

Université Lille 2

THESE Pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 2,

Ecole doctorale : biologie et santé

<p>Etude du tropisme rénal du syndrome hémolytique et urémique atypique</p> <p><i>Susceptibilité endothéliale glomérulaire à l'hème et découverte de RAGE comme un nouveau récepteur de l'hème</i></p>
--

Présentée et soutenue publiquement par

Olivia MAY

Le 30 octobre 2018

Dirigée par le Professeur Eric Boulanger et le Docteur Lubka Roumenina

Devant un jury composé de :

Monsieur le Professeur Marc Hazzan, Président du jury

Madame le Professeur Fatouma Touré, Rapporteur

Monsieur le Professeur Dominique Guerrot, Rapporteur

Madame le Docteur Véronique Frémeaux-Bacchi, Examinatrice

Madame le Docteur Laure Yatime, Examinatrice

Monsieur le Professeur Eric Boulanger, Directeur

Madame le Docteur Lubka Roumenina, Co-Directrice

Madame le Docteur Marie Frimat, Tutrice

Travaux réalisés sous la tutelle du Dr Marie Frimat

Laboratoires d'accueil :

Lille Inflammation Research Center

Dirigé par le Pr. Pierre Desreumaux

Unité INSERM U995

Equipe Glycation, de l'inflammation au vieillissement

Dirigée par le Pr. Eric Boulanger

1 Place de Verdun,

59000 Lille

Centre de Recherche des Cordeliers,

Dirigé par le Pr. Pascal Ferré

Unité INSERM UMRS11 38

Equipe 10, Complément et Maladies

Dirigée le Dr. Véronique Frémeaux Bacchi

15, rue de l'école de Médecine

75270 Paris Cedex 06

RESUME

Le syndrome hémolytique et urémique atypique (SHUa) est une microangiopathie thrombotique complément-dépendante dont l'atteinte majoritairement rénale reste, à ce jour, incomprise. L'objectif de ce travail était d'améliorer la compréhension de ce tropisme d'organe au moyen de deux axes d'étude : i) la susceptibilité de l'endothélium glomérulaire à l'hémolyse, celle-ci étant à la fois la conséquence des microthromboses dans le SHUa et un amplificateur de la voie alterne du complément via l'hème libre, molécule issue des globules rouges lysés ; ii) le rôle potentiel du récepteur aux produits de glycation avancés ou RAGE. Ce récepteur membranaire aux fortes propriétés proinflammatoires et prothrombotiques a en effet été impliqué dans de nombreuses pathologies rénales, et sa liaison au C3a - anaphylatoxine libérée dans l'activation du complément - a été rapportée par une équipe.

La première partie de ce travail a visé à expliquer la vulnérabilité de l'endothélium glomérulaire sous l'effet d'une hémolyse. Nous avons étudié plusieurs types de cellules endothéliales exposées +/- à l'hème, et mis au point un modèle murin traité par de l'hème. En condition hémolytique, plusieurs facteurs pouvant participer à cette susceptibilité endothéliale glomérulaire ont ainsi été mis en avant : i) une moindre liaison du facteur H, principal régulateur du complément, à sa surface ; ii) une faible expression de la thrombomoduline, protéine de la coagulation et régulatrice du complément ; iii) une faible expression de l'enzyme principale de dégradation de l'hème, l'hème-oxygénase 1. Ces deux derniers points étaient rattachés à une faible induction endothéliale glomérulaire de leurs facteurs de transcription, KLF2 et KLF4.

La seconde partie de ce travail s'est concentrée sur le RAGE. N'ayant pas réussi à reproduire l'interaction RAGE/C3a, nous avons exploré l'hypothèse d'une liaison du RAGE à l'hème. En effet, le seul récepteur endothélial connu jusqu'à présent est le Toll Like Receptor 4 (TLR4), qui partage plusieurs ligands communs avec le RAGE (LPS - lipopolysaccharide, HMGB1 - high-mobility group box 1). Nous avons découvert que le RAGE était un récepteur de l'hème, et identifié que le site de liaison se trouvait sur le domaine V. A l'aide d'un modèle murin invalidé pour le RAGE et traité +/- par l'hème, nous avons mis en évidence que i) l'invalidation de RAGE avait un effet protecteur en cas d'exposition à l'hème, marqué par

une diminution de l'expression de gènes de l'inflammation (IL1 β , TNF α) et du facteur tissulaire au niveau pulmonaire, organe exprimant le plus fortement RAGE ; ii) l'hème activait la phosphorylation des voies ERK1/2 et Akt via le RAGE.

Par ces travaux, nous avons précisé les liens entre activation du complément, hémolyse et susceptibilité endothéliale glomérulaire dans le SHUa. Parallèlement, nous avons identifié le RAGE comme un nouveau récepteur à l'hème, dont la liaison à ce récepteur activerait différentes voies de signalisation de l'inflammation. Le contrôle de l'hème et du RAGE pourrait ainsi constituer de nouvelles voies thérapeutiques dans le SHUa et les maladies hémolytiques.

Mots clefs : cellules endothéliales, hème, microangiopathie thrombotique, récepteur aux produits de glycation avancés, syndrome hémolytique et urémique

SOMMAIRE

RESUME	3
REMERCIEMENTS	Erreur ! Signet non défini.
SOMMAIRE	5
TABLE DES ABREVIATIONS.....	8
AVANT-PROPOS.....	11
PARTIE 1. REVUE DE LA BIBLIOGRAPHIE	14
Chapitre 1 - Le syndrome hémolytique et urémique atypique, une MAT à tropisme rénal.....	15
1 - Description générale des microangiopathies thrombotiques.....	16
2 - Le SHUa : épidémiologie et présentation clinique	18
2.1- Epidémiologie.....	18
2.2 - Caractérisation de l'atteinte rénale	19
2.3 - Description des atteintes extra rénales	21
3 - Physiopathologie du SHUa : le rôle clef du complément.....	24
3.1 - Implication du complément dans le SHUa	24
3.2 - Description du système du complément	25
4 - Physiopathologie du SHUa : le complément n'est pas suffisant	30
4.1 - Nécessité de facteurs additionnels	30
4.2 - Concept de multiples hits et dépassement des capacités de régulation de la CE	31
4.3 - Pourquoi l'endothélium glomérulaire dans le SHUa ?	32
Chapitre 2 - Rôle de l'hémolyse dans la susceptibilité rénale aux MAT.....	41
1 - L'hémolyse : description générale	41
1.1 - L'hémolyse intratissulaire.....	41
1.2 - L'hémolyse intravasculaire	42
2 - Hème et hémoglobine : description générale.....	44
2.1 - L'hémoglobine	45
2.2 - L'hème	46
3 - Conséquences de l'hémolyse	47
3.1 - Effets toxiques de l'hème libre.....	47
3.2 - Hème et complément	49
3.3 - Atteintes rénales spécifiques liées à l'hème	51
4 - Régulation de l'hème : rôle clef de l'hème-oxygénase	52
4.1 - HO : présentation générale	53

4.2 - HO-1 : ses effets anti inflammatoires.....	54
4.3 - HO-1 : ses liens avec le système du complément	55
5 - Atteintes rénales des maladies hémolytiques	55
Chapitre 3 - Le RAGE.....	59
1 - Historique.....	60
2 - Présentation générale	60
2.1 - Structure.....	60
2.2 - Isoformes.....	61
2.3 - Distribution de RAGE.....	63
3 - Ligands de RAGE.....	65
3.1 - Les AGE.....	65
3.2 - Autres ligands de RAGE	66
4 - Effecteurs intracellulaires se liant au ctRAGE	68
4.1 - Diaph1	68
4.2 - ERK.....	69
4.3 - PKC, TIRAP, Myd88.....	69
5 - Voies de signalisation activées par RAGE.....	70
5.1 - NFκB	70
5.2 - MAPK/JNK	71
5.3 - PI3K/Akt/mTOR	72
6 - Implication de RAGE en pathologie humaine : une place pour le SHUa?	72
6.1 - RAGE et maladies rénales.....	73
6.2 - RAGE et complément	77
6.3 - Homologie RAGE - TLR4	79
PARTIE 2 - PRESENTATION DES TRAVAUX.....	81
Chapitre 1 - Hème et susceptibilité endothéliale glomérulaire à l'activation du complément	82
1.1 - Résumé et présentation de l'article n°1.....	82
1.2 - Données supplémentaires sur l'étude des polymorphismes de HO-1 dans le SHUa.....	86
Chapitre 2 - Rôle de RAGE dans le tropisme rénal du SHUa ?.....	88
2.1 - Interactions entre RAGE et protéines du complément.....	88
2.2 - Etude de l'atteinte rénale dans un modèle d'hémolyse induit par phénylhydrazine chez des souris RAGE ^{-/-} versus WT	92
2.3 - Etude de l'expression de RAGE sur des biopsies de patients.....	103
2.4 - Résumé et présentation de l'article n°2.....	106

2.5 - Données complémentaires : études des voies Akt et ERK	109
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	
BIBLIOGRAPHIE.....	123

TABLE DES ABREVIATIONS

aa : Acide aminé
ADAM10 : A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 10
ADAMTS-13 : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type I repeats-13
Ag : Antigène
AGE-R2 : Advanced Glycation End products -Receptor 2
AGE-R3 : Advanced Glycation End products -Receptor 3
Akt : Serine-thréonine kinase
ANCA : Anticorps Anti-Cytoplasme des Neutrophiles
AP-1 : Activator Protein-1
aPL : Anticorps anti-phospholipides
BMVEC : Brain Microvascular Endothelial Cells
BSA : Bovine Serum Albumin
CAPS : Syndrome Catastrophique des Anti-Phospholipides
CCP : Complement Control Protein
CE : Cellule Endothéliale
CIVD : Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée
CoPPIX : Cobalt Protoporphyrine IX
cox2 : Cyclo-oxygénase 2
CRS : Crise rénale sclérodermique
DN-RAGE : RAGE dominant négatif
ctRAGE : domaine C-terminal de RAGE
DAF : Decay Accelerating Factor
DGKE : Diacylglycerol Kinase Epsilon
E. coli : Escherichia coli
eNOS : endothelial Nitric Oxyde Synthase
EPCR : Récepteur Endothélial à la Protéine C
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
ET-1 : Endothéline-1
FB : Facteur B
Fer(III)pht : Fer(III)phthalocyanine
FH : Facteur H
FI : Facteur I
FP : Facteur P
FT : Facteur Tissulaire
G6PD : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
GAG : Glycosaminoglycanes
GEC : Glomerular Endothelial Cells
GH : Growth Hormone
GPCR : Récepteur Couplé aux Protéines G
GR : Globule Rouge
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β
GVH : Greffon Versus Hôte
Hb : Hémoglobine

HCP1 : Heme Carrier Protein 1
hGEC : human Glomerular Endothelial Cells
HMGB1 : High–Mobility Group Box 1
HO-1 : Hème-Oxygénase 1
Hp : Haptoglobine
HPN : Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne
HRGEC : Human Renal Glomerular Endothelial Cells
HTA : Hypertension artérielle
HUVEC : Human Umbilical Venous Endothelial Cells
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule 1
IEC : Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion
IF : immunofluorescence
IFN β : Interféron β
IFN γ : Interféron γ
IgA : Immunoglobuline A
IgM : Immunoglobuline A
IHC : Immunohistochimie
IL1 β : Interleukine 1 β
IL6 : Interleukine 6
iNOS : inductible Nitric Oxyde Synthase
IRA : Insuffisance rénale aiguë
IRM : Imagerie par résonance magnétique
kDa : kiloDalton
kim1 : Kidney injury molecule-1
KLF2 : Krüppel-like Factor 2
KLF4 : Krüppel-like Factor 4
LES : Lupus Erythémateux Disséminé
lox1 : Lectin-type oxidized LDL receptor 1
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MAT : Microangiopathie Thrombotique
MCP : Membrane Cofactor Protein
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1
mDia1 : Mammalian Diaphanous-related formin-1
MMACHC : Methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblC type, with homocystinuria
MMP9 : Matrix MetalloProteinase 9
mTOR : mechanistic Target Of Rapamycin
Myd88 : Myeloid differentiation primary response 88
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAF : Neuropathie amyloïde familiale
NF κ B : Nuclear factor- κ B
ngal : Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NO : Nitric Oxyde
PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1
PAS : Periodic Acid Schiff
PBS : Phosphate Buffered Saline
PGI2 : Prostaglandine I2

PHZ : Phénylhydrazine
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PKB : Phosphokinase B
PKC : Phosphokinase C
PNN : Polynucléaire Neutrophile
PRES : Posterior Reversible Encephalopathy Syndrom
PTT : Purpura Thrombotique Thrombocytopenique
RAGE : Récepteur aux produits de glycation avancés
RCA : Regulator of Complement Activation
ROS : Reactive oxygen species, ou dérivés réactifs de l'oxygène
SAA : Sérum Amyloïde A
SHN : Sérum humain normal
SHU : Syndrome hémolytique et urémique
SHUa : Syndrome hémolytique et urémique atypique
siRNA : silencing RNA
SnMPIX : Étain Métaloporphyrine IX
SNC : Système nerveux central
sRAGE : RAGE soluble
STEC : Escherichia Coli entéro-hémorragique producteur de Shigatoxines
sTM : Thrombomoduline soluble
TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGFβ : Tissue Growth Factor β
TIRAP : Toll-Interleukin 1 Receptor domain containing Adaptor Protein
TLR : Toll-Like Receptor
TM : Thrombomoduline
TNFα : Tumor Necrosis Factor α
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
vWF : Facteur von Willebrand
WT : Wild type
ZnPPIX : Zinc Protoporphyrine IX

AVANT-PROPOS

Les microangiopathies thrombotiques (MAT) regroupent différentes pathologies unies par une même expression histologique : le développement de thrombi fibrino-plaquettaires dans les vaisseaux de petit calibre. Ces lésions se traduisent biologiquement par une anémie hémolytique mécanique rapportée à la lyse des hématies sur les thrombi intraluminaux et une thrombopénie périphérique. Cela s'associe cliniquement à une ou plusieurs défaillances d'organes secondaires à l'ischémie d'aval induite par les microthrombi. Historiquement, différents tableaux de MAT étaient distingués en fonction de l'atteinte d'organe prédominant cliniquement. Ainsi, le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) s'accompagne principalement de symptômes neurologiques et le syndrome hémolytique et urémique (SHU) d'une insuffisance rénale aiguë. Cette classification évolue et tend à se baser actuellement sur les mécanismes physiopathologiques impliqués. En effet, la recherche a permis, ces dernières années, l'identification de plusieurs facteurs étiologiques forts, tels que le déficit en ADAMTS-13 (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type I repeats-13) dans le PTT, les shigatoxines dans les SHU dits typiques (SHU associé à l'*E. coli* entéro-hémorragique), ou encore les MAT induites par des médicaments (par exemple, les anti-VEGF). L'activation excessive de la voie alterne du complément a, quant à elle, été mise en avant dans les SHU dits atypiques (SHUa).

Étonnamment, les reins sont en première ligne dans ces MAT associées à une dérégulation du complément, et ce même lorsque l'activation du complément est systémique comme le suggère la baisse du taux de C3 chez plus d'un tiers des patients¹. Les atteintes extra-rénales sont, elles, plus rares dans le SHUa (15 à 20% des cas)². Mon travail a ainsi visé à préciser les raisons du tropisme rénal observé dans le SHUa, en étudiant les mécanismes unissant le complément à l'activation endothéliale glomérulaire. Nous nous sommes concentrés sur deux principales cibles d'étude : l'hémolyse et le récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products), qui pourraient ainsi constituer de nouvelles voies thérapeutiques.

L'hémolyse est un amplificateur de la voie alterne du complément, via en particulier l'hème^{3,4}, petite molécule structurale de l'hémoglobine appartenant à la famille des porphyrines, libérée dans la circulation en période hémolytique. Nous avons émis l'hypothèse que le rein, organe lésé également dans d'autres maladies hémolytiques que le

SHUa comme la drépanocytose, était moins protégé contre l'hémolyse. L'hème a donc été utilisé dans ces travaux à la fois comme un modèle visant à mimer des conditions hémolytiques mais aussi comme activateur de la voie alterne du complément.

Le RAGE, récepteur ubiquitaire multi-ligands, est un puissant inducteur d'activation endothéliale. Il est exprimé par de nombreux types cellulaires, notamment les cellules endothéliales, où sa liaison à différents ligands peut activer des voies de signalisation notamment impliquées dans l'inflammation ou le stress oxydatif. RAGE est un acteur identifié dans la physiopathologie de plusieurs néphropathies telles que la néphropathie diabétique mais aussi la néphrite lupique, l'amylose rénale ou encore la néphropathie hypertensive⁵. Aucune donnée n'a, pour l'heure, rapporté un rôle de RAGE dans les MAT. Pourtant, ses propriétés prothrombotiques et son implication dans les maladies rénales en font un acteur potentiel intéressant, et ce d'autant qu'une équipe a rapporté en 2010 que le C3a, anaphylatoxine issue du clivage du C3 et puissant médiateur de l'inflammation et de l'hémostase, constituait un ligand de haute affinité pour ce récepteur⁶. Ce travail s'est surtout concentré sur l'étude des interactions C3a/RAGE, explorant peu les conséquences fonctionnelles de cette liaison. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que le RAGE puisse constituer l'un des liens unissant le couple complément-activation endothéliale.

J'ai réalisé mes travaux au sein de deux unités : l'équipe Complément et Maladies - UMRS 1138 (Dr Véronique Frémeaux Bacchi, Dr Lubka Roumenina) au Centre de Recherche des Cordeliers et l'équipe INSERM U995 (Pr Eric Boulanger, Dr Marie Frimat) au sein du LIRIC (Lille Inflammation Research International Center). Ils seront présentés selon l'organisation suivante :

- La première partie sera consacrée à la revue de la bibliographie :

- Le chapitre 1 s'intéressera au SHUa, et plus précisément, au tropisme rénal observé dans cette pathologie. Nous aborderons à travers cette partie le système du complément et sa régulation ainsi que les spécificités de l'endothélium glomérulaire.
- Le chapitre 2 sera axé sur l'hémolyse, premier mécanisme supposé pouvant expliquer en partie le tropisme rénal dans le SHUa. Nous présenterons son implication dans l'activation endothéliale et complémentaire, en insistant particulièrement sur la molécule d'hème et son rôle dans le SHUa.

- Enfin, le chapitre 3 s'intéressera au récepteur RAGE, sa structure, ses ligands connus et les voies de signalisation qui lui sont rattachées. Pour explorer l'hypothèse d'un rôle de RAGE dans les MAT, nous décrirons son implication en physiopathologie rénale, des liens avec le système du complément et ses caractéristiques communes au récepteur TLR4, récepteur endothélial à l'hème.

- La seconde partie de ce travail rapportera nos principaux résultats. Chacun des deux articles soumis ou en cours de soumission sera précédé d'une introduction résumant les résultats et les points de discussion essentiels. Nous développerons également certains résultats complémentaires non encore publiés.

- Les conclusions de ce travail nous permettront de présenter les principales perspectives de ce projet, visant à poursuivre l'amélioration des connaissances de la physiopathologie des lésions endothéliales glomérulaires complément-dépendantes dans les maladies hémolytiques, et l'implication méconnue à ce jour du RAGE.

PARTIE 1. REVUE DE LA BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1 - Le syndrome hémolytique et urémique atypique, une MAT à tropisme rénal

Le syndrome hémolytique et urémique est caractérisé par la triade associant insuffisance rénale aiguë, thrombopénie périphérique et anémie hémolytique mécanique, quel que soit le facteur étiologique identifié. Ce terme a été proposé pour la première fois en 1955 par Gasser, qui décrivit cette triade biologique chez 4 nourrissons et une enfant de 7 ans⁷. Trois ans plus tard, Habib décrivait l'atteinte rénale anatomopathologique caractéristique : la microangiopathie thrombotique⁸. Ces lésions correspondaient à un épaississement de la paroi des capillaires glomérulaires, avec un aspect en double contour dû à l'élargissement de l'espace sous-endothélial. Elles concernaient le plus souvent les capillaires glomérulaires et les artérioles pré-glomérulaires alors que les artères de plus gros calibre étaient rarement touchées.

Le SHU est donc une MAT à tropisme préférentiellement rénal, cependant les lésions de MAT ne sont pas spécifiques du SHU. Ces lésions de MAT sont parfois rattachées à des agents infectieux (pneumocoque, grippe) ou encore dans des contextes cliniques spécifiques : post transplantation d'organe, néoplasie, maladie auto-immune telle que le syndrome catastrophique des anti-phospholipides⁹. Le chevauchement de ces différents syndromes en rend la classification difficile. L'avancée dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques fait évoluer cette classification au fil du temps, permettant une amélioration des thérapeutiques ciblées¹⁰. La mise en évidence d'une dysrégulation du complément, chez plus de 60% des patients présentant un SHUa, a mené à l'obtention d'un traitement spécifique dirigé contre la voie terminale du complément¹¹, l'Eculizumab. A ce titre, le SHUa est devenu un modèle d'étude de la dysfonction endothéliale aiguë secondaire à une dérégulation du complément.

Ce premier chapitre sera consacré au SHUa, MAT à tropisme rénal, et à sa physiopathologie en abordant plus particulièrement deux de ses caractéristiques : l'activation excessive du complément et la susceptibilité de l'endothélium glomérulaire.

1 - Description générale des microangiopathies thrombotiques

Le terme de MAT décrit un ensemble de maladies cliniquement hétérogènes, associant la présence d'une lésion endothéliale qui mène à la formation de thromboses au sein du système microvasculaire, à la fois artériel et veineux. Ces microthrombi engendrent la consommation secondaire de plaquettes et une hémolyse mécanique par fracassement des globules rouges circulant sur ces thrombi^{12,13}. La MAT est ainsi définie par la triade classique associant : i) une anémie hémolytique mécanique à Coombs négatif (éliminant l'anémie hémolytique auto-immune) avec la présence de schizocytes au frottis sanguin; ii) une thrombopénie périphérique; iii) une atteinte d'organe liée à l'ischémie d'aval microvasculaire. Selon le système vasculaire atteint, les lésions d'organes varient : insuffisance rénale, atteinte neurologique, complications cardiaques, pancréatite, ou encore atteinte cutanée⁹. Les caractéristiques physiopathologiques et cliniques des différentes MAT sont résumées dans le tableau n°1. Il s'agit en général de pathologies rares, en dehors de contexte particulier tel l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques où les MAT peuvent concerner 10 à 40% des patients selon les définitions utilisées.

Tableau n°1 : Principales caractéristiques des MAT

Maladie	Mécanismes physiopathologiques	Caractéristiques clinico*-biologiques	Traitements	Réf.
PTT acquis	ADAMTS-13<5%, Présence d'inhibiteur anti ADAMTS 13	Signes neurologiques , convulsions, atteinte rénale	Echange plasmatique, corticothérapie, Rituximab	
PTT constitutionnel (Upsham-schulman syndrome)	Déficit en ADAMTS-13, transmission autosomique récessive	Clinique idem PTT acquis Diagnostiqué dans l'enfance : 50% des cas. Révélé par la grossesse : 25% des cas	Echange plasmatique et perfusion de plasma	13-15
MAT liée aux maladies auto-immunes Ex: LES, CAPS, CRS	Lésion endothéliale directe	Atteinte rénale, polysérite, CAPS : thromboses artérielle et veineuse CRS : HTA maligne	LES : immunosuppresseur CAPS : Plasmaphérèse, immunosuppresseur, Eculizumab (CAPS réfractaire) CRS : IEC	16-20
Cancer métastatique	Lésion endothéliale directe	Antécédents néoplasiques Infiltration médullaire Anomalies myélogramme	Traitement du cancer	21,22
Déficit en vitamine B12 (Cobalamine)	Mutation du gène MMACHC		Supplémentation en vitamine B12 (hydroxycobalamine), acide folique	23
MAT liée à la cascade de la coagulation	Mutation de la TM Mutation du plasminogène	Insuffisance rénale	Eculizumab à titre expérimental	24,25 26
MAT liée à une mutation de DGKE	Mutation de DGKE		Echange plasmatique, Eculizumab si récidive	27,28
MAT médicamenteuse <i>Anticorps médié, dose indépendante</i>	Ticlopidine : anticorps anti ADAMTS-13 Quinine: anticorps anti cellule endothéliale	Insuffisances rénale et hépatique	Arrêt du traitement , plasmaphérèse si anticorps anti ADAMTS-13	13,15, 29
MAT médicamenteuse <i>Lésion endothéliale, dose dépendante</i>	Anti calcineurine, mitomycine C, gemcitabine, bevacicumab, anti-VEGF, IFNβ		Arrêt du traitement, Eculizumab à titre expérimental	30-32
MAT associée à la transplantation de cellules souches	Lésion cellule endothéliale, activation du complément, élévation du sC5b69	Insuffisance rénale, atteinte neurologique HTA, défaillance cardiaque, défaillance multiviscérale	Eculizumab à titre expérimental	33-38
MAT de novo liée à la transplantation d'organe solide	Multi factorielle Lésion endothéliale directe, activation du complément,	Insuffisance rénale	Traitement du facteur causal (rejet, infections, modification immunosuppression) Eculizumab si mutation du complément	39-41
MAT liée au VIH	Associée à une infection opportuniste	Signes neurologiques, convulsions, insuffisance rénale	Anti rétro viral, traitement facteur déclenchant, Echange plasmatique	42,43

SHUa	Activation de la voie alterne du complément, anticorps anti FH, mutations (FH, MCP, FI, C3)	Insuffisance rénale aiguë , atteinte d'autres organes dont neurologiques, récurrences fréquentes	Echange plasmatique, Eculizumab Si anti-FH : immunosuppression (corticoïdes, Rituximab)	1,2,44
SHU à STEC	Présence de <i>E. coli</i> / shigelle / citrobacter sécréteur de shigatoxine dans les selles	Insuffisance rénale , diarrhée Atteinte majoritaire chez l'enfant.	Pas de traitement spécifique, suppléance d'organe selon défaillance	11,45 -47
SHU infectieux	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , grippe Exposition de l'antigène cryptique de Thomsen Friedenreich par la neuraminidase A	Insuffisance rénale, Pneumonie , méningite, bactériémie	Traitement anti-infectieux	48-50
HTA maligne Ex: sténose de l'artère rénale, sclérodémie, HTA ancienne non contrôlée	Suractivation du système rénine angiotensine.	Atteinte rénale, atteinte ophtalmologique, atteinte neurologique (PRES)	Traitement antihypertenseur Inhibiteur de l'enzyme de conversion	51,52

**Les caractéristiques cliniques en gras sont les plus fréquentes*

ADAMTS13 : a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13, **CAPS** : syndrome catastrophique des antiphospholipides, **CE** : cellule endothéliale, **CRS** : crise rénale sclérodermique, **DGKE** : diacylglycerol kinase epsilon, **E. coli** : Escherichia coli, **FH** : facteur H, **FI** : facteur I, **HTA** : hypertension artérielle, **IEC** : inhibiteur de l'enzyme de conversion, **IFN β** : interféron β , **LES** : lupus érythémateux disséminé, **MAT** : microangiopathie thrombotique, **MCP** : membrane co factor protein, **MMACHC** : Methylmalonic aciduria and homocystinuria type C, **PTT** : purpura thrombotique thrombocytopénie, **PRES** : posterior reversible encephalopathy syndrom, **SHU** : syndrome hémolytique et urémique, **SHUa** : SHU atypique, **TM** : thrombomoduline, **VIH** : virus de l'immunodéficience humaine

2 - Le SHUa : épidémiologie et présentation clinique

2.1- Epidémiologie

Les SHUa représentent 5 à 10% des SHU de l'enfance, et la majorité des SHU à l'âge adulte. L'incidence est estimée entre 0,5 et 2 cas par an par million d'habitants⁵³. L'atteinte rénale est par définition systématique⁵⁴ et les symptômes extra rénaux sont présents dans 15-20% des cas. Avant la mise sur le marché de l'Eculizumab, anticorps monoclonal bloquant la voie terminale du complément, la mortalité était estimée à près de 10%, et environ 50% des adultes et 15% des enfants évoluaient vers l'insuffisance rénale terminale après le premier épisode¹¹.

Le SHUa présente un sex-ratio autour de 1 chez les enfants, alors qu'il existe une prédominance féminine, à ce jour inconnue, à l'âge adulte (3 pour 1). Il peut toucher tous les âges, du nouveau-né au sujet âgé (âges extrêmes décrits : 1 jour à 83 ans). Il survient avant 18 ans dans 60% des cas. Soixante-dix % des enfants atteints le sont avant l'âge de 2 ans, et environ 25% avant 6 mois. L'âge médian des SHUa liés à un anticorps anti FH est plus

tardif, autour de 9 ans environ, et 84% des cas sont décrits chez l'enfant⁵⁵. Un tableau de SHU survenant avant 6 mois est fortement évocateur d'un SHUa; en effet moins de 5% des SHU liés à une shigatoxine surviennent avant cet âge⁵³.

2.2 - Caractérisation de l'atteinte rénale

2.2.1 - Tableau clinique

La présentation est dans la plupart des cas brutale. L'insuffisance rénale peut être d'emblée anurique, il existe une protéinurie si la diurèse est préservée. L'HTA est fréquente et sévère, liée d'une part à l'insuffisance rénale et l'oligurie avec défaut d'excrétion sodée, et d'autre part à l'hyperréninisme secondaire à la MAT. Plus de la moitié des patients requièrent l'épuration extra rénale à l'admission. Pour certains patients, la maladie évolue par poussées ou rechutes successives. La fonction rénale peut revenir à la normale entre chaque poussée, et l'intervalle entre chaque épisode peut aller de quelques jours à plusieurs dizaines d'années. Un épisode unique de la maladie sans récurrence est également possible².

2.2.2 - Tableau anatomopathologique

L'altération endothéliale peut s'étendre de l'artériole afférente au flocculus glomérulaire. L'intensité et la diffusion des lésions sont très variables selon les patients. L'atteinte des tubes et de l'interstitium est constante et sévère, avec une nécrose tubulaire aiguë et un œdème interstitiel secondaires à l'ischémie. Historiquement, trois types histologiques ont été décrits : les MAT glomérulaires, les MAT artérielles et les nécroses corticales^{56,57}. Ces trois aspects lésionnels peuvent s'associer sur une même biopsie⁵⁸. Si les formes glomérulaires caractérisent classiquement les MAT de l'enfant et les formes artérielles plus volontiers celles de l'adulte⁵⁹, l'association des lésions est assez fréquente et n'est pas spécifique du SHUa. Cette classification, ne reposant pas sur un substrat anatomo-clinique précis, tendra peut-être à évoluer dans les années à venir^{59,60}.

Microscopie optique

Les caractéristiques principales sont résumées dans le Tableau n°2 et illustrées dans la Figure n°1. L'analyse morphologique montre que la lésion endothéliale est constante, la thrombose n'étant qu'une conséquence de cette lésion, témoignant de la chronologie de ces lésions, endothéliales en premier lieu. Les formes dites de nécroses corticales sont secondaires à une ischémie du parenchyme rénal, pouvant être le reflet d'une forme à la fois glomérulaire et artérielle, de forme sévère. On l'observe chez 10 à 30% des enfants et moins de 10% des adultes.

Tableau n°2 : Description des lésions histopathologiques de MAT rénale en microscopie optique

	Atteinte glomérulaire	Atteinte vasculaire
MAT glomérulaire	<p>Glomérules volumineux, à flocculus dense, lumière capillaire peu visible. Thrombi fibrino-plaquettaires obstruant les lumières</p> <p>Parfois ischémie glomérulaire</p> <p>CE turgescente et bombante dans la lumière capillaire</p> <p>Cellule mésangiale turgescente, œdème mésangial, mésangiolyse (rare)</p>	<p>Artériole pré-glomérulaire : lésion constante, turgescence endothéliale.</p> <p>Elargissement espace sous-endothélial, œdème intimal et de la média</p> <p>Parfois thrombose fibrineuse et de globules rouges</p>
MAT artérielle	<p>Atteinte ischémique secondaire à l'atteinte vasculaire, glomérules rétractés</p>	<p>Atteinte des artères interlobulaires et artérioles</p> <p>CE turgescente, œdème intimal (endartérite mucoïde).</p> <p>Thromboses fibrineuses fréquentes.</p> <p>Prolifération de myofibroblastes dans l'intima (bulbe d'oignon)</p>
Nécrose corticale	<p>Infarctus du cortex rénal d'étendue parfois sévère, par ischémie</p> <p>Calcification des zones infarcies à un stade tardif</p>	<p>Artères interlobulaires ou arquées : endartérite proliférative et fibrineuse</p>

CE : cellule endothéliale, **MAT** : microangiopathie thrombotique

Figure n°1 : Illustrations de lésions anatomopathologiques des MAT, reflétant les réponses tissulaires à une lésion endothéliale (d'après Brocklebank et al., CJASN, 2018⁹)

Immunofluorescence

L'immunofluorescence montre généralement la présence de fibrine le long des parois glomérulaires et dans les thromboses. Des dépôts endomembraneux d'IgM, de C3 et de C1q sont souvent présents dans les glomérules et dans les parois artériolaires⁵⁹.

La signification de ces dépôts de complément est, à ce jour, indéterminée. Des travaux démontrent néanmoins le caractère spécifique et témoin de l'activation du complément de ces dépôts. Sur trois modèles murins d'atteinte glomérulaire avec activation du complément (néphrite de Heymann, glomérulonéphrite extra-membraneuse et glomérulonéphrite à la concanavoline) le fragment d'activation du C3 (le C3c) observé sur les glomérules disparaissait à 85% lorsque le complément cessait d'être activé en moins de 24 heures, dans les trois modèles. Ce phénomène était parallèle à une baisse du C5b-9 urinaire dans le modèle de la néphrite de Heymann⁶¹. En revanche, les dépôts de C3d, qui à l'inverse du C3c sont liés de façon covalente, persistaient à distance du processus activant le complément. Ainsi, le dépôt de C3c, qui se détache rapidement de la surface, est un marqueur d'une activation récente du complément.

Par ailleurs, il convient de souligner que les biopsies rapportées sont rarement réalisées en période active d'hémolyse, en raison d'une thrombopénie profonde contre-indiquant la biopsie per cutanée. Ces descriptions classiques de lésions de MAT rénales ont parfois été obtenues sur des tissus prélevés en *post-mortem*⁶². Ainsi, il est possible que ces dépôts de complément observés sur les biopsies soient parfois d'acquisition tardive, dont la signification reste soumise à débat.

2.3 - Description des atteintes extra rénales

Bien que l'atteinte rénale soit au premier plan, les atteintes extra rénales concernent 15-20% des cas de SHUa environ. Parmi elle, les plus fréquentes sont les atteintes cardiaques et neurologiques. Environ 5% des patients présentent un tableau clinique catastrophique de défaillance multiviscérale associant à la fois atteinte neurologique, cardiaque, hémorragie

pulmonaire, pancréatique, hépatique et hémorragie digestive⁶³. Dans une cohorte pédiatrique récente, les enfants atteints de SHUa présentaient une atteinte extra-rénale dans près de 44% des cas (dont une atteinte neurologique pour 37% des patients)⁶⁴. Les atteintes extra rénales les plus fréquemment rapportées sont décrites dans le Tableau n°3.

Tableau n°3 : Caractéristiques cliniques et épidémiologiques des principales atteintes extra-rénales dans le SHUa

Organe	Fréquence	Présentation clinique	Ref.
SNC	Cohorte mondiale de 2018 : 20%	Irritabilité, somnolence	2,63,65,66
	Cohortes pédiatriques :	Diplopie, cécité corticale	
	- anti FH (Inde) : 40%	Hémi-parésie ou -plégie, tétraparésie spastique,	
	- tous SHUa confondus (Suisse) : 48%	convulsions, coma.	
	Mutation C3 R139W : 36%		
Cardio-vasculaire	Revue de 17 études : 3 à 10%	Cardiomyopathie, myocardite, mort subite	1,63,66-68
	Cohorte pédiatrique (Suisse) : 43%	Sténoses des gros vaisseaux	
	Mutation C3 R139W : 57%	Ischémie distale	
	Mutation FH cohorte française : 7%	Plus fréquente pour les anomalies suivantes : FH dérégulé, gain de fonction C3, anomalie FB	
Peau	Indéterminée	Ischémie, gangrène	69-71
Pancréas	Indéterminée parmi SHUa	Diabète transitoire	55,63
	Cohorte anti-FH : 23%	Pancréatite biologique (amylasémie >3N)	

FH : facteur H, **IRMc** : Imagerie par Résonance Magnétique cérébrale, **PRES** : Posterior Reversible Ephalopathy Syndrom, **N** : valeur normale, **SHUa** : syndrome hémolytique et urémique atypique, **SNC** : système nerveux central

A l'heure actuelle, les facteurs à l'origine de tableaux avec atteinte rénale isolée *versus* atteintes multi-organes ne sont pas identifiés. Le type d'anomalie dérégulant le complément pourrait jouer un rôle. En effet, il a été rapporté une association fréquente entre la mutation du C3 R139W et une atteinte cardiaque⁶⁶, ainsi qu'entre anticorps anti FH et atteinte neurologique⁶⁵.

De façon intéressante, l'atteinte pancréatique reste méconnue mais est rapportée dans plusieurs travaux. Dans une cohorte suisse pédiatrique, un patient avait développé un diabète transitoire nécessitant une insulinothérapie de courte durée (une semaine). En 1991, une équipe autrichienne publiait une étude rétrospective de 40 patients consécutivement admis pour un tableau d'hémolyse aiguë. Quinze sujets présentaient une atteinte pancréatique aiguë (définie par une amylasémie supérieure à 3 fois la normale), qui

était systématiquement associée à une insuffisance rénale aiguë. Les causes de ces hémolyses étaient variées, et comportaient 2 MAT : un SHU et un PTT⁷². La fréquence exacte des atteintes pancréatiques n'est pas retrouvée dans la littérature, celle-ci n'étant pas recherchée systématiquement. Dans une série de patients atteints de SHUa liée à un anticorps anti FH, décrite par Dragon-Durey *et al.*, une pancréatite était rapportée de façon vraisemblablement plus fréquente que pour les SHUa sans anti FH, et concernait 23.1% des cas⁵⁵. Cette atteinte pancréatique est retrouvée dans des travaux expérimentaux sur des modèles murins^{73,74}. Merle *et al.* décrivaient, chez des souris hémolytiques, une amylasémie élevée ainsi que la présence d'une amylasurie⁷⁴.

Concernant l'atteinte dermatologique microvasculaire, des formes cutanées, de type gangrène ischémique qui ont parfois mené à des amputations des extrémités, ont été rapportées. Celles-ci sont rares et concernent généralement des enfants⁷⁰. Un cas clinique d'un patient avec une immunoglobuline monoclonale de type IgA λ rapportait une atteinte vasculaire et cutanée, sous la forme d'une angiopathie distale menant à l'amputation de 2 doigts. Trois années plus tard, il présentait un tableau du SHUa lié à cet anticorps⁷¹. Magro *et al.* ont réalisé en 2015 des biopsies cutanées systématiques, en peau saine, chez 8 patients présentant un tableau de SHUa, et chez un patient présentant un SHU typique⁶⁹. Deux patients présentaient des lésions cutanées (purpura pour le premier cas et ischémie d'orteil pour le second) qui ont également été biopsiées. Ces biopsies étaient comparées à celles de 13 patients contrôles qui présentaient des caractéristiques des MAT sans argument pour un SHUa (dont 5 PTT, 1 SLE, 2 HELLP). Les patients atteints de SHUa présentaient, sur la plupart des biopsies un détachement de CE focal avec de petits thrombi intraluminaux fibrino-plaquettaires, en faveur d'un état procoagulant sous-jacent. Dans les biopsies de lésions cutanées, des thromboses pauci-inflammatoires et des signes d'ischémie cutanée étaient observés. L'étude du complément en immunofluorescence retrouvait, à l'exception d'un patient, d'intenses dépôts granulaires de stigmates d'activation complémentaire : des dépôts de C3d, C4d et C5b-9 sur la plupart des vaisseaux dermiques. Ces lésions diminuaient significativement après traitement par Eculizumab. Pour les patients contrôles, les auteurs ne rapportaient pas d'anomalie significative à l'exception de deux cas. Il s'agissait de lésions microvasculaires chroniques focales, corrélées avec des dépôts vasculaires significatifs de C5b-9 chez les deux patients ayant un PTT. Des dépôts significatifs pour C3d, C4d et C5b-9

ont seulement été observés dans deux cas de PTT, dont un où le patient présentait une mutation d'un gène régulateur du complément (chevauchement PTT et SHUa). Cette étude confirme ainsi que l'activation du complément est systémique et souligne la possibilité d'atteintes extra rénales sans symptomatologie clinique, justifiant l'intérêt d'utiliser dans notre étude des cellules dermiques, sensibles à l'activation du complément.

