ces prostaglandines dans la protection de certaines cellules rénales contre l'hypertonie.¹ On sait que le rein des mammifères possède la capacité de produire une urine d'osmolalité supérieure à celle du milieu intérieur (de deux à quinze fois supérieure selon les espèces), une adaptation importante pour la conservation de l'eau chez les mammifères terrestres ou marins. Cette concentration de l'urine dépend de l'action de l'hormone antidiurétique (ADH) sur la perméabilité à l'eau des canaux collecteurs, mais est également tributaire de l'accumulation dans la zone médullaire du rein de solutés (essentiellement le sodium et l'urée) à des concentrations très supérieures à celles du milieu intérieur. Toutes les cellules de la médulla rénale sont donc soumises à « stress » hyperosmotique dont l'intensité varie en fonction de l'état d'hydratation de l'organisme. Les cellules de cette région du rein ont développé des mécanismes de résistance à ce stress basés sur l'augmentation de la concentration intracellulaire d'osmolytes organiques (glycéro-phosphatidylcholine, bétaïne, inositol et sorbitol).² Plusieurs gènes codant pour des enzymes ou des transporteurs permettant la synthèse locale ou l'entrée dans les cellules de ces osmolytes sont activés par une augmentation de la pression osmotique ambiante, précédés par l'activation de gènes de la famille des MAP kinases. D'autre part, on sait que les prostaglandines participent aussi à cette adaptation à l'hypertonie.

L'article de Hao et coll. concerne plus particulièrement la signification fonctionnelle et les mécanismes responsables de l'induction de la cyclooxygénase 2 (COX2), l'une des deux enzymes jouant un rôle limitant dans la synthèse des prostaglandines, dans le maintien de l'intégrité cellulaire des cellules interstitielles de la médulla rénale (RMIC) face à un stress osmotique. Les auteurs ont utilisé plusieurs approches expérimentales in vivo et in vitro chez deux espèces différentes (lapin et souris).

Dans les études sur l'animal entier, ils comparent les effets d'une suppression totale des apports hydriques (pendant 72 heures chez le lapin et 24 heures chez la souris) à ceux d'une prise hydrique augmentée, obtenue en offrant aux animaux de

l'eau additionnée de glucose à 5%. La déshydratation augmente l'expression de l'ARNm de COX2 dans la médulla rénale (x 2 chez le lapin et x 5 chez la souris), cette expression étant évaluée par essai de protection de la ribonucléase. Aucun effet n'est détecté sur l'ARNm de COX1. L'hybridation in situ montre que, dans la médulla interne, COX2 est localisée uniquement dans les cellules interstitielles et non dans les canaux collecteurs. Chez des lapins chez lesquels l'activité COX2 a été inhibée par l'inhibiteur spécifique SC58236 pendant dix jours, une privation d'eau de 72 heures entraîne l'apparition de groupes de RMIC apoptotiques (évaluées par la méthode TUNEL) alors que la privation d'eau seule ou l'inhibiteur seul est sans effet.

Les auteurs emploient ensuite une technique bien connue d'isolement et de mise en culture de RMIC à partir de rein de lapin ou de souris. Sur des RMIC de lapin, l'augmentation de la pression osmotique jusqu'à 500 mosm/kg H₂O, par addition de NaCl, entraîne une augmentation de l'expression de la protéine COX2 détectable dès la 4^e heure, mais reste sans effet sur COX1. L'ARN messenger de COX2 est également augmenté. Le mannitol a le même effet que le NaCl, tandis que l'urée (une osmole dont la concentration s'équilibre de part et d'autre des membranes cellulaires) n'entraîne pas d'augmentation. Par ailleurs, la production de PGE₂ par les RMIC est sept fois plus importante en milieu hypertonique qu'en milieu isotonique, indiquant bien une activation fonctionnelle de COX2 par l'hypertonie.

Pour étudier le rôle de NF- κ B dans l'activation de COX2, les auteurs emploient des souris transgéniques pour l'élément de réponse NF- κ B et pour le gène de la luciférase (utilisé comme gène rapporteur) placé sous le contrôle du même promoteur (souris HLL). La déshydratation pendant 24 heures induit une augmentation de 300% de l'activité luciférase rénale. Dans des RMIC préparées à partir de ces souris, l'hypertonie du milieu de culture induit une augmentation d'expression de la luciférase de 250%. Ce sont les protéines p50 et p65 de NF- κ B qui sont impliquées dans cette activation. Le rôle de NF- κ B dans l'induction de COX2 est confirmé par le fait que cette induction est fortement réduite quand NF- κ B est bloqué par un adénovirus I κ B dominant négatif transfecté dans les RMIC. A l'inverse, l'activation de NF- κ B par la transduction d'un adénovirus IKKa constitutivement actif dans des RMIC de souris HLL augmente l'activité luciférase de ces cellules ainsi que l'ARN messenger et l'abondance de la protéine COX2. Ces effets sont abolis par la co-transduction de l'adénovirus dominant négatif I κ B qui ne possède pas les sites de phosphorylation IKK. Enfin, les auteurs montrent que l'inhibition de COX2 par le SC58236 (confirmée

par immunoblot) réduit de façon dose-dépendante le nombre de cellules viables après un changement d'osmolalité ambiante de 300 à 500 mosm/kg H₂O.