3 - Physiopathologie du SHUa : le rôle clef du complément

L'identification fréquente d'une anomalie du complément chez les patients souligne le rôle majeur de ce système dans la physiopathologie du SHUa. Sa description, ci-dessous, sera centrée sur la voie alterne - voie impliquée dans cette maladie - et sa régulation.

3.1 - Implication du complément dans le SHUa

Si le système du complément est connu de longue date, il n'a été identifié comme jouant un rôle clef dans le SHUa que dans les années 70. En 1973, le lien était établi entre C3 abaissé et SHUa⁷⁵. En 1981, on rattachait un tableau de SHUa chez deux frères à un déficit en FH⁷⁶. En 1998, à partir de trois familles de malades, était établi un lien entre le SHUa et une anomalie située sur le locus RCA du chromosome 1q32⁷⁷. Le premier gène candidat étudié fut celui du FH et menait à la mise en évidence d'une mutation hétérozygote sur le CCP (Complément Control Protein) 20 du FH.

A ce jour, au moins une mutation du système du complément ou un anticorps dirigé contre le FH sont identifiés chez 60% des cas de la cohorte française publiée en 2013¹ et 45% des cas dans l'étude de cohorte mondiale décrite en 2018², atteignant FH, MCP, FI, C3 et FB (cf. Tableau n°4). Ces mutations sont le plus fréquemment hétérozygotes. Le pronostic de la maladie est impacté par le type d'anomalie : dans une étude de cohorte récente, les patients avec une mutation de MCP présentaient ainsi un meilleur pronostic rénal, tandis que celui des patients porteurs d'un FH anormal était le plus sombre².

Récemment, des anomalies sur des protéines en dehors du système du complément ont également été impliquées dans le SHUa : la thrombomoduline (TM), protéine de la coagulation, et DGKE, protéine de l'homéostasie vasculaire dont le déficit mène à un état prothrombotique, ouvrant de nouvelles perspectives thérapeutiques^{24,28,78}.

Tableau n°4 : Fréquence des anomalies du complément identifiées dans le SHUa rapportées dans les études de cohorte

Cohorte	Mondiale ² n=851	Française ¹ n=214	Américaine ²⁵ n=144	Italienne ⁷⁹ n=273	Japonaise ⁸⁰ n=118
Mutations					
FH	21	28	27	24	10
MCP	9	9	5	7	4
FI	6	8	8	4	0
C3	6	8	2	4	31
FB	2	2	4	0.4	0
Anti FH	21	8	nd	3	17

Les valeurs sont exprimées en pourcentage.

FB : facteur B, FH : facteur H, FI : facteur I, MCP : membrane co-factor protein, n : nombre de patients inclus, nd : non disponible

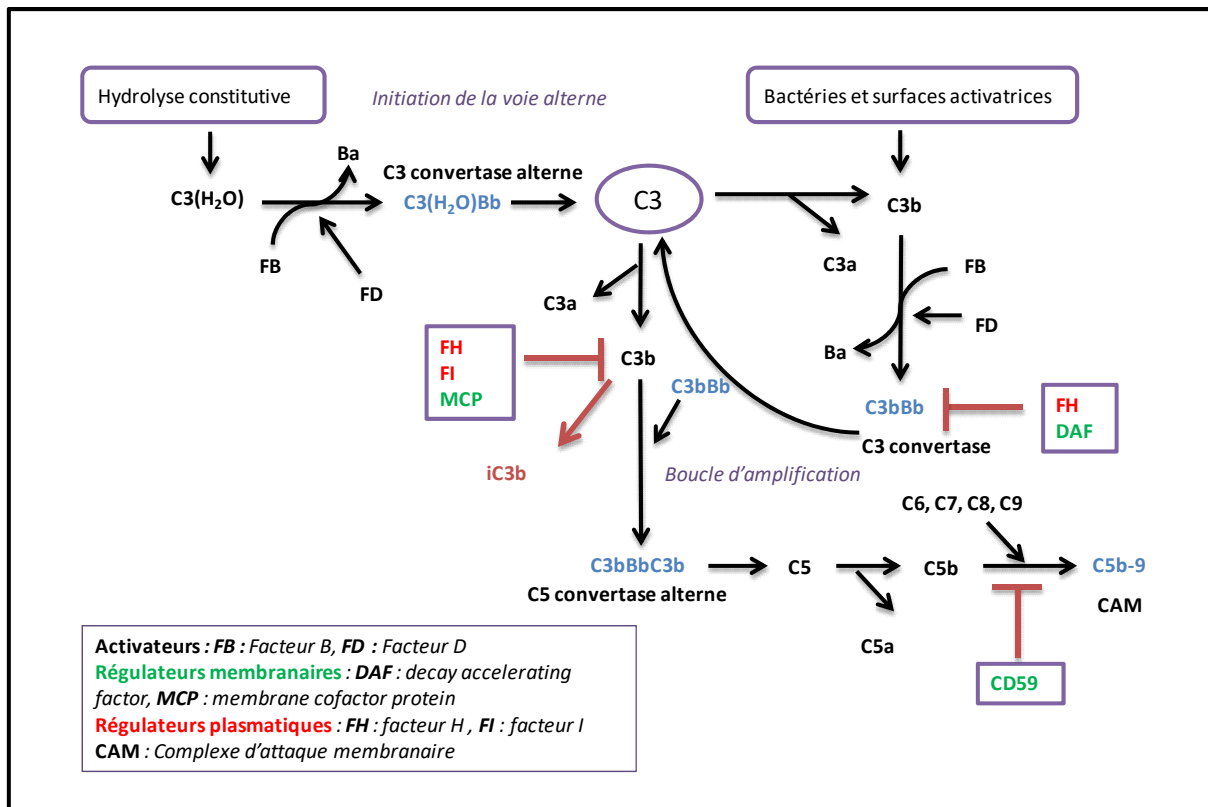
3.2 - Description du système du complément

Le système du complément est un composant essentiel de l'immunité. Il participe à la défense de l'hôte contre les infections (opsonisation, effet chimiotactique, lyses des cellules et des bactéries), à la modulation de la réponse immunitaire via des interactions avec de nombreuses cellules inflammatoires et à l'élimination des cellules apoptotiques et des complexes immuns circulants. Ce système est constitué d'environ 50 protéines plasmatiques ou membranaires, activatrices (activité enzymatique) ou régulatrices, interagissant entre elles dans une cascade de clivages finement régulée.

Activation du complément

Cette cascade peut être activée par trois voies : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. Toutes trois conduisent au clivage du C3, étape essentielle suivie de la production exponentielle du complexe d'attaque membranaire (C5b-9) et d'anaphylatoxines (C3a, C5a). Bien qu'elle soit probablement la plus ancienne des trois voies du complément, la voie alterne se nomme ainsi car elle a été découverte après la voie classique, et a été considérée à l'époque comme une voie alternative. Alors que l'activation par les voies classique ou dépendante des lectines requiert une reconnaissance spécifique ligand-protéine de reconnaissance, la voie alterne a la particularité d'être activée en continu (cf. Figure n°2) par un phénomène décrit comme le tick-over⁸¹.

Figure n°2 : Régulation et activation de la voie alterne



En permanence, une petite fraction de protéines C3 hydrolysent spontanément leur groupement thioester pour former C3(H₂O) qui est capable de former une C3 convertase. Cette C3 convertase alterne est composée de C3(H₂O), associée à un fragment du facteur B (FB), le Bb. Le C3(H₂O)Bb peut cliver à son tour du C3 en C3a (anaphylatoxine) et C3b (opsonine)⁸². Si la molécule de C3b ne rencontre pas de surface activatrice, elle est rapidement hydrolysée et inactivée. En l'absence de régulation (comme par exemple, à la surface des agents pathogènes), les molécules de C3b vont pouvoir se fixer de façon covalente avec une liaison thioester à la surface et recruter le FB. La fixation du FB sur le C3b induit un changement conformationnel du FB qui, après clivage par le facteur D (FD) en Bb et Ba, constitue une autre C3 convertase (C3bBb). Cette C3 convertase alterne clive à son tour les molécules de C3 en C3a et le C3b. Le C3b peut alors :

- participer à une boucle amplificatrice en reformant une nouvelle C3 convertase, augmentant ainsi la formation de C3b et donc l'opsonisation des agents pathogènes,
- conduire à la formation d'une C5 convertase (C3bBbC3b) qui clive le C5 en C5b et C5a (autre anaphylatoxine). La formation du C5b mène à la formation du complexe d'attaque

membranaire, constitué des molécules C5b, C6, C7, C8 et C9 (le C5b-9). Celui-ci forme des pores dans les membranes cellulaires et induit la lyse directe des pathogènes et l'activation cellulaire.

Le C3b, circulant ou lié à la surface cellulaire, est ensuite clivé en plusieurs fragments (Figure n°3): iC3b et C3f, via les facteurs I et H, iC3b étant lui clivé en C3dg (à la surface) et C3c (en phase fluide)

Figure n°3 : Différentes étapes du clivage du C3

Les marqueurs d'études de l'activation du complément sont donc :

- les fragments du clivage du FB après sa liaison au C3b, le Ba et le Bb
- les fragments du clivage de C3 et C5 par les convertases, les anaphylatoxines C3a et C5a
- la liaison de C3b à la cellule, évaluée par ses fragments iC3b et C3d
- la formation C5b-9 à la surface des cellules, ou sous forme soluble (sC5b-9).

Régulation de la voie alterne du complément

L'activation du complément doit être finement régulée afin d'éviter des lésions non spécifiques des cellules de l'hôte, tout en préservant une activation sur les surfaces microbiennes. Elle implique ainsi de nombreux acteurs dont la description a fait l'objet de plusieurs revues détaillées⁸³⁻⁸⁵. Concernant plus spécifiquement la voie alterne, sa régulation repose, d'une part, sur plusieurs protéines membranaires : MCP (membrane co-factor protein ou CD46), DAF (decay accelerating factor ou CD55), CR1 (complement receptor 1), CD59 et thrombomoduline (TM), et d'autre part sur des régulateurs plasmatiques : le FH, élément clé de la régulation de la C3 convertase à travers ses fonctions multiples, et le facteur I (FI). Brièvement, la formation de la C3 convertase est inhibée par le FH. Lorsqu'elle est formée, la dissociation de la C3 convertase est favorisée par CR1, FH et DAF. Le FI, quant à lui, dégrade le C3b en iC3b à l'aide de FH, MCP et CR1 comme co-facteurs. La TM agit comme co-facteur du FH dans la dégradation du C3b. Enfin, le CD59 agit en aval dans la

cascade en prévenant la polymérisation du C5b-9. Nous ne détaillerons ci-dessous que les régulateurs plus particulièrement impliqués dans la protection des CE, à savoir le FH, MCP, DAF, ainsi que la TM.

Facteur H

Le FH constitue le principal facteur de régulation de la voie alterne du complément. Il s'agit d'une protéine hautement glycosylée, de 155kDa. Son origine est majoritairement hépatique. Il circule sous forme active dans le plasma (dit en phase fluide)⁸⁶. Il est composé de 20 modules répétitifs d'une soixantaine d'acides aminés, les Complement Control protein Domain (CCP), anciennement dénommés Short Consensus Repeats (SCR)⁸⁷. Il inhibe la formation de la C3 convertase, en compétition avec le FB pour lier le C3b⁸⁸. Il accélère la dissociation de la C3 convertase et agit comme cofacteur du FI pour dégrader le C3b^{89,90}. Ses ligands principaux sont le C3b, le C3d, C3(H₂O), à l'inverse du C3 non clivé, ainsi que les glycosaminoglycanes (GAG)^{91,92}. Les sites d'interaction entre le FH et ses ligands ont été caractérisés. Deux sites sont impliqués dans la liaison du C3b : les CCP 1-4 et 19-20; liaisons cristallisées par Forneris *et al.*⁹³. Les CCP 6-8 et 19-20 sont mis en jeu dans la reconnaissance des surfaces cellulaires polyanioniques (tels que les endothéliums, chargés négativement du fait de la présence de glycoprotéines de surface) avec une affinité spécifique pour certains héparanes sulfates. Par exemple, il a été démontré que FH se lie aux liaisons acide sialique α 2-3 mais pas α 2-6 ou α 2-8⁹⁴. Pour illustrer l'hétérogénéité des organes, mentionnons ici que la répartition des GAG varie selon les endothéliums. Ainsi, le CCP 6-8 du FH se liera à l'endothélium de l'œil tandis que le FH se lie à l'endothélium glomérulaire par les CCP 19-20. Il a été mis en évidence que des mutations de FH touchant la partie terminale des CCP 19-20 entraînaient une perte de l'activité régulatrice du complément au niveau des membranes cellulaires endothéliales dans le SHUa⁹⁵, tandis qu'un polymorphisme des CCP 6-8 a été impliqué dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge⁹⁶. La fixation du FH à la surface de la CE glomérulaire est donc essentielle pour la protection contre l'attaque par le complément et pour empêcher la formation de C3 convertases⁹⁷.

Membrane Cofactor Protein

MCP, ou CD46, est une glycoprotéine transmembranaire, présente sous 4 isoformes de 51 à 68kDa, issus d'un épissage alternatif. La portion extracellulaire de MCP contient 4 CCP de 60 acides aminés. Le gène codant pour MCP se situe sur le chromosome 1, en q3.2, à l'instar de

DAF et CR1⁹⁸. MCP est exprimé sur les surfaces de toutes les cellules nucléées⁹⁹. Il agit comme cofacteur du FI (protéase sérine plasmatique) dans la dégradation du C3b en phase membranaire. L'activité cofacteur MCP/FI est 50 fois plus faible que l'activité FH/FI pour générer du iC3b¹⁰⁰. MCP ne participe pas à la dégradation de iC3b en C3c et C3dg, à l'inverse de CR1 et FI¹⁰⁰. Son expression augmente à la surface des CE via la protéine C réactive (CRP)¹⁰¹. MCP jouerait également un rôle dans l'immunité adaptative, sur la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en T régulateur¹⁰².

Decay Accelerating Factor

DAF, ou CD55, protéine de 70kDa, agit également comme régulateur du complément. Il comporte 4 CCP dans son domaine extracellulaire, hautement glycosylés, et une ancre GPI qui le lie à la membrane¹⁰³. Il accélère la dissociation des C3 et C5 convertases et prévient la formation de nouvelles convertases¹⁰⁴. DAF inhibe la C3 convertase alterne en se liant au fragment Bb¹⁰⁵, et au C3b¹⁰⁶ en compétition avec le FB. Le complexe DAF/C3b a été cristallisé en 2016 par Forneris *et al.*⁹³. De nombreux stimuli augmentent l'expression de DAF à la surface des CE, comme les cytokines proinflammatoires (IFN β , TNF α)¹⁰⁷, l'hème-oxygénase 1 (HO-1)¹⁰⁸, le VEGF (vascular endothelial growth factor)¹⁰⁹ ou la thrombine¹¹⁰. De même que MCP, DAF module négativement la réponse immunitaire adaptative T¹¹¹.

Thrombomoduline

La TM est une protéine n'appartenant pas au système du complément, mais au système de la coagulation. C'est une glycoprotéine transmembranaire de 74kDa¹¹², exprimée par toutes les CE à l'exception de l'endothélium cérébral^{113,114}. Le rôle anticoagulant de la TM a été décrit dans les années 80, à travers ses fonctions de ligand de la thrombine et de cofacteur majeur de la protéine C¹¹⁵. Delvaeye *et al.*, en 2009, ont décrit 6 mutations du gène de la TM chez 7 patients atteints de SHUa²⁴. La publication de ces cas de SHUa liés à une mutation de la TM a permis la mise en évidence d'un rôle direct comme régulateur du complément : la TM accélère la dégradation du C3b par le FI, en présence de FH ou de C4bBP^{24,116}. Pour certains auteurs, le rôle de régulateur du complément par la TM reste soumis à discussion, les mutations décrites par Delvaeye *et al.* pouvant être considérées comme des variants rares.

La portion soluble de la TM, ou sTM, correspond à la partie extracellulaire de la TM ; sa concentration plasmatique est aux alentours de 30 à 50ng/ml¹¹⁷. Elle est générée par le

clivage enzymatique de la TM¹¹⁸⁻¹²⁰. La sTM est augmentée en cas d'agression endothéliale (sepsis, CIVD - coagulation intravasculaire disséminée -, inflammation)¹²¹. Sur le plan thérapeutique, dans les MAT rattachées à la transplantation, les coagulopathies liées aux greffes de cellules hématopoïétiques, la maladie veino-occlusive du foie ou les réactions de greffon versus hôte (GVH)^{34,122}, l'administration de sTM a été rapportée comme bénéfique. Elle a également été testée avec des résultats positifs au Japon, chez des patients présentant une CIVD^{123,124}. Ces pathologies variées avaient en commun les lésions endothéliales, un état d'hypercoagulabilité et un état proinflammatoire par sécrétion de cytokines. Dans des études précliniques sur la pré-éclampsie, la TM recombinante améliorait significativement le débit sanguin utéro-placentaire, l'oxygénation fœtale et placentaire, et diminuait le taux de mortalité fœtale¹²⁵.

4 - Physiopathologie du SHUa : le complément n'est pas suffisant

4.1 - Nécessité de facteurs additionnels

Si l'activation excessive de la voie alterne joue un rôle clef dans la genèse du SHUa, la présence d'une anomalie favorisant la dérégulation de ce système n'apparaît pas suffisante. En effet, le SHUa est une pathologie dont la pénétrance s'avère variable (~50%) et modulée par le type et le nombre de mutations, ainsi que par la présence associée ou non d'éventuels polymorphismes¹²⁶⁻¹²⁹. D'autre part, deux patients porteurs des mêmes mutations ou polymorphismes ne déclenchent pas pour autant tous les deux la maladie, suggérant également un rôle fort de l'environnement.

Dans les cohortes de patients atteints de SHUa, un facteur déclenchant ou "trigger" est mis en évidence chez plus de la moitié des patients^{79,130}. Cela pourrait participer à expliquer pourquoi 40% des tableaux de SHUa ne se déclarent qu'à l'âge adulte^{79,126}. Ce trigger peut être un phénomène infectieux, tel qu'une infection des voies respiratoires ou de l'appareil digestif, décrit chez près de 80% des cas dans les cohortes pédiatriques¹³¹. Caprioli *et al.* ont également rapporté un taux élevé d'infections précédant le SHUa, à savoir respectivement 100%, 70% et 60% pour les mutations de MCP, FH et FI.¹²⁶ La grossesse est aussi un trigger fréquent : chez 20% des femmes présentant la maladie, le premier épisode de SHUa est survenu en lien avec la grossesse (dont 80% en *post partum*)^{132,133}. La transplantation est également mise en cause, pouvant être le facteur déclenchant d'un SHUa chez des patients présentant une anomalie de régulation du complément qui n'avait, jusqu'alors, jamais parlé

cliniquement³⁹. Ces triggers, de nature variée, favoriseraient probablement le développement d'un environnement vasculaire prothrombotique, et la dysrégulation du complément serait ainsi un facteur prédisposant à l'apparition d'une MAT, après activation de l'endothélium. Ces observations de phénomènes en cascade soulignent le concept de multiples hits.

4.2 - Concept de multiples hits et dépassement des capacités de régulation de la CE

Plusieurs travaux de notre équipe ont développé et argumenté ce concept de hits multiples, cherchant à expliquer la cascade de la microthrombose dans le SHUa, suite à une agression endothéliale^{4,134}.

1/ En conditions basales, l'endothélium est quiescent, sa perméabilité est limitée à ses fonctions physiologiques d'interface sang/tissu. Les CE favorisent la circulation sanguine, synthétisent des médiateurs vasodilatateurs et antithrombotiques, et expriment peu de protéines d'adhérence.

2/ En réponse à une agression (ex : infection, grossesse, transplantation, médicament...), le phénotype endothélial évolue vers un profil prothrombotique et proinflammatoire. Sa perméabilité est augmentée, ainsi que l'expression de molécules d'adhérence qui engendre le recrutement de leucocytes. Cette adaptation physiologique vise à contrecarrer une agression par un pathogène.

3/ Le niveau d'activation endothéliale peut, en conditions pathologiques, être dépassé et les mécanismes de régulation saturés, par exemple en cas d'inflammation forte, de choc septique ou d'hémolyse massive. Une suractivation du complément (via un dérèglement du complément dans le SHUa) favoriserait alors l'activation endothéliale par un défaut de protection de l'endothélium agressé. Cette activation, initialement bénéfique, pourrait induire des lésions de l'endothélium hôte. Le complément serait insuffisamment régulé avec production en excès de C3b et d'anaphylatoxines à l'origine de l'exocytose des corps de Weibel Palade endothéliaux. Denses et multiples, ce sont des vésicules stockant des protéines, dont la P-sélectine^{135,136} et le facteur von Willebrand (vWF)¹³⁷, impliqués tous deux dans l'hémostase. Il s'ensuit l'activation et l'agrégation plaquettaire et l'activation de la coagulation, qui forment des thrombi fibrino-plaquettaires. Les globules rouges se lysent alors sur ces micro thrombi, libérant l'hémoglobine puis l'hème. L'hème, activateur de la voie

alterne du complément, pourrait ainsi jouer le rôle de "second hit" et amplifier l'événement thrombotique.

4.3 - Pourquoi l'endothélium glomérulaire dans le SHUa ?

Après une brève description de l'endothélium et de ses propriétés, nous tenterons de déterminer si certaines spécificités de l'endothélium glomérulaire peuvent expliquer le tropisme rénal du SHUa.

4.3.1 - Endothélium : Présentation générale

L'endothélium vasculaire est stratégiquement situé entre l'espace intravasculaire et la paroi vasculaire proprement dite. Sa première description daterait de Harvey en 1628, dans un texte intitulé "*Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*"¹³⁸. La description était complétée par Malpighi en 1661, qui décrivait les capillaires, séparant le sang des tissus¹³⁹. Reckinghausen conceptualisait la CE, et l'anatomiste suisse Wilhelm His introduisait en 1865 le concept d'endothélium en le différenciant des épithéliums¹⁴⁰. La description précise de la structure de l'endothélium débute dans les années 60 par les travaux de recherche de Florey¹⁴¹. Le développement d'isolement et de méthodes de culture cellulaire dans les années 70 a rendu possible l'analyse fine de la biologie cellulaire endothéliale¹⁴². En quelques dizaines d'années, de multiples fonctions ont été reconnues à l'endothélium, jouant un rôle vital dans l'homéostasie tissulaire, le tonus vasomoteur, l'immunité innée et adaptative^{143,144}.

Il se constitue d'une fine couche monocellulaire tapissant la face interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques, depuis leur origine, à la sortie du cœur, jusqu'aux capillaires, leurs plus fines ramifications intra organes. On divise classiquement l'endothélium en deux grandes catégories, selon le diamètre des vaisseaux (cf. Figure n°4) : le système macrovasculaire (artères, veines) et le système microvasculaire (artérioles, veinules, capillaires). On estime le nombre de CE à 10^{12} soit environ 1,5kg. Ce tapis repose sur une membrane basale composée, en outre, de collagène et glycoprotéines.

Figure n°4 : Schéma représentatif des structures vasculaires (d'après Benjamin Cummings Publishing compagny, 2001)

Les cellules sont jointes par des jonctions serrées (fusions membranaires focales) ou communicantes (accolement simple de 2 membranes). La surface endoluminale des CE est couverte du glycocalyx, un fin manteau fragile qui fut découvert dans les années 60 grâce à la microscopie électronique par Luft¹⁴⁵. Il se constitue principalement de glycoprotéines, protéoglycanes et GAG, parmi lesquels l'héparane sulfate, aux propriétés anticoagulantes¹⁴⁶ (cf. Figure n°5). Le glycocalyx, chargé négativement, participe à la régulation du trafic cellulaire. Par exemple il repousse les plaquettes circulantes et les leucocytes circulants chargés négativement. Il régule également la circulation de macromolécules¹⁴⁷. Des travaux chez l'animal ont démontré que la dégradation du glycocalyx engendrait une hyperperméabilité capillaire¹⁴⁸ et sa dégradation par des héparinases engendrait une adhésion leucocytaire¹⁴⁹. Les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de ces cellules sont sujettes à hétérogénéité.

Figure n°5 : Schéma représentatif du glycocalyx endothélial et ses constituants principaux (d'après Reitsma et al., 2007, Eur J Physiol¹⁴⁶)

4.3.2 - Hétérogénéité endothéliale

Alors que la majorité des travaux publiés dans les années 80 étaient concentrés sur l'étude des HUVEC, en faisant un modèle classique de la littérature (et dans une moindre mesure les CE bovines aortiques), quelques équipes se penchaient sur l'hétérogénéité endothéliale, notamment avec l'utilisation de l'IHC (immunohistochimie)¹⁵⁰⁻¹⁵². Différents lits vasculaires étaient décrits, dont les protéines exprimées différaient. Auerbach isola et utilisa des cellules de nombreux organes différents pour approcher ce concept d'hétérogénéité endothéliale¹⁵³. Rapidement, les cliniciens se sont intéressés à l'hétérogénéité endothéliale afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques de certaines maladies avec une atteinte d'organe spécifique.

Hétérogénéité structurelle : les CE sont de formes généralement losangiques mais varient dans leurs dimensions, selon qu'elles tapissent le système macro ou microvasculaire. Une étude de Kribria *et al.*¹⁵⁴ sur la variation de la forme des CE chez le rat retrouvait, par exemple, que les CE aortiques étaient longues, étroites et fusiformes tandis que les CE de la veine cave inférieure étaient longues, étroites et rectangulaires. Dans une étude de la microcirculation trachéale chez le rat, les CE étaient allongées et fusiformes dans les artérioles, de forme irrégulière dans les capillaires, et grandes et elliptiques dans les veinules post-capillaires¹⁵⁵. D'autre part, l'endothélium peut être continu (fenêtré ou non) ou discontinu (cf. Figure n°6). L'endothélium non fenêtré continu se trouve dans les artères, veines et capillaires du cerveau, de la peau, du cœur et du poumon. L'endothélium fenêtré continu se retrouve dans les organes ayant un rôle de filtration ou de transport transendothélial : les capillaires des glandes exo et endocrines, l'estomac, la muqueuse intestinale, le plexus choroïde et enfin les glomérules et certains capillaires péri tubulaires. Les endothéliums discontinus sont décrits dans les lits vasculaires sinusoïdaux, dont on peut citer le foie ou la rate^{143,144}.

Figure n°6 : Schéma représentatif de l'hétérogénéité de perméabilité endothéliale (d'après Aird, Circulation Research, 2007¹⁴³)

Hétérogénéité fonctionnelle : Les fonctions de l'endothélium sont nombreuses. Outre leur fonction classique de barrière, les CE interviennent dans la régulation du tonus vasomoteur et de la perméabilité vasculaire, du contrôle de l'inflammation tissulaire et de la thrombose¹⁵⁶, notamment par l'agrégation plaquettaire, l'adhésion leucocytaire et la prolifération des cellules musculaires lisses. Les acteurs impliqués dans ces processus physiologiques sont sécrétés après activation de l'endothélium par de nombreux agonistes (neurotransmetteurs, hormones, produits des plaquettes ou de la coagulation). Ces molécules se lient majoritairement à l'endothélium par des récepteurs couplés à une protéine G (GPCR)¹⁵⁷. Le tonus vasomoteur est régulé par de nombreux facteurs endothéliaux, vaso-constricteurs (ex : thromboxane A2, endothéline-1, angiotensine II) ou vaso-dilatateurs (ex : monoxyde d'azote ou NO, prostaglandine I2 ou PGI2)¹⁵⁸. Le tableau n°5 illustre la répartition hétérogène des principaux facteurs de l'hémostase

Tableau n°5 : Hétérogénéité endothéliale de répartition des facteurs de l'hémostase dans des modèles cellulaires, animaux et à partir de donneurs humains décédés (adapté de Roumenina et al.¹³⁴)

Prot.	Fonctions	Modèles	Etat	Vaisseaux	Organes	Ref.
vWF	Adhésion plaquettaire, protéine chaperon du facteur VIII	Souris (ARN, Ag)	Etat basal	Veines (ubiquitaires) > artères (mosaïque statique) Macro > Microvx	Poumon > cerveau > cœur > rein > foie	159
		Souris (ARN)	LPS		↗ : cœur, rein ↘ : cerveau	160
		Humain (ARN)	2 don. (mort trauma.)		Cœur > poumon > rein > cerveau > foie	
FT	Initiateur de la coagulation	HUVEC, BAECs	Basal / TNFα, LPS	Pas ou peu d'expression / ↗ expression et activité		161,1 62
		Prog. de CE (ARN)	Basal / TNFα			163
		Babouin	Contrôle / sepsis à <i>E. coli</i>		↗ FT dans la rate ++ ↗ activité dans les glomérules et les septas alvéolaires	164
		Babouin	Sepsis à <i>E. coli</i>		Branches artérielles > gros segments (aorte)	165
PAI-1	Antifibrinolytique	Souris	Basal / LPS	Microvx (capillaires, veinules) / ↗	Poumon > cœur > cerveau / ↗ cœur > poumon > cerveau	166
TM	Anticoagulant Régulateur du complément	CE humaines (prot.)	Basal / TNFα	Tous les segments	GEC > HUVEC / ↘ ↘ GEC > ↘ HUVEC	167
		Humain (prot.)	4 don.		Placenta, poumon > foie, rate > rein, cœur > cerveau ≈ 0	114
		Humain (ARN)	2 don. (mort trauma.)		Poumon, cœur > foie > rein > cerveau	160
TFPI	Anticoagulant	Souris (ARN)	basal / TNFα, LPS	Microvx ++	Poumon > cœur > rein, cerveau > foie ≈ 0 / ↘	168
		Humain (ARN)	2 don. (mort trauma.)		Placenta > poumon, foie > rein, cœur > cerveau	160
EPCR	Anticoagulant	Humain (prot.)	3 don.	Macrovx ++, faible dans les capillaires	+++ : cœur, poumon, foie, cerveau	169
		Babouin (prot.)	Basal		++ : rein	
		Souris, rat (ARN)	Basal		Placenta > poumon > foie > cœur rein > cerveau	170

Ag : antigène, **CE** : cellules endothéliales, **don.** : donneurs, **EPCR** : récepteur endothélial à la protéine C, **FT** : facteur tissulaire, **macrovx** : macrovaisseaux, **microvx** : microvaisseaux, **PAI-1** : inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1, **prot.** : protéines, **TFPI** : inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, **TM** : thrombomoduline, **vWF** : facteur von Willebrand

4.3.3 - Particularités de l'endothélium glomérulaire

Système vasculaire rénal et particularités de l'endothélium glomérulaire

Le débit sanguin rénal représente approximativement 20-25% du débit sanguin cardiaque¹⁷¹. Le sang arrive au rein par l'artère rénale et ses branches, qui se divisent en artères interlobaires, arquées et interlobulaires (cf. Figure n°7). Les artérioles afférentes provenant des artères interlobulaires pénètrent dans la pelote de capillaires glomérulaires, puis la circulation continue par les artérioles efférentes, jusqu'aux capillaires péri-tubulaires ou la *vasa recta*.

Figure n°7 : Illustration d'un glomérule et d'un capillaire glomérulaire (d'après Aird, Circulation Research, 2007¹⁴⁴)

Les capillaires glomérulaires ont un rôle de filtre, perméables à l'eau et aux petites molécules, mais physiologiquement imperméables aux macromolécules. Le filtre glomérulaire comporte 3 couches : l'endothélium (et son glycocalyx), la membrane ou lame basale glomérulaire et les podocytes (cf. Figure n°7). Les CE glomérulaires forment la première barrière à la filtration. Elles participent au contrôle de la vasomotricité par la sécrétion de facteurs tel que le NO¹⁷², les prostaglandines¹⁷³ ou l'ET-1 (endothéline-1)¹⁷⁴.

L'étude des particularités phénotypiques des CE glomérulaires a longtemps été rendue difficile par les difficultés inhérentes à leur fragilité en conditions expérimentales. L'immortalisation d'une lignée cellulaire de CE glomérulaires humaines a pu être réalisée en 2006 par l'équipe de Satchell, cellules auxquelles nous avons eu recours pour nos travaux¹⁷⁵. *In vivo*, les CE glomérulaires humaines expriment de façon continue et uniforme CD31 et CD34 alors que l'expression de vWF était focale ou négative¹⁷⁶.

La microvascularisation rénale présente une compartimentation inhérente à son rôle de filtration. Trente % du volume sanguin étant filtré par le glomérule, le sang pénétrant dans les artérioles efférentes présente une viscosité nettement accrue. En fonction de leur

hétérogénéité fonctionnelle, les différents compartiments microvasculaires rénaux expriment des marqueurs moléculaires distincts. Par exemple, eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) est plus élevée dans les CE de la médullaire rénale (*vasa recta*) que dans le cortex (glomérules et capillaires péri-tubulaires)¹⁷⁷. Les connexines 37 et 40 sont exprimées dans l'endothélium des artérioles afférentes, mais non dans les artérioles efférentes chez la souris; la connexine 43 est exprimée à la fois dans les artérioles afférentes et efférentes; aucune des connexines ci-dessus n'est présente dans les capillaires glomérulaires¹⁷⁸. Les claudines 10 et 15 sont exprimées dans l'endothélium des *vasa recta*, mais ne sont pas retrouvées dans les artérioles afférentes ou efférentes¹⁷⁹.

Des travaux datant de 2013 ont étudié par microdissection de glomérules de patients atteints de SHUa, *versus* des glomérules de patients contrôles, l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la coagulation. PAI-1 était 95 fois plus exprimé dans les glomérules de patients atteints de la maladie, alors que le tPA était moins exprimé. L'expression de vWF était 3 fois plus élevée dans les glomérules de patients atteints de SHUa. Les auteurs ne trouvaient pas de différence pour l'expression de l'ADAMTS-13. L'expression de la TM était 7 fois plus élevée dans le SHUa, corrélée de façon positive avec l'expression des facteurs de transcription KLF2 et KLF4¹⁸⁰.

Endothélium glomérulaire et complément

La différence de distribution entre molécules régulatrices du complément selon les endothéliums a été peu étudiée. Une de nos hypothèses initiales était que ces différences phénotypiques pourraient expliquer en partie une susceptibilité aux stimuli inflammatoires ou thrombotiques. En 2016, Sartain *et al.*¹⁶⁷ ont comparé des cultures primaires cellulaires (HUVEC et de CE glomérulaires humaines commerciales). Ils constataient une expression des régulateurs du complément à l'état basal faiblement différente en RTqPCR : respectivement x2, x1.7, x0.3 et x0.3 pour la TM, CD59, MCP et DAF sur les CE glomérulaires par rapport aux HUVEC. En cytométrie en flux (FACS), à la surface des 2 types cellulaires, la TM était 2 fois plus exprimée que DAF et MCP, tandis que CD59 était 13 fois plus exprimé que la TM. L'intensité relative de ces 4 régulateurs en FACS était équivalente sur les 2 types cellulaires. La comparaison des gènes de la voie alterne notait des différences entre HUVEC et CE glomérulaires : l'expression du facteur P (ou properdine), du FD et du FH était respectivement plus élevée de 7, 3 et 3 fois sur les CE glomérulaires. Il n'y avait pas de

différence pour les niveaux d'expression génique de C3, C4, C5, FB, FI ainsi que pour le vWF et l'ADAMTS-13. Les auteurs ont ensuite étudié les différences d'expression de ces protéines, après stimuli proinflammatoires par des cytokines (IL-1 β , TNF α). Les différences après stimulation étaient modestes. La principale différence résidait dans l'expression de la TM après stimulation par le TNF α . L'expression de la TM diminuait de 2,8 fois sur les HUVEC et 6,7 fois les CE glomérulaires, RTqPCR, avec une diminution respective de 14 et 20 fois mesurée en FACS, associée à une baisse d'activation de la protéine C par le complexe TM-thrombine, et donc un phénotype procoagulant.

La même équipe publiait en 2018¹⁸¹ un travail de comparaison de l'expression des protéines liées au complément sur les CE glomérulaires, *versus* des CE microvasculaires de cerveau (BMVEC) à l'état basal et stimulées par le TNF α . Les protéines de la voie alterne C3, FB et C5 étaient significativement plus exprimées sur les BMVEC. A l'inverse, le FD y était moins exprimé. Certains régulateurs du complément étaient plus exprimés à l'état basal et sous stimulation à la surface des BMVEC (MCP, TM, DAF, FI et FH), pouvant rendre compte d'une susceptibilité au complément plus importante sur les CE glomérulaires. En effet, celles-ci généraient plus d'anaphylatoxines C3a et C5a dans leur surnageant, en faveur d'une activation des C3 et C5 convertases plus intense à leur contact. Le tableau n°6 présente l'hétérogénéité de distribution du complément décrite dans la littérature

Tableau n°6 : Hétérogénéité endothéliale de répartition des protéines du complément, sur des modèles cellulaires, humains et animaux (adapté de Roumenina et al. ¹³⁴)

Pro t.	Fonctions	Modèles	Expression	Conditions associées à une ↗	Ref.
C3	Progéniteur C3a, C3b et fragments d'activation du C3 (iC3b, C3dg, C3d)	HUVEC (ARN, prot.) CE rats, hGEC (ARN, prot.)	Faible HUVEC ≈ GEC	IL-1β, TNFα, glucocorticoïdes + IL-1α +/- IFNγ * TNFα	167,182-186
FB	Clive C3/C5 Active les C3/C5 convertases alternes	HUVEC (ARN, protéine) hGEC (ARN, prot.)	Faible HUVEC ≈ GEC	TNFα, IL-1β, glucocorticoïdes + IL-1α, IFNγ TNFα, IL-1β	167,182-186
FD	Clive la liaison C3b-FB pour former C3/C5 convertases alternes	hGEC (ARN) HUVEC (ARN)	HUVEC (faible) < hGEC	TNFα, IL-1β (faible)	167,186
FP	Stabilise C3/C5 convertases alternes Initie la VA	HUVEC, EC cardiaques (ARN) HUVEC, hGEC (ARN)	Faible HUVEC << GEC	"shear stress"	186,187 167
FH	Accélère la dissociation des convertases; cofacteur du FI	HUVEC (ARN, prot.) hGEC (ARN, prot.)	HUVEC << GEC	IFNγ, hème	182,188-190,167,186
FI	Dégrade C3b	HUVEC (ARN, prot.) hGEC (ARN, prot.)	+ HUVEC ≈ GEC	IL6 +/- IFNγ*	167,182,186,190

*résultats contradictoires. **FB** : facteur B, **FD** : facteur D, **FH** : facteur H, **FI** : facteur I, **FP** : facteur P (properdine), **GEC** : Glomerular Endothelial Cells, **hGEC** : human GEC, **HUVEC** : Human Umbilical Vein Endothelial Cells, **prot.** : protéine, **VA** : voie alterne

Le SHUa est donc une MAT à tropisme rénal. La dérégulation de la voie alterne du complément joue un rôle majeur dans la genèse de la maladie. Cependant, d'autres facteurs sont également impliqués, la maladie ne s'exprimant parfois qu'à l'âge adulte, chez des patients porteurs de mutation depuis leur naissance. L'on en déduit le concept d'un trigger d'activation endothéliale (infection ou grossesse par exemple), qui, conjugué à des anomalies de régulation du complément, aboutit au phénotype microvasculaire proinflammatoire et prothrombotique du SHUa. Quels que soient ces triggers, un tableau de SHU comporte une agression endothéliale, la formation de thrombi dans les microvaisseaux, puis, dans un deuxième temps, une hémolyse intravasculaire par lyse des globules rouges sur les thrombi. Les facteurs expliquant la prédominance des lésions du SHUa au niveau de l'endothélium glomérulaire demeurent à ce jour inconnus. Nous avons émis l'hypothèse que l'hémolyse pourrait contribuer à expliquer le tropisme rénal observé dans le SHUa. Nous y consacrerons ainsi le second chapitre.

Chapitre 2 - Rôle de l'hémolyse dans la susceptibilité rénale aux MAT

Ce second chapitre sera consacré à l'hémolyse et nous nous intéresserons plus particulièrement au rôle de l'hème, identifié comme "second hit" dans le SHUa, capable d'amplifier les lésions de MAT via une activation du complément et l'aggravation de la dysfonction endothéliale. Nous décrirons les liens existants entre l'hème, le complément, et les mécanismes de détoxification de l'hème. Afin de préciser le rôle de l'hème dans les lésions de MAT rénales, nous effectuerons une brève présentation des maladies hémolytiques atteignant le rein, dans le but d'en dégager certains dénominateurs communs.

1 - L'hémolyse : description générale

L'hémolyse est définie par la destruction des globules rouges (GR) libérant l'hémoglobine (Hb) dans la circulation sanguine. Chez les individus sains, la durée de vie d'un GR est de 120 jours au terme desquels le GR est détruit, par hémolyse intratissulaire au niveau splénique ou hépatique¹⁹¹. L'hémolyse pathologique amplifie ces mécanismes et, à l'inverse des mécanismes physiologiques d'élimination des GR, a lieu majoritairement en intravasculaire.

1.1 - L'hémolyse intratissulaire

La destruction des GR intratissulaires concerne 85% des GR vieillissants et s'effectue en plusieurs étapes, représentées figure n°8 :

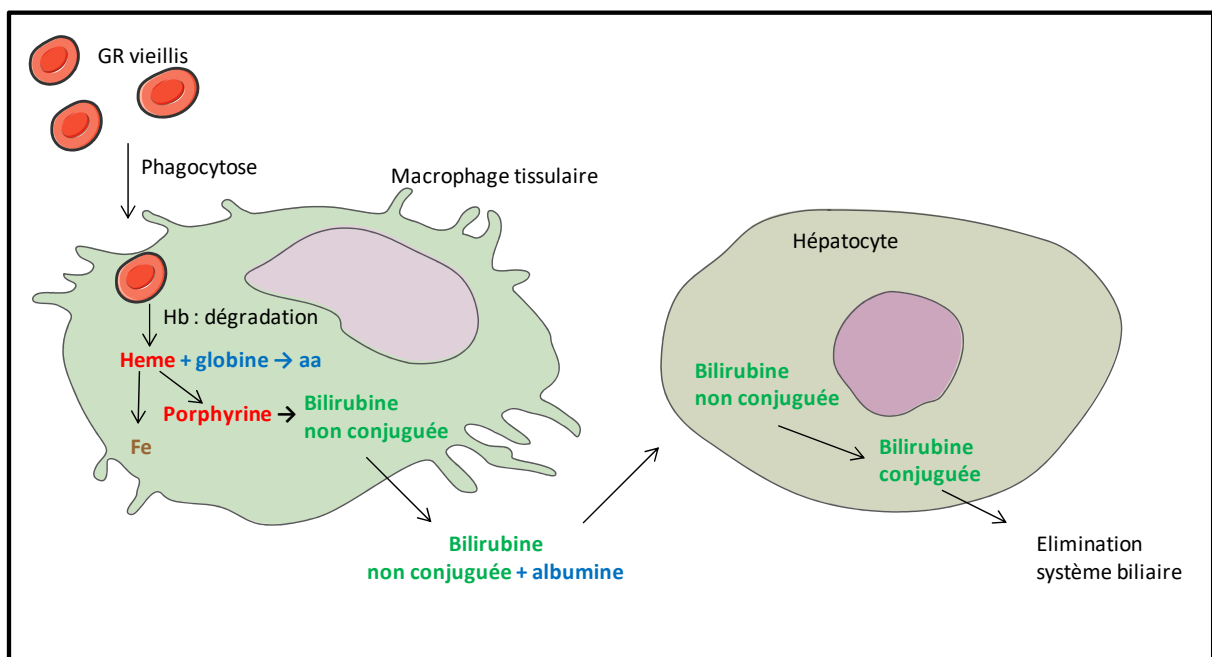
- Phagocytose des GR vieillissants dans le cytoplasme des macrophages hépatiques, spléniques ou médullaires.
- L'Hb, principal composant des GR, est alors décomposée en ses différents constituants : l'hème (porphyrine contenant du Fer) et la globine. La globine est dégradée (catabolisme protéique). Le fer est recyclé dans l'érythropoïèse ou stocké dans les macrophages via la ferritine. L'hème est transformé en biliverdine sous l'action de l'hème-oxygénase (HO), réaction produisant du monoxyde de carbone (CO)¹⁹². La biliverdine est transformée en bilirubine (dite bilirubine libre, non conjuguée, ou encore indirecte, dont la structure tétrapyrrolique est encore fermée) qui va se lier à l'albumine dans le plasma.
- Au niveau hépatique, cette bilirubine non conjuguée et non aqua-soluble, est transformée en bilirubine conjuguée, par conjugaison de cette molécule avec l'acide glucuronique

(ouverture de l'anneau tétrapyrrolique et formation d'une structure linéaire), au ratio de 2 molécules de glucuronide / 1 molécule de bilirubine¹⁹³.

- Soluble dans l'eau, la bilirubine conjuguée est ensuite excrétée dans la bile et donc directement injectée dans le duodénum. Elle sera alors dégradée par la flore intestinale et transformée en stercobiline (pigment qui colore les fèces) et en urobilinogène qui est réabsorbé via le cycle entéro-hépatique puis filtré au niveau rénal, menant à l'urobiline qui est retrouvée dans les urines¹⁹⁴.

Au cours de l'hémolyse, la concentration de bilirubine libre sérique est augmentée.

Figure n°8 : Schéma représentatif de l'hémolyse intratissulaire



aa : acides aminés, *Fe* : ferritine, *GR* : globules rouges, *Hb* : hémoglobine

1.2 - L'hémolyse intravasculaire

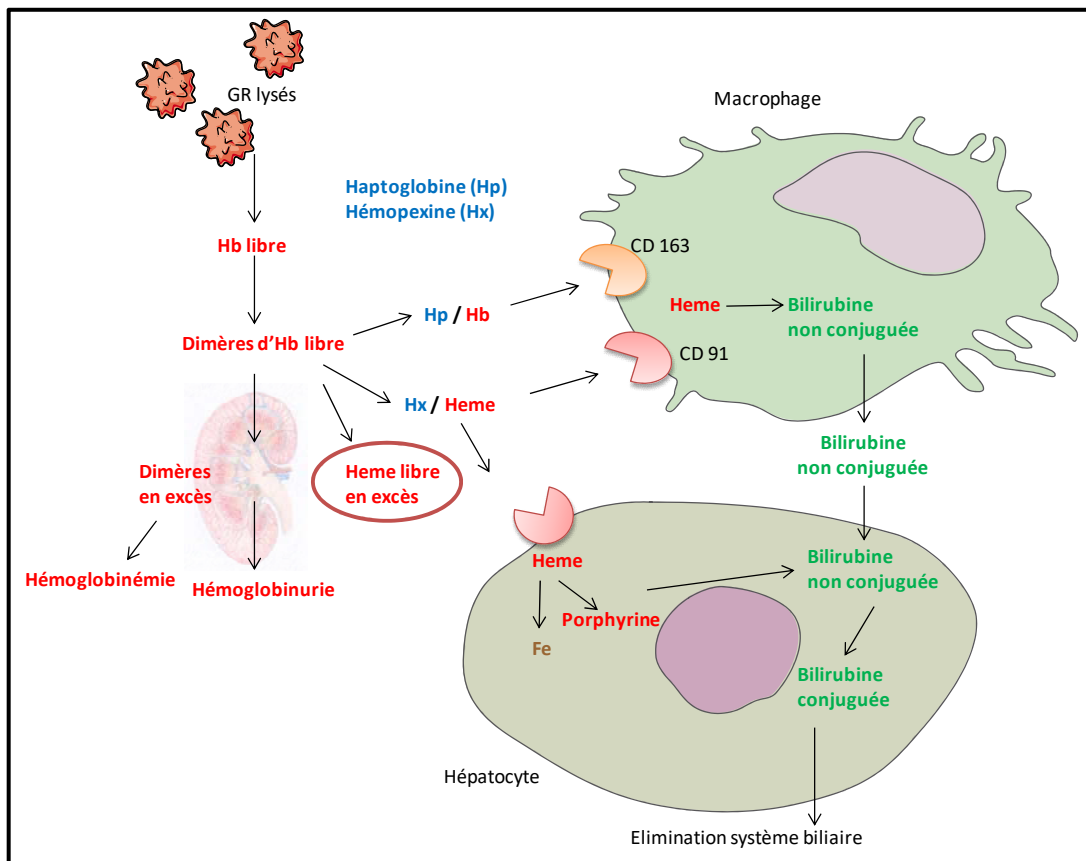
Celle-ci représente environ 15% de l'hémolyse physiologique, par lyse osmotique des GR vieillissants ou par fragmentation dans les capillaires. Elle est majoritaire en cas d'hémolyse massive, pathologique. Ses étapes sont illustrées Figure n°9.

L'Hb libre se fixe à l'haptoglobine (Hp), qui est une α_2 globuline dont la synthèse est hépatique. Alors que la demi-vie de l'Hp plasmatique libre est de 4 à 5 jours, celle du complexe Hp-Hb est de moins de 30 minutes par catabolisme hépatique¹⁹⁵.

Dans l'hémolyse intravasculaire, l'Hp est très abaissée, parfois indosable en cas d'hémolyse massive. L'Hb libre intravasculaire est alors en partie captée par les hépatocytes et dissociée en dimères $\alpha\beta$ qui traversent le filtre glomérulaire où ils sont partiellement réabsorbés. Si la réabsorption est saturée, l'excès d'Hb libre au niveau urinaire provoque une hémoglobinurie¹⁹⁶.

Cette réabsorption de l'Hb libre au niveau tubulaire rénal induit un catabolisme et un stockage du Fer. On peut alors visualiser ces dépôts de fer dans les cellules tubulaires par coloration de Perls, qui signe l'hémosidérinurie¹⁹⁷.

Figure n°9 : Schéma représentant les étapes de l'hémolyse intravasculaire



aa : acides aminés, *Fe* : ferritine, *GR* : globules rouges, *Hb* : hémoglobine, *Hp* : haptoglobine, *Hx* : hémopexine

L'hème libre intravasculaire peut par ailleurs se lier à l'albumine et à l'hémopexine (Hx) (β glycoprotéine de synthèse hépatique). Le complexe Hx – hème est capté par les hépatocytes et l'Hx est libérée du complexe et retourne partiellement dans le plasma tandis que l'hème est dégradé en intra-hépatique¹⁹⁸.

L'hémolyse est considérée comme pathologique lorsque la durée de vie du GR est raccourcie et engendre une anémie, dite hémolytique, rattachée à cette destruction accélérée des GR. Cette définition demeure imparfaite pour deux raisons. D'une part, un phénomène de réduction de la durée de vie des GR est observé dans la majorité des anémies, quelle qu'en soit la cause (ex: anémie ferriprive, insuffisance médullaire). Ces affections ne sont pas considérées comme des anémies hémolytiques car la destruction globulaire n'est pas la cause de l'anémie. D'autre part, toute réduction de la survie des GR n'entraîne pas systématiquement une anémie. Celle-ci survient lorsque la moelle osseuse ne peut plus compenser la perte de GR due à l'hémolyse malgré l'augmentation de la production de GR (anémie régénérative).

On distingue sur le plan étiologique les hémolyses de causes corpusculaires (anomalie intrinsèque, innée ou acquise, du GR) et les causes extracorporelles, rattachées à un facteur extrinsèque (cf. Tableau n°7).

Tableau n°7 : Principales étiologies d'hémolyse

Causes corpusculaires	
Maladies de l'Hb	Drépanocytose, thalassémies, Hb instable
Enzymopathies	Déficit en G6PD, en pyruvate kinase, Wilson
Maladies de la membrane	Constitutionnelle (sphérocytose, elliptocytose, stomatocytose)
	Acquise (HPN, déficit des protéines d'ancrage de DAF et CD59)
Causes extracorporelles	
Immunologiques	Auto immune
	Allo immune (post transfusion, materno-fœtale)
Toxiques	Saturnisme, cuivre
Médicamenteuses	Ribavirine, sulfone
Bactériennes	Perfringens
Parasitaires	Paludisme, babésiose
Mécaniques	MAT
	Valves cardiaques mécaniques

G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase, **Hb** : hémoglobine, **HPN** : hémoglobinurie paroxystique nocturne, **MAT** : microangiopathie thrombotique

2 - Hème et hémoglobine : description générale

La molécule centrale impliquée dans l'hémolyse est donc l'Hb. Après une description générale de cette protéine, nous détaillerons plus particulièrement l'un de ses composants, l'hème, utilisé dans notre modèle mimant l'hémolyse, à travers l'étude de ses effets proinflammatoire et de sa régulation.

2.1 - L'hémoglobine

Les premiers écrits retrouvés concernant la notion de globule datent de 1674 lorsqu'Antoni van Leeuwenhoek établissait la description de l'analyse de son propre sang, composé majoritairement "de petites formes globulaires et rouges"¹⁹⁹. Les premières études décrivant l'Hb datent du XIXe siècle. Sa découverte est attribuée à Hunefeld en 1840 à l'université de Leipzig²⁰⁰. La structure de l'Hb fut établie par Perutz en 1959²⁰¹. Cette découverte lui valut de partager le prix Nobel de chimie en 1962 avec Kendrew, et ses travaux semblables sur l'étude de la myoglobine.

Figure n°10 : Schéma représentatif des structures de l'Hb et la molécule d'hème

L'Hb est une métalloprotéine contenant du Fer, présente au sein des érythrocytes. Sa fonction principale est le stockage et le transport d'oxygène, de dioxyde de carbone et de NO, de l'appareil respiratoire au reste de l'organisme où se déroulent les échanges gazeux. L'Hb est une chromoprotéine porphyrinique, de la superfamille des globulines. Il s'agit d'une protéine de 64kDa hétérotétramérique formée de chaînes polypeptidiques, identiques 2 à 2 (chez l'adulte ce sont les globines α et β) (cf. Figure n°10). Chaque globine présente un repliement caractéristique, une poche hydrophobe, dans laquelle se situe un groupe prosthétique : l'hème (le ratio étant d'une globine pour une molécule d'hème)²⁰².

2.2 - L'hème

2.2.1 - Caractéristiques structurelles

L'hème, représenté sur la Figure n°10, correspond à la protoporphyrine IX qui est constituée de 4 noyaux pyrroles (tétrapyrroliques) liés par un groupe -CH, et en situation basale d'un cation de Fer à l'état ferreux (Fe^{2+}). La molécule tétrapyrrolique est plane, et l'atome de Fer se lie par coordination au résidu d'histidine F8 de la globine. Ce résidu d'histidine proximal est situé sous le plan de l'hème. La molécule de Fer peut également se lier de façon réversible, par coordination, à la molécule d' O_2 au-dessus du plan de l'hème, à l'histidine distale. La poche hydrophobe dans laquelle est contenu l'hème lui permet d'être maintenu à l'état ferreux (Fe^{2+}). En cas d'oxydation, le fer passe à l'état ferrique (Fe^{3+}) et l'hème est alors désigné sous le terme d'hématine, tandis que l'hémoprotéine devient la méthémoglobine²⁰².

L'hème est issu d'une synthèse mitochondriale. C'est une molécule de nature hydrophobe qui contient des groupes méthyles en positions 1, 3, 5 et 8; des groupes vinyle en positions 2 et 4 et des groupes d'acide propionique en positions 6 et 7. Plusieurs types d'hème, qui diffèrent selon la composition des chaînes pyrroliques, sont présents dans la nature. L'hème de type b est le plus fréquent et constitue la partie prosthétique de toutes les hémoprotéines sauf les cytochromes (hème de type a et c)²⁰².

2.2.2 - Récepteur de l'hème

En 2007, Figueiredo *et al.*²⁰³ identifiaient le premier récepteur extracellulaire à l'hème, en démontrant que l'hème induisait la sécrétion de $TNF\alpha$ macrophagique par un mécanisme dépendant de MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88), du récepteur TLR4 et de CD14. Les conséquences physiopathologiques de cette liaison hème-TLR4 étaient confirmées en 2014 dans un modèle murin de drépanocytose, où l'hème provoquait la dégranulation des corps de Weibel Palade, l'activation de la voie $NF\kappa B$ et la vaso-occlusion sous l'effet du TLR4²⁰⁴. Ainsi, l'hème activerait TLR4 pour induire la production de cytokines mais aussi la mort cellulaire par nécrose programmée. La nécrose induite par l'hème serait TLR4-dépendante, via la production de TNF ²⁰⁵.

Des études anciennes laissaient présager l'existence de plusieurs récepteurs cellulaires à l'hème. En 1979, Gräsbeck *et al.* rapportaient une liaison entre l'hème et les cellules de la bordure en brosse intestinale, chez l'humain et le porc²⁰⁶. Grâce à la spectrophotométrie, il a été démontré que l'hème liait la protéine de myéline basique bovine²⁰⁷ ainsi qu'une protéine

de surface de la bactérie *Aeromonas salmonicida*²⁰⁸. L'étude d'interaction directe entre hème et cellules murines révélait une liaison spécifique, réversible, saturable, d'affinité modérée avec un récepteur²⁰⁹, comme le laissait également suggérer la liaison directe de l'hème aux cellules humaines hépatiques HepG2²¹⁰. Finalement, il s'avérait que de nombreuses protéines liaient l'hème²¹¹, telles que la protéine du prion²¹², le peptide β amyloïde²¹³, la myosine²¹⁴, l'hormone de croissance (GH)²¹⁵ ou encore la molécule centrale du complément, le C3⁴.

En 2005, Shayeghi *et al.*²¹⁶ rapportaient l'existence d'un transporteur de l'hème inconnu jusqu'alors, le HCP1 (heme carrier protein 1), dans les cellules duodénales. En 2007, l'équipe de Raghuram²¹⁷ découvre que l'hème a pour récepteurs intracellulaires REV-ERB α (encodé par le gène *NR1D1*) et REV-ERB β (*NR1D2*), de la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux (NHR), orphelins jusqu'à cette découverte. La stœchiométrie de ces liaisons était de 1:1, et leurs conséquences physiopathologiques décrites étaient le recrutement du corépresseur NCoR, menant à la répression du gène *BMAL1*, composant du rythme circadien, sur un modèle cellulaire (cellules HepG2).

Certaines interrogations concernant les récepteurs de l'hème restent en suspens. L'hème peut induire la migration des neutrophiles *in vitro*, indiquant ainsi que l'hème agit comme une molécule chimiotactique^{218,219}. Les chimiokines et les molécules chimiotactiques peuvent induire la migration des neutrophiles par le biais de GPCR. L'inhibition pharmacologique de plusieurs voies activées par les GPCR (PI3K, PKC, phospholipase C (PLC) β , Rho et p38) a démontré que la migration des neutrophiles dépendait de l'activation des voies de signalisation caractéristiques des récepteurs chimiotactiques²¹⁹. Pour Dutra *et al.* ces résultats soulèvent la possibilité que l'hème activerait les neutrophiles via un GPCR, qui serait à découvrir²²⁰.

3 - Conséquences de l'hémolyse

3.1 - Effets toxiques de l'hème libre

Dans un état pathologique d'hémolyse, l'hème libre circulant chez les patients est évaluée aux alentours de 20 à 50 μ M^{198,221,222}. Dans les modèles murins, cette concentration atteint 75 à 100 μ M²²³. Lorsque le système de détoxification est saturé, l'hème entraîne des effets délétères (cf. Figure n°10). La dualité de l'hème réside dans le fait qu'en petite quantité, elle

induit des fonctions indispensables aux fonctions cellulaires, tandis qu'en excès, l'hème libre cause des lésions cellulaires et tissulaires²²⁴⁻²²⁷.

Figure n °10 : Schéma représentant les effets toxiques de l'hème au niveau cellulaire et son implication dans certaines pathologies (adapté de Immenschuh et al, Frontiers in Pharmacology, 2017²²⁸)

3.1.1 - Stress oxydant

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) sont impliqués dans la physiopathologie de nombreuses pathologies vasculaires, incluant les MAT, l'ischémie reperfusion ou encore l'athérosclérose. La libération d'hème libre génère des ROS, qui vont engendrer des lésions de peroxydation lipidique, d'agrégation protéique et des anomalies au niveau de l'ADN. L'hème libre s'agrège dans les membranes et augmente la perméabilité membranaire et l'oxydation. L'oxydation des composés membranaires peut mener à la lyse cellulaire^{229,230}. L'exposition des CE à l'hème favorise la mort cellulaire liée aux PNN²³¹. L'hème favorise la conversion des lipoprotéines de bas poids moléculaires en produits oxydés²³², ce qui peut être considéré comme un trigger dans l'athérosclérose.

3.1.2 - Amplification de l'hémolyse

L'hème libéré en cas d'hémolyse peut lui-même entretenir voire aggraver ce phénomène. En 1981, Albert Chou réalisait l'expérience suivante : la forme oxygénée de l'hème, ferriprotoporphyrine IX, était mise en contact avec des érythrocytes de souris et des érythrocytes humains. Cinq μM de ferriprotoporphyrine IX provoquait une hémolyse de 50% des érythrocytes en 2,5 heures, par atteinte de la membrane des globules rouges et stimulation de la sortie de potassium par la cellule²³³. Gosh et al., en 2013, utilisaient l'hème comme déclencheur d'une crise aigüe hémolytique dans un modèle murin de drépanocytose²³⁴. Cet effet hémolytique de l'hème était prévenu par le blocage du TLR4 (molécule TAK 242), récepteur endothélial à l'hème. Ce récepteur n'étant pas présent sur les globules rouges, cette étude suggère le rôle joué directement par l'endothélium dans l'amplification de l'hémolyse.

3.1.3 - Effets pro-inflammatoires

In vitro, l'exposition des CE à l'hème stimule l'expression extracellulaire de molécules d'adhésion : ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine (démonstré par Wagener 1997 sur des HUVEC)²³⁵,

ou P-sélectine²³⁶ probablement médiée par la génération de ROS intracellulaires, et l'activation des facteurs de transcription de NFκB. Ces molécules d'adhésion participent à l'état activé de l'endothélium, en recrutant des leucocytes, formant une des principales caractéristiques d'un endothélium dit proinflammatoire.

Au-delà de l'effet sur les CE, l'hème semble avoir également un effet proinflammatoire direct sur les leucocytes. L'activation des neutrophiles était étudiée dans les travaux de Graça-Souza et al.²¹⁸, selon lesquels l'injection d'hème dans la cage thoracique de rats induisait une migration leucocytaire dose-dépendante de l'hème. *In vitro*, l'hème provoquait le chimiotactisme des neutrophiles, notamment par l'expression de la cytokine IL8. Notons également qu'il existe un effet procoagulant de l'hème : l'hématine forme des complexes avec le facteur VIII/vWF, altérant son activité fonctionnelle et participant à l'activation plaquettaire via la liaison de VIII/vWF aux plaquettes²³⁷.

Pour certains auteurs, cependant, les effets pro-inflammatoires de l'hème seraient un artefact observé expérimentalement, en l'absence de protéines neutralisant l'hème. Pour ces mêmes auteurs, même en utilisant des milieux dépourvus de protéines neutralisant l'hème, les effets de cette molécule resteraient inférieurs à ceux médiés par les cytokines tel que le TNFα²³⁸.

3.2 - Hème et complément

L'hème présente, là-aussi, une dualité : elle inhibe la liaison de C1q avec ses ligands et, *contrario*, active la voie alterne du complément.

3.2.1 - Hème et voie classique

Il a été observé que l'exposition d'IgG à des ions ferreux augmentait leur liaison anticorps-antigène et leurs propriétés anti-inflammatoires²³⁹. En 2006, il été démontré que l'hème inhibait la liaison du C1q aux IgG et IgM²⁴⁰. Cette interaction était secondairement expliquée, dans les travaux de Roumenina *et al.*, par une liaison directe du C1q à l'hème (ratio 1:12)²⁴¹.

3.2.2 - Hème et voie alterne

Les liens unissant la voie alterne du complément et l'hème, au cœur de nos travaux, ont été plus explorés que ceux de la voie classique. En étudiant les effets proinflammatoires et prothrombotiques de l'Hb libre, il était observé en 1992 que l'hème participait au clivage de la molécule C3²⁴². L'étude de l'interaction hème - C3 a été poursuivie en pathologie humaine

et notamment dans le paludisme. Dans cette pathologie, les érythrocytes circulants présentent des niveaux réduits de 2 protéines de la cascade du complément : le CR1, récepteur immun au C3b (non présent sur les CE) et le CD55, régulateur membranaire envers les dépôts cellulaires de C3b²⁴³⁻²⁴⁵. En outre, plusieurs observations révélèrent que les C3b et ses fragments étaient plus élevés dans les phases hémolytiques du paludisme²⁴⁶⁻²⁴⁸. Plus récemment, il a été démontré que le parasite Plasmodium était impliqué dans l'activation du complément en se liant directement à C3b et C4b²⁴⁹.

Le lien a alors été démontré en 2007 par Pawluczko *et al.* qui prouvèrent que l'hème activait la voie alterne du complément en favorisant un dépôt des produits d'activation du C3 sur les érythrocytes (C3b, iC3b, C3dg), en partie via le récepteur CR1, dans le paludisme³. Notre équipe a par la suite confirmé l'activation de la voie alterne par l'hème (cf. Figure n°11), en retrouvant une augmentation de C3a, C5a et du sC5b-9 dans du sérum humain normal exposé à l'hème⁴. Cette activation de la voie alterne était confirmée sur des CE exposées à l'hème avec une augmentation du dépôt de C3b et de C5b-9 à la surface des cellules, anomalies exacerbées en présence d'un sérum de patient porteur de SHUa avec un complément dérégulé. L'hème interagirait avec la molécule C3 à proximité du pont thioester, induisant des complexes C3-C3 et favorisant la formation de C3 et C5 convertases hyperactives.

Figure n°11 : Représentation schématique des différents mécanismes (non exclusifs) conduisant à l'activation du complément sur les CE par l'hème (de Frimat et al., Blood, 2013⁴)

L'hème jouerait également un rôle sur les régulateurs du complément, induisant une diminution de l'expression de MCP et DAF sur les CE⁴ (cf. Figure n°11). De plus, l'hème favoriserait une exocytose rapide des corps de Weibel-Palade (moins de 30 minutes), entraînant une expression membranaire de la P-sélectine, protéine décrite comme plateforme d'ancrage pour le C3b²⁵⁰, et entraînant la libération du facteur de vWF, prothrombotique, à la surface. Ces résultats suggèrent donc fortement que l'hème pourrait amplifier les lésions endothéliales et les lésions de thrombose dans le SHUa.

Le rôle de l'activation de la voie alterne par l'hème a également été étudié dans la drépanocytose²⁵¹. L'observation de biopsies rénales de patients drépanocytaires retrouvait la présence de stigmates d'activation de la voie alterne et terminale du complément chez 80% des patients étudiés, ainsi que dans les reins d'un modèle murin de drépanocytose (cf. Figure n°12).

Figure n°12 : Etude anatomopathologique rénale des dépôts de C3b/iC3b dans la drépanocytose (de Merle et al., JCI insight, 2018²⁵¹)

2

Ces dépôts de complément étaient reproduits dans un modèle murin d'hémolyse, via l'injection de phénylhydrazine (PHZ), molécule visant à lyser les globules rouges et utilisée autrefois dans la polyglobulie²⁵². Ce modèle d'hémolyse a été validé dans la littérature par de nombreuses équipes^{74,253,254}. L'utilisation de scavenger de l'hème (hémopexine) et de l'hémoglobine (haptoglobine) diminuait ces dépôts de complément (cf. Figure n°13). Sur des HUVEC, l'hème favorisait l'expression des récepteurs aux anaphylatoxines C3aR et C5aR.

Figure n°13 : Etude anatomopathologique rénale des dépôts de C3b/iC3b sur modèle murin d'hémolyse (de Merle et al., JCI insight, 2018²⁵¹)

3.3 - Atteintes rénales spécifiques liées à l'hème

Les lésions rénales rapportées à l'hème sont bien étudiées dans la littérature. Différents mécanismes spécifiques sont rapportés. Rodriguez *et al.* en 2003, sur un modèle de rat perfusé avec de l'hème, décrivent plusieurs effets directement imputés à l'hème²⁵⁵. Ils rapportent une vasodilatation rénale par baisse des résistances vasculaires et une augmentation de l'excrétion urinaire de sodium et du volume de diurèse totale. Un prétraitement par le méclofenamate de sodium (bloqueur de la cyclo-oxygénase) inhibait l'effet vasodilatateur, supposant un mécanisme cyclo-oxygénase dépendant. Un prétraitement par la mésoporphyrine SnMPIX (inhibiteur de l'hème oxygénase) bloquait l'effet diurétique et natriurétique, en faveur d'un mécanisme HO-dépendant par inhibition tubulaire de la réabsorption du sodium, de mécanisme indéterminé. Dans une étude de

1995, Nath *et al.* décrivaient un effet prooxydatif dû à l'hème, sur une culture cellulaire de cellules épithéliales tubulaires, par la peroxydation des lipides et une réduction du contenu cellulaire en glutathion (antioxydant protecteur des ROS)²⁵⁶. L'hème inhiberait la croissance des cellules épithéliales tubulaires, entre autres par les voies de l'apoptose, avec un arrêt du cycle cellulaire²⁵⁷. En 2017, Tabibzadeh *et al.*²⁵⁸ démontraient un effet de raréfaction des capillaires péri tubulaires dans un modèle murin. *A contrario*, dans l'étude de Nath *et al.*²⁵⁹, l'exposition répétée à l'hème chez des rats démontrait un rôle anti-inflammatoire de l'hème par la prévention de l'activation de NFκB, l'expression de MCP-1 et l'inflammation cellulaire tubulo-interstitielle, qui n'était pas présente chez les souris HO-1^{-/-} (dont la mise au point du modèle de KO a été décrite par Poss *et al.*²⁶⁰). Récemment, cette même équipe a étudié les effets rénaux de l'hème qui passait, en partie seulement, par son agoniste endothélial connu, le TLR4²⁶¹. Via le blocage de TLR4 par TAK 242, les mécanismes de toxicité rénale imputables partiellement à la liaison hème-TLR4 étaient une vasoconstriction et un effet proinflammatoire sur les cellules épithéliales tubulaires (augmentation de l'expression de MCP-1 via NFκB, retrouvée *in vitro* mais pas *in vivo*). Les auteurs suggéraient également un rôle direct de l'hème par son affinité au NO, sans passer par la voie de TLR4. Dans cette même étude, l'induction de HO1 par NRF2 n'était pas modulée par le TAK 242, laissant présager d'autres voies de signalisation de l'hème.

Dans une étude de notre équipe, caractérisant l'atteinte rénale d'un modèle murin d'hémolyse, l'injection de PHZ révélait une dilatation tubulaire mineure mais significative, suggérant une nécrose tubulaire aiguë. Nous observions également une up-régulation des marqueurs de l'atteinte tubulaire, kim-1 et ngal⁷⁴. La coloration de Perls, objectivant les dépôts ferriques, était fortement positive aux niveaux glomérulaire et tubulaire.

4 - Régulation de l'hème : rôle clef de l'hème-oxygénase

Ainsi, l'hème provoque, à court terme, un effet inflammatoire via le stress oxydant, l'amplification de l'hémolyse et l'activation du complément, ainsi que des lésions rénales spécifiques nécessitant des systèmes de régulation puissants. La détoxification de l'hème est indispensable pour contrer l'oxydo-réduction qu'elle provoque. Plusieurs mécanismes sont décrits chez l'humain : le système des hèmes-oxygénases (HO1 et HO2) et les systèmes protéiques scavenger (hémopexine, albumine, α1microglobuline...). Nous détaillerons plus particulièrement ici l'HO-1, principal régulateur intracellulaire de l'hème.

4.1 - HO : présentation générale

Les HO sont des enzymes impliquées dans la protection cellulaire envers le stress oxydant induit par l'hème. Les premiers travaux cherchant à identifier le mécanisme catabolisant l'Hb remonteraient à 1967²⁶², où une équipe japonaise identifiait une enzyme, purifiée à partir de foie de cochon d'Inde, catalysant la transformation de l'Hb en pigments biliaires et requérant la présence de NADPH. Cette enzyme était initialement dénommée "heme α methenyl oxygénase". Les travaux de Tenhunen²⁶³ décrivaient plus précisément à partir de fraction microsomiale hépatique de rat que l'hème-oxygénase catalysait le clivage de l'hème contenu dans l'Hb en bilirubine. En 1986, Maines démontrait la présence de plusieurs isoformes d'HO²⁶⁴, dont deux s'avèrèrent finalement avoir une activité catalytique pour l'hème : l'HO1, d'origine mitochondriale et inductible²⁶⁵⁻²⁶⁷ et l'HO-2, constitutive, dont les fonctions dans l'homéostasie cellulaire ont été moins étudiées à ce jour²⁶⁸. Leurs gènes respectifs sont *ho-1* et *ho-2*.

L'HO-1 requiert la présence de l'enzyme cytochrome-p450-réductase, qui catalyse la réaction « NADPH + H⁺ + hémoprotéine oxydée réduite » pour dégrader l'hème²⁶⁹. Elle clive l'anneau tétrapyrrolique contenant l'hème, causant la libération de CO avec une quantité équimolaire de biliverdine et de fer. La biliverdine est alors convertie en bilirubine par une enzyme cytosolique, la biliverdine réductase²⁷⁰.

L'expression intracellulaire de HO-1 à la membrane du système réticulo-endoplasmique est induite par de nombreux stimuli, dont le stress oxydatif, et directement par l'entrée de l'hème dans la cellule, via la liaison des complexes Hb-haptoglobine et hème-hémopexine à leurs récepteurs spécifiques, respectivement CD163²⁷¹ et CD91²⁷². L'augmentation rapide de HO-1 après stimulation constitue l'une des caractéristiques de cette enzyme, dont la synthèse est régulée via de nombreux facteurs transcriptionnels et circuits de signalisation. Parmi ceux-ci, on retrouve NFR2²⁷³, lui-même induit par KLF2, notamment sous l'effet d'un "shear stress"²⁷⁴ comme cela a été démontré sur des HUVEC, ainsi que BACH1²⁷⁵.

Figure n°14 : Schéma représentant les mécanismes de dégradation de l'hème par HO-1 (adapté de Schmidt et al., Frontiers in Pharmacology, 2012²⁷⁶)

4.2 - HO-1 : ses effets anti inflammatoires

Le rôle majeur de HO-1 dans la protection vasculaire a été démontré par la publication du premier cas clinique d'un patient de 6 ans présentant une mutation déficiente pour HO-1²⁷⁷. Notons qu'HO-2 était normalement exprimée chez le patient. Le patient souffrait d'une anémie hémolytique, d'une insuffisance rénale et d'une anomalie des voies de la coagulation avec une élévation de la TM et du vWF. L'examen des lésions rénales retrouvait de sévères lésions endothéliales glomérulaires, une prolifération mésangiale et de multiples dépôts ferriques. Un tableau clinique similaire est rapporté chez la souris invalidée pour HO-1²⁶⁰.

La génération de bilirubine et de CO par catabolisme de l'hème confère également un rôle cyto-protecteur à HO-1. Par exemple, la bilirubine participe à neutraliser (par scavenging) les radicaux peroxydés²⁷⁸ et possède une activité anti-oxydante²⁷⁹. Cliniquement, elle est associée à une protection contre le risque de maladie coronarienne²⁸⁰. Le CO a des effets anti-inflammatoires par inhibition de l'expression des cytokines inflammatoires TNF α et IL1 β , via les MAPK²⁸¹. L'induction de HO-1 stimule la synthèse de ferritine impliquée dans la prise en charge du fer libre qui, sous cette forme, est un puissant oxydant cellulaire.

4.3 - HO-1 : ses liens avec le système du complément

Certaines études tendent à montrer que HO-1 est protectrice envers le complément, via la régulation de DAF. Ayant démontré que le VEGF induisait l'expression endothéliale de HO-1²⁸² et de DAF²⁸³, et devant le lien supposé entre activité de HO-1 et baisse de l'activité du complément dans l'inflammation²⁸⁴, une équipe a exploré le rôle de HO-1 dans la régulation de DAF¹⁰⁸. Ils ont démontré que l'inhibition de HO-1 par ZnPPIX (zinc protoporphyrine IX) réduisait l'expression de DAF sur des HUVEC. Cet effet était également retrouvé sur des cellules de souris HO-1^{-/-}. L'utilisation sur des HUVEC d'un inducteur de HO-1, le CoPPIX (Cobalt protoporphyrine IX), induisait DAF. L'induction de DAF sur les cellules diminuait de 50% la présence de C3 à la surface des cellules, démontrant ainsi un effet protecteur de HO-1 envers l'activation du complément. Fort de ces résultats, Detsika *et al.*²⁸⁵ ont généré un modèle de rat HO-1^{-/-} et mis au point une lignée de CE glomérulaires dont l'expression constitutive de DAF était diminuée. Il s'y associait une augmentation des dépôts de C3b sur ces cellules en présence de sérum de rat normal.

5 - Atteintes rénales des maladies hémolytiques

En cas d'hémolyse, comme nous l'avons vu, le rein est un lieu de filtration et de dégradation de l'Hb libre intravasculaire. Après captation hépatique, elle est dissociée en dimères puis traverse le filtre glomérulaire avant d'être internalisée par les cellules épithéliales du tubule contourné proximal. Deux récepteurs sont identifiés au pôle apical : la cubuline et à la mégaline²⁸⁶. L'hème, dissocié de l'Hb, est alors pris en charge par HO-1, dont la synthèse est fortement induite au sein des cellules épithéliales tubulaires par la présence d'hème²⁸⁷. Si la réabsorption est saturée, en cas d'hémolyse massive, cet excès d'Hb libre au niveau urinaire provoque une hémoglobinurie. Par ces mécanismes de prise en charge de l'Hb au niveau rénal, le rein semble être un organe particulièrement lésé au cours de l'hémolyse.

Le tropisme rénal à l'hémolyse est étudié depuis près d'un siècle, notamment via des modèles animaux de perfusion d'Hb induisant une insuffisance rénale aiguë. Rapidement, l'atteinte tubulaire a été mise en avant. Dans des travaux sur le paludisme, Yorke et Nauss²⁸⁸, réalisaient en 1911 des injections d'Hb à des lapins. Ils observaient alors une précipitation tubulaire induisant une obstruction tubulaire par des "pigments d'Hb", pouvant expliquer l'intérêt d'alcaliniser les urines afin de prévenir cette précipitation. En 1925, Baker et Dodds publiaient les résultats d'autopsie de 2 patients ayant reçu par erreur une

transfusion sanguine non compatible²⁸⁹. L'analyse histologique rénale révélait une dilatation et obstruction tubulaire, sans infiltration ou inflammation. En 1947, Harrison réalisait des perfusions d'Hb à des chiens, qui engendraient une insuffisance rénale aiguë (élévation de la créatininémie et de l'urée). L'examen anatomopathologique rénal révélait une nécrose tubulaire aiguë, des dépôts d'Hb intratubulaires et une hémodisérose tubulaire proximale²⁹⁰.

Partant de ces observations, 3 mécanismes sont donc classiquement décrits à ce jour pour expliquer la toxicité rénale de l'hème: i) l'obstruction des tubules rénaux par la précipitation des dérivés de l'Hb et la myoglobine (dans la rhabdomyolyse) ; ii) l'atteinte des cellules tubulaires rénales par toxicité induite par le stress oxydant lié à la saturation en hème ; iii) la diminution du débit sanguin rénal par vasoconstriction et par déplétion en NO.