L'ensemble de ces résultats démontre bien que COX2 joue un rôle essentiel dans la tolérance à l'hypertonie des cellules interstitielles de la médulla rénale alors que COX1 n'intervient pas. COX2 dans ces cellules n'est sensible qu'au NaCl et pas à l'urée alors que d'autres auteurs ont montré que l'urée induit l'expression de COX2 dans une lignée cellulaire issue du canal collecteur (une structure largement représentée dans la médulla et qui produit également des PGE₂ de façon abondante).³ Il existe donc vraisemblablement des différences dans la régulation de COX2 selon les types cellulaires. Ces travaux montrent bien aussi le rôle de NF- κ B dans le contrôle de l'expression de COX2 après un choc osmotique. Ces travaux révèlent donc, au moins en partie, des éléments essentiels à la protection des cellules de la médulla rénale face aux conséquences de l'hypertonie à laquelle elles sont soumises. Ils ont aussi un intérêt clinique car ils permettent de mieux connaître le mécanisme responsable des nécroses papillaires observées lors de la prise chronique d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, en particulier dans un contexte de relative déshydratation.⁴

Commentaires

Cet article est très riche expérimentalement, les auteurs ayant employé une abondance de moyens directs et indirects pour démontrer l'implication de COX2 dans la réponse à l'hypertonie *in vivo* et *in vitro*, et le mécanisme responsable de son activation. Cependant, on peut regretter un manque de précision dans la présentation de certains résultats et un manque d'esprit critique dans certaines des conclusions.

Par exemple, les auteurs n'expliquent pas pourquoi ils passent du lapin à la souris pour certaines des expériences (dans le cas de souris non génétiquement modifiées) ni pourquoi ils font 24 heures de déshydratation chez la souris et 72 heures chez le lapin (alors que la souris a une résistance à la privation d'eau et une capacité de concentration de l'urine très supérieures au lapin). Les lapins doivent être gravement déshydratés au moment de l'étude alors que les souris sont sans doute nettement moins affectées. On ne sait pas toujours sur quelle espèce portent les résultats présentés dans les figures et tableaux. Pour certains résultats, les méthodes ne sont pas décrites (étude de la synthèse de prostaglandines).

Le travail *in vitro* concerne bien les cellules interstitielles, mais, quand l'activité de COX2 ou l'abondance de l'ARNm ou de la protéine sont étudiées dans la médulla rénale (ou même dans le rein entier, car ce n'est pas toujours clair dans les méthodes), il

est difficile de penser que les cellules des canaux collecteurs n'ont pas aussi contribué aux changements observés. Les auteurs n'ont pas identifié la présence de l'ARNm de COX2 dans les canaux collecteurs par hybridation *in situ*, mais plusieurs autres travaux ont montré la formation de prostaglandines dans cette structure, supposant donc bien la présence de cette enzyme.³ D'autre part, les auteurs ne disent pas si la zone médullaire étudiée incluait la médulla externe et la médulla interne. Or, l'hybridation *in situ* présentée (fig. 3a, p. 976) révèle un marquage abondant de COX2 dans la médulla externe. On sait que les cellules interstitielles sont nombreuses dans la médulla interne (où il en existe d'ailleurs plusieurs types), mais très peu abondantes dans la médulla externe. Le marquage observé dans la médulla externe correspond très vraisemblablement aux segments larges ascendants qui pourraient donc aussi avoir contribué significativement aux changements observés après la déshydratation, *in vivo*.

En conclusion, il s'agit donc d'un article intéressant, convainquant, mais peut-être un peu excessif dans la masse de données qui sont présentées et qui paraissent vouloir convaincre à tout prix, sans porter assez d'attention à la validité des protocoles.

Dr Lise Bankir
INSERM Unité 367
17, Rue du Fer à Moulin
F-75005 Paris



Références

1. Hao CM, Yull F, Blackwell T, Komhoff M, Davis LS, Breyer MD. Dehydration activates nf- κ b-driven, COX2-dependent survival mechanism in renal medullary interstitial cells. *J Clin Invest* 2000; 106: 973-82.
2. Garcia-Perez A, Burg MB. Renal medullary organic osmolytes. *Physiol Rev* 1991; 71:1081-115.
3. Bonvalet JP, Pradelles P, Farman N. Segmental synthesis and actions of prostaglandins along the nephron. *Am J Physiol* 1987; 253: F377-F87.
4. Schlondorff D. Renal complications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Kidney Int* 1993; 44: 643-53.