En dehors de cette dysfonction endothéliale rapportée à la consommation du NO, l'atteinte vasculaire n'est pas décrite, en particulier au niveau des capillaires glomérulaires. Nous supposons que le potentiel prothrombotique et proinflammatoire de l'hémolyse et ses dérivés au sein des microvaisseaux rénaux s'exprime préférentiellement en cas d'activation ou lésion endothéliale préalables. C'est ainsi la somme d'un trigger endothélial, d'une hémolyse et d'une dérégulation du complément (concept de hits multiples) qui pourrait mener à d'authentiques lésions microvasculaires. Le tableau n°8 illustre cette hypothèse en identifiant les lésions endothéliales ou le rôle du complément dans d'autres exemples de maladies hémolytiques que le SHUa.

Tableau n°8 : Liste (non exhaustive) de pathologies associant une hémolyse et une atteinte rénale, et arguments pour une implication du complément

Maladie	Epidémio. & physiopath.	Mécanismes hémolyse	Atteinte rénale	Rôle du complément	Ref.
Drépanocytose ou anémie falciforme	- 1/2000 naissances/an en France - + Fréquente en Afrique - Mutation chaîne β Hb, transmission autosomique récessive	- Hémolyse chronique sévère - Polymérisation Hb et désoxygénation, obstruction microvx	- Vaso-occlusion → stress ox, altération Σ NO → dysfonction endothéliale - Altérations tubulaires - Parfois MAT histologique	- GR sensibles à la liaison du C3 et formation C5b-9 - \nearrow Bb circulant - Activation VA par les GR via properdine - Dépôts C3 et C5b-9 sur biopsies rénales	251,2 91– 298
Paludisme	- 500 millions cas/an (monde) - Infection à plasmodium transmise/moustique	- Lyse GR - Hypersplénisme - Dommages oxydatifs membrane GR - Opsonisation/lyse médiée par complément - Cytoadhérence CE microvx - Rosetting	- IRA fonctionnelle - cytoadhérence et rosetting → obstruction des capillaires tubulaires, NTA - Parfois tableau de MAT avec hémoglobinurie	- Activation VC et VA: \nearrow Bb, sC5b-9 et C4d circulants (sérum patients) - Rôle C5a dans forme neuro chez la souris - Activation VA par hème et vacuoles parasitaires - Activation VL	3,299 –307
Syndrome catastrophiques des anti-phospholipides	- Forme grave et accélérée du SAPL (1%)	- Atteinte macro et microvx - Activation endothéliale médiée par TLR4? - Génération thrombine et fibrine par \searrow fibrinolyse, due à \nearrow PAI	- Occlusion capillaire & artériolaire, hyperplasie intinale - MAT aPL médiée	- Activation VA : \nearrow sC5b-9 et FD, \searrow C3 et C4 circulant et activité FH (sérum patients) - Rôle du C5aR chez la souris - Utilisation Eculizumab rapportée	308– 312
Crise rénale sclérodermique	- Sclérodermie = rare (6000 à 8000 patients en France) - Excès de collagène, mécanismes + auto-immuns - CRS : 5% des sclérodermies	- Prolifération de cellules vs dont CE et CML → rétrécissement vs, thrombose - Agrégation et activation plaquettaire - Rôle de l'ET-1	- \nearrow rénine, HTA maligne, MAT et insuffisance rénale aiguë - Biopsie : nécrose fibrinoïde, aspect bulbe d'oignon	- Dépôt de C3 et C4d sur biopsie rénale - Activation VA : \searrow C3 et FB (sérum patients) - Utilisation Eculizumab rapportée	313– 320
βthalassémie	- Fréquente dans les pays en voie de développement - Mutation gène β globine	- Anémie chronique par trouble de la synthèse Hb	- Dysfonction tubulaire - Surcharge chronique en fer /transfusion - \searrow résistance vs, hyperfiltration glomérulaire /anémie	- Activation VA : \nearrow sC5b-9 et C5a, corrélé à sévérité maladie. \searrow C3 et C4 circulant (sérum patients) - Déficit en DAF à la surface des GR	321– 333

aPL : anticorps anti-phospholipides, **CE** : cellule endothéliale, **CML** : cellule musculaire lisse, **CRS** : crise rénale sclérodermique, **C5aR** : C5a récepteur, **DAF** : decay accelerating factor, **ET-1** : endothéline-1, **FB** : facteur B, **FD** : facteur D, **FH** : facteur H, **GR** : globule rouge, **Hb** : hémoglobine, **HTA** : hypertension artérielle, **IRA** : insuffisance rénale aiguë, **MAT** : microangiopathie thrombotique, **NTA** : nécrose tubulaire aiguë, **PAI-1** : plasminogen activator inhibitor-1, **SAPL** : syndrome des antiphospholipides, **microvx** : microvaisseaux, Σ **NO** : synthèse de monoxyde d'azote, **VA** : voie alterne, **VC** : voie classique, **VL** : voie des lectines, **vs** : vaisseaux

Alors que dans le SHUa l'anomalie complémentaire est au premier plan et que l'atteinte rénale prédomine, il existe également une activation complémentaire dans d'autres maladies hémolytiques qui semble toutefois secondaire à l'activation endothéliale. Dans ces pathologies, l'atteinte rénale est moins sévère et conduit moins fréquemment vers l'insuffisance rénale terminale. Dans ces pathologies autres que le SHUa, le rein semblerait capable de mieux «se défendre» contre cette agression endothéliale en conditions d'hémolyse, l'hypothèse pouvant expliquer cela étant un complément à la fois activé mais aussi amplifié par sa propre dérégulation.

Chapitre 3 - Le RAGE

RAGE, récepteur multiligands, est exprimé par de nombreux types cellulaires : les CE, les cellules musculaires lisses, les pneumocytes, les podocytes, les cellules mésothéliales péritonéales ou encore certaines cellules circulantes (macrophages, lymphocytes T, monocytes). Depuis sa découverte, son rôle a été affirmé dans de nombreuses pathologies rénales inflammatoires, telles que l'atteinte rénale liée au diabète, la glomérulopathie liée à l'obésité, la néphropathie induite par la doxorubicine ou encore la néphropathie hypertensive³³⁴.

Divers travaux, menés sur des modèles de souris transgéniques ou à l'aide d'un blocage pharmacologique de RAGE, nous indiquent que la modulation de l'expression ou de la fonction de RAGE affecterait le développement de ces pathologies. L'accumulation de preuves liant RAGE à la physiopathologie des maladies rénales tend à démontrer que l'antagonisme de RAGE pourrait être une stratégie dans le traitement de la maladie rénale chronique et la prévention du vieillissement rénal physiologique^{335,336}. Dans le cadre de nos travaux sur le tropisme rénal du SHUa, aucune donnée n'était rapportée sur l'implication du RAGE dans cette pathologie. De même, peu de données existaient dans la littérature sur la relation RAGE-complément, si ce n'est une liaison du RAGE au C3a et au C1q.

L'objectif de ce troisième chapitre est de présenter le récepteur RAGE, sa structure et ses ligands extracellulaires connus. Dans un second temps, nous aborderons les voies de signalisation induites par l'activation de RAGE et ses ligands intracellulaires. Enfin, nous ferons le lien entre RAGE et les maladies rénales, particulièrement vasculaires³³⁴. Nous dégagerons alors notre hypothèse de travail : celle-ci postule qu'il existe un lien entre le RAGE, récepteur de l'inflammation impliqué dans les maladies rénales, et le SHUa, maladie de l'endothélium pro-inflammatoire, dont les chaînons menant du RAGE au SHUa seraient les piliers hémolyse et complément.

1 - Historique

Les premiers travaux démontrant la présence d'un récepteur de haute affinité aux AGE datent de 1985, lorsque Vlassara *et al.*³³⁷ ont rapporté l'existence d'un récepteur sur les macrophages péritonéaux de souris, interagissant avec de la BSA (bovine serum albumin) glyquée. En 1992 Schmidt *et al.*³³⁸ identifiaient deux récepteurs aux AGE sur les CE de poumon d'origine bovine, la lactoferrine, de 80kDa, et un second récepteur de 35kDa qui sera désigné par cette équipe comme le RAGE. Le RAGE présentait des homologies de séquences avec MCAM (melanoma cell adhesion molecule, ou CD146), les récepteurs NCAM (neural cell adhesion molecule), et le domaine cytoplasmique de CD20.

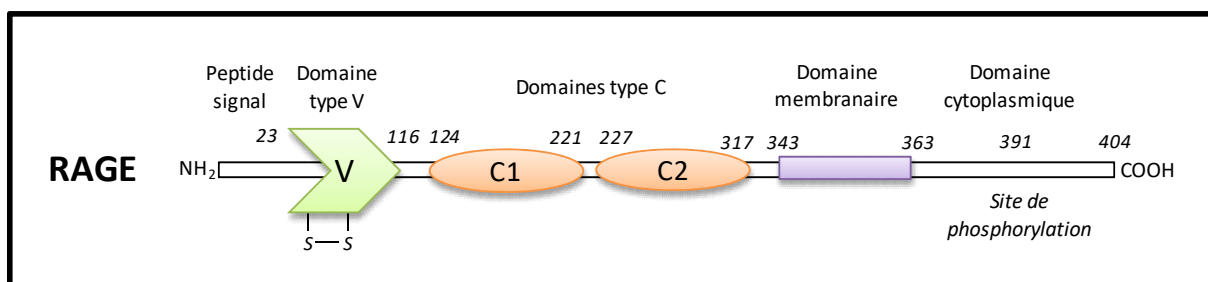
2 - Présentation générale

RAGE est un récepteur multi-ligands qui appartient à la superfamille des immunoglobulines. Il a finalement été localisé dans de nombreux types cellulaires : cellules musculaires lisses, hépatocytes, neurones, CE, macrophages, monocytes et cellules mésothéliales péritonéales^{339,340}. Son expression peut être anormalement up ou down-régulée dans certaines pathologies humaines. RAGE est constitutivement exprimé durant le développement embryonnaire, particulièrement dans le cerveau, puis est down-régulé à l'âge adulte. Enfin, il est retrouvé de façon plus importante dans le vieillissement physiologique³⁴¹.

2.1 - Structure

Le RAGE entier, ou "full length RAGE" contient les domaines V, C1 et C2, une hélice transmembranaire et un domaine C-terminal cytosolique (ctRAGE ou RAGE-CTF) (cf. Figure n°15).

Figure n°15 : Schéma représentatif de la structure de RAGE



Structure du RAGE full length comprenant : le domaine variable (V), les domaines constants (C1 et C2), la région transmembranaire et la queue cytoplasmique. Un pont de disulfure relie les deux feuillets β du domaine V.

Publiés en 2013 par L. Yatime et G. Andersen, les travaux de cristallisation de RAGE, ont permis de mieux appréhender la structure de cette protéine³⁴² (cf. Figure n°16). Le domaine V est le principal site de liaison aux ligands de RAGE. Il est composé de 8 brins reliés par 6 boucles, formant 2 feuillets β reliés par un pont disulfure. Le domaine C1 est un domaine de type constant des immunoglobulines. La surface moléculaire des domaines V et C1 est recouverte par une cavité hydrophobe chargée positivement. Des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes se produisent entre V et C1 qui forment ainsi une unité structurale impliquée dans la liaison de certains ligands chargés négativement. RAGE peut se dimériser ou s'oligomériser, via la liaison V-V ou C1-C1, formant des complexes stables. *A contrario*, C2 est décrit comme une unité indépendante. De même que V, C2 existe sous la forme de deux feuillets β composés de 8 brins, stabilisés par des ponts disulfure. Cette structure est chargée négativement, avec des résidus acides dirigés vers VC1, basique³⁴³⁻³⁴⁵. Le domaine extracellulaire VC1C2 du RAGE humain partage une homologie de séquence respectivement de 79.6%, 79.2% et 96.5% avec la souris, le rat et les primates (macaque rhésus)³⁴⁶. Les résidus chargés positivement impliqués dans la liaison AGE-RAGE (notamment lys52, arg98 ou lys110) sont conservés entre les espèces, soulignant un modèle de liaison commun^{347,348}.

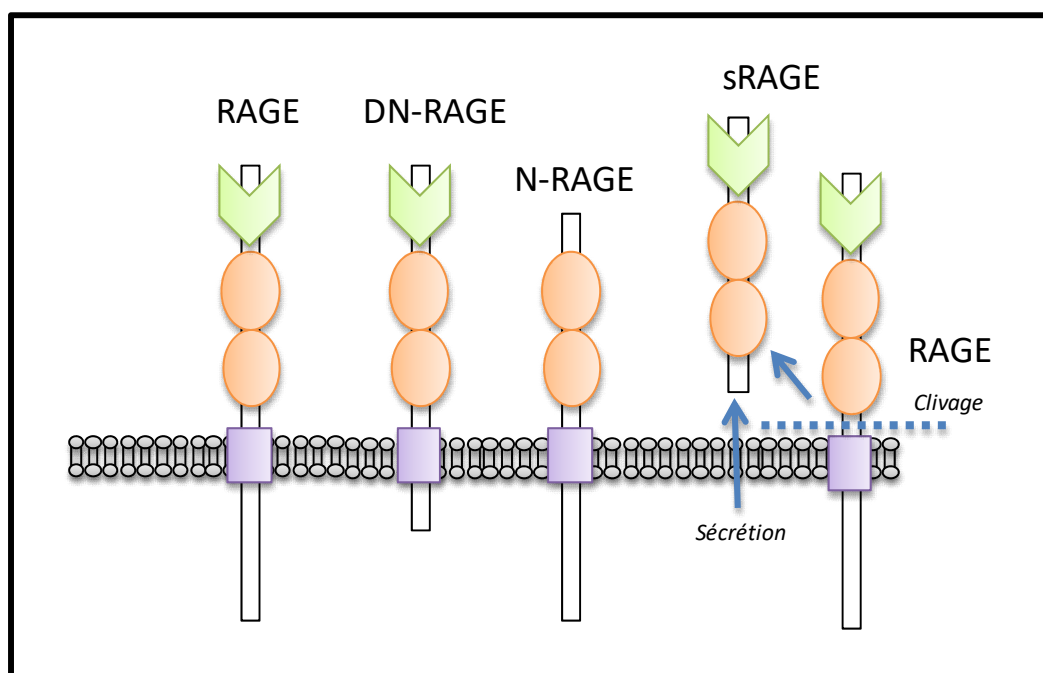
Figure n°16 : Représentation schématique de la cristallisation de RAGE (de Yatime et Andersen, FEBS, 2013³⁴²)

ctRAGE, qui contient 42 acides aminés, présente une structure hélicoïdale. Cette structure est divisée en trois parties : la partie proximale, à la membrane, de 17 acides aminés, une partie centrale de 17 acides aminés également, puis la portion C-terminale. ctRAGE peut promouvoir l'homodimérisation de sa structure hélice-hélice en intracellulaire et est ainsi impliqué dans le signal de transduction³⁴². La délétion de la portion ctRAGE (variant 1) conduit RAGE à agir comme un récepteur leurre³⁴⁹ et bloque ses effets physiopathologiques. ctRAGE humain présente 92% d'homologie de séquence avec les primates et 70,7% avec les rongeurs³⁴⁶.

2.2 - Isoformes

Plusieurs isoformes de RAGE ont été détectés dans les cellules humaines et coexistent, possédant différentes propriétés biologiques (cf. Figure n°17). Le RAGE full length contient tous les composants de RAGE et représente sa forme active. Sans son domaine cytoplasmique, le RAGE est de forme dominant négatif ou DN-RAGE³⁵⁰. La surexpression de DN-RAGE jouerait un rôle dans la prolifération cellulaire³⁵¹. La forme tronquée de sa partie N-terminale, N-RAGE, est incapable d'interagir avec les AGE³⁵¹. sRAGE, ou RAGE soluble, est la forme circulante de RAGE, privée du domaine cytoplasmique et de la portion transmembranaire.

Figure n°17 : Schéma représentatif des isoformes clefs de RAGE

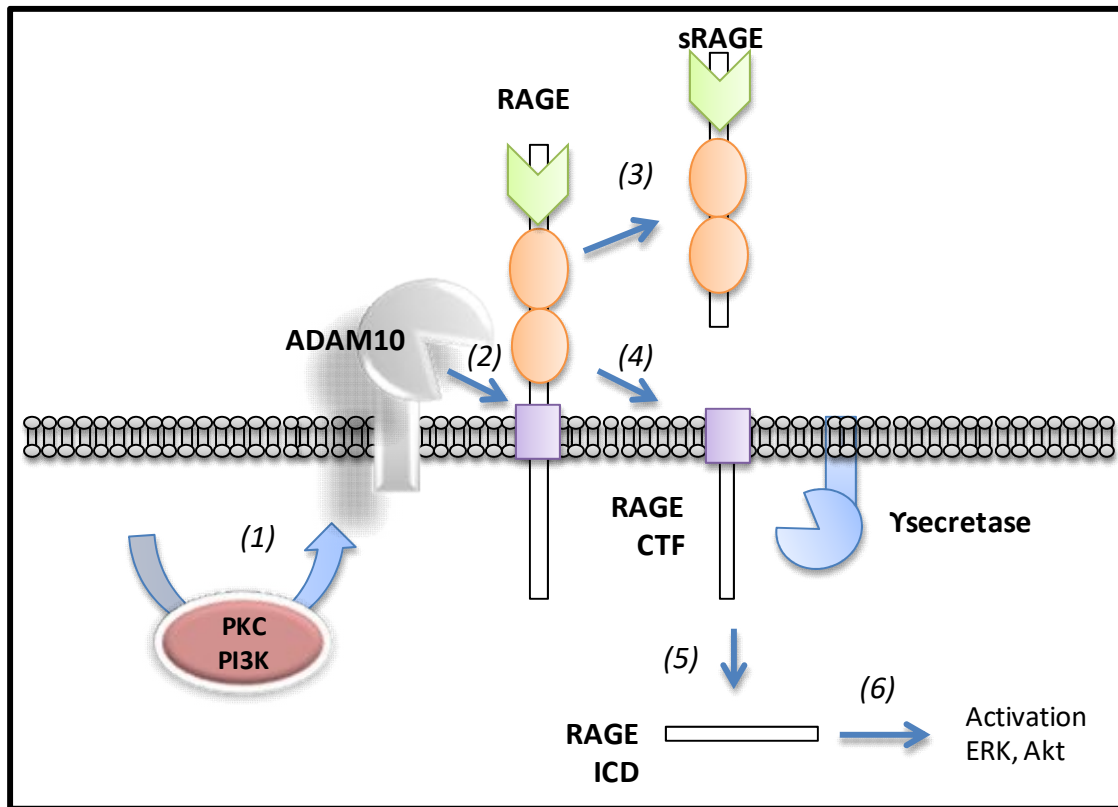


A partir de la gauche: i) **RAGE full length**, ii) RAGE dominant négatif (**DN-RAGE**), iii) RAGE N tronqué (**N-RAGE**), iv) RAGE soluble, obtenu par sécrétion ou clivage (**sRAGE**)

sRAGE, parfois appelé variant 2, est une population hétérogène d'isoformes de RAGE et est exprimé à un niveau différent du RAGE full length, le ratio sRAGE/RAGE full length étant spécifique à chaque tissu (entre 0.59 et 1.79)³⁵². Pour certains auteurs, sRAGE pourrait être un biomarqueur intéressant dans le diagnostic et le pronostic de certaines maladies chroniques inflammatoires (diabète, athérosclérose, insuffisance rénale, vieillissement)³⁵³. En 2008, Zhang *et al.* ont mis en évidence que sRAGE pouvait être clivé à la membrane, sur l'ecto-domaine de RAGE, par deux métalloprotéinases Zinc-dépendantes : ADAM10 (a disintegrin metalloproteinase 10) et MMP9 (matrix metalloproteinase 9). Elles laissent à la membrane, après clivage, le fragment C-terminal de RAGE³⁵⁴ (cf. Figure n°18). Le clivage par

ADAM10, démontré chez l'homme et la souris, serait activé par les voies PKC (protéine kinase C) et PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)³⁵⁵.

Figure n°18 : Schéma des mécanismes proposés de clivage de l'ecto-domaine de RAGE et de sa régulation



(1) Suite à un stimulus ou l'afflux de Calcium, PKC et PI3K sont activées. **(2)** Ceci active à son tour ADAM10, qui clive RAGE à la membrane et libère sRAGE. **(3)** Le fragment C-terminal de RAGE (RAGE CTF) reste à la membrane **(4)**, puis est clivé par une γ-sécrétase. Ceci libère le domaine intracellulaire de RAGE (RAGE ICD) **(5)** qui peut activer différentes voies de signalisation tel que ERK ou Akt **(6)**.

2.3 - Distribution de RAGE

En 1993, l'équipe d'Ann Marie Schmidt réalisait une cartographie de la concentration de RAGE : les tissus à la concentration de RAGE la plus élevée étaient le poumon et les tissus musculo-squelettiques (environ 5000pg/ml), suivis du cœur, du foie, du rein (<1000pg/ml), de l'utérus puis du cerveau³⁵⁶. Ils comparaient également des cultures cellulaires et observaient des différences intercellulaires : dans l'ordre décroissant, les cellules exprimant le plus RAGE étaient une lignée de cellules de phéochromocytome, des monocytes phagocytaires, des cellules mésangiales, des cellules musculaires lisses vasculaires et des CE. L'expression dans les GR était presque indétectable. D'autres types cellulaires exprimaient également RAGE, incluant les neurones, les cardiomyocytes, les podocytes ou encore certaines cellules épithéliales³⁵⁶.

La présence abondante de RAGE dans le poumon a été confirmée par d'autres équipes. La cellule pulmonaire exprimant intensément RAGE est le pneumocyte alvéolaire de type I³⁵⁷ sur sa membrane baso-latérale, pouvant laisser présager un rôle de RAGE dans les pathologies pulmonaires. Dans le cancer du poumon, l'expression de RAGE est diminuée par rapport aux zones saines³⁵⁸. D'autres études soulignent un rôle de RAGE dans le cancer pulmonaire non petites cellules³⁵⁹. Dans des modèles d'agression pulmonaire, l'induction d'une silicose provoquait une baisse de l'expression de RAGE. Ce même modèle sur des souris RAGE^{-/-} induisait des lésions plus sévères³⁶⁰. Des souris RAGE^{-/-} avec injection intra trachéale de *E. coli* présentaient moins d'inflammation et moins d'infection pulmonaire³⁶¹. Cependant, des souris RAGE^{-/-} avec administration pulmonaire de LPS présentaient un phénotype plus sévère que les souris WT³⁶⁰. Dans un modèle de fibrose à la bléomycine, la délétion de RAGE jouait un rôle aggravant³⁶². Le rôle de RAGE dans le poumon humain reste à explorer.

L'expression basale faible de RAGE ne semble pas être un frein à une implication de RAGE dans la physiopathologie de certaines maladies, comme l'illustre la maladie d'Alzheimer. Alors que l'expression de RAGE en niveau basal est très faible au niveau cérébral, on retrouve dans la maladie d'Alzheimer une surexpression de RAGE dans l'hippocampe³⁶³. De même, l'expression basale de RAGE est faiblement détectée dans le rein, hormis dans les cellules interstitielles et les cellules musculaires lisses. Dans certaines pathologies comme le diabète, le marquage anti-RAGE devient positif dans les CE glomérulaires et artérielles, les podocytes et les cellules épithéliales³⁶⁴.

L'hétérogénéité de RAGE varie également avec le vieillissement. Avec l'âge, le taux d'AGE accumulé dans le rein et le foie augmente, à l'inverse des tissus musculo-squelettiques. De même, les taux d'HMGB1 et de S100 β augmentent avec le vieillissement, dans le rein. Le ratio de ligands liés à RAGE augmenterait également avec le temps, impliquant RAGE dans des pathologies rénales plutôt chroniques qu'aiguës³⁶⁵.

3 - Ligands de RAGE

3.1 - Les AGE

Comme son nom l'indique, RAGE lie donc les AGE. Ceux-ci résultent d'une cascade d'étapes appelée réaction de Maillard, découvreur de ces composés et de leur formation³⁶⁶. Une première réaction de condensation a lieu entre la fonction aldéhyde d'un sucre réducteur et la fonction NH₂ libre d'une protéine ou d'un acide aminé libre, dont les principaux sont la lysine et l'arginine. Ils forment ainsi une base de Schiff. Cette réaction se déroule sans participation enzymatique. Ensuite, un réarrangement moléculaire (l'hydrogène du groupe hydroxyl adjacent à la base Schiff se lie à l'azote, laissant une cétone) aboutit à la formation d'un produit d'Amadori. Secondairement, ce produit est oxydé, réaction irréversible qui aboutit aux AGE³⁶⁷. Les AGE se produisent dans la nature, lors de la préparation d'aliments ou dans l'organisme. Ils peuvent contribuer au développement de complications du diabète et de l'athérosclérose³⁶⁸.

Un AGE en particulier, la N^ε-carboxyméthyllisine (CML), est le plus étudié en termes d'activation et de signalisation intracellulaire de RAGE³⁶⁹. De même qu'il existe une hétérogénéité de RAGE, la répartition des AGE, et notamment de la CML, varie entre les organes. Des travaux réalisés par notre équipe sur un régime enrichi en CML marquée *versus* contrôle chez des souris WT et RAGE^{-/-} retrouvaient une accumulation prépondérante de la CML dans le rein, suivie des intestins et des poumons. Ce tropisme rénal de la CML n'était pas dépendant de RAGE car il persistait chez les souris RAGE^{-/-}³⁷⁰.

De façon intéressante, RAGE n'est pas le seul récepteur décrit des AGE. Parmi les autres récepteurs décrits, citons notamment les MSRs (macrophages scavenger receptors)³⁷¹, OST48 (oligosaccharyl transferase-48) connu aussi sous le nom de AGE-R1, 80 K-H phosphoprotéine connu sous le nom de AGE-R2, galectine 3 (AGE-R3)³⁷², lox1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1)³⁷³ ou encore CD36³⁷⁴. Ces récepteurs sont impliqués dans la régulation de l'endocytose et la dégradation des AGE, alors que RAGE joue un rôle dans le signal de transduction et active diverses voies inflammatoires.

3.2 - Autres ligands de RAGE

Les ligands endogènes de RAGE sont nombreux. Le Tableau n°9 et la Figure 18 résument les principaux ligands connus de RAGE extracellulaires ainsi que leur domaine de liaison si toutefois celui-ci a été identifié. De la même façon que les AGE ne sont pas des ligands spécifiques de RAGE, le RAGE n'est pas le récepteur spécifique des autres ligands sus-mentionnés. Par exemple, HMGB1 se lie aux TLR4 et TLR2. LPS se lie également à TLR4.

Tableau n°9 : Ligands extracellulaires de RAGE

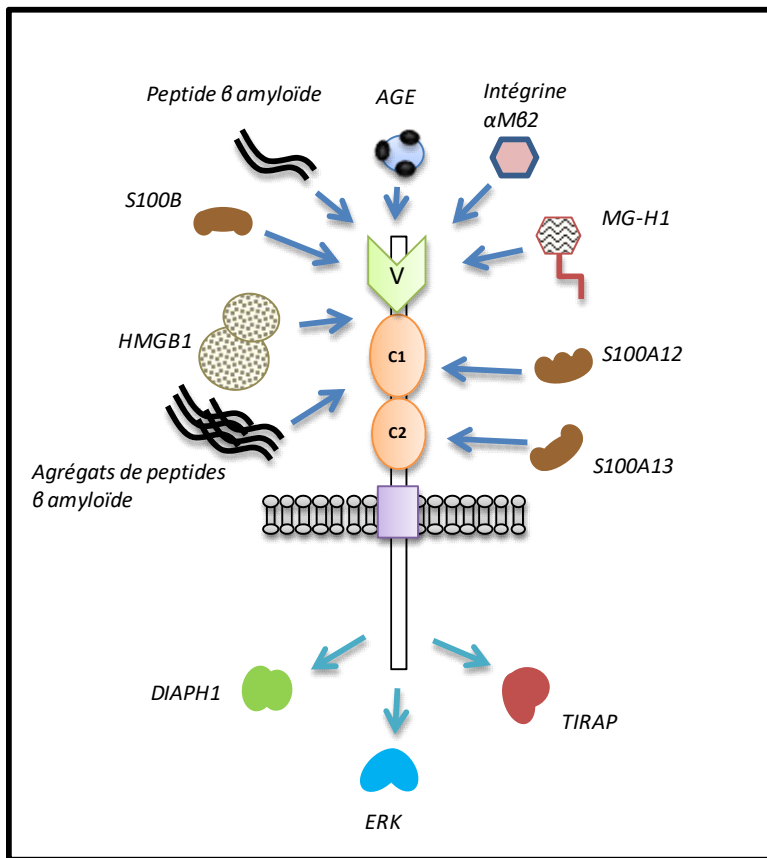
Ligand	Isoforme de RAGE	Domaine de liaison	Affinité (Kd)	Test de liaison	Réf.
CML/CEL lié à un peptide	sRAGE humain	V	90-100nM	NMR Titration par fluorescence	347
					345
HMGB1	sRAGE rat et souris	VC1C2	6-10nM	Essai de liaison de saturation <i>in vitro</i>	375
S100B	sRAGE humain	VC1 V	11nM, 550nM	ITC, SPR	343
S100P	RAGE humain	V	6µM	ITC, spectroscopie de fluorescence	376
S100A6	sRAGE humain	VC1	0.6 – 5.8 µM	SPR	377
		V C2	0.5 – 13.5 µM 28nM - 1 µM		
S100A8	RAGE bovin	Indéterminé	34.4+/-13nM	ELISA immuno enzymatique	378
S100A9*	RAGE humain	V	5.7µM	NMR	379
S100A11	sRAGE	V	0.5µM	NMR, spectroscopie de fluorescence	380
S100A12	sRAGE humain	C1	70nM	Titration par fluorescence	381
S100A13	sRAGE	C2	1.3µM	ITC, NMR	382
Transthyréline	sRAGE	Indéterminé	120nM	Test de liaison à la transthyréline marquée	383
Peptide β amyloïde	sRAGE humain	V	70-80nM	Essai de liaison de saturation <i>in vitro</i>	384
IAPP**	sRAGE	Indéterminé	Non précisé	SPR	385
AOPP	sRAGE	Indéterminé	Non précisé	ELISA	386
Phosphatidylserine	sRAGE	Indéterminé	0.563 µM	SPR	387
MG-H1	sRAGE humain	V	30 - 40nM	Titration par fluorescence	348
Acide quinolinique	sRAGE humain et rat	VC1	43nM	Titration par fluorescence	388
Pyridoline	sRAGE	Indéterminé	43.8µM	SPR	389
Intégrine αXβ2***	sRAGE humain	V	0.49µM	SPR	390
Intégrine αMβ2°	sRAGE humain	V	0.23µM	SPR	390
LPS	sRAGE	Indéterminé	35nM	SPR	391
LPA	sRAGE	V	9nM	SPR	392
HSP70	hRAGE	Indéterminé	Non précisée	ELISA Immunoprécipitation	6
					393
SPARC°°	hRAGE	Indéterminé	Non précisée	ELISA	6
CpGA oligos	hRAGE	Indéterminé	20nM	ELISA, SPR	6
C3a	hRAGE	Indéterminé	EC50 = 1.9nM	ELISA	6
C3a desarginé	hRAGE	Indéterminé	EC50 = 30nM	ELISA	6
C1q	sRAGE	Indéterminé	5.6µM	ELISA, SPR	394

* S100A9 = MRP-14 = calgranuline B, **IAPP = amyline, *** Intégrine αXβ2 = Domaine αX-I

° Intégrine αMβ2 = Domaine αM-I = Mac1 = CD11b/CD18 = CR3, °° SPARC = osteonectine = BM40

AOPP : advanced oxidation protein products, **BM40** : basement-membrane protein 40, **CEL** : carboxyethyl-lysine, **CML** : N^ε-carboxymethyllysine, **EC50** : concentration efficace médiane, **HMGB1** : high-mobility group box 1, **HSP70** : heat shock protein 70, **IAPP** : islet amyloid polypeptide, **ITC** : titration colorimétrique isothermique, **LPA** : lysophosphatidic acid, **LPS** : lipopolysaccharide **MG-H1** : methylglyoxal hydroimidazolone 1, **NMR** : spectroscopie par Nuclear Magnetic Resonance, **SPARC** : secreted protein acidic and rich in cysteine, **SPR** : surface plasmon resonance

Figure n°18 : Schéma représentatif des principaux ligands extracellulaires et effecteurs intracellulaires de RAGE



AGE : advanced glycation end products, **DIAPH1** : diaphanous related formin 1, **ERK** : extracellular signal-regulated kinase, **HMGB1** : high-mobility group box 1, **MG-H1** : methylglyoxal hydroimidazolone 1, **TIRAP** : toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein

4 - Effecteurs intracellulaires se lient au ctRAGE

4.1 - Diaph1

Diaph1 (Diaphanous related-formin-1) est une protéine de 140kDa, identifiée initialement chez la drosophile et désignée mDia1 dans sa forme murine. Il a été démontré en 2008 par le groupe d'Ann Marie Schmidt³⁹⁵ que Diaph1 liait ctRAGE, en faisant un médiateur clef dans les voies induites par RAGE. Ces travaux reposaient sur le fait que ctRAGE ne contenait pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque et nécessitait de recourir à une protéine extérieure pour induire les cascades de signalisation. Diaph1 appartient à la famille des formines, et est impliquée dans le métabolisme de l'actine et la polymérisation des microtubules, qui contrôle la migration cellulaire³⁹⁶. Elle est codée par le gène Drf1/Diaph1 (5q31). Il a été démontré par Touré *et al.* que l'expression protéique de Diaph1 était augmentée en cas d'augmentation de l'expression de RAGE alors que le niveau d'expression de RAGE n'était

pas modulé par une délétion de Drf1/Diaph1³⁹⁷. L'inhibition du complexe RAGE-Diaph1 diminue les effets liés à la CML³⁹⁸. Le domaine FH1 (formine homologie1) de Diaph1 se lie directement avec ctRAGE (Kd<10µM)³⁹⁹. La plupart des cascades de signalisation activées par ctRAGE sont contrôlées par Diaph1: cdc42/Rac1³⁹⁵, egr1⁴⁰⁰, PKB/Akt³⁹⁸, GSK3β³⁹⁷. Les souris Drf1^{-/-} présentent un phénotype similaire aux souris RAGE^{-/-}. Par exemple, toutes deux présentent des anomalies de la migration des cellules musculaires lisses et de remodelage vasculaire³⁹⁷. Cependant, un phénotype de lymphopénie a été décrit chez les souris Drf1^{-/-}, non présent chez les souris RAGE^{-/-}, impliquant des effets de Diaph1 indépendants de RAGE⁴⁰¹.

4.2 - ERK

Les travaux *in vitro* d'Ishihara *et al.* ont confirmé que le ctRAGE liait les formes phosphorylées et non phosphorylées de ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2), suggérant une interaction entre le domaine intracellulaire de RAGE et les kinases⁴⁰². Le domaine de liaison se situe de la Leu362 à l'Ala375. RAGE stabilise ERK et mène à l'activation de l'interaction entre ERK et d'autres protéines. L'induction de ERK par HMGB1 est plus importante en présence de RAGE⁴⁰². Lander *et al.*⁴⁰³ ont mis en évidence, via l'utilisation d'AGE liés à l'albumine, l'induction d'un stress oxydant et l'activation d'ERK, cette dernière stimulant à son tour NFκB. La stimulation de ERK et NFκB était supprimée par le blocage de RAGE au moyen d'un anticorps bloquant⁴⁰³.

4.3 - PKC, TIRAP, Myd88

Une étude de Sakaguchi *et al.* a prouvé que Diaph1 et ERK n'étaient pas les seuls effecteurs intracellulaires liant directement ctRAGE⁴⁰⁴. Leurs expériences ont confirmé que l'activation de RAGE déclenchait la liaison de la protéine kinase Cξ (PKCξ) à ctRAGE, entraînant la phosphorylation de RAGE à la Ser391. Ce processus était dose-dépendant des ligands de RAGE, S100A11, S100A12, HMGB1 ou des AGE, et était exclusif de RAGE. La phosphorylation de RAGE influençait la liaison de RAGE à TIRAP (toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein) et Myd88 (myeloide differentiation primary response gene 88). L'interaction protéine-protéine augmentait l'activité des signaux de l'inflammation engendrés par RAGE tels que NFκB, JNK ou AKT⁴⁰⁴. L'inhibition de PKCξ, TIRAP ou Myd88 sur des CE diminuait la production d'IL1 et d'IL6.

5 - Voies de signalisation activées par RAGE

La plupart des ligands de RAGE sont impliqués dans l'inflammation et les processus de migration cellulaire, pouvant up-réguler l'expression de RAGE dans les processus inflammatoires⁴⁰⁵ (cf. Figure n°19). L'activation de RAGE par ses ligands régule positivement l'expression de RAGE, comme le démontre le fait que la concentration protéique de RAGE retrouvée dans les milieux riches en RAGE-ligand augmente^{406,407}. La majorité des ligands de RAGE sont sécrétés par les leucocytes (monocytes, macrophages, neutrophiles), cellules jouant un rôle déterminant dans les voies de l'inflammation RAGE-médiées.

Une augmentation anormale de l'expression et l'activation de RAGE est impliquée dans certaines pathologies, dont le diabète, les maladies cardiovasculaires, le cancer, ou la maladie d'Alzheimer. Il en résulte que le blocage de RAGE est devenu une cible thérapeutique d'intérêt dans ces pathologies, soulignant l'importance d'une meilleure compréhension des voies de signalisation médiées par RAGE. Ces voies ont été particulièrement étudiées ces dix dernières années, avec le développement de modèles murins adaptés. Le premier KO global de RAGE a été généré en 2001, par le groupe de Bern Arnold⁴⁰⁸. Les exons 2 à 7 étaient délétés via un système Cre/LoxP. Depuis, de nombreuses équipes ont effectué des travaux sur différentes lignées murines KO pour décrypter les mécanismes de l'inflammation liés à RAGE, à la migration et la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore l'autophagie.

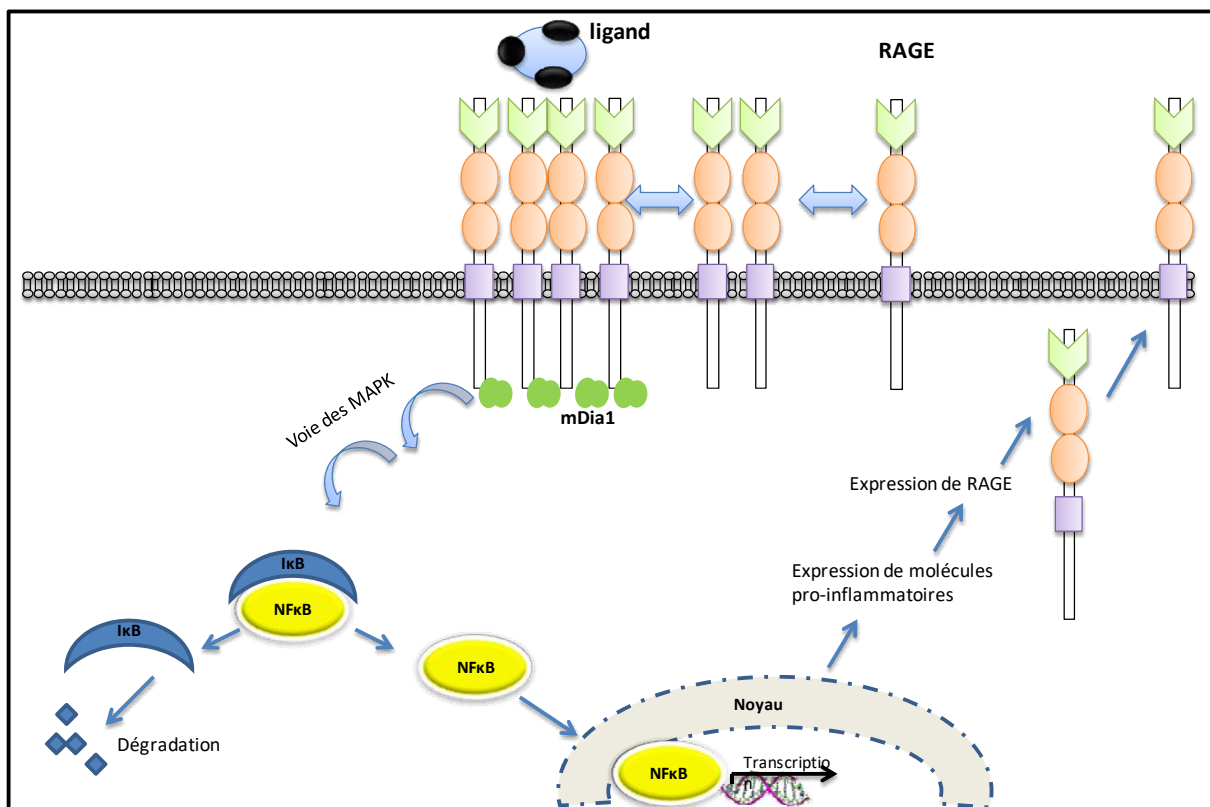
Figure n°19 : Schéma représentatif des voies de signalisation activées par RAGE via ses ligands, en fonction du type cellulaire étudié (de Kierdorf and Fritz, Journal of Leukocyte Biology, 2013⁴⁰⁹)

5.1 - NFκB

Lorsque RAGE est stimulé par ses ligands, le facteur de transcription NFκB (nuclear factor - light-chain-enhancer of activated B cells) est transloqué dans le noyau et se lie au promoteur de la région RAGE, qui initie la transcription de l'ARNm de RAGE⁴⁰⁶. NFκB est un complexe protéique clef dans la réponse immune aux stimuli infectieux et inflammatoires. Il est formé par deux classes de protéines formant des homo ou hétérodimères : la première classe est une protéine de 50 à 52kDA, respectivement NFκB1 ou 2. La deuxième classe implique RelA,

RelB et cRel, qui possèdent un domaine de transactivation en C-terminal. Quand il est inactivé, NFκB est séquestré par IκB, inhibiteur de κB dans le cytoplasme. Son activation mène à sa libération et sa phosphorylation par le complexe kinase IκB (IKK), formé de 3 unités : IKKα, β et γ⁴¹⁰. NFκB est le premier signal de transduction découvert en tant que voie d'activation par le complexe AGE-RAGE⁴¹¹ (cf. Figure n°20). NFκB est capable d'induire de nombreux ARNm de l'inflammation. Citons COX-2 (cyclo oxygénase-2), le TNFα (tumor necrosis factorα) et l'IL6 (interleukine 6), dont il augmente la synthèse et la sécrétion⁴¹⁰. NFκB promeut également la synthèse de NO, régulée par l'enzyme iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase)⁴¹².

Figure n°20 : Schéma d'un mécanisme d'activation de RAGE proposé



RAGE s'assemble à la membrane, en formant des oligomères, sous l'effet de ses ligands. Les ligands stabilisent les assemblages de RAGE en déplaçant l'équilibre vers des grands oligomères qui initient des voies de signalisation (ex : Diaph1 et les MAPK) menant à l'activation de NFκB, par sa libération du complexe IκB. NFκB induit l'expression de molécules proinflammatoires et de RAGE lui-même.

5.2 - MAPK/JNK

La stimulation de RAGE est également capable d'activer la cascade de signalisation des MAPK (mitogen-activated protein kinase) qui convergent vers IKK pour inhiber IκB, et ainsi relâcher et activer NFκB. L'activation des MAPK a été démontrée par Lander *et al.* dans leurs travaux sur des cellules musculaires lisses artérielles de rat⁴⁰³. Yeh *et al.* ont démontré que

l'activation de NFκB par la CML sur des cellules humaines monocytaires nécessitait la présence d'une MAPK, p38MAPK, ainsi que de ERK

⁴¹³. Le groupe d'Ann Marie Schmidt a également démontré, dans des CE aortiques de souris, l'implication d'une autre MAPK, JNK (c-Jun N-terminal kinase). L'induction de VCAM-1, marqueur de l'inflammation, était activée par la liaison RAGE-ligand et inhibée par un inhibiteur de JNK ou un siRNA de JNK⁴¹⁴. L'activation de JNK par la protéine S100B, dans des cellules murines de microglie, augmente l'activité du facteur de transcription AP-1 (activator protein 1), qui, avec NFκB, up-régule la transcription de COX-2, TNFα et IL1β⁴¹⁵.

5.3 - PI3K/Akt/mTOR

Il a été mis en évidence en 2013 que RAGE activait la voie PI3K/Akt/mTOR (PI3K pour phosphatidylinositol 3-kinase, Akt pour serine-thréonine kinase, et mTOR pour mechanistic target of rapamycin, auparavant mammalian target of rapamycin). Sur des macrophages murins, Qin *et al.* mettaient en évidence que la migration cellulaire de ces macrophages exposés aux AGE était induite par une héparanase et inhibée par le blocage de cette héparanase, blocage qui prévenait la phosphorylation de Akt. L'inhibition de la voie PI3K/Akt down-régulait la migration cellulaire induite par les AGE. De plus, le blocage de RAGE (à l'aide d'un anticorps bloquant) inhibait la migration cellulaire médiée par les AGE, en diminuant l'expression de l'héparanase ainsi que la phosphorylation de Akt⁴¹⁶. Une autre équipe a démontré que les AGE stimulaient PI3K sur des cellules mésangiales rénales⁴¹⁷. Cependant, les effets des AGE et de RAGE restent sujets à controverse. Dans une autre étude, les AGE up-régulaient l'expression de RAGE, tout en diminuant l'activation endothéliale Akt, sur des cellules progénitrices isolées à partir de cordons ombilicaux. Le blocage de RAGE (ici encore, au moyen d'un anticorps bloquant) annulait la diminution de la phosphorylation de Akt, en faveur d'une down-régulation de Akt induite par les AGE et médiée par RAGE⁴¹⁸. Dans une étude sur des cellules musculaires lisses vasculaires de rat, une équipe rapportait que les AGE inhibaient la phosphorylation d'Akt et mTOR via RAGE, l'inhibition de RAGE étant réalisée par siRNA⁴¹⁹. Enfin, des travaux indiquaient que les AGE, via RAGE, induisaient l'autophagie sur des cardiomyocytes, en inhibant la voie PI3K/Akt/mTOR (+/- bloqué par un anticorps)⁴²⁰.

6 - Implication de RAGE en pathologie humaine : une place pour le SHUa?

RAGE est impliqué dans des pathologies au phénotype clinique hétérogène : la maladie d'Alzheimer avec son interaction avec le peptide β amyloïde⁴²¹, le cancer et certains polymorphismes de RAGE⁴²², ou encore des maladies inflammatoires comme les arthrites auto-immunes^{423,424} ou le Takayasu, artérite inflammatoire⁴²⁵. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons principalement aux liens décrits entre le RAGE et la physiopathologie de certaines néphropathies ou atteintes vasculaires, afin de faire le lien avec le SHUa.

L'implication de RAGE en pathologie rénale et son lien suggéré avec le complément nous ont amené à proposer l'hypothèse d'un rôle possible de ce récepteur dans le SHUa. Nous allons détailler ci-dessous les éléments qui nous ont conduit à poser cette hypothèse.

6.1 - RAGE et maladies rénales

6.1.1 - RAGE et glomérulopathie diabétique

Le diabète, avec l'insuffisance rénale et le vieillissement, sont considérés comme des modèles d'étude des pathologies liées aux AGE. A partir d'échantillons de patients diabétiques ou de modèles animaux de diabète, de nombreux travaux ont été réalisés sur RAGE, notamment sur le vieillissement vasculaire⁴²⁶. Le diabète est une des premières causes d'évolution vers l'insuffisance rénale terminale dans les pays développés⁴²⁷. Plusieurs études ont fait le lien entre RAGE et la maladie rénale liée au diabète^{428-432,334}. Une accumulation d'AGE était rapportée sur des biopsies rénales de patients diabétiques (n=26), dont le prédominant est la CML, ainsi qu'une surexpression podocytaire de RAGE⁴²⁸. Cette surexpression podocytaire était également retrouvée dans des modèles murins de diabète⁴³⁰. Plusieurs modèles murins ont permis de démontrer le rôle de RAGE dans la néphropathie diabétique : l'administration de sRAGE à des souris diabétiques diminuait les atteintes glomérulaires, dont la prolifération mésangiale et l'albuminurie⁴³⁰. L'administration d'anticorps anti-RAGE prévenait également la néphropathie diabétique induite à la streptozotocine⁴³³, de même que la délétion de RAGE⁴³⁴. Dans un modèle de diabète murin croisé avec des souris RAGE^{-/-}, on observait un ralentissement du déclin de la fonction rénale⁴³⁵. Les infections bactériennes sont plus fréquentes chez les patients diabétiques *versus* non diabétiques. RAGE pourrait être impliqué dans cette susceptibilité aux infections. Un lien a été démontré entre RAGE et l'adhésion des neutrophiles chez les patients diabétiques et urémiques, via la modulation de l'adhésion des neutrophiles circulants au collagène glyqué et sur la matrice extracellulaire glyco-oxydée, à l'instar du diabète⁴³⁶. Un

polymorphisme de RAGE sur l'exon 3 (allèle 82Ser) serait également un facteur de risque d'aggravation de la néphropathie diabétique dans le diabète de type I^{437,438}.

6.1.2 - Atteinte vasculaire chronique

Les événements cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité chez les patients insuffisants rénaux terminaux. Elevée dans l'insuffisance rénale chronique, l'urée, est associée à l'augmentation des événements cardio-vasculaires ainsi qu'à l'accumulation d'AGE. Un travail réalisé en France étudiait, chez des patients en dialyse péritonéale, la corrélation entre accumulation d'AGE (mesurée par autofluorescence cutanée) et vasculopathie chronique (vélocité de l'onde de pouls et hypertrophie ventriculaire gauche). Les auteurs rapportaient une corrélation positive entre la présence d'AGE dans la peau et la vasculopathie chronique⁴³⁹. Cette mesure d'autofluorescence cutanée, associée à la présence d'AGE dans la peau, était également un facteur de risque prédictif de mortalité chez les patients en hémodialyse chronique⁴⁴⁰. Plus récemment, cette mesure a été corrélée à la rigidité artérielle et à la résistance à l'insuline⁴⁴¹, ainsi qu'aux complications microvasculaires du diabète de type II (à l'aide d'une mesure de la fluorescence en palmo-plantaire)⁴⁴². Un modèle de vasculopathie urémique (des souris néphrectomisées des 5/6 et Apoe^{-/-}) permettait d'étudier les lésions d'athérosclérose⁴⁴³ : la néphrectomie partielle et donc l'insuffisance rénale chronique aggravait l'athérosclérose, avec une augmentation de l'expression de RAGE dans l'aorte chez les animaux néphrectomisés. En revanche, il existait un rôle aggravant de RAGE : en cas de co-KO Apoe^{-/-} RAGE^{-/-}, les souris étaient protégées de cette accélération de l'athérosclérose. L'athérosclérose était médiée, entre autre, par le SAA (sérum amyloïde A), toxine urémique mais également ligand de RAGE.

6.1.3 - Néphropathie hypertensive

La néphropathie hypertensive est l'une des premières causes d'insuffisance rénale terminale chez les sujets âgés⁴⁴⁴. Les lésions caractéristiques sont une paroi vasculaire épaissie, des dépôts hyalins dans les artéioles, parfois des lésions en bulbe d'oignon et une nécrose fibrinoïde glomérulaire dans la néphroangiosclérose maligne⁴⁴⁵. Une équipe a étudié l'expression de RAGE sur des biopsies rénales de patients présentant une néphropathie hypertensive. Chez les patients contrôles (zone saine de tumeur rénale), les seules cellules exprimant RAGE constitutivement étaient des cellules interstitielles et les cellules musculaires lisses vasculaires. Quelques cellules tubulaires distales étaient discrètement

positives. Les CE artérielles, artériolaires ou glomérulaires, les podocytes et les cellules épithéliales de la capsule demeuraient négatives. Dans la néphropathie hypertensive, tous les types cellulaires mentionnés ci-dessus devenaient alors positifs pour RAGE³⁶⁴. Tanji *et al.* ont également décrit une accumulation de CML dans les reins de patients avec une néphropathie hypertensive⁴²⁸.

Le système rénine angiotensine (SRA) contribue à la dysfonction endothéliale, étape initiale de la néphropathie hypertensive⁴⁴⁶. Thomas *et al.* ont démontré que l'administration d'angiotensine II augmentait de façon significative l'accumulation d'AGE chez des rats, et qu'elle était abolie par un bloqueur du SRA (valsartan)⁴⁴⁷. Matui *et al.* ont démontré que l'irbésartan, autre bloqueur du SRA, inhibait l'up-régulation de VCAM-1 par les AGE dans les CE glomérulaires⁴⁴⁸. En conséquence, l'hypertension pourrait activer le cross-talk pathologique AGE-RAGE⁴⁴⁹, impliquant le RAGE dans la progression de la néphroangiosclérose hypertensive.

6.1.4 - Prééclampsie

Compte tenu de l'implication de RAGE dans les maladies vasculaires, une équipe a émis en 2003 l'hypothèse d'un rôle joué par ce récepteur dans la prééclampsie, en comparant des biopsies de myomètre de femmes gravides (prééclamptiques ou non) et de femmes non enceintes. Les auteurs rapportaient une expression indétectable de RAGE sur les tissus des patientes non gravides et une augmentation de l'expression endothéliale du co-marquage RAGE-vWF sur le myomètre des patientes enceintes sans prééclampsie. Chez les patientes prééclamptiques, le marquage de RAGE était encore plus intense, suggérant ainsi un rôle de RAGE dans la prééclampsie⁴⁵⁰. Ces résultats étaient corroborés par d'autres équipes, qui ont retrouvé une augmentation des AGE circulants chez les patientes prééclamptiques, associée à une augmentation de l'expression des AGE et de RAGE dans leur placenta et une augmentation de certains marqueurs du stress oxydant^{451,452}. De même, il a été rapporté que l'augmentation de sRAGE dans le sérum des patientes diabétiques de type I serait un marqueur prédictif de prééclampsie⁴⁵³. Ces résultats concordent avec la mise en évidence d'une forte activation de NFκB dans la prééclampsie (marquage placentaire)⁴⁵⁴, et l'altération des systèmes anti-oxydants du myomètre dans cette pathologie⁴⁵⁵.

6.1.5 - Progression de la maladie rénale chronique

Dans une étude sur des cellules circulantes de patients insuffisants rénaux chroniques (non diabétiques), l'expression de RAGE était corrélée au stade d'insuffisance rénale et au taux plasmatique d'AGE⁴⁵⁶. RAGE est également impliqué dans la dialyse péritonéale, une des méthodes de dialyse possible en cas d'insuffisance rénale terminale. La stérilisation des dialysats, liquides infusés en intra-péritonéal pendant la dialyse, entraîne des produits de dégradation des sucres. Eux-mêmes étaient fortement concentrés en glucose au début des années 2000. L'exposition de cellules mésothéliales péritonéales humaines à des AGE (CML) menait à l'expression de molécules d'adhésion leucocytaire (VCAM1), dont l'expression était bloquée par un anti-RAGE. Ces résultats suggéraient un rôle de RAGE dans l'inflammation locale péritonéale par exposition aux liquides de dialyse³⁴⁰. Sur ces mêmes cellules, RAGE favorisait l'angiogénèse via le VEGF lorsqu'il était stimulé par la CML^{457,458}. L'administration de ces produits, via une pompe osmotique à des rats néphrectomisés des 5/6 engendrait une élévation des taux aortiques et cardiaques de RAGE et des AGEs⁴⁵⁹.

6.1.6 - RAGE dans l'insuffisance rénale aiguë et le sepsis

Brodzka *et al.* ont démontré qu'il existait une corrélation entre taux plasmatiques de sRAGE et mortalité à 28 jours ou défaillance d'organe, dont l'insuffisance rénale aiguë, chez des patients en soins intensifs admis pour sepsis. Le sRAGE était plus prédictif de mortalité que la procalcitonine, la protéine C réactive ou le lactate⁴⁶⁰. Dans un modèle de choc septique par ligature du cæcum, l'on retrouvait une élévation de HMGB1, ligand de RAGE⁴⁶¹. L'administration de sRAGE (récepteur leurre pour les ligands de RAGE) ou une délétion de RAGE augmentaient la survie des rongeurs dans des modèles de sepsis. Yamamoto *et al.* ont démontré que le LPS liait RAGE via le lipide A sur le domaine V, induisant l'activation de NFκB et la sécrétion de TNFα dans des modèles de choc septique lié au LPS³⁹¹. RAGE a également été impliqué dans l'ischémie-reperfusion, via sa liaison à HMGB1, menant à une amplification de l'ischémie rénale⁴⁶². Ainsi, la liaison du LPS ou de HMGB1 pourrait être impliquée dans les insuffisances rénales aiguës liées au sepsis.

6.1.7 - Autres maladies rénales

L'axe RAGE-ligand a été impliqué dans d'autres néphropathies, que nous mentionnons brièvement :

- Une surexpression de RAGE et de CML était retrouvée sur des biopsies rénales de patients atteints de néphropathie lupique^{364,428} ainsi qu'une élévation de taux de HMGB1 circulant¹⁶⁵. Certains polymorphismes de RAGE seraient associés à la néphropathie lupique⁴⁶³.

- Une augmentation de l'expression de RAGE et une accumulation d'AGE ont été décrites dans les néphropathies à amylose AA⁴⁶⁴, avec une augmentation des taux d'AGE plasmatiques. Dans d'autres formes d'amylose, à l'instar de la neuropathie amyloïde familiale (NAF), les taux sériques d'AGE étaient plus élevés que chez les sujets contrôles, et l'analyse en IHC retrouvait une surexpression de RAGE et des AGE au niveau glomérulaire et tubulaire, co-localisant avec les dépôts amyloïdes (NAF à transthyrétine et à gelsoline)^{465,466}.

- Dans la polykystose, maladie autosomique dominante, Park *et al.* ont retrouvé une augmentation de l'expression de RAGE au niveau rénal ainsi qu'une augmentation de l'expression génique de ses ligands S100A8 et S100A9 dans un modèle murin de la maladie⁴⁶⁷. Un siRNA de RAGE permettait la réduction de la taille des kystes⁴⁶⁸.

- Dans la sclérodémie, une équipe a rapporté une augmentation de l'expression de sRAGE, ainsi que de HMGB1 dans les lésions cutanées, sur un modèle murin et sur un groupe de 70 patients atteints de la maladie⁴⁶⁹. Ces résultats étaient confirmés par une autre équipe, qui retrouvait une augmentation de l'expression de la CML et du RAGE dans des biopsies cutanées de patients avec une sclérodémie⁴⁷⁰. La mesure des AGE par fluorescence cutanée est également corrélée à la sévérité de la maladie⁴⁷¹. Cependant, il n'y a pas d'étude à ce jour sur l'atteinte rénale de la sclérodémie et RAGE.

6.2 - RAGE et complément

Comme indiqué dans le tableau n°9, RAGE est décrit comme un récepteur de trois molécules de la cascade du complément : l'anaphylatoxine C3a et sa forme inactive le C3a désarginé ainsi que le C1q^{6,394}.

L'interaction avec le C3a et le C3a désarginé était rapportée en ELISA. En SPR, le C3a ne semblait pas se lier directement mais via l'interaction avec des CpGA, oligonucléotides de

cytosine-guanine non méthylé riche en ADN A, qui eux liaient directement RAGE en SPR. Sur des PBMC (cellules mononucléées du sang périphérique) humaines, C3a augmentait la production d'IFN α en présence de CpGA, et cette production d'IFN α était bloquée par un anti-RAGE⁶. La production d'IFN α diminuait chez des souris exposées à des CpGA ou à du C3a, lorsqu'elles étaient RAGE^{-/-}, en comparaison aux souris WT. Les interactions RAGE/C3a desarginé étaient également de plus forte affinité en présence de CpG, mais n'ont pas été présentées plus en détail dans cet article.

Ma *et al.* ont démontré pour la première fois que RAGE était un ligand de C1q, en ELISA et en SPR, avec une constante d'affinité à $5.6\mu\text{M}^{394}$. Les courbes de liaison C1q-RAGE étaient multiphasiques, indiquant une liaison hétérogène entre sRAGE immobilisé et C1q en phase liquide. C1q ayant une structure à 6 têtes globulaires, les auteurs en déduisaient une liaison faible formée par une seule tête et une liaison forte lorsque les 6 têtes se liaient. Le site de liaison de C1q se trouverait sur ses portions globulaires, un anticorps liant les têtes globulaires de C1q empêchant la liaison à RAGE. Le site de liaison de C1q sur RAGE était identifié sur la portion N-terminale, des résidus 35 à 39. Il n'y avait pas de compétition entre C1q et les autres ligands testés de RAGE (S100B, BSA glyquée, peptide β amyloïde). Par la suite, les auteurs démontraient l'existence d'un complexe RAGE-C1q-CR3 (Mac1), ligand connu de RAGE également.

Dans ce même article, les auteurs démontraient que le sRAGE activait le complément : dans le but de mimer un complexe immun immunoglobuline-antigène, du sRAGE était coaté sur une plaque puis exposé à du sérum humain normal (SHN). Les taux de C3a dans le surnageant étaient mesurés, reflet du clivage du C3. L'exposition de SHN à du sRAGE retrouvait des taux de C3a élevés, *versus* une absence de C3a en cas de protéine contrôle négative immobilisée. En cas d'exposition à du sérum humain déplété en C1q, le sRAGE n'activait plus le complément, suggérant que le sRAGE agirait comme une immunoglobuline activant la voie classique du complément. L'adjonction de Mg-EGTA, bloquant la voie classique et la voie des lectines, confirmait cette hypothèse et inhibait également l'activation du complément par sRAGE.

Les auteurs étudiaient ensuite les conséquences phénotypiques de cette liaison. Sur une lignée de monocytes humains, le niveau d'expression basal de RAGE est faible. L'exposition

en vitamine D3 et TGF β 1 favorise leur transformation en phagocytes matures qui expriment alors RAGE. L'addition de C1q sur ces phagocytes favorisait la phagocytose. Un anticorps bloquant de RAGE diminuait cet effet du C1q. Une lignée cellulaire épithéliale surexprimant RAGE (ARPE-19RAGE) était exposée à des billes en Latex coatées au C1q versus des billes coatées à la BSA. Seules les billes coatées au C1q se liaient aux cellules, et cette liaison était atténuée par un anti-RAGE. Ainsi, ces auteurs démontraient de façon robuste la liaison RAGE-C1q.

En 2016, une seconde équipe a confirmé la liaison de C1q à sRAGE. Ils décrivaient, en outre, en SPR, un complexe ternaire RAGE-C1q-HMGB1, chacun des trois composants se liant de façon indépendante aux deux autres. Ce complexe était impliqué dans la différenciation des monocytes en macrophages M2 anti-inflammatoires⁴⁷².

Une étude sur le rôle du sRAGE dans le lupus retrouvait des taux plasmatiques de C3 et C4 inversement corrélés au taux de sRAGE, en analyse multivariée, pouvant être une preuve des liens entre RAGE et complément⁴⁷³. En 1994, le site de liaison du iC3b a été identifié sur les β 2 intégrines⁴⁷⁴. Les sites de liaison seraient distincts entre les intégrines $\alpha_X\beta_2$ et $\alpha_M\beta_2$ ⁴⁷⁵. Le site de liaison sur le iC3b serait contenu dans C3d⁴⁷⁶. Les intégrines $\alpha_X\beta_2$ et $\alpha_M\beta_2$ étant des ligands de RAGE, elles pourraient constituer une plateforme de liaison du iC3b au RAGE. Cette hypothèse reste à démontrer.

6.3 - Homologie RAGE - TLR4

TLR4 étant impliqué dans la physiopathologie de l'hémolyse par son rôle de récepteur endothélial à l'hème, nous nous sommes intéressés aux points communs entre ces deux molécules. RAGE et les récepteurs TLR jouent un rôle critique dans l'immunité innée, via leur interaction avec les produits microbiens (PAMPS, pathogen-associated molecular patterns) et les molécules endogènes relarguées en cas d'inflammation (DAMPs, damage-associated molecular patterns)^{477,478}. RAGE et certains TLR coopèrent de façon synergique dans l'amplification de la réponse inflammatoire et partagent des ligands communs (cf. Tableau n°10). RAGE interagit également avec TIRAP et Myd88, protéines toutes deux impliquées dans les voies intracellulaires activées par les TLR2 et 4⁴⁰⁴.

Tableau n°10 : Ligands partagés entre certains TLR et RAGE

Ligands	TLR2	TLR4	TLR9	Ref.
HMGB1	X	X	X	479,480
LPS bactérien		X		481
Complexe S100A8/A9		X		482
S100A12		X		483
Sérum amyloïde A*	X			484
Sérum amyloïde β*	X	X		485

* se lie par les fibrilles β plissés. **HMGB1**:high - mobility group box 1, **LPS** :lipopolysaccharide

Selon plusieurs travaux étudiant des pathologies très différentes, RAGE et TLR4 interagiraient entre eux via ces ligands communs. Les protéines S100A8 sont augmentées dans certains syndromes myéloprolifératifs (mutation JAK2) et y auraient un rôle pathogène, en induisant la déphosphorylation de la voie ERK1/2. Le blocage RAGE/TLR4 prévenait de l'inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 médiée par S100A8/9 dans la maladie de Vaquez⁴⁸⁶. Dans le lichen plan, une équipe a proposé l'hypothèse d'une boucle proinflammatoire RAGE-TLR4 via HMGB1, avec une surexpression des deux récepteurs et de leurs ligands dans les biopsies cutanées de patients⁴⁸⁷. Dans un modèle murin de diabète, une susceptibilité aux infections à bacilles gram moins était médiée par TLR4/RAGE⁴⁸⁸. Dans les vascularites à ANCA, des taux plasmatiques élevés de HMGB1 reflétaient une maladie active. HMGB1 pourrait favoriser la dégranulation leucocytaire induite par les ANCA, via la voie TLR4-RAGE et MyD88/NFκB⁴⁸⁹.

Les interactions hème-RAGE, ligand de TLR4, n'ont pas été étudiées à ce jour. Notons qu'il existe des voies activées communes, telles que la phosphorylation de ERK1/2 comme cela a été démontré sur des astrocytes et des HUVEC^{490,491}, ou l'activation de Myd88 par TLR4, que nous avons évoqué ci-dessus⁴⁹². Fort de cette littérature, nous avons ainsi émis l'hypothèse que le RAGE, à l'instar de TLR4, serait un récepteur endothélial à l'hème.

PARTIE 2 - PRESENTATION DES TRAVAUX

Chapitre 1 - Hème et susceptibilité endothéliale glomérulaire à l'activation du complément

*Les résultats relatifs à cette partie de mon travail ont fait l'objet d'un article en cours de révision (corrections mineures) dans la revue *Frontiers in Immunology*. D'autre part, ils ont été présentés en communications orales à l'*European Meeting on Complement in Human Disease* (Septembre 2017, Copenhague, Dr. Roumenina), et au congrès annuel de la *Société Francophone de Néphrologie, Dialyse et Transplantation* (Octobre 2017, Nice) et en communication affichée au congrès de l'*European Renal Association - European Dialysis and Transplantation Association* (Mai 2018, Copenhague).*

1.1 - Résumé et présentation de l'article n°1

Objectifs principaux

Le SHUa est une pathologie marquée par l'identification fréquente d'une dysrégulation de la voie alterne du complément. Alors que, dans cette MAT, l'activation du complément est systémique, l'atteinte rénale reste cliniquement au premier plan, les atteintes extra-rénales ne concernant qu'environ 15% des patients. L'objectif de ce travail était de comprendre les mécanismes menant à l'atteinte préférentiellement rénale dans le SHUa, avec pour principale hypothèse une réponse endothéliale hétérogène à l'hémolyse.

Matériel et Méthodes

Modèle murin

Des souris C57BL/6 ont été traitées par injection intrapéritonéale d'hème à J0 et J1, stimulus visant à mimer l'hémolyse, ou par PBS. A 24h, les souris étaient sacrifiées et différents organes étaient récupérés (reins, foie, cœur, poumons, cerveau, peau). Le dépôt de C3, ainsi que l'expression d'un régulateur du complément (TM) et de l'hémolyse (HO-1), ont été analysés en IHC ou IF. Un co-marquage de vWF signifiait le caractère endothélial du marquage.

Modèle cellulaire

Quatre types de cellules ont été étudiés : les HRGEC (Human Renal Glomerular Endothelial Cells), CE primaires glomérulaires commerciales, les GENC (Glomerular ENdothelial Cells), lignée immortalisée de CE glomérulaires, obtenues auprès du Pr Satchell (Bristol), les HUVEC (Human Umbilical Venous Endothelial Cells), culture primaire de CE de veines de cordon

ombilical (CHRU de Lille) et les HMEC (Human Microvascular Endothelial Cells), lignée immortalisée de CE microvasculaires de peau. Les cellules étaient incubées pendant une nuit (~16h) avec de l'hème à différentes concentrations, dans un milieu dépourvu de sérum (milieu OPTI®) afin de ne pas inhiber les effets de l'hème. Après décollement cellulaire, différents marqueurs ont été analysés : i) en FACS : C3, régulateurs du complément (MCP, DAF, TM, FH), ii) en RTqPCR : HO-1, TM, Nrf2, BACH1, KLF2 et KLF4.

Etude anatomopathologique de biopsies rénales de patients

Des biopsies rénales de sujets porteurs d'un SHUa en période hémolytique ont été analysées, concernant l'activation du complément (dépôt de C3 en IF), la présence d'une atteinte rénale de l'hémolyse par la coloration de Perls (dépôt de fer) et l'expression de HO-1. Ont été considérés comme contrôle positif d'une hémolyse des biopsies rénales de patients porteurs de valve mécanique, et comme contrôle négatif des biopsies systématiques sans anomalie de patient greffé à 3 mois.

Résultats

L'analyse des organes murins après injection d'hème retrouvait un fort dépôt de C3b, au niveau glomérulaire, en comparaison aux souris traitées au PBS. Le dépôt de C3b, après injection d'hème dans notre modèle murin, était plus fortement retrouvé au niveau glomérulaire que dans les autres organes.

Afin d'identifier une susceptibilité endothéliale rénale en condition d'hémolyse, nous avons comparé les différentes cultures cellulaires après incubation avec de l'hème. Après 16h d'incubation avec de l'hème, le dépôt de C3b était plus important sur les cellules glomérulaires. Pour comprendre cette différence d'activation du complément sous l'effet de l'hème, nous avons émis 2 hypothèses : i) celle d'une dysrégulation de la C3 convertase, ii) celle d'un défaut de protection envers l'hémolyse.

Hypothèse 1 : Défaut de régulation de la C3 convertase - sous l'effet de l'hème

- MCP, DAF : nous avons observé une diminution dose-dépendante sur tous les types cellulaires, sans différence significative (FACS)
- FH : nous avons retrouvé une plus faible liaison sur les CE glomérulaires (FACS)
- TM : nous avons observé une augmentation plus faible de la TM sur CE glomérulaires, par rapport aux HUVEC où cette augmentation était importante (FACS, RTqPCR).

Hypothèse 2 : Défaut de protection envers l'hémolyse

Modèle cellulaire

Etude de HO-1 : Nous avons observé une forte induction de HO-1 sur les HUVEC après traitement à l'hème. Celle-ci était bien moins forte sur CE glomérulaires (WB, RTqPCR).

Etude des facteurs de transcription de HO1 et TM : L'étude de ces facteurs de transcription sur les différents types cellulaires ne retrouvait pas de différence pour NRF2 ni BACH1. En revanche, KLF2 et KLF4 étaient significativement plus exprimés par les HUVEC que les autres CE.

Modèle murin

L'analyse des reins murins révélait une faible expression de HO-1 au niveau glomérulaire endothélial, par rapport aux autres organes.

Biopsie de patients

L'analyse des biopsies de patients porteurs d'une hémolyse retrouvait un important dépôt de fer (coloration de Perls). La coloration de Perls était négative sur les biopsies de patients contrôles négatifs. L'expression de HO-1 était retrouvée au niveau tubulaire chez les patients hémolytiques, mais n'était pas mise en évidence au niveau glomérulaire, attestant donc d'un défaut *in vivo* d'induction d'HO1 au niveau glomérulaire.

Lien entre HO-1 et défaut de protection contre le complément?

Nous avons mis au point une expérience dite de "rechallenge", consistant en l'incubation toute la nuit d'hème sur les cellules versus PBS, dans le but d'induire HO-1 dans les cellules exposées à l'hème. Le lendemain, les cellules étaient réexposées à une seconde incubation de 30min d'hème puis le dépôt de C3b était mesuré (FACS). Sur les HUVEC incubées à l'hème toute la nuit, on observait un moindre dépôt de C3 que sur les HUVEC pré-incubées avec du PBS, ce qui semble témoigner d'un effet "protecteur" envers le complément. Sur les CE glomérulaires, la pré incubation à l'hème toute la nuit n'apportait aucune différence en terme de dépôt de C3 après la seconde exposition sur les cellules. Les CE glomérulaires semblaient donc se comporter différemment des HUVEC en termes de complément-protection médiée par une exposition prolongée à l'hème.

Afin d'étudier le rôle de HO-1 dans cet effet protecteur, nous avons donc bloqué cette enzyme via SnMPIX (étain métaloporphyrine, bloqueur de HO-1) et réalisé l'expérience de "rechallenge" sur les HUVEC. L'incubation de SnMPIX avec de l'hème toute la nuit objectivait

une perte de l'effet protecteur, avec l'absence de baisse du dépôt de C3 par rapport aux cellules exposées à l'hème seul.

Conclusion

En conditions d'hémolyse, sur des modèles murins et cellulaires, nous observons un fort dépôt de complément (C3b) au niveau glomérulaire. Différents facteurs pourraient expliquer cette atteinte rénale : un défaut de régulation de la C3 convertase, avec une faible liaison de FH sur les CE glomérulaires, ainsi qu'une faible expression de TM sous l'effet de l'hème. De plus nous observons un défaut de régulation de l'hémolyse au niveau glomérulaire, comme en témoigne la faible induction de HO-1 tant sur le modèle murin que cellulaire, ainsi que les biopsies de patients. Cette enzyme semble jouer un rôle prépondérant dans la protection envers le complément. Nos données suggèrent également que ce défaut d'expression glomérulaire pourrait être lié au défaut d'expression d'un facteur de transcription commun de HO-1 et TM, le KLF2.

1.2 - Données supplémentaires sur l'étude des polymorphismes de HO-1 dans le SHUa

Objectifs

Au vu de nos résultats sur un rôle potentiel de HO-1 dans la complément-protection dans le SHUa, nous nous sommes intéressés aux polymorphismes du promoteur de ce gène. En effet, il a été rapporté que le nombre de répétitions de (GT), (GT)_n, dans le promoteur du gène HO-1, modulait la transcription de ce gène^{493,494}. Ces polymorphismes ont été associés à différentes pathologies, dont certaines au tropisme rénal⁴⁹⁵.

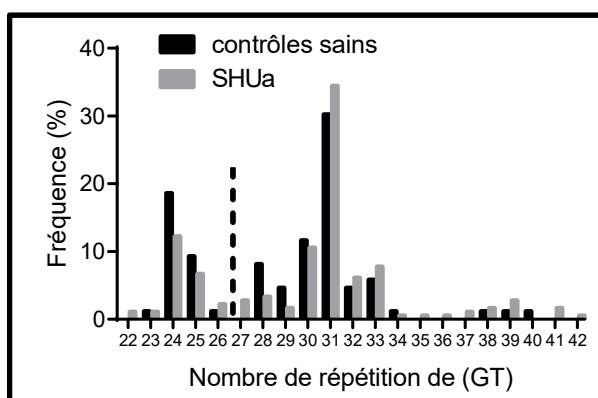
Méthodes

Une étude rétrospective a été menée auprès de 90 patients adultes de la cohorte française de SHUa¹, comparés à 43 témoins sains appariés sur l'ethnie. La région promotrice de HO-1 et les (GT)_n ont été évalués selon les méthodes décrites par Guénéguou *et al.*⁴⁹⁶. Nous avons évalué la distribution des (GT)_n dans les deux groupes.

Résultats

Aucune différence de (GT)_n n'a été retrouvée entre les patients SHUa et les témoins sains (Figure n°21). Le (GT)_n avait une distribution bimodale, avec un pic situé à 24 répétitions et l'autre à 31 répétitions, à la fois chez les témoins et les patients.

Figure n°21 : Distribution des répétitions (GT)_n du promoteur de HO-1 chez les témoins sains (n=43) et les SHUa (n=90)



Conclusion

Nous n'avons pas mis en évidence un rôle des polymorphismes de HO-1 dans le SHUa, sans différence de distribution retrouvée avec une cohorte contrôle appariée.

Chapitre 2 - Rôle de RAGE dans le tropisme rénal du SHUa ?

Les résultats relatifs à cette partie de mon travail font l'objet d'un article en cours de rédaction, dont la soumission est prévue dans la revue Journal of Biological Chemistry. D'autre part, ils seront présentés en communication orale au congrès annuel de la Société Francophone de Néphrologie, Dialyse et Transplantation (Octobre 2018, Lille).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'implication de RAGE en pathologie rénale et son lien suggéré avec le complément par sa liaison à l'anaphylatoxine C3a nous ont amené à proposer l'hypothèse d'un rôle de ce récepteur dans le SHUa. Nous allons détailler ici nos travaux non publiés visant à étayer cette hypothèse, avant d'explorer le lien révélé par notre étude entre RAGE et hémolyse.

2.1 - Interactions entre RAGE et protéines du complément

Objectifs

Nous avons analysé les interactions entre le récepteur RAGE et les protéines de la cascade du complément, en vue premièrement de reproduire les travaux décrivant une liaison directe de C3a et C1q sur RAGE^{6,394}. D'autre part, nous avons pour objectif de tester les interactions entre RAGE et d'autres protéines du complément, à savoir l'anaphylatoxine C5a, C3a et C5a inactivés (desarginés), et le C3b. Nous avons également émis l'hypothèse que ces liaisons pouvaient être potentialisées par l'hème, au même titre que la liaison C3a/hème est décrite comme potentialisée par les CpG.

Méthodes

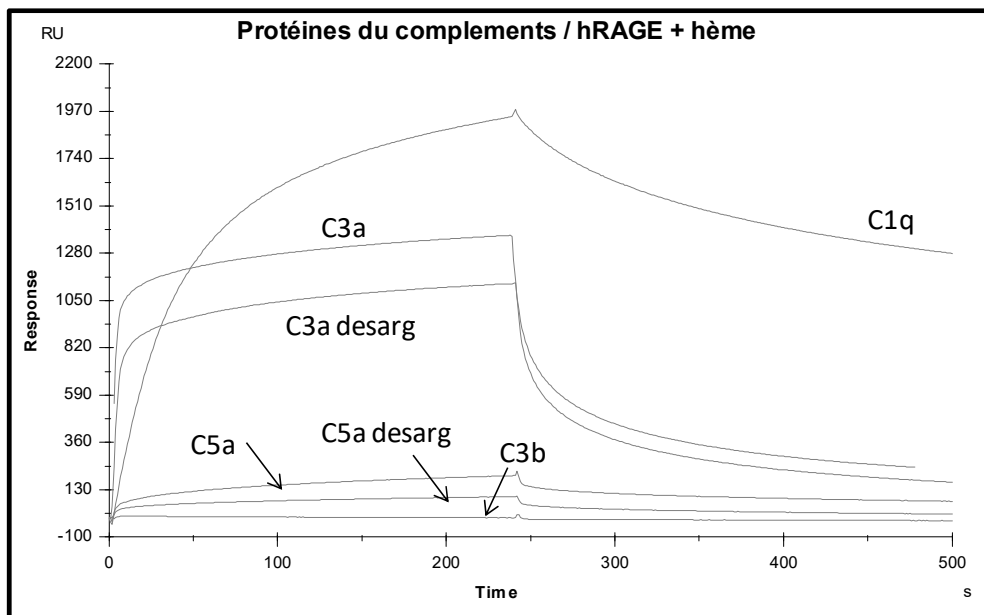
Nous avons immobilisé en SPR hRAGE et testé la liaison directe des protéines de la cascade du complément (C3a, C1q, C3b, C3a desarginé, C5a desarginé). Cette liaison a également été testée après exposition à de l'hème. Nous avons utilisé comme récepteur contrôle TLR4 et sa liaison connue à l'hème. Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans l'article n°2. Les protéines du complément sont d'origine commerciale (Complement Technology).

Résultats

- Après immobilisation de hRAGE, aucune liaison n'a été détectée avec C3a ni C1q, même à forte concentration, alors que la CML, contrôle positif, liait bien le RAGE.

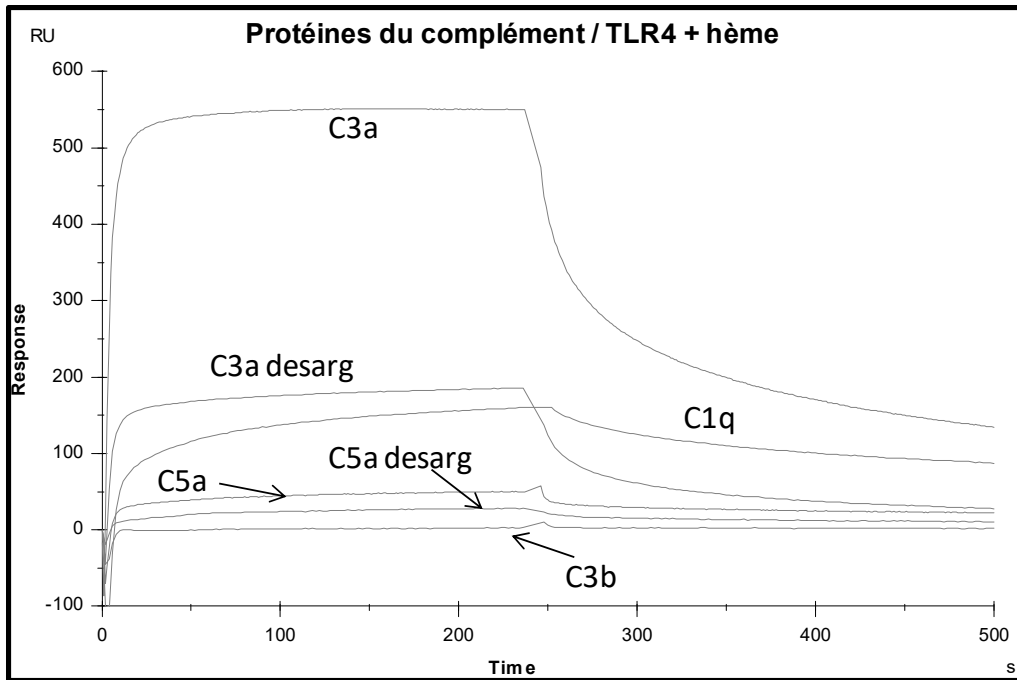
- En revanche, après liaison d'hème sur le RAGE, C3a et C1q liaient le complexe RAGE/hème avec une forte affinité (Figure n°22). D'autres protéines de la cascade du complément liaient le complexe RAGE/hème: C5a, C3a desarginé et C5a desarginé (Figure n°22). De façon intéressante, C3b ne se liait pas à RAGE/hème, soulignant une spécificité des liaisons précédentes (Figure n°22).

Figure n°22 : Etude en SPR des liaisons entre RAGE et les protéines du complément, après exposition de l'hème



- Les différentes liaisons RAGE/hème/protéines du complément étaient plus fortes qu'envers le complexe TLR4/hème/protéine du complément (Figure n°23), démontrant bien le rôle central de RAGE dans la liaison RAGE/hème/C3a.

Figure n°23 : Etude en SPR des liaisons entre TLR4 et les protéines du complément, après exposition de l'hème



- D'autre part, ces liaisons étaient dose-dépendantes, comme l'illustre la liaison du C3a sur RAGE/hème et TLR4/hème, à concentration variable de C3a (Figures n°24 et 25).

Figure n°24 : Etude en SPR de la liaison de C3a à RAGE après exposition à de l'hème. Doses croissantes de C3a de 0.5µg/ml à 15µg/ml

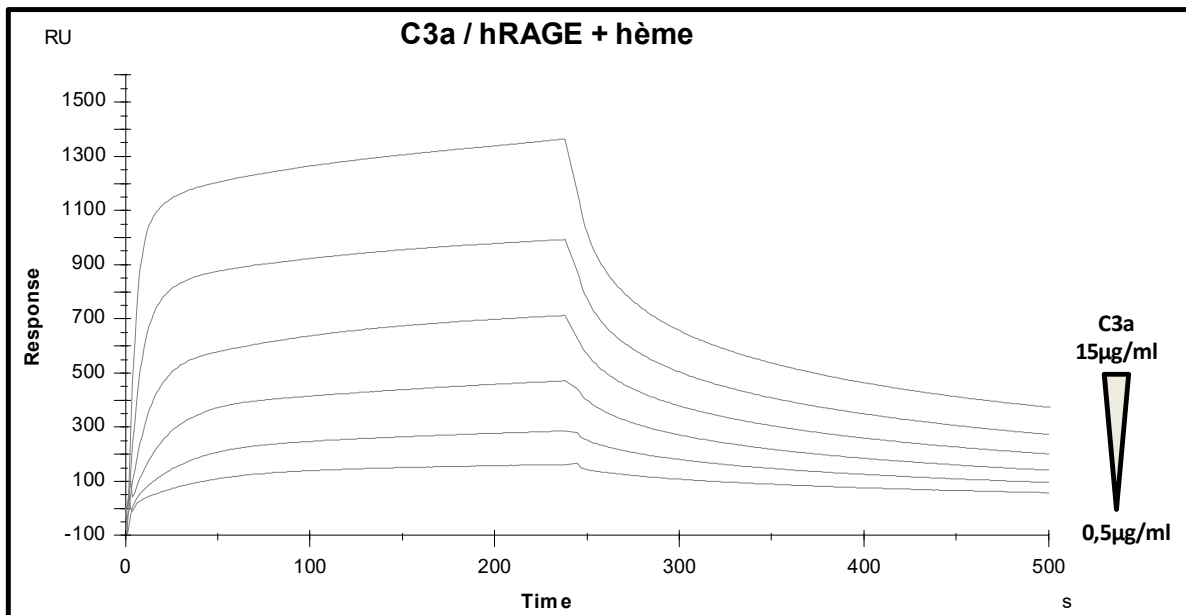
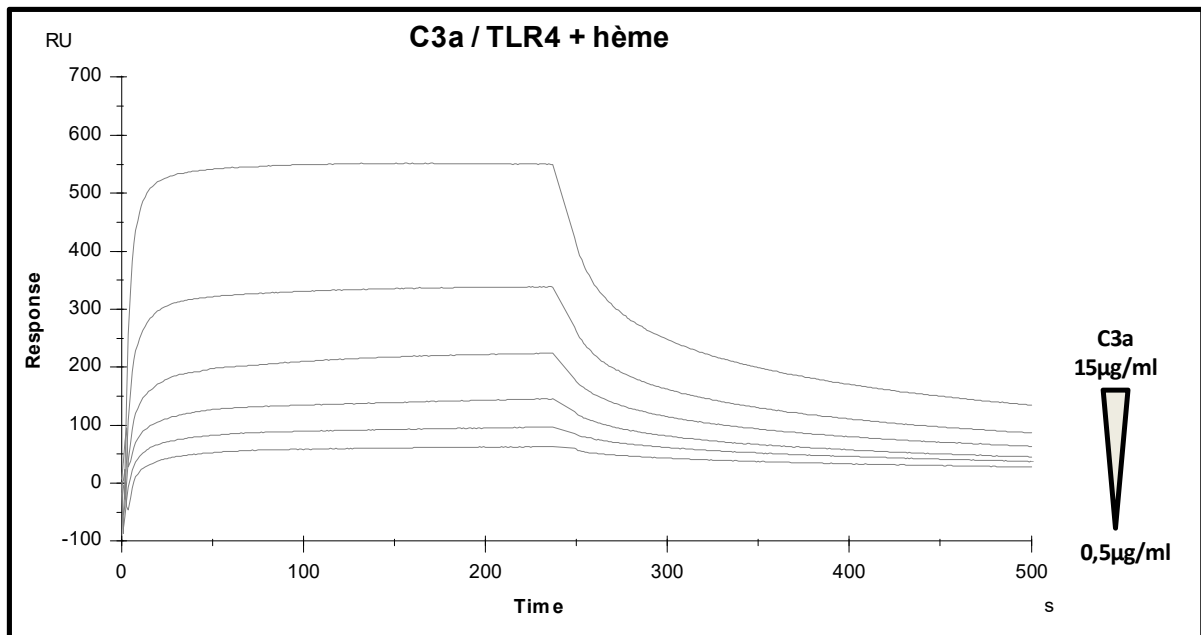


Figure n°25 : Etude en SPR de la liaison de C3a à TLR4 après exposition à de l'hème. Doses croissantes de C3a de 0.5µg/ml à 15µg/ml



Conclusion

RAGE semble être une plateforme potentialisant la liaison de l'hème aux protéines du complément, déjà décrite dans la littérature. A concentration égale, C3a et les autres protéines du complément testées, mis à part C3b, liaient plus fortement RAGE/hème que TLR4/hème, ce qui laisse supposer un rôle central de RAGE dans cette liaison.

2.2 - Etude de l'atteinte rénale dans un modèle d'hémolyse induit par phénylhydrazine chez des souris RAGE^{-/-} versus WT

Objectifs

Dans l'étude de notre modèle avec injection d'hème, sur des souris WT et RAGE^{-/-}, nous nous sommes intéressés aux lésions rénales pouvant être médiées par RAGE. En effet, chez les souris traitées par l'hème, nous avons observé une augmentation de l'expression de RAGE en RTqPCR dans les lysats de rein total. Ainsi, nous avons testé un second modèle d'hémolyse validé dans la littérature, utilisant l'injection de phénylhydrazine (PHZ) qui provoque une lyse des GR. Nous nous sommes intéressés aux lésions anatomopathologiques et à certains marqueurs de l'atteinte rénale tubulaire.

Méthodes

Ces travaux ont été réalisés sur 6 souris C57bl6 WT et 6 souris RAGE^{-/-} (même lignée que celle utilisée dans l'article n°2). Les souris recevaient à J0 une injection intrapéritonéale de 100µL de PBS ou 100µL de PHZ concentrée à 25mg/ml, soit 2.5mg par souris (n=3 par groupe). A J1, les souris étaient anesthésiées par isofurane puis sacrifiées par ponction intracardiaque après thoracotomie, et exsanguination. Un demi-rein était congelé directement par carboglace (IF), un demi-rein était immergé dans l'AFA à 4°C pendant une nuit puis inclus en paraffine (microscopie optique), un demi-rein était congelé à sec (WB), et enfin, un demi-rein était immergé en "RNA later" à température ambiante (extraction d'ARN).

La coupe et l'analyse des reins en microscopie optique a été réalisée en collaboration avec le laboratoire d'anatomopathologie du CHRU de Lille (Dr V. Gnemmi). Les colorations suivantes ont été réalisées : PAS (Periodic Acid Schiff), trichrome de Masson et coloration de Perls (étude des dépôts de fer).

Les demi-reins étudiés en optique ont été coupés au cryostat à l'épaisseur de 5µm. Après 15 minutes à température ambiante, les lames étaient fixées en acétone 4°C puis séchées. Les coupes d'organes étaient délimitées au Dakopen. Après 2 lavages au TBS 0.04% Tween de 5 minutes, un blocking était réalisé avec du TBS 5% BSA pendant 20 minutes à température ambiante en chambre humide. Un nouveau lavage au TBS 0.04% Tween était

réalisé. L'anticorps primaire était incubé pendant 1 heure dans l'obscurité en chambre humide dans du TBS 1% BSA :

- contrôle isotypique par Ac de lapin IgG monoclonal, Abcam, 1/200
- Ac de rat anti-C3 murin IgG1 Hycult Biotech, 1/100
- Ac de lapin anti-C5b9 murin Abcam, 1/1000
- Ac de lapin polyclonal anti-fibrinogène Abcam, 1/50
- Ac de lapin polyclonal anti-RAGE Abcam, 1/200

L'anticorps secondaire était incubé après 2 nouveaux lavages (anticorps de chèvre dirigés contre le rat et le lapin, Thermoscientific, au 1/200). S'ensuivaient 2 lavages puis une coloration du noyau par DAPI 200µL par lame au 1/500 dans le TBS pendant 3 minutes et lavage à l'eau distillée. Les lames étaient finalement montées en milieu Aquapoly/mount. La lecture des lames était réalisée en Axioscann en laser Texas Red.

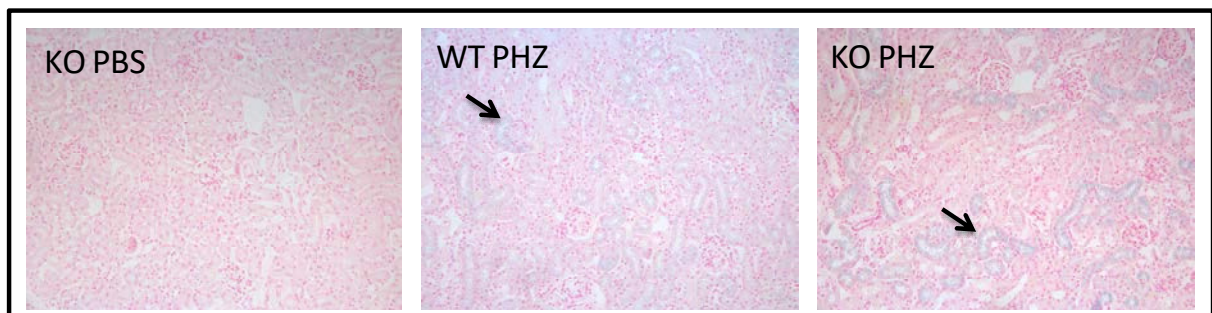
Les études en RTqPCR et en WB étaient réalisées telles que décrites dans l'article n°2.

Résultats

Microscopique optique

- La coloration de Perls était faiblement positive, signant un dépôt de fer, avec un marquage principalement tubulaire (Figure n°26) (flèches noires) sur les reins de souris PHZ+. La coloration était négative sur les reins de souris exposées au PBS (Figure n°26).

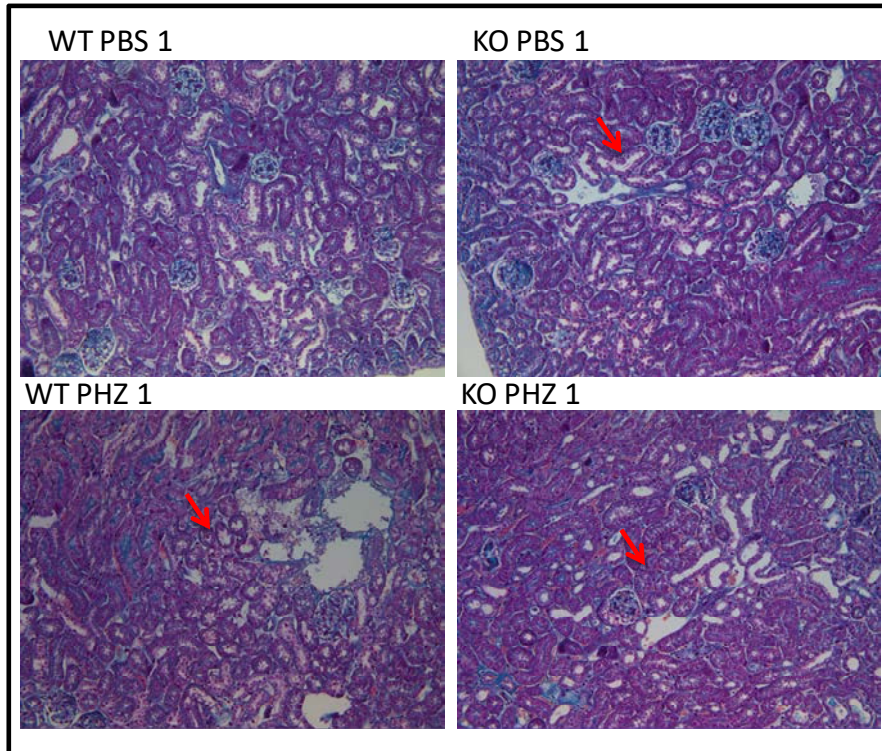
Figure n°26 : Etude du dépôt de fer au niveau rénal



Coloration de Perls. i) Souris RAGE^{-/-}, injectée avec du PBS : marquage négatif. ii) Souris RAGE^{+/+}, injectée avec de la PHZ : marquage positif (flèche noire). iii) Souris RAGE^{-/-}, injectée avec de la PHZ : marquage positif (flèche noire).

- L'analyse en Trichrome de Masson (Figure n°27, une souris représentée par groupe) ne retrouvait pas de différence en termes de lésion glomérulaire entre les 4 groupes (notamment pas de lésion de MAT glomérulaire ou artériolaire, pas de turgescence endothéliale ou de microthrombi). En revanche, on notait de la nécrose tubulaire aiguë (NTA) de façon plus fréquente parmi les souris injectées à la PHZ, sans différence entre les groupes WT et RAGE^{-/-} (flèches rouges) (Figure n°27 et Tableau n°11).

Figure n°27 : Etude anatomopathologique de l'atteinte rénale et des lésions de nécrose tubulaire aiguë



Coloration en Trichrome de Masson. Les lésions de NTA sont indiquées par des flèches rouges **Haut** : i) Souris RAGE^{+/+}, injectée avec du PBS : pas de lésion visible. ii) Souris RAGE^{-/-}, injectée avec du PBS : discrètes lésions de NTA. **Bas** : i) Souris RAGE^{+/+}, injectée avec de la PHZ : quelques lésions de NTA. ii) Souris RAGE^{-/-}, injectée avec de la PHZ, quelques lésions de NTA.

Tableau n°11: Etude des lésions de NTA dans les 4 groupes de souris

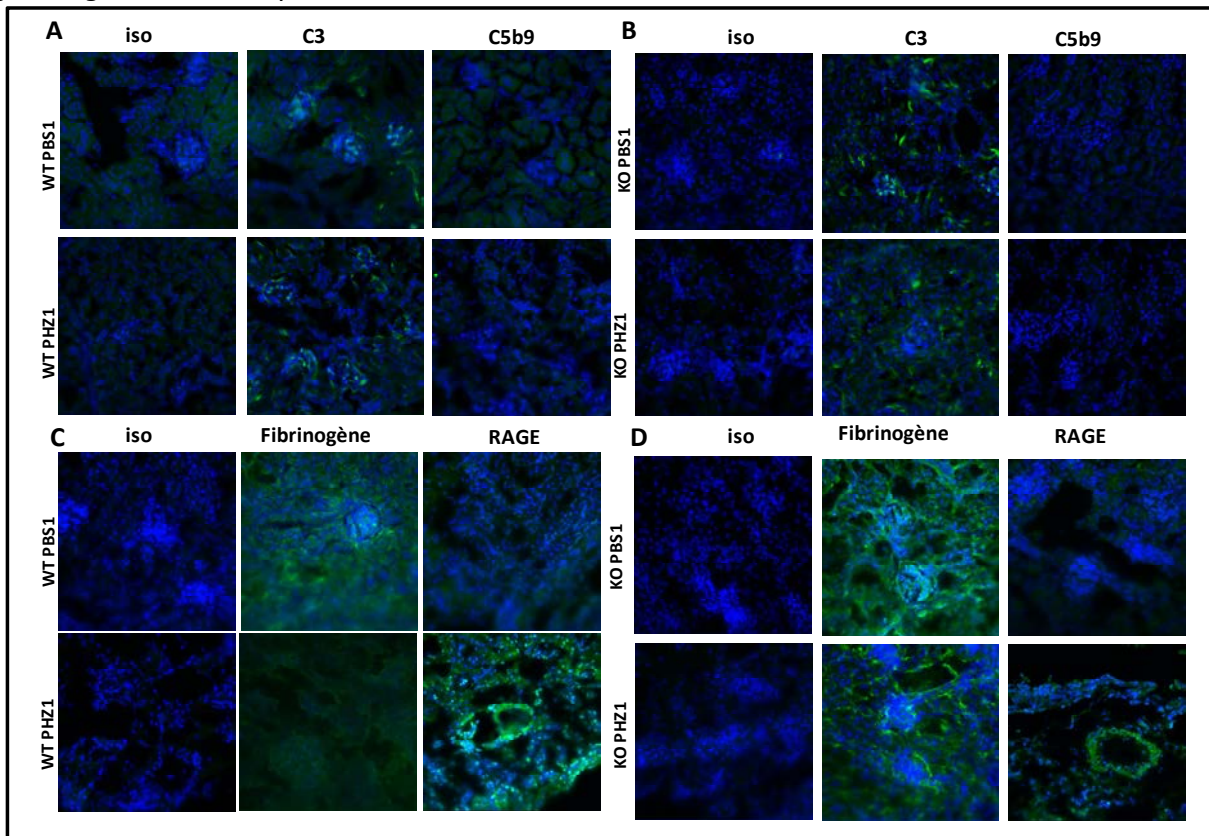
Souris		NTA+	NTA-
WT	PBS	0	3
	PHZ	1	2
RAGE KO	PBS	1 (focale)	2
	PHZ	2	1

Immunofluorescence

L'analyse du dépôt de C3b sur les reins des souris était hétérogène, et est illustrée par la Figure n°28 (une souris représentée par groupe) :

- groupe WT PBS : 2 souris parmi 3 présentaient de légers dépôts de C3b au niveau glomérulaire (contrôle isotype négatif),
- groupe KO PBS : les 3 souris présentaient du dépôt de C3b au niveau glomérulaire,
- groupe WT PHZ : les 3 souris présentaient également du dépôt de C3b au niveau glomérulaire, dont une présentait un dépôt particulièrement intense,
- groupe KO PHZ : le dépôt de C3 était présent de façon légère au niveau glomérulaire sur 2 souris, et une souris ne présentait pas de dépôt de C3.

Figure n°28 : Etude en IF des dépôts de fragments d'activation du complément et du fibrinogène, et de l'expression de RAGE au niveau rénal



Etude des fragments d'activation du complément : (A) souris RAGE^{+/+}, PBS et PHZ (B) souris RAGE^{-/-}, PBS et PHZ. Marquages noyau en bleu (DAPI) i) isotype ii) C3b/iC3B (vert) iii) C5b-9. Etude du dépôt de fibrinogène et de l'expression de RAGE : (C) souris RAGE^{+/+}, PBS et PHZ (D) souris RAGE^{-/-}, PBS et PHZ. Marquages noyau en bleu (DAPI) i) isotype ii) Fibrinogène (vert) iii) RAGE. Une souris représentative par groupe de 3.

L'analyse du dépôt de C5b9 demeurerait négative sur toutes les lames rénales (Figure n°28).

L'analyse du dépôt de fibrinogène, pouvant signer la présence de microthrombi, revenait fortement positive sur les souris PBS et sur 3 souris PHZ (2 KO, 1 WT) (cf. Figure n°28). L'étude des tissus semblait toutefois difficile du fait d'une conservation longue avant utilisation en IF.

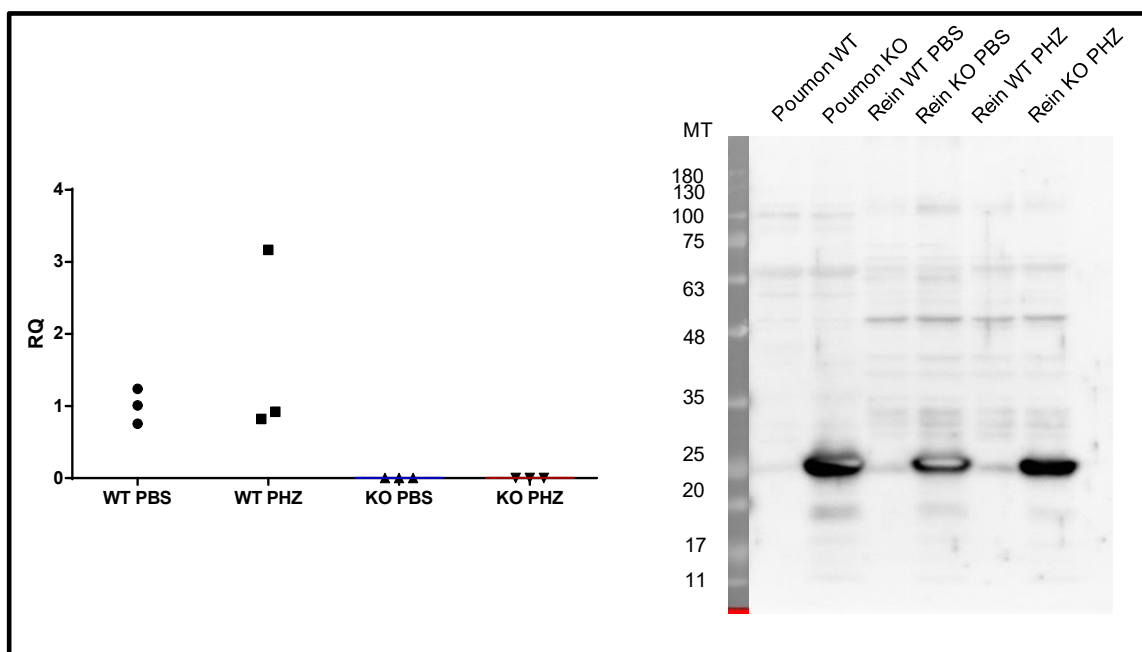
Etude de l'expression de RAGE en IF

- groupe WT PBS : un faible marquage était observé sur les 3 souris,
- groupe KO PBS : aucun marquage n'était retrouvé,
- groupe WT PHZ 2 : le marquage était très intense sur la souris une souris WT PHZ (souris qui présentait le plus fort dépôt de C3b) et faible chez les deux autres souris du groupe,
- groupe KO PHZ : de façon étonnante, alors que deux souris étaient bien négatives, une souris présentait un marquage franchement positif au niveau vasculaire (cf. Figure n°28).

Validité du KO

Devant ce résultat, nous avons testé la validité du KO de RAGE par PCR (Figure n°29), et confirmé l'absence d'amplification du gène RAGE dans les 6 souris KO.

Figure n°29 : Etude de validité de l'invalidation de RAGE

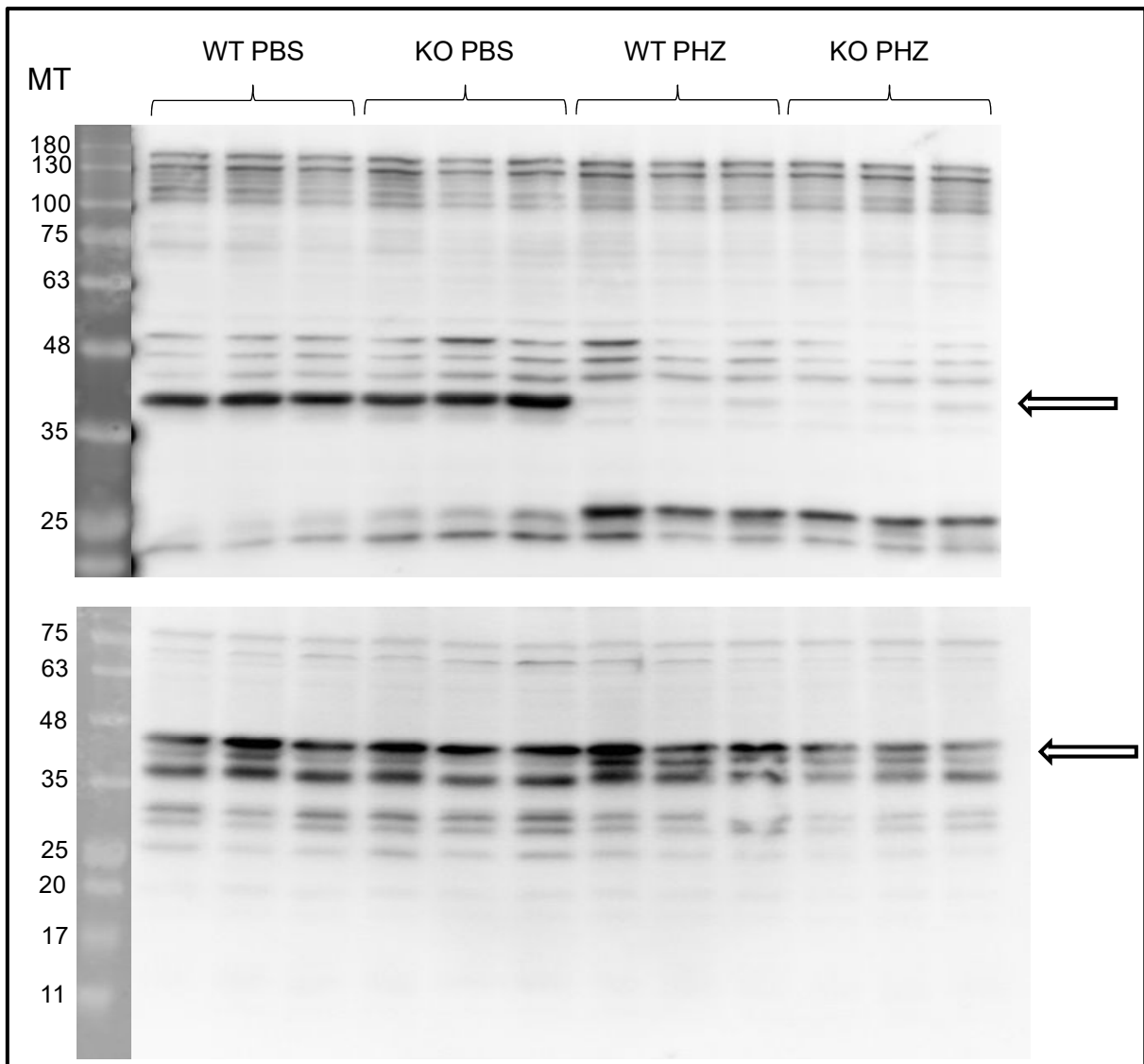


A gauche : qPCR de RAGE sur lysats de reins, groupe de souris indiqué en abscisse. **A droite** : Western blot anti GFP (poids moléculaire attendu de 27kDa), sur poumon et rein des différentes souris

Nous avons également réalisé un WB de la GFP (Green Fluorescent Protein), utilisée dans le KO de RAGE. L'expression de la GFP était bien retrouvée sur les reins et poumons de souris KO (cf. Figure n°29).

Cette observation nous a conduit à tester plusieurs anticorps anti RAGE en WB (Figure n°30), en comparant des reins de souris RAGE^{-/-} versus WT, ainsi que des poumons de souris WT et RAGE^{-/-} (organe exprimant le plus fortement RAGE).

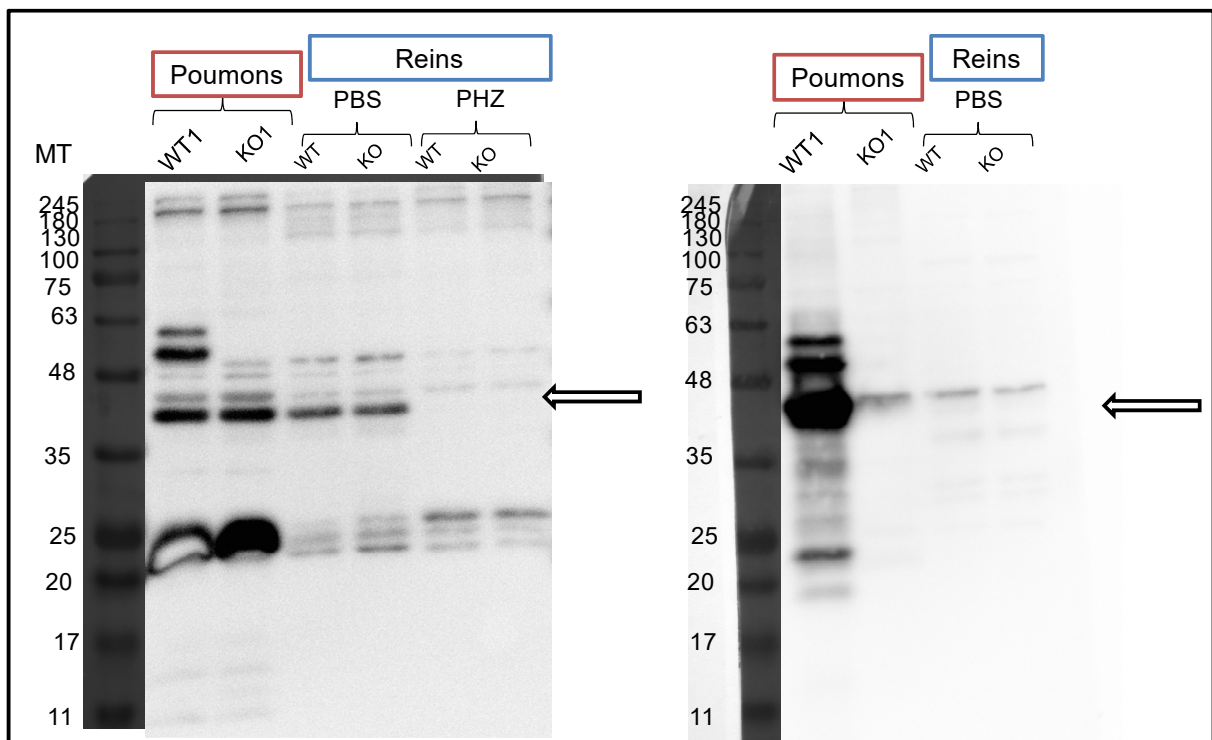
Figure n°30 : Etude de RAGE sur reins de souris



Haut : WB de RAGE - anticorps Abcam ab3611 (utilisé en IF, Figure n°28 D) : on observe à la taille attendue de 45kDA (flèche) une bande chez les 6 souris WT, non présente chez les souris RAGE^{-/-}. En revanche, on observe de la « non spécificité » avec de multiples bandes noires chez les 12 souris. **Bas** : WB de RAGE - anticorps Abcam ab65965. A nouveau, on retrouve une absence de spécificité de l'anticorps avec de multiples bandes non attendues.

Finalement, nous avons utilisé le poumon comme organe contrôle positif avec ces mêmes anticorps : avec le premier (Abcam ab3611), nous avons conclu à une absence de spécificité de l'anticorps devant des bandes aux alentours de 45kDa, à la fois sur le poumon WT et sur le poumon KO (Figure n°31, gauche). Le second anticorps (Abcam ab65965) était plus spécifique au niveau du poumon, avec une expression de RAGE à la bande 45kDa retrouvée sur les poumons WT, et non sur les poumons KO (Figure n°31, droite).

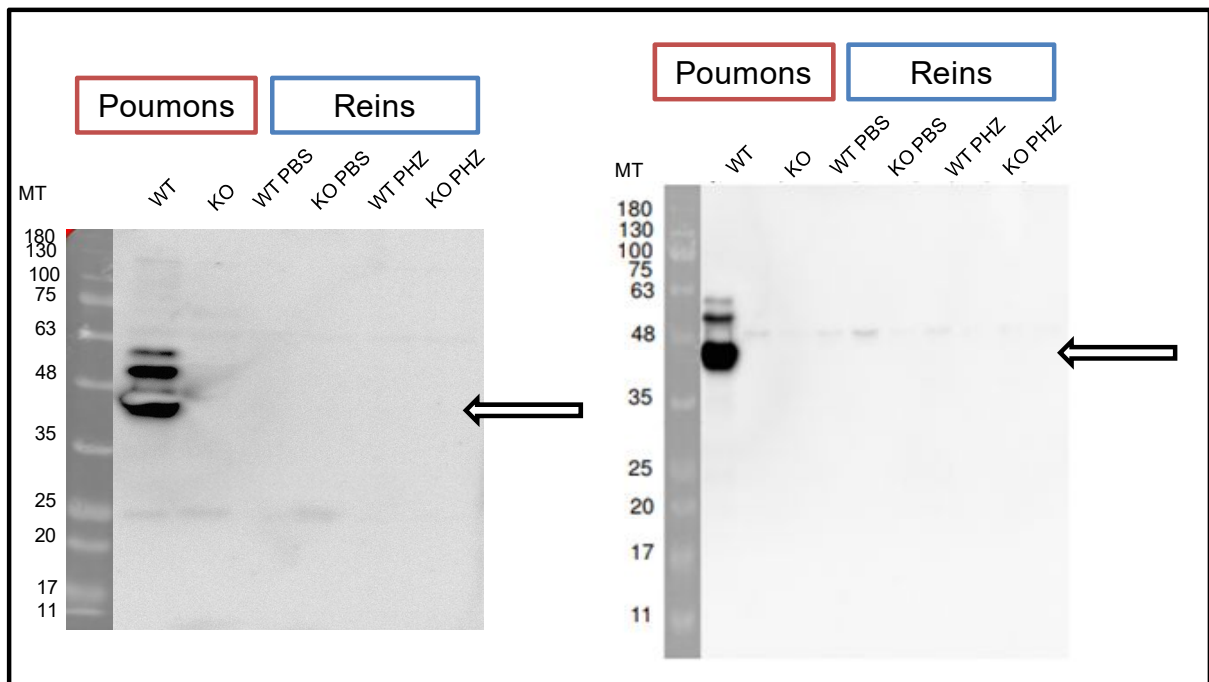
Figure n°31 : Etude de RAGE sur reins et poumons de souris



WB de RAGE, taille attendue de 45kDa (flèche). **Gauche** : anticorps Abcam ab3611 (utilisé en IF, Figure n°25 D, et en WB Figure 27 haut). **Droite** : anticorps Abcam ab65965 (utilisé en WB, Figure n° 27 Bas).

Enfin, l'utilisation de deux autres anticorps (Abcam 181293 et R&D AF1145) retrouvait un marquage spécifique de RAGE sur le poumon WT, négatif sur le poumon KO et négatif dans les reins de souris KO ou WT (Figure n°32).

Figure n°32 : Etude de RAGE sur reins et poumons de souris



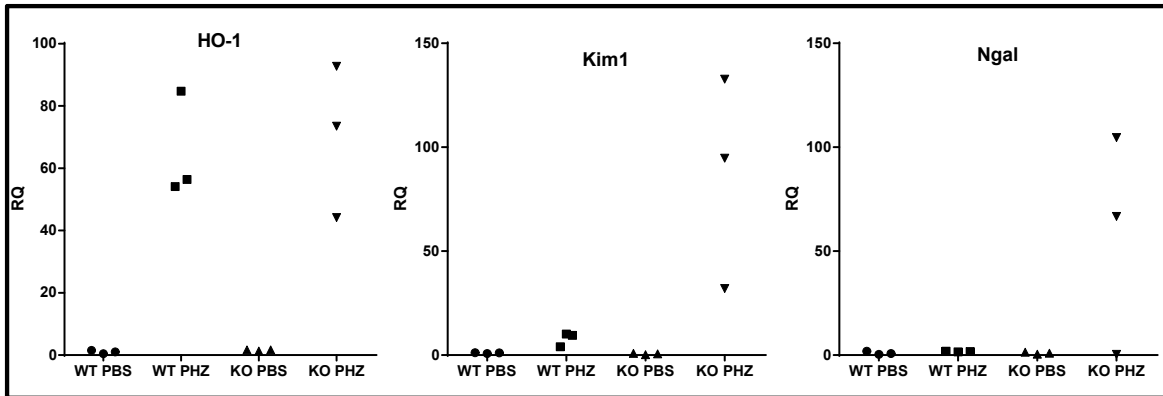
WB de RAGE, taille attendue de 45kDA (flèche). **Gauche** : anticorps Abcam ab181293. **Droite** : anticorps R&D AF1145.

Etude de la souffrance tubulaire

Afin d'identifier s'il existait une atteinte rénale plus importante chez les souris WT *versus* RAGE^{-/-} en conditions d'hémolyse, nous avons mesuré l'expression de marqueurs de souffrance tubulaire au niveau rénal, par RTqPCR sur les broyats d'organes.

- Dans un premier temps, une RTqPCR de HO-1 nous a permis de confirmer que les souris ayant reçu de la PHZ présentaient bien une hémolyse, HO-1 étant induite par l'hème au niveau tubulaire. L'expression de HO-1 était augmentée d'environ 70 fois chez les souris hémolytiques (Figure n°33).

Figure n°33 : Validité du modèle d'hémolyse et étude de l'atteinte tubulaire sur les reins murins, PBS versus PHZ

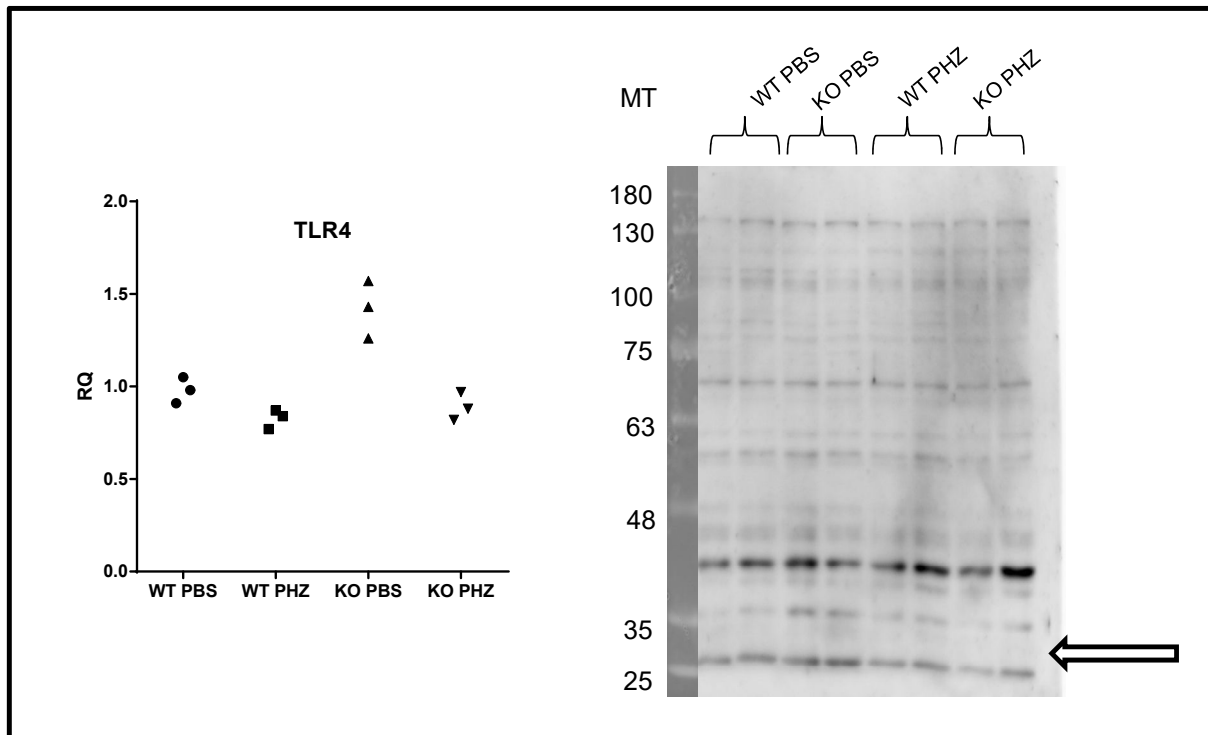


Représentations des RTqPCR sur lysats de reins, n=3 souris par groupe : i) HO-1 ii) Kim1 (Kidney injury molecule-1) iii) Ngal (neutrophil gelatinase-associated lipocalin). Les groupes de souris sont indiqués en abscisse, et les RQ en ordonnée.

- L'expression de Kim 1 était augmentée d'environ x10 chez les 3 souris WT PHZ, et x100 chez les 3 souris KO PHZ. L'expression de Ngal, parallèlement, était augmentée de x2 dans le groupe WT PHZ et x60 dans le groupe KO PHZ. Il existait donc augmentation des marqueurs de souffrance tubulaire plus importante dans le groupe KO *versus* WT, sous l'effet de l'hémolyse (cf. Figure n°33).

Pour comprendre ce mécanisme, nous avons émis l'hypothèse que les souris KO surexprimaient TLR4 au niveau rénal, ce qui aurait pu expliquer des lésions tubulaires plus fortes ou des dommages TLR4-médiés. Ainsi, nous avons mesuré l'expression de TLR4 par RTqPCR sur les lysats rénaux mais nous n'avons pas observé de différence entre les groupes KO et WT PHZ (cf. Figure n°34). Un WB TLR4 a été réalisé mais dont les résultats sont ininterprétables, à nouveau par probable manque de spécificité de l'anticorps (cf. Figure n°34).

Figure n°34 : Etude de l'expression de TLR4 sur les reins de souris



Etude de l'expression de TLR4 par : **Gauche** : RTqPCR sur lysats de reins, n=3 par groupe. **Droite** : WB, poids moléculaire attendu ~30KDa (flèche noire)

Conclusion

Ce projet avait pour but d'étudier les effets, principalement au niveau rénal, d'une hémolyse induite par la PHZ chez des souris $RAGE^{-/-}$. Nous nous sommes attachés à décrire l'atteinte histopathologique rénale, via l'étude de certains marqueurs de lésions tubulaires, et la mise au point d'une étude de l'activation du complément en immunofluorescence.

D'une part, nous n'avons pas observé de différence majeure histologique entre les souris WT et $RAGE^{-/-}$ sous l'effet de la PHZ. D'autre part, l'étude du complément en IF s'est révélée difficile d'interprétation, en raison de nos faibles effectifs. La mise en évidence de la présence de RAGE sur des vaisseaux de souris $RAGE^{-/-}$ en IF nous a poussé à préciser la spécificité des anticorps anti RAGE. Ainsi, nous avons donc mis en évidence que l'anticorps utilisé dans notre 1ère expérience d'IF n'était pas spécifique de RAGE. En revanche, l'anticorps monoclonal spécifique que nous avons pu valider secondairement dans le poumon ne retrouvait pas de bande au poids moléculaire correspondant à RAGE sur les lysats rénaux, signifiant une trop faible présence de RAGE pour être détectée. Cette absence de marquage protéique de RAGE au niveau rénal a déjà été rapportée dans la littérature⁴⁹⁷.

Une différence notable a été observée sur ce travail : en l'occurrence, la plus forte atteinte tubulaire des souris RAGE^{-/-} exposées à la PHZ, avec une augmentation forte de l'expression de Kim1 et Ngal. Notre hypothèse concernant une surexpression de TLR4 ne s'est pas vérifiée. Ces travaux doivent être poursuivis afin de comprendre ce mécanisme.

2.3 - Etude de l'expression de RAGE sur des biopsies de patients

Objectif

L'expression de RAGE étant retrouvée dans certaines pathologies rénales telles que le diabète, nous avons émis l'hypothèse que l'expression de RAGE pourrait être augmentée dans le rein en cas d'hémolyse.

Méthodes

A partir des patients présentés dans l'article 1 en période d'hémolyse (MAT et valve mécanique), nous avons réalisé en collaboration avec le laboratoire d'anatomopathologie (Dr Gibier) un marquage de RAGE sur ces biopsies rénales. Nous avons utilisé, afin de contrôler la positivité de l'anticorps, des biopsies de poumons (poumon sain et fibrose idiopathique). Le marquage primaire était réalisé avec anticorps anti RAGE R&D polyclonal IgG de chèvre (AF1145) à 5µg/ml, l'anticorps secondaire était un anticorps anti-chèvre couplé HRP.

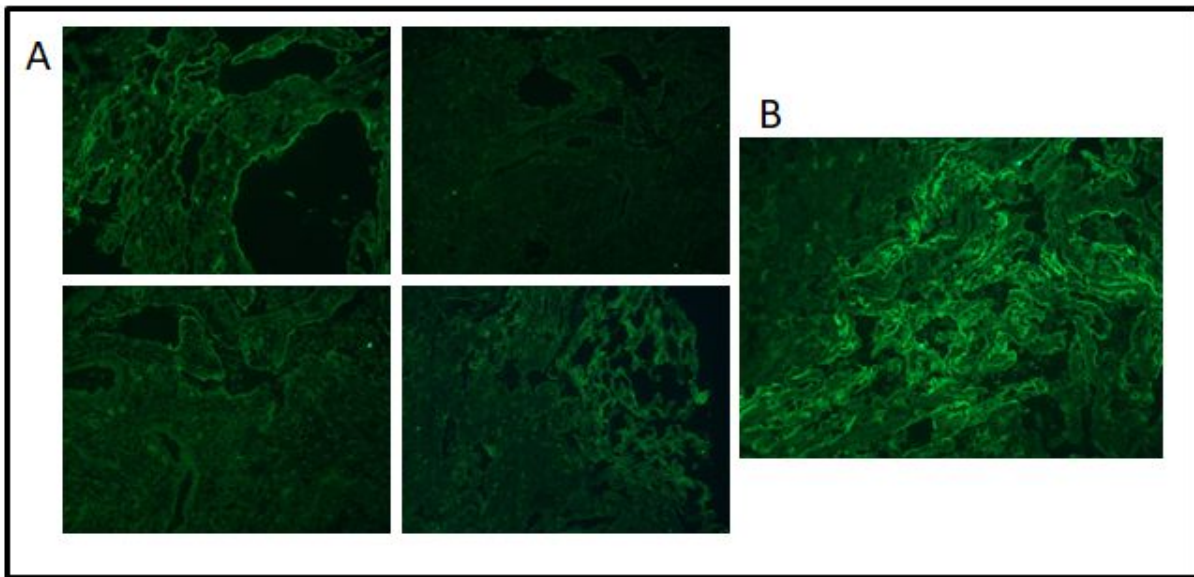
Résultats

Le marquage dans les biopsies pulmonaires de poumons sains restait non significatif (cf. Figure n°35 A). Il existait un discret marquage sur une biopsie de poumon de fibrose idiopathique, notamment au niveau des pneumocytes et des macrophages (cf. Figure n°35 B). Au niveau rénal, nous n'avons pas retrouvé de différence d'expression de RAGE entre les patients sains et hémolytiques : le RAGE demeurait non détectable. (cf. Figure n°36 et 37)

Conclusions

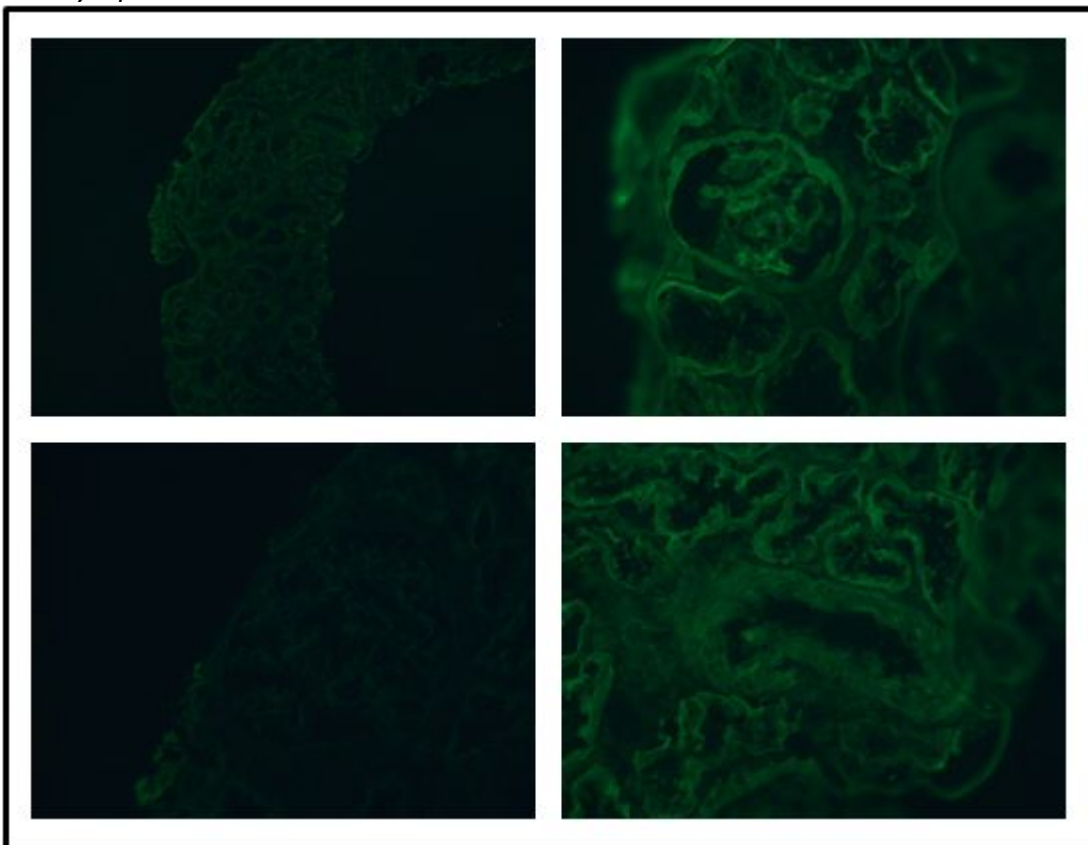
Nos résultats ne retrouvent pas de surexpression de RAGE au niveau rénal en cas d'hémolyse. Ces résultats sont à pondérer par la fiabilité de l'anticorps et le très faible nombre de patients testés. Bien que nous ayons testé et validé la spécificité de cet anticorps en Western Blot, le marquage reste non spécifique sur les poumons sains. Pourtant, la littérature rapporte un marquage positif sur les pneumocytes à l'état basal dans le poumon⁴⁹⁸.

Figure n°35 : Etude de l'expression de RAGE sur des biopsies pulmonaires



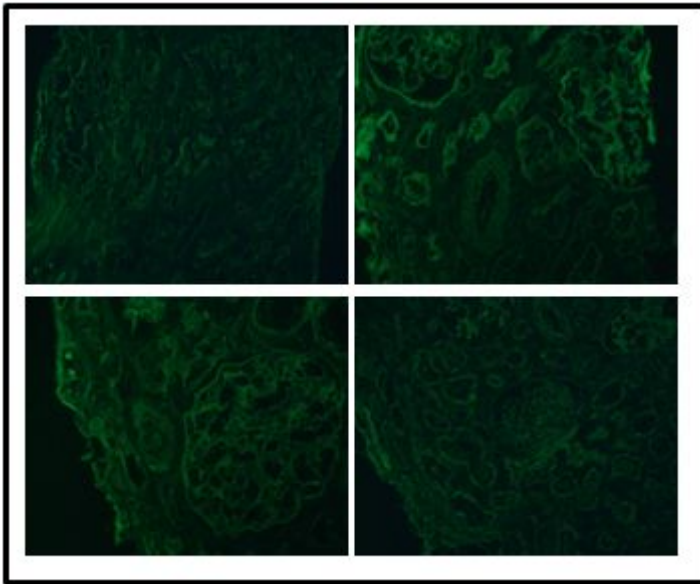
Marquage de RAGE en immunofluorescence (vert), sur tissus pulmonaires (A) : 4 patients contrôles négatifs (B) patient contrôle positif (fibrose pulmonaire idiopathique)

Figure n°36 : Etude de l'expression de RAGE sur des biopsies rénales de patients non hémolytiques



Marquage de RAGE en immunofluorescence (vert), sur biopsies rénales d'un patient sain. Gauche : faible grossissement. Droite : glomérule (haut) et structure vasculaire (bas)

Figure n°37 : Etude de l'expression de RAGE sur des biopsies rénales de patients hémolytiques



*Marquage de RAGE en immunofluorescence (vert), sur biopsies rénales de patients présentant : **(Haut)** une MAT, et **(Bas)** une valve mécanique.*

Ainsi, nos résultats indiquent l'absence de RAGE détectable en WB sur les lysats de reins des souris WT et sur des biopsies rénales de patients, aussi bien sur des contrôles négatifs que des patients hémolytiques. Il nous est apparu qu'il serait difficile de mettre en évidence une différence sur le rôle de RAGE dans l'hémolyse en partant de l'étude du rein, si ce récepteur n'y était exprimé de façon très faiblement détectable, aussi bien en WB qu'en RTqPCR. Nous avons donc choisi d'associer à nos recherches un organe exprimant fortement RAGE, le poumon. En effet, nos expériences y confirmaient une forte expression en WB et RTqPCR.

2.4 - Résumé et présentation de l'article n°2

Objectifs

L'hème libre, produit de l'hémolyse, a de fortes propriétés proinflammatoires. Son récepteur membranaire décrit est le TLR4, mais les interactions TLR4-hème ne suffisent pas à expliquer tous les effets proinflammatoires rattachés à l'hème. Le RAGE et le TLR4 partagent plusieurs ligands dont le LPS, HMGB1, le complexe S1001A8/A9 et le sérum β amyloïde. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que le RAGE pourrait être un récepteur de l'hème.

Méthodes

Etudes des interactions avec RAGE

Nous avons étudié les interactions RAGE-hème par plusieurs méthodes : la spectroscopie d'absorbance (collaboration avec le Dr Dimitrov), la chromatographie d'exclusion stérique (collaboration avec le Dr Yatime) ainsi qu'en SPR. Deux formes de RAGE ont été utilisées : une protéine d'origine commerciale (hRAGE-Fc, R&D Systems) ainsi qu'une protéine recombinante du domaine extracellulaire de RAGE, le VC1C2 (collaboration Dr Yatime), et les domaines purifiés VC1, V et C2. Nous avons utilisé comme contrôle la protéine IgG1 Fc (R&D Systems). La BSA glyquée avec de la CML était utilisée comme ligand contrôle du RAGE.

Modèle murin

Des souris C57BL/6 invalidées ou non pour RAGE ont été traitées par injection intrapéritonéale d'hème à J0, à la dose de 100 μ mol/kg, ou par PBS. A 24h, les souris étaient sacrifiées et différents organes étaient récupérés (reins, cœur, poumons, rate). L'expression de RAGE était étudiée en RTqPCR sur les quatre organes, ainsi que l'expression de marqueurs de l'inflammation au niveau pulmonaire (TNF α , IL1 β , IL6, facteur tissulaire), organe exprimant le plus fortement RAGE.

Modèle cellulaire

Deux types de CE ont été étudiés : les HUVEC (Human Umbilical Venous Endothelial Cells), culture primaire de CE de veines de cordon ombilical (CHRU de Lille) et les HMEC (Human Microvascular Endothelial Cells), lignée immortalisée de CE microvasculaires de peau. Les cellules étaient incubées pendant une nuit (~16h) avec de l'hème à différentes concentrations croissantes (0 à 50 μ M), dans un milieu dépourvu de sérum (milieu OPTI®) afin de ne pas inhiber les effets de l'hème. L'expression de RAGE était étudiée en WB et RTqPCR.

Résultats

Dans un premier temps, nous avons étudié l'interaction hème-RAGE en spectrométrie d'absorbance et retrouvé des arguments pour l'existence d'une liaison. Ces résultats étaient corroborés par une chromatographie d'exclusion stérique réalisée par le Dr Yatime.

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à une étude d'interaction en SPR, qui confirmait la liaison hème-hRAGE Fc avec une affinité de l'ordre du micromolaire, alors que l'hème ne liait pas la protéine contrôle IgG1- Fc. L'utilisation de domaines purifiés de RAGE (VC1C2, VC1, V et C2) nous a permis de mettre en évidence que le site de liaison de l'hème se situait sur le V, celui-ci liant tous les fragments de RAGE à l'exception du C2.

Afin de caractériser plus en détail cette liaison, l'utilisation de différentes protoporphyrines (Zinc(II)PP, Manganèse(III)PP, Cobalt(III)PP, Magnésium(II)PP) et des molécules contenant du Fer (Fer(III)phtalocyanine, ferroïne) nous a permis de mettre en évidence que le RAGE semblait interagir avec les molécules contenant du Fer et d'autres métaux de transition.

In vitro, sur des cultures cellulaires d'HUVEC et HMEC, nous avons observé une augmentation de l'expression de RAGE dose dépendante à l'hème incubé pendant 16h, en cytométrie en flux et RTqPCR. *In vivo*, chez des souris C57BL6 WT, l'injection d'hème induisait une augmentation de l'expression de RAGE, mesurée en RTqPCR, sur les reins, le cœur et la rate. En revanche, sur les poumons, organes exprimant le plus fortement RAGE, nous ne retrouvions pas cette augmentation.

Via l'inactivation de RAGE sur ces souris, nous avons étudié les effets de l'hème sur l'inflammation médiée par RAGE. Nous avons observé que les souris invalidées pour RAGE présentaient une baisse d'expression significative de molécules de l'inflammation au niveau pulmonaire (TNF α , IL1 β et Facteur tissulaire) sous l'effet de l'hème.

Conclusions

Ainsi, cette étude montre pour la première fois que l'hème libre serait un ligand de RAGE, dont le site de liaison se situerait sur le domaine V. Affine et spécifique, cette liaison aurait pour conséquences d'activer certaines voies de l'inflammation, menant à un phénotype pro-inflammatoire comme le démontrent la baisse de l'expression du $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ et Facteur tissulaire en cas d'invalidation de RAGE, sous l'effet de l'hème.

2.5 - Données complémentaires : études des voies Akt et ERK

Objectifs

Au vu de nos résultats obtenus concernant les conséquences phénotypiques de la liaison hème-RAGE, nous avons souhaité étudier les voies communes à l'hème et au RAGE, dont la phosphorylation de ERK1/2 et Akt.

Méthodes

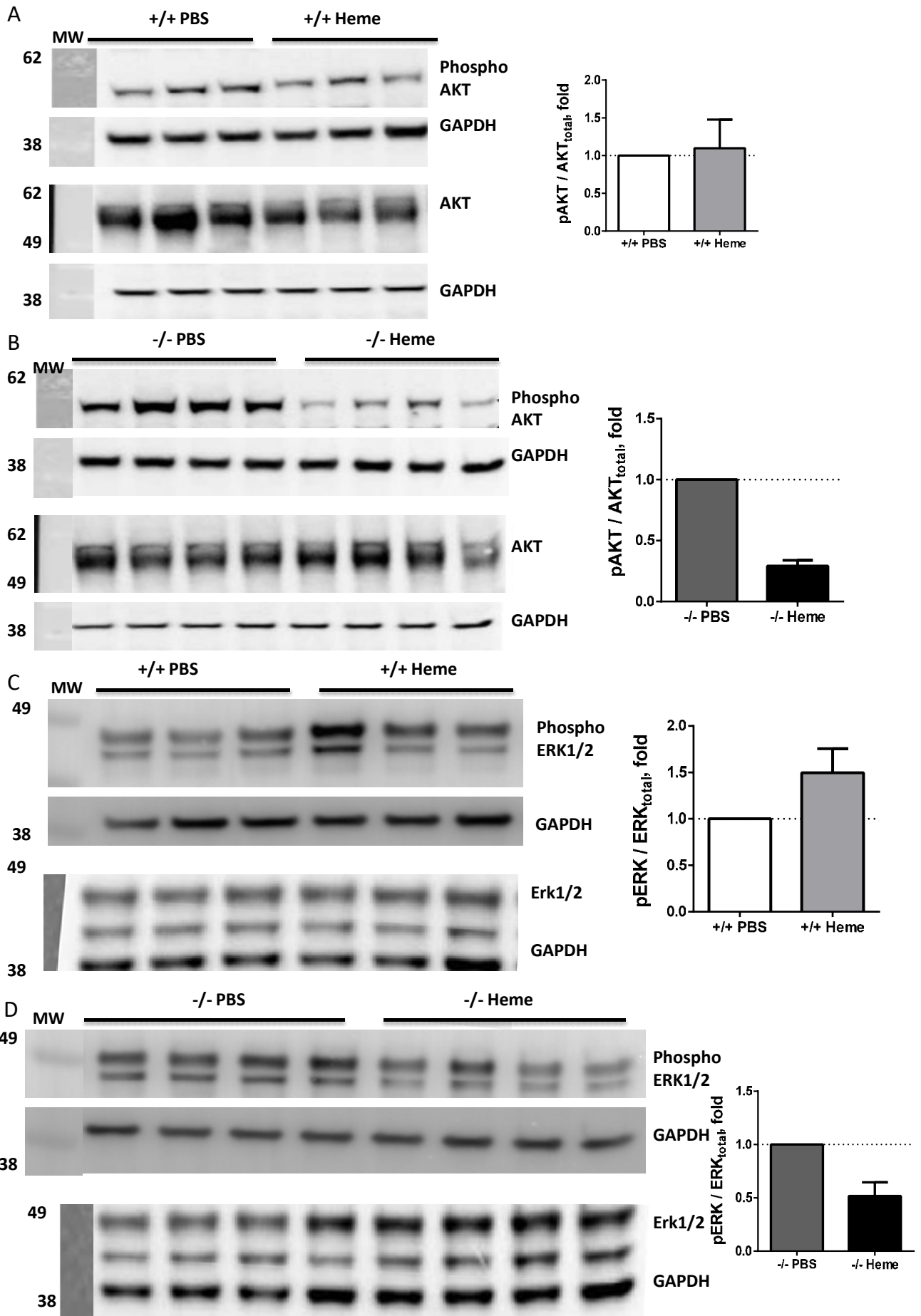
Etude en Western Blot : Les poumons des souris WT et RAGE^{-/-} traitées à l'hème ou au PBS (souris identiques à celles utilisées dans l'article n°2) ont été récupérés et lysés en tampon RIPA (RadiolImmunoPrecipitation Assay). 25µg par échantillon étaient déposés sur des gels acrylamide précoulés (Bolt™ 4-12%, Bis-Tris Plus Gels, 15 puits, Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific). Après un transfert de 7 minutes (Trans-Blot Turbo, membrane PVDF), les membranes étaient saturées en BSA5% pendant une heure à température ambiante. Secondairement, les anticorps primaires étaient incubés toute la nuit à 4°C : anti-ERK1/2 Cell Signaling 4695S (dilution 1/1000), anti-phosphoERK1/2 Cell Signaling 4376S (dilution 1/1000), anti-Akt R&D MAB2055 (dilution 1/2500) et anti-phosphoAkt R&D AF887 (dilution 1/500). L'anticorps dirigé contre la GAPDH (Santa Cruz sc32233, 1/500) était incubé durant 1h30 à température ambiante le lendemain. Après lavage, les anticorps secondaires étaient incubés 1h30 à température ambiante, respectivement : anti-Rabbit Cell Signaling HRP 7074S (dilution 1/5000) pour ERK, phosphoERK et phosphoAkt, et un anti-Mouse HRP Cell Signaling 7076 (dilution 1/5000) pour Akt and GAPDH. Les WB étaient révélés par chimiluminescence (ECL BioRad Clarity).

Résultats

Après injection d'hème sur les souris WT, nous avons observé une augmentation modérée de la phosphorylation de ERK1/2 au niveau pulmonaire (Figure A). Le ratio phosphoERK/ERK_{total} chez les souris WT traitées à l'hème était ~1,1fois plus élevé que chez les souris WT PBS. La phosphorylation de ERK1/2 diminuait fortement chez les souris RAGE^{-/-} après exposition à l'hème : le ratio phosphoERK/ERK_{total} était ~0,14 fois plus bas que ce ratio chez les souris RAGE^{-/-} PBS (Figure B). Concernant la voie Akt, chez les souris WT traitées à l'hème, on observait une augmentation de 1.5 fois le ratio phosphoAkt/Akt_{total} par rapport aux souris WT PBS (Figure C). Chez les souris RAGE^{-/-} mice, ce ratio de phosphorylation était de 0.5 par rapport aux souris RAGE^{-/-} PBS (Figure D).

Conclusion

Nos données sur l'étude des voies de signalisation communes entre RAGE et l'hème retrouvent, sur les souris RAGE^{-/-}, une baisse de la phosphorylation de ERK1/2 et Akt sous l'effet de l'hème. Ces résultats, à confirmer notamment par une répétition de l'expérience, pourraient expliquer les mécanismes de l'effet protecteur de l'inactivation de RAGE décrits dans l'article n°2 au niveau pulmonaire. En effet, on notait une plus faible augmentation de l'expression de certaines molécules de l'inflammation (TNF α , IL1 β et le facteur tissulaire) sous l'effet de l'hème chez les souris RAGE^{-/-}, dont une hypothèse serait une moindre phosphorylation des voies de l'inflammation, Akt et ERK1/2.



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif initial de l'ensemble de ces travaux était d'identifier certains facteurs pouvant mener à une susceptibilité endothéliale glomérulaire dans le SHUa. Nos travaux ont confirmé le rôle clef du complément et de l'hémolyse et ont ouvert des perspectives via la découverte d'un nouveau récepteur à l'hème, le RAGE.

En premier lieu, il est apparu en conditions hémolytiques que la CE glomérulaire était plus susceptible à l'activation du complément à sa surface en comparaison à des cellules macrovasculaires (HUVEC) ou microvasculaires issues du derme. En effet, l'activation du complément, mesurée par les dépôts de fragments de clivage du C3, était plus intense sous l'effet d'une exposition prolongée à l'hème sur les CE glomérulaires. *In vivo*, sur un modèle murin, le dépôt de C3b glomérulaire était également particulièrement intense par rapport aux autres organes. La quantification des dépôts de C3b nous semblait être un marquage pertinent, reflet de l'activation du complément à la surface des cellules. Ces dépôts constituent le témoin d'une activation du complément en raison d'une liaison covalente à la membrane cellulaire du C3b après clivage de la molécule C3 par les C3 convertases. En effet, l'anticorps ne reconnaît pas les molécules de C3 non clivées, liées à la membrane ou produites localement, mais reconnaît en revanche iC3b et C3c, reflet d'une activation récente du complément sur des modèles murins⁶¹. L'étude du dépôt de C5b-9 sur les CE et les tissus murins était peu contributive, rarement positive, même en cas de positivité forte du dépôt de C3b. Une hypothèse plausible serait la nécessité de C3 convertases en plus grande quantité pour pouvoir mener à la formation de C5 convertases, puis au C5b-9, comme lors d'expériences utilisant un complément dérégulé via le sérum de patients⁴. Nos travaux montrent des biopsies de patients hémolytiques avec la présence de dépôt de C3b sur les tissus rénaux. On peut s'interroger sur la spécificité de ce marquage. Pour certains auteurs, ces dépôts seraient aspécifiques^{499,500}. Cependant, nous pensons que ces dépôts pourraient refléter l'activation du complément due à l'hémolyse et au complément dérégulé, cette dernière condition expliquant pourquoi les dépôts de C3b seraient plus importants chez les patients atteints de SHUa que dans les cas d'hémolyse mécanique isolée (valve cardiaque mécanique).

L'expression des régulateurs MCP et DAF diminuait sous l'effet de l'hème, de façon similaire entre les types cellulaires, n'expliquant pas la susceptibilité des CE glomérulaires à l'hème. En revanche, on observait une moindre liaison du FH sur les CE glomérulaires, principal régulateur de la C3 convertase et dont une anomalie est présente chez plus de 40% des cas de SHUa². Pour isoler l'importance du rôle du FH sur le dépôt de C3 indépendamment des autres régulateurs de la C3 convertase, nous pourrions réaliser un blocage du FH sur les HUVEC (au moyen d'un anticorps anti FH). Par ailleurs, cette faible liaison du FH sur les CE glomérulaires nécessite d'être confirmée *in vivo*, par exemple au moyen d'une comparaison histologique (par un marquage anti-FH) de différents endothéliums murins. Les mécanismes sous-jacents à cette plus faible liaison du FH sur les CE glomérulaires, si elle était confirmée *in vivo*, nécessiteraient des explorations complémentaires. Une hypothèse pouvant expliquer cette liaison plus faible serait la spécificité du glycocalyx de l'endothélium glomérulaire. Nous pourrions, à l'aide un traitement dirigé contre les GAG sur les HUVEC (telle une héparanase) reproduire les expériences d'exposition à l'hème et mesurer le dépôt de C3b. D'autre part, l'étude en histologie sur les tissus murins et les biopsies de patients serait également intéressante afin de préciser l'hétérogénéité de la liaison du FH aux différents endothéliums *in vivo*. Des résultats préliminaires de notre laboratoire (J. Léon) mettent en évidence que l'hémolyse, dans un modèle murin, induisait une augmentation de l'expression du FH au niveau hépatique. L'utilisation d'une lignée de souris déficientes pour le FH au niveau hépatique, décrite par Vernon *et al.*⁵⁰¹, pourrait nous permettre de faire la part des choses entre l'origine locale (production hépatique) et systémique du FH quant à cette surexpression du FH au niveau hépatique.

Deuxièmement, nous avons identifié la TM comme acteur de ce tropisme rénal. Sur les HUVEC, ainsi que dans certains organes murins (peau, foie), nos résultats retrouvaient une augmentation de l'expression de la TM sous l'effet de l'hème, en accord avec la littérature^{502,503}. Le rôle de la TM dans les MAT et le SHUa est mis avant depuis plusieurs années par différentes équipes : identifié comme régulateur du complément depuis une dizaine d'années²⁴, nous avons ici confirmé son rôle dans l'accélération de la dégradation du C3b par le FI en présence de FH. Des mutations de la TM ont été identifiées chez certains

patients porteurs de SHUa²⁴, qui demeurent pour certains auteurs des variants rares et dont la causalité reste à établir^{26,504}. Sur l'endothélium glomérulaire, nous observions une moindre augmentation de son expression sous l'effet de l'hème, *in vitro* et *in vivo*. Dans l'étude de Sartain *et al.*, l'expression de la TM sur les HRGEC diminuait également après exposition à une autre molécule inflammatoire, la cytokine TNF α ¹⁶⁷. Afin de démontrer un lien entre faible expression de la TM sur les CE glomérulaires et élévation du dépôt de C3b, nous pourrions réitérer les expériences d'exposition à l'hème sur des CE dont l'expression de la TM serait inhibée (modèle cellulaire de siRNA), ou au moyen d'une invalidation de la TM chez des souris exposées à l'hème. La concordance de nos résultats sur la TM souligne son rôle comme acteur à part entière dans le SHUa et la régulation du complément, rappelant que la sTM soluble a été testée comme agent thérapeutique avec des résultats positifs, dans le SHU typique au Japon⁵⁰⁵⁻⁵⁰⁷, sans étude randomisée à effectif suffisant à l'heure actuelle.

Une élévation des taux de sTM, traduisant une baisse d'expression endothéliale due à son clivage, constitue le témoin d'une atteinte endothéliale⁵⁰⁸. *In vivo*, des souris avec une TM tronquée présentaient des dépôts glomérulaires de C3b sans traitement préalable, ainsi qu'un risque accru de SHU typique. Dans cette même étude sur le SHU typique, les auteurs rapportaient une perte d'expression de la TM *in vitro* (sur des HMEC) et *in vivo*, dépendant de C3a⁵⁰⁹. Une hypothèse envisageable pour intégrer nos résultats à la littérature serait qu'en cas de stimuli proinflammatoires (tels qu'un sepsis, modélisé par les cytokines), l'endothélium serait activé et la TM diminuée. Ceci favoriserait l'activation du complément, par le rôle régulateur du complément de la TM, et donc les microthromboses. L'hémolyse, secondaire à ces thrombi, engendrerait la libération d'hème qui permettrait sur certains endothéliums une ré-augmentation de la TM et une protection contre le complément. Ces mécanismes pourraient ne pas avoir lieu sur l'endothélium glomérulaire, du fait d'une moindre traduction des facteurs de transcription de la TM sous l'effet de l'hème, KLF2 et KLF4. Afin de valider cette hypothèse, nous pourrions poursuivre les expériences en exposant les différentes CE à des cytokines, réaliser une incubation avec l'hème puis mesurer l'activation du complément à la surface cellulaire.

Le troisième facteur mis en lumière par nos travaux sur l'étude de la résistance au complément était l'HO-1, première enzyme de protection envers l'hème²⁰². Nous avons mis

en évidence une forte expression d'HO-1 par les HUVEC après exposition prolongée à l'hème, qui était plus faible sur les CE microvasculaires et notamment les CE glomérulaires. Cette faible expression endothéliale glomérulaire était retrouvée également *in vivo*, avec un faible marquage endothélial glomérulaire sous l'effet de l'hème, en comparaison aux endothéliums hépatiques, cardiaques, cutanés ou pulmonaires. La faible expression de HO-1 au niveau endothélial glomérulaire a été récemment décrite dans des travaux de notre équipe⁷⁴, mais sans comparaison inter-organes. Notre résultat *in vitro* s'ajoute aux différences qui opposent les endothéliums macro et micro vasculaires. Citons en exemple le récepteur de protéine C, majoritairement exprimé par les gros vaisseaux, à l'inverse du TFPI, plutôt exprimé par le système microvasculaire⁵¹⁰. Pour poursuivre les explorations de ces différences entre types de CE, nous souhaitons réaliser une analyse transcriptomique des CE +/- exposées à l'hème afin de mieux appréhender ces différences.

Après mise au point d'un nouveau modèle de re-stimulation des CE par l'hème, nous avons montré sur des HUVEC qu'il existait une baisse du dépôt de C3b sur les cellules pré-exposées à l'hème, comparativement aux cellules non traitées, suggérant un effet protecteur via l'expression de HO-1. Cet effet n'était pas retrouvé sur les CE microvasculaires. Il a été démontré dans la littérature que HO-1 prévient de l'activation du complément : la stimulation de HO-1 induisait une augmentation de l'expression de DAF sur les HUVEC¹⁰⁸. Ces résultats ont été confirmés sur un modèle de souris invalidées pour HO-1, qui présentait une diminution de l'expression de DAF et une augmentation du niveau d'activation du complément¹⁰⁸. Il a également été démontré dans un modèle murin que HO-1 augmentait l'expression de la TM à la surface des CE pulmonaires, avec un effet protecteur sur le sepsis⁵⁰³, ce qui concorde avec nos résultats. Nous n'avons pas réussi, à l'heure actuelle, à observer l'augmentation de DAF corrélée à l'induction de HO-1, suggérant la possibilité d'autres mécanismes liant HO-1 et la complément-protection. L'ensemble de ces résultats suggère que l'endothélium glomérulaire serait mal protégé contre l'hémolyse, alors que les autres organes pourraient, par une capacité à induire HO-1, se protéger de l'hème et de la cascade d'activation du complément qu'elle engendre. Afin de préciser le rôle de HO-1 dans le défaut de complément-protection et démontrer notre hypothèse, nous pourrions réaliser un blocage de HO-1, par siRNA sur les HUVEC, ou au contraire induire une surexpression de HO-1 dans les CE microvasculaires et reconduire nos expériences de rechallenge avec

l'hème. Nous avons essayé de mettre au point le siRNA de HO-1, sans succès car le silencing était insuffisant et ne diminuait que de 50-60% l'expression de HO-1 sur les HUVEC. De même, HO-1 étant up-régulée par le CoPPIX, tandis que son activité est bloquée par SnMPIX et ZnPPIX¹⁰⁸, nous pourrions avoir recours à ces trois molécules pour induire ou bloquer HO1, respectivement sur les CE glomérulaires et les HUVEC, et mesurer l'activation du complément dans l'expérience de rechallenge. D'autres expériences mécanistiques pourraient être proposées : l'utilisation directe des produits dérivés de HO-1 et du catabolisme de l'hème (tels que les CO-related molécules ou la bilirubine) dans notre expérience de "rechallenge" cellulaire, en lieu et place de la préincubation à l'hème. Nous pourrions également induire HO-1 par certaines molécules non liées à l'hémolyse, à l'instar des statines⁵¹¹ ou du curcuma⁵¹². *In vivo*, nous pourrions nous tourner vers l'acquisition d'une lignée murine invalidée pour HO-1.

Devant nos résultats suggérant un rôle de HO-1 dans la complément-protection, nous avons mené une étude sur les polymorphismes de HO-1 en comparant les patients de la cohorte française à des contrôles sains. Il n'a pas été mis en évidence de différence entre les deux groupes. Le rôle des polymorphismes du promoteur du gène de HO-1 a été largement démontré en pathologie humaine, depuis leur première description par Kimpara *et al.* en 1997⁵¹³. Il a été montré qu'un polymorphisme microsatellite du promoteur du gène de HO-1 (répétition de paires de bases (GT)_n) était capable de moduler la transcription du gène en réponse au stress oxydant⁵¹⁴. Un promoteur long serait associé à une moindre expression de la protéine HO-1. Deux études portant sur 101 et 384 patients retrouvent que le génotype de courte répétition de (GT)_n serait associé à une meilleure survie rénale après transplantation^{515,516}. D'autres mécanismes protecteurs de l'hème semblent jouer un rôle important sur le plan rénal. Les souris hémopexine KO présentent une insuffisance rénale en cas d'hémolyse⁵¹⁷. Un polymorphisme de l'haptoglobine est décrit dans les maladies rénales chroniques⁵¹⁸. Dans le SHUa, l'étude génétique des molécules protectrices de l'hème n'a pas encore été réalisée mais nous avons suggéré qu'elles pourraient jouer un rôle important dans la physiopathologie de cette maladie. Devant l'hétérogénéité de la réponse endothéliale à certains stimuli inflammatoires tels que l'hème ou les cytokines, une hypothèse de travail serait d'étudier les polymorphismes de l'HO-1 des différents donneurs de CE primaires.

Les différents types de cultures cellulaires utilisés constitue une autre limite à souligner dans ce travail est. Nous avons choisi l'utilisation des HUVEC, celles-ci étant considérées comme la culture cellulaire de référence dans la littérature, notamment pour leur facilité d'isolement et leur résistance en culture. Néanmoins, le cordon ombilical, dont proviennent ces cellules, n'est pas un organe témoin dans le SHUa. L'utilisation de culture primaire de CE cérébrales, cardiaques ou pulmonaires aurait pu avoir une meilleure justification clinique. Nous avons mis en culture des CE d'autres organes, notamment d'endothéliums microvasculaires cérébraux et cardiaques, mais nous n'avons pas réussi à les cultiver suffisamment longtemps pour les développer et les utiliser pour nos expériences. L'étude de nombreux organes dans notre article a tenté de pallier ce manque de diversité et de relevance clinique des CE utilisées. D'autre part, afin de poursuivre ce travail sur les comparaisons endothéliales, nous souhaitons étudier, dans notre modèle cellulaire, l'exposition à du sérum humain normal versus celui de patients atteints de SHUa, pour caractériser les lésions du complément sur les CE dans un modèle *in vitro* de la maladie.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons tourné nos recherches vers le récepteur RAGE, en émettant l'hypothèse d'un rôle dans le SHUa. En effet, RAGE est décrit comme un récepteur de 3 molécules impliquées dans la cascade du complément : l'anaphylatoxine C3a et sa forme inactivée le C3a desarginé, et le C1q^{6,394}. Nous avons essayé de reproduire les expériences décrites par Ruan *et al.*, et la liaison du C3a au RAGE en SPR. Malgré l'utilisation de plusieurs conditions expérimentales (différents tampons de courses avec modulation des concentrations en HEPES, NaCl, Tween, +/-MgCl₂, +/-EDTA), nous ne sommes pas parvenus à reproduire cette liaison. Dans les travaux de Ruan *et al.*, cette liaison était rapportée de façon directe en ELISA. En SPR, méthode bien plus sensible que l'ELISA et validée pour étudier les interactions entre protéines⁵¹⁹, cette liaison était décrite comme directe mais n'était uniquement montrée qu'après potentialisation par des CpG (débris d'ADN). Une étude s'est intéressée au rôle de RAGE dans l'ischémie-reperfusion digestive, à travers cette liaison rapportée entre RAGE et C3a⁵²⁰, en comparant des souris RAGE^{+/+} et RAGE^{-/-}. Après réalisation d'une ischémie/reperfusion au niveau mésentérique, les auteurs observaient une augmentation systémique de deux ligands de RAGE : HMBG1 et C3a. Cependant, dans le groupe invalidé pour RAGE, les atteintes inflammatoires digestives étaient identiques, laissant supposer que les ligands de RAGE, dont C3a, jouaient un rôle inflammatoire à travers

leur liaison à d'autres récepteurs et que la liaison C3a/RAGE, si elle existait, occupait un rôle minime dans ce modèle.

Aussi, nous avons émis l'hypothèse que l'hème pourrait jouer ce même rôle de potentialisateur. Nous n'avons pas retrouvé d'étude s'intéressant aux interactions entre RAGE et l'hème, et peu de travaux ont abordé le lien entre RAGE et l'hémolyse. Dans sa thèse, le Dr. Charrin décrit pour la première fois un lien entre souris drépanocytaires et RAGE⁵²¹. Via l'étude du modèle murin drépanocytaire Townes, certains paramètres de l'inflammation et du stress oxydant étaient analysés. Les reins présentaient une susceptibilité particulière au stress oxydant et à l'inflammation, avec des taux élevés d'AOPP, et une augmentation de NFκB et de TNFα⁵²². En souhaitant étudier les effets proinflammatoires induits par l'hémolyse dans ce modèle de drépanocytose, et compte-tenu du fait que des taux d'AGE élevés ont été retrouvés chez des patients drépanocytaires^{523,524}, les auteurs ont réalisé un blocage de RAGE dans ces souris : ces résultats, non publiés, retrouvaient une diminution de l'hémolyse (augmentation de l'hématocrite et du taux d'hémoglobine, baisse du taux de réticulocytes) et une diminution de certaines cytokines proinflammatoires (TNFα, IL-1β), de molécule d'adhésion (VCAM-1) et de marqueurs du stress oxydant (activité NADPH oxydase, taux d'AOPP). On notait également une augmentation de l'expression de eNOS au niveau rénal et du taux plasmatique de NO.

Pour la première fois, nous avons démontré que l'hème liait le RAGE, en SPR, où les molécules du complément telles que C3a, C3a désarginé et C1q venaient se lier au complexe RAGE-hème. Devant la découverte de RAGE comme récepteur de l'hème, nous avons souhaité poursuivre la description de cette liaison, et l'avons confirmée par deux autres techniques : en spectroscopie d'absorbance, en collaboration avec le Dr. Dimitrov, et en chromatographie d'exclusion stérique, en collaboration avec le Dr. Yatime.

Secondairement, grâce à une collaboration avec le Dr Yatime et l'obtention des différents domaines purifiés du RAGE, nous avons caractérisé le domaine de liaison de l'hème, qui s'est avéré être le domaine V. Il s'agit du domaine identifié le plus fréquemment comme site de liaison des nombreux ligands de RAGE³⁴⁶. Dans la continuité de ces travaux, la collaboration avec le Dr Yatime se poursuit actuellement avec pour objectif de cristalliser le complexe RAGE/hème. Les résultats du Dr Yatime retrouvent par ailleurs, en chromatographie

d'exclusion stérique, que les complexes RAGE/hème formeraient des oligomères de taille variée, rendant la cristallisation de ce complexe plus difficile.

En outre, nous avons mis en évidence que deux autres molécules contenant du Fe^{3+} - Fer(III)pht et la ferroïne -, ainsi que les porphyrines contenant un métal de transition à 3 valences - Mn(III), ZnPP, Co(III) - liaient RAGE en SPR, à la différence du Mg(II). Dans le but de déterminer si la valence Fe^{2+} ou $^{3+}$ jouait un rôle dans la liaison RAGE/hème, nous avons collaboré avec les Dr A. Ghinet, M. Billamboz et C. Waterlot (Ecole des Hautes d'Etudes d'Ingénieurs, Lille). La molécule de piroxicam étant spécifique d'une liaison au Fe^{3+} et non au Fe^{2+} ⁵²⁵, ils ont confirmé que l'hème utilisé dans nos travaux (dilué en solution NaCl NaOH) comportait du Fer à valence 3+, car il se liait au piroxicam. Par ailleurs, les travaux du Dr Yatime ont retrouvé une abolition partielle de la liaison RAGE/hème par le piroxicam en chromatographie d'exclusion sérique.

Une autre étude propose un lien entre RAGE et le fer⁵²⁶. Dans un modèle murin diabétique induit par la streptozotocine et le nicotinamide, une supplémentation en fer (sous forme de citrate ferrique) était délivrée afin d'étudier le lien entre administration de fer, AGE et RAGE. Une supplémentation de plus d'un gramme par jour induisait une stéatose hépatique, ainsi qu'une accumulation hépatique d'AGE et l'augmentation de l'expression hépatique de RAGE ainsi que des voies p38MPK et NFκB.

Afin de préciser les conséquences phénotypiques de cette liaison, nous avons travaillé sur une lignée de souris RAGE^{-/-}. L'expression de RAGE étant hétérogène entre les organes, nous avons choisi d'étudier, en plus de l'étude du rein, le poumon, organe exprimant le plus fortement RAGE à l'état basal³⁵⁶. Ainsi, nous avons pu observer que l'inactivation de RAGE avait un effet protecteur envers l'hème au niveau pulmonaire, avec une moindre augmentation de l'expression du facteur tissulaire, d'IL1β et de TNFα. Nos données sur l'étude des voies communes de signalisation de RAGE et de l'hème retrouvaient chez les souris RAGE^{-/-} une plus faible phosphorylation des voies ERK1/2 et Akt, sous exposition à l'hème. L'implication de RAGE dans la phosphorylation de ces deux voies de signalisation est bien décrite dans la littérature. La phosphorylation de ERK a été décrite via HMBG1⁴⁰² et avec l'utilisation d'AGE⁴⁰³, induisant NFκB. L'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR a été décrite sur des macrophages murins par l'intermédiaire des AGE⁴¹⁶ ainsi que sur des cellules

rénales mésangiales⁴¹⁷. Cette up-régulation de Akt par RAGE demeure controversée pour certaines équipes⁴¹⁸⁻⁴²⁰. Ainsi, nos résultats tendent à confirmer l'hypothèse d'une up-régulation de Akt. D'autres voie de signalisation activées par RAGE pourraient être étudiées dans notre modèle, afin de renforcer la robustesse de nos arguments, telles l'expression de Diaph1, l'activation de la PKC/TIRAP/Myd88 ou encore des MAPK/JNK.

L'induction de HO-1 par l'hème, mesurée en RTqPCR, était comparable entre les souris WT et invalidées pour RAGE. Peu de données sont rapportées dans la littérature sur un lien entre HO-1 et RAGE. Une équipe a retrouvé une surexpression de RAGE, HMGB1 et TLR4 dans un modèle murin d'ischémie/reperfusion rénale, parallèle à une baisse de marqueurs anti-inflammatoires dont HO-1, son facteur de transcription NRF2, et IL10⁵²⁷. Le blocage de RAGE par une molécule thérapeutique expérimentale, le FPSZM1, sur des cellules de microglie de rats, menait à une élévation de l'expression de HO-1 et NRF2⁵²⁸. RAGE pourrait ainsi avoir un effet proinflammatoire par l'inhibition de HO-1. De même, HO-1 pourrait réguler RAGE, comme le laisse supposer une étude sur un modèle murin d'insuffisance respiratoire aiguë induite au LPS, où le LPS augmentait significativement l'expression de RAGE et HMGB1 au niveau pulmonaire. Un traitement par agoniste de PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) supprimait les effets du LPS, réversait l'induction de HMGB1 et RAGE et augmentait l'induction de HO-1. Un inhibiteur de HO-1, ZnPP, inhibait les effets protecteurs de PPAR γ , suggérant ainsi que l'activation des PPAR γ inhiberait les lésions pulmonaires induites par le LPS, en négativant les effets de RAGE et HMGB1 via l'induction de HO-1⁵²⁹. Sur ce même modèle d'inflammation pulmonaire après exposition au LPS, une équipe démontrait qu'une activation des PPAR γ (par le curcuma) restaurait l'induction de HO-1 dans les tissus pulmonaires de rongeurs et diminuait parallèlement l'expression de HMGB1, RAGE, TNF α , IL6 et TGF β dans ces tissus⁵³⁰. Une autre équipe a publié récemment des travaux sur le FPSZM1 dans les lésions pulmonaires induites par la fumée de cigarette, démontrant que le blocage de RAGE avait un rôle anti-inflammatoire et anti-oxydant en inhibant l'activation des DAMP via la signalisation de NRF2⁵³¹. Une balance RAGE/HO-1 pourrait être une hypothèse intéressante dans la régulation de l'inflammation aiguë, comme le proposaient Wang *et al.* en 2013⁵³².

Afin de poursuivre ce travail, notre laboratoire a mis au point une lignée de cellule HEK, exprimant très faiblement le RAGE à l'état basal, et transfectées avec RAGE. En effet, les travaux préliminaires de notre équipe avec l'utilisation d'anticorps bloquant de RAGE ne se sont pas révélés contributifs. Nous souhaiterions ainsi tester les effets de l'hème sur ces cellules en les comparant aux cellules HEK non transfectées. Concernant la mise au point d'un modèle cellulaire, une autre voie possible consisterait en l'isolement de cellules pulmonaires directement sur les souris WT et RAGE^{-/-}, et particulièrement les pneumocytes de type I.

Nous pensons ainsi avoir ouvert des perspectives de travail concernant le rôle du RAGE dans les maladies hémolytiques. Plusieurs questions restent en suspens, et en particulier celle de la signification de cette liaison RAGE/hème, ces deux molécules étant toutes deux multi-ligands. Cependant, nos contrôles avec le fragment Fc des immunoglobulines ou le récepteur TLR4 étaient en faveur d'une liaison affine et spécifique.

Finalement, une de nos hypothèses de travail initiale était la suivante : la susceptibilité glomérulaire endothéliale au SHUa passe-t-elle par le RAGE ? Bien que cet organe exprime peu le RAGE à l'état basal, comme la plupart des organes, nous avons retrouvé une augmentation de l'expression de RAGE dans le rein sous l'effet de l'hème, ainsi que dans le cœur et la rate. Aussi, cette hypothèse reste à explorer. Une possibilité serait la mise au point d'un modèle du SHUa, via l'utilisation par exemple d'un FH défaillant sur des souris RAGE^{-/-}, associé à un trigger de l'hémolyse.

Concernant le tropisme rénal du SHUa, nous avons choisi de nous concentrer sur des points précis tels que le complément, l'hémolyse et le RAGE. D'autres pistes d'études sont proposées dans la littérature, comme les particularités rhéologiques du rein : en effet, la forme en pelote des capillaires glomérulaires engendre un "shear-stress" ou cisaillement, cette contrainte laminaire régulant l'expression génique des CE, leur morphologie et la production de médiateurs solubles tels que le NO⁵³³⁻⁵³⁵. Pour certains auteurs, les lésions de MAT seraient favorisées par les effets du shear-stress sur les CE^{536,537}. D'autre part, certaines hormones ont été impliquées dans les lésions de MAT. L'aldostérone, par exemple, impliquée dans l'HTA maligne, a été retrouvée plus élevée chez des patients avec lésions de MAT⁵³⁸. Il s'agissait d'une étude rétrospective sur 18 patients présentant une HTA maligne.

L'aldostérone plasmatique des patients présentant une MAT biologique associée (44%) avaient des taux plasmatiques d'aldostérone plus élevés que les patients non hémolytiques, alors que l'activité rénine plasmatique était similaire entre les deux groupes. Les œstrogènes ont également été incriminés⁵³⁹, cette hypothèse pouvant expliquer le lien entre SHUa et grossesse, et la prédominance féminine à l'âge adulte. Ainsi, différents modèles cellulaires pourraient être proposés, tels que l'étude des cultures cellulaires en flux pour mimer le shear-stress ou l'étude des différentes CE sous stimuli hormonaux.

En conclusion, ces différentes perspectives d'étude pourraient permettre d'améliorer encore la connaissance des mécanismes physiopathologiques du SHUa et de préciser le rôle nouveau de RAGE dans les maladies hémolytiques. L'amélioration de la compréhension d'une pathologie permet d'améliorer sa prise en charge, comme l'a démontré l'exemple du SHUa et de l'utilisation du bloqueur de la voie terminale du complément. L'intérêt des molécules anti-RAGE dans ces pathologies reste à démontrer.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fremeaux-Bacchi V, Fakhouri F, Garnier A, Bienaimé F, Dragon-Durey M-A, Ngo S, et al. Genetics and Outcome of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: A Nationwide French Series Comparing Children and Adults. *Clin J Am Soc Nephrol*. 4 mai 2013;8(4):554-62.
2. Schaefer F, Ardissino G, Ariceta G, Fakhouri F, Scully M, Isbel N, et al. Clinical and genetic predictors of atypical hemolytic uremic syndrome phenotype and outcome. *Kidney Int*. 12 juin 2018;
3. Pawluczko AW, Lindorfer MA, Waitumbi JN, Taylor RP. Hematin promotes complement alternative pathway-mediated deposition of C3 activation fragments on human erythrocytes: potential implications for the pathogenesis of anemia in malaria. *J Immunol*. 2007;179(8):5543–5552.
4. Frimat M, Tabarin F, Dimitrov JD, Poitou C, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, et al. Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 11 juill 2013;122(2):282-92.
5. Fukami K, Taguchi K, Yamagishi S, Okuda S. Receptor for advanced glycation endproducts and progressive kidney disease: *Curr Opin Nephrol Hypertens*. janv 2015;24(1):54-60.
6. Ruan BH, Li X, Winkler AR, Cunningham KM, Kuai J, Greco RM, et al. Complement C3a, CpG oligos, and DNA/C3a complex stimulate IFN- α production in a receptor for advanced glycation end product-dependent manner. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 oct 2010;185(7):4213-22.
7. Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R. [Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia]. *Schweiz Med Wochenschr*. 20 sept 1955;85(38-39):905-9.
8. Habib R, Mathieu H, Royer P. [Arteriole-capillary thrombotic disease of the kidney in children]. *Rev Fr Etud Clin Biol*. oct 1958;3(8):891-4.
9. Brocklebank V, Wood KM, Kavanagh D. Thrombotic Microangiopathy and the Kidney. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 7 févr 2018;13(2):300-17.
10. Fakhouri F, Vincent F, Legendre C. Pathological and therapeutic distinctions in HUS/TTP. *Lancet Lond Engl*. 5 févr 2000;355(9202):497; author reply 497-498.
11. Fakhouri F, Zuber J, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C. Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet Lond Engl*. 12 août 2017;390(10095):681-96.
12. Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med*. 22 août 2002;347(8):589-600.
13. George JN, Nester CM. Syndromes of thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med*. 14 août 2014;371(7):654-66.
14. George JN. The association of pregnancy with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Hematol*. sept 2003;10(5):339-44.
15. Schwartz J, Padmanabhan A, Aqui N, Balogun RA, Connelly-Smith L, Delaney M, et al. Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice-Evidence-Based Approach

- from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Seventh Special Issue. *J Clin Apheresis*. juin 2016;31(3):149-62.
16. Barber C, Herzenberg A, Aghdassi E, Su J, Lou W, Qian G, et al. Evaluation of clinical outcomes and renal vascular pathology among patients with lupus. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. mai 2012;7(5):757-64.
 17. Barrera-Vargas A, Rosado-Canto R, Merayo-Chalico J, Arreola-Guerra JM, Mejía-Vilet JM, Correa-Rotter R, et al. Renal Thrombotic Microangiopathy in Proliferative Lupus Nephritis: Risk Factors and Clinical Outcomes: A Case-Control Study. *J Clin Rheumatol Pract Rep Rheum Musculoskelet Dis*. août 2016;22(5):235-40.
 18. Ghossein C, Varga J, Fenves AZ. Recent Developments in the Classification, Evaluation, Pathophysiology, and Management of Scleroderma Renal Crisis. *Curr Rheumatol Rep*. janv 2016;18(1):5.
 19. Rodríguez-Pintó I, Moitinho M, Santacreu I, Shoenfeld Y, Erkan D, Espinosa G, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS): Descriptive analysis of 500 patients from the International CAPS Registry. *Autoimmun Rev*. déc 2016;15(12):1120-4.
 20. Woodworth TG, Suliman YA, Li W, Furst DE, Clements P. Scleroderma renal crisis and renal involvement in systemic sclerosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(11):678-91.
 21. Govind Babu K, Bhat GR. Cancer-associated thrombotic microangiopathy. *ecancermedicallscience* [Internet]. 28 juin 2016 [cité 20 août 2018];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4929977/>
 22. Lechner K, Obermeier HL. Cancer-related microangiopathic hemolytic anemia: clinical and laboratory features in 168 reported cases. *Medicine (Baltimore)*. juill 2012;91(4):195-205.
 23. Beck BB, van Spronsen F, Diepstra A, Berger RMF, Kömhoff M. Renal thrombotic microangiopathy in patients with cblC defect: review of an under-recognized entity. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. mai 2017;32(5):733-41.
 24. Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, Esmon CT, Esmon NL, Ferrell G, et al. Thrombomodulin Mutations in Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome. *N Engl J Med*. 23 juill 2009;361(4):345-57.
 25. Maga TK, Nishimura CJ, Weaver AE, Frees KL, Smith RJH. Mutations in alternative pathway complement proteins in American patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Hum Mutat*. juin 2010;31(6):E1445-1460.
 26. Bu F, Maga T, Meyer NC, Wang K, Thomas CP, Nester CM, et al. Comprehensive genetic analysis of complement and coagulation genes in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol JASN*. janv 2014;25(1):55-64.
 27. Bruneau S, Néel M, Roumenina LT, Frimat M, Laurent L, Frémeaux-Bacchi V, et al. Loss of DGKe induces endothelial cell activation and death independently of complement activation. *Blood*. 5 févr 2015;125(6):1038-46.
 28. Lemaire M, Frémeaux-Bacchi V, Schaefer F, Choi M, Tang WH, Le Quintrec M, et al. Recessive mutations in DGKE cause atypical hemolytic-uremic syndrome. *Nat Genet*. mai 2013;45(5):531-6.

29. Bennett CL, Jacob S, Dunn BL, Georgantopoulos P, Zheng XL, Kwaan HC, et al. Ticlopidine-associated ADAMTS13 activity deficient thrombotic thrombocytopenic purpura in 22 persons in Japan: a report from the Southern Network on Adverse Reactions (SONAR). *Br J Haematol*. juin 2013;161(6):896-8.
30. Pisoni R, Ruggenenti P, Remuzzi G. Drug-induced thrombotic microangiopathy: incidence, prevention and management. *Drug Saf*. 2001;24(7):491-501.
31. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, et al. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med*. 13 mars 2008;358(11):1129-36.
32. Kavanagh D, McGlasson S, Jury A, Williams J, Scolding N, Bellamy C, et al. Type I interferon causes thrombotic microangiopathy by a dose-dependent toxic effect on the microvasculature. *Blood*. 15 déc 2016;128(24):2824-33.
33. Chapin J, Shore T, Forsberg P, Desman G, Van Besien K, Laurence J. Hematopoietic transplant-associated thrombotic microangiopathy: case report and review of diagnosis and treatments. *Clin Adv Hematol Oncol HO*. sept 2014;12(9):565-73.
34. Fujiwara H, Maeda Y, Sando Y, Nakamura M, Tani K, Ishikawa T, et al. Treatment of thrombotic microangiopathy after hematopoietic stem cell transplantation with recombinant human soluble thrombomodulin. *Transfusion (Paris)*. avr 2016;56(4):886-92.
35. Jodele S, Zhang K, Zou F, Laskin B, Dandoy CE, Myers KC, et al. The genetic fingerprint of susceptibility for transplant-associated thrombotic microangiopathy. *Blood*. 25 févr 2016;127(8):989-96.
36. Rosenthal J. Hematopoietic cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Blood Med*. 2 sept 2016;7:181-6.
37. Rotz SJ, Luebbering N, Dixon BP, Gavriilaki E, Brodsky RA, Dandoy CE, et al. In vitro evidence of complement activation in transplantation-associated thrombotic microangiopathy. *Blood Adv*. 23 août 2017;1(20):1632-4.
38. Gavriilaki E, Sakellari I, Batsis I, Mallouri D, Bousiou Z, Vardi A, et al. Transplant-associated thrombotic microangiopathy: Incidence, prognostic factors, morbidity, and mortality in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Clin Transplant*. 6 août 2018;e13371.
39. Le Quintrec M, Lionet A, Kamar N, Karras A, Barbier S, Buchler M, et al. Complement mutation-associated de novo thrombotic microangiopathy following kidney transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. août 2008;8(8):1694-701.
40. Reynolds JC, Agodoa LY, Yuan CM, Abbott KC. Thrombotic microangiopathy after renal transplantation in the United States. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. nov 2003;42(5):1058-68.
41. Verbiest A, Pirenne J, Dierickx D. De novo thrombotic microangiopathy after non-renal solid organ transplantation. *Blood Rev*. nov 2014;28(6):269-79.
42. Ahmed S, Siddiqui R, Siddiqui A, Zaidi S, Cervia J. HIV associated thrombotic microangiopathy. *Postgrad Med J*. sept 2002;78(923):520-4.

43. Dineshkumar T, Dhanapriya J, Jaganathan P, Sakthirajan R, Gopalakrishnan N, Balasubramaniyan T. Thrombotic microangiopathy as an initial manifestation in HIV patients. *Indian J Crit Care Med Peer-Rev Off Publ Indian Soc Crit Care Med.* juin 2016;20(6):374-6.
44. Deville C, Garrouste C, Coppo P, Evrard B, Lautrette A, Heng AE. Efficacy of rituximab and plasmapheresis in an adult patient with antifactor H autoantibody-associated hemolytic uremic syndrome. *Medicine (Baltimore) [Internet].* 30 sept 2016 [cité 23 août 2018];95(39). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5265956/>
45. Kielstein JT, Beutel G, Fleig S, Steinhoff J, Meyer TN, Hafer C, et al. Best supportive care and therapeutic plasma exchange with or without eculizumab in Shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4 induced haemolytic-uraemic syndrome: an analysis of the German STEC-HUS registry. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* oct 2012;27(10):3807-15.
46. Michael M, Elliott EJ, Craig JC, Ridley G, Hodson EM. Interventions for hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* févr 2009;53(2):259-72.
47. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uremic syndrome. *Lancet Lond Engl.* 19 mars 2005;365(9464):1073-86.
48. Burin des Roziers N, Chadebecq P, Bodivit G, Guinchard E, Bruneel A, Dupré T, et al. Red blood cell Thomsen-Friedenreich antigen expression and galectin-3 plasma concentrations in *Streptococcus pneumoniae*-associated hemolytic uremic syndrome and hemolytic anemia. *Transfusion (Paris).* juin 2015;55(6 Pt 2):1563-71.
49. Cochran JB, Panzarino VM, Maes LY, Tecklenburg FW. Pneumococcus-induced T-antigen activation in hemolytic uremic syndrome and anemia. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* mars 2004;19(3):317-21.
50. Waters AM, Kerecuk L, Luk D, Haq MR, Fitzpatrick MM, Gilbert RD, et al. Hemolytic uremic syndrome associated with invasive pneumococcal disease: the United kingdom experience. *J Pediatr.* août 2007;151(2):140-4.
51. Born VD, H B-J, Koopmans RP, Montfrans V, A G. The Renin-Angiotensin System in Malignant Hypertension Revisited: Plasma Renin Activity, Microangiopathic Hemolysis, and Renal Failure in Malignant Hypertension. *Am J Hypertens.* 1 août 2007;20(8):900-6.
52. van den Born BJH, Honnebier UPF, Koopmans RP, van Montfrans GA. Microangiopathic hemolysis and renal failure in malignant hypertension. *Hypertens Dallas Tex* 1979. févr 2005;45(2):246-51.
53. Loirat C, Frémeaux-Bacchi V. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* déc 2011;6(1):60.
54. Kerr H, Richards A. Complement-mediated injury and protection of endothelium: Lessons from atypical haemolytic uraemic syndrome. *Immunobiology.* 1 févr 2012;217(2):195-203.
55. Dragon-Durey M-A, Sethi SK, Bagga A, Blanc C, Blouin J, Ranchin B, et al. Clinical Features of Anti-Factor H Autoantibody-Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *J Am Soc Nephrol JASN.* déc 2010;21(12):2180-7.

56. Habib R, Courtecuisse V, Leclerc F, Mathieu H, Royer P. [Anatomo-pathologic study of 35 cases of hemolytic and uremic syndrome in children]. *Arch Fr Pediatr.* avr 1969;26(4):391-416.
57. Vitsky BH, Suzuki Y, Strauss L, Churg J. The hemolytic-uremic syndrome: a study of renal pathologic alterations. *Am J Pathol.* déc 1969;57(3):627-47.
58. Noris M, Remuzzi G. Glomerular Diseases Dependent on Complement Activation, Including Atypical Hemolytic Uremic Syndrome, Membranoproliferative Glomerulonephritis, and C3 Glomerulopathy: Core Curriculum 2015. *Am J Kidney Dis.* août 2015;66(2):359-75.
59. Droz D, Nochy D, Noël L-H, Heudes D, Nabarra B, Hill G. MICROANGIOPATHIES THROMBOTIQUES : LÉSIONS RÉNALES ET EXTRARÉNALES. In: ACTUALITÉS NÉPHROLOGIQUES 2000 [Internet]. FLAMMARION MÉDECINE-SCIENCES. [cité 16 juill 2018]. Disponible sur: http://www.sfnfdt.org/sn/PDF/enephro/publications/actualites/2000/2000_12.pdf
60. Noël L.-H. Atlas de pathologie rénale [Internet]. *Medecine-Science*; 2008 [cité 16 juill 2018]. Disponible sur: <https://livre.fnac.com/a2305815/Laure-Helene-Noel-Atlas-de-pathologie-renale>
61. Schulze M, Pruchno CJ, Burns M, Baker PJ, Johnson RJ, Couser WG. Glomerular C3c localization indicates ongoing immune deposit formation and complement activation in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol.* janv 1993;142(1):179-87.
62. Mele C, Remuzzi G, Noris M. Hemolytic uremic syndrome. *Semin Immunopathol.* juill 2014;36(4):399-420.
63. Neuhaus TJ, Calonder S, Leumann EP. Heterogeneity of atypical haemolytic uraemic syndromes. *Arch Dis Child.* juin 1997;76(6):518-21.
64. Vaterodt L, Holle J, Hüseman D, Müller D, Thumfart J. Short- and Long-Term Renal Outcome of Hemolytic-Uremic Syndrome in Childhood. *Front Pediatr* [Internet]. 7 août 2018 [cité 23 août 2018];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6090047/>
65. Sinha A, Gulati A, Saini S, Blanc C, Gupta A, Gurjar BS, et al. Prompt plasma exchanges and immunosuppressive treatment improves the outcomes of anti-factor H autoantibody-associated hemolytic uremic syndrome in children. *Kidney Int.* 1 mai 2014;85(5):1151-60.
66. Roumenina LT, Frimat M, Miller EC, Provot F, Dragon-Durey M-A, Bordereau P, et al. A prevalent C3 mutation in aHUS patients causes a direct C3 convertase gain of function. *Blood.* 3 mai 2012;119(18):4182-91.
67. Loirat C, Macher M-A, Elmaleh-Berges M, Kwon T, Deschênes G, Goodship THJ, et al. Non-atheromatous arterial stenoses in atypical haemolytic uraemic syndrome associated with complement dysregulation. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* oct 2010;25(10):3421-5.
68. Noris M, Remuzzi G. Cardiovascular complications in atypical haemolytic uraemic syndrome. *Nat Rev Nephrol.* mars 2014;10(3):174-80.
69. Magro CM, Momtahn S, Mulvey JJ, Yassin AH, Kaplan RB, Laurence JC. Role of the skin biopsy in the diagnosis of atypical hemolytic uremic syndrome. *Am J Dermatopathol.* mai 2015;37(5):349-56; quiz 357-9.

70. Malina M, Gulati A, Bagga A, Majid MA, Simkova E, Schaefer F. Peripheral gangrene in children with atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics*. janv 2013;131(1):e331-335.
71. Rigother C, Delmas Y, Roumenina LT, Contin-Bordes C, Lepreux S, Bridoux F, et al. Distal Angiopathy and Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: Clinical and Functional Properties of an Anti-Factor H IgA λ Antibody. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. août 2015;66(2):331-6.
72. Druml W, Laggner AN, Lenz K, Grimm G, Schneeweiss B. Pancreatitis in acute hemolysis. *Ann Hematol*. juill 1991;63(1):39-41.
73. Saruc M, Yuceyar H, Turkel N, Ozutemiz O, Tuzcuoglu I, Yuce G, et al. An experimental model of hemolysis-induced acute pancreatitis. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol*. juill 2003;36(7):879-86.
74. Merle NS, Grunenwald A, Figueres M-L, Chauvet S, Daugan M, Knockaert S, et al. Characterization of Renal Injury and Inflammation in an Experimental Model of Intravascular Hemolysis. *Front Immunol [Internet]*. 2018 [cité 9 juin 2018];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00179/full>
75. Cameron JS, Vick R. Letter: Plasma-C3 in haemolytic-uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Lancet Lond Engl*. 27 oct 1973;2(7835):975.
76. Thompson RA, Winterborn MH. Hypocomplementaemia due to a genetic deficiency of beta 1H globulin. *Clin Exp Immunol*. oct 1981;46(1):110-9.
77. Warwicker P, Goodship TH, Donne RL, Pirson Y, Nicholls A, Ward RM, et al. Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*. avr 1998;53(4):836-44.
78. Bruneau S, Néel M, Roumenina LT, Frimat M, Laurent L, Frémeaux-Bacchi V, et al. Loss of DGKe induces endothelial cell activation and death independently of complement activation. *Blood*. 5 févr 2015;125(6):1038-46.
79. Noris M, Caprioli J, Bresin E, Mossali C, Pianetti G, Gamba S, et al. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. oct 2010;5(10):1844-59.
80. Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Fujimoto M, et al. Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Clin Exp Nephrol*. 6 mars 2018;
81. Lachmann PJ, Halbwachs L. The influence of C3b inactivator (KAF) concentration on the ability of serum to support complement activation. *Clin Exp Immunol*. juill 1975;21(1):109-14.
82. Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med*. 1 sept 1981;154(3):856-67.
83. Noris M, Remuzzi G. Overview of Complement Activation and Regulation. *Semin Nephrol*. nov 2013;33(6):479-92.
84. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Frémeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol*. 2015;6:257.

85. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol.* 2015;6:262.
86. Zipfel PF, Skerka C. FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol Today.* mars 1999;20(3):135-40.
87. Perkins SJ, Nan R, Li K, Khan S, Miller A. Complement factor H-ligand interactions: self-association, multivalency and dissociation constants. *Immunobiology.* févr 2012;217(2):281-97.
88. Kazatchkine MD, Fearon DT, Austen KF. Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for cell-bound C3b. *J Immunol Baltim Md 1950.* janv 1979;122(1):75-81.
89. Weiler JM, Daha MR, Austen KF, Fearon DT. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc Natl Acad Sci U S A.* sept 1976;73(9):3268-72.
90. Whaley K, Ruddy S. Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J Exp Med.* 2 nov 1976;144(5):1147-63.
91. Kajander T, Lehtinen MJ, Hyvärinen S, Bhattacharjee A, Leung E, Isenman DE, et al. Dual interaction of factor H with C3d and glycosaminoglycans in host-nonhost discrimination by complement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 févr 2011;108(7):2897-902.
92. Morgan HP, Schmidt CQ, Guariento M, Blaum BS, Gillespie D, Herbert AP, et al. Structural basis for engagement by complement factor H of C3b on a self surface. *Nat Struct Mol Biol.* avr 2011;18(4):463-70.
93. Forneris F, Wu J, Xue X, Ricklin D, Lin Z, Sfyroera G, et al. Regulators of complement activity mediate inhibitory mechanisms through a common C3b-binding mode. *EMBO J.* 17 2016;35(10):1133-49.
94. Langford-Smith A, Day AJ, Bishop PN, Clark SJ. Complementing the Sugar Code: Role of GAGs and Sialic Acid in Complement Regulation. *Front Immunol [Internet].* 2 févr 2015 [cité 23 août 2018];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313701/>
95. Ferreira VP, Herbert AP, Cortés C, McKee KA, Blaum BS, Esswein ST, et al. The binding of factor H to a complex of physiological polyanions and C3b on cells is impaired in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 juin 2009;182(11):7009-18.
96. Clark SJ, Ridge LA, Herbert AP, Hakobyan S, Mulloy B, Lennon R, et al. Tissue-specific host recognition by complement factor H is mediated by differential activities of its glycosaminoglycan-binding regions. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 mars 2013;190(5):2049-57.
97. Zaferani A, Vivès RR, van der Pol P, Navis GJ, Daha MR, van Kooten C, et al. Factor h and properdin recognize different epitopes on renal tubular epithelial heparan sulfate. *J Biol Chem.* 7 sept 2012;287(37):31471-81.
98. Santiago Rodriguez de Cordobar Rey-Campos, Pilar Sanchez-Corral,, Javier Rey-Campos. Structural gene for human membrane cofactor protein (MCP) of complement maps to within 100 kb of the 3' end of the C3b/C4b receptor gene. *J Exp Med.* 1 févr 1989;169(2):597-602.

99. Barilla-LaBarca ML, Liszewski MK, Lambris JD, Hourcade D, Atkinson JP. Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 juin 2002;168(12):6298-304.
100. Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:431-55.
101. Li S-H, Szmitko PE, Weisel RD, Wang C-H, Fedak PWM, Li R-K, et al. C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells. *Circulation*. 24 févr 2004;109(7):833-6.
102. Cardone J, Le Fric G, Kemper C. CD46 in innate and adaptive immunity: an update. *Clin Exp Immunol*. juin 2011;164(3):301-11.
103. Nicholson-Weller A, Wang CE. Structure and function of decay accelerating factor CD55. *J Lab Clin Med*. avr 1994;123(4):485-91.
104. Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:35-58.
105. Hourcade DE, Mitchell L, Kuttner-Kondo LA, Atkinson JP, Medof ME. Decay-accelerating factor (DAF), complement receptor 1 (CR1), and factor H dissociate the complement AP C3 convertase (C3bBb) via sites on the type A domain of Bb. *J Biol Chem*. 11 janv 2002;277(2):1107-12.
106. Hasan RJ, Pawelczyk E, Urvil PT, Venkatarajan MS, Goluszko P, Kur J, et al. Structure-Function Analysis of Decay-Accelerating Factor: Identification of Residues Important for Binding of the Escherichia coli Dr Adhesin and Complement Regulation. *Infect Immun*. août 2002;70(8):4485-93.
107. Mason JC, Yarwood H, Sugars K, Morgan BP, Davies KA, Haskard DO. Induction of decay-accelerating factor by cytokines or the membrane-attack complex protects vascular endothelial cells against complement deposition. *Blood*. 1 sept 1999;94(5):1673-82.
108. Kinderlerer AR, Gregoire IP, Hamdulay SS, Ali F, Steinberg R, Silva G, et al. Heme oxygenase-1 expression enhances vascular endothelial resistance to complement-mediated injury through induction of decay-accelerating factor: a role for increased bilirubin and ferritin. *Blood*. 2009;113(7):1598–1607.
109. Mason JC, Lidington EA, Yarwood H, Lublin DM, Haskard DO. Induction of endothelial cell decay-accelerating factor by vascular endothelial growth factor: a mechanism for cytoprotection against complement-mediated injury during inflammatory angiogenesis. *Arthritis Rheum*. janv 2001;44(1):138-50.
110. Lidington EA, Haskard DO, Mason JC. Induction of decay-accelerating factor by thrombin through a protease-activated receptor 1 and protein kinase C–dependent pathway protects vascular endothelial cells from complement-mediated injury. *Blood*. 15 oct 2000;96(8):2784-92.
111. Heeger PS, Lalli PN, Lin F, Valujskikh A, Liu J, Muqim N, et al. Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity. *J Exp Med*. 16 mai 2005;201(10):1523-30.

112. Jackman RW, Beeler DL, Fritze L, Soff G, Rosenberg RD. Human thrombomodulin gene is intron depleted: nucleic acid sequences of the cDNA and gene predict protein structure and suggest sites of regulatory control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* sept 1987;84(18):6425-9.
113. Maruyama I, Bell CE, Majerus PW. Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J Cell Biol.* août 1985;101(2):363-71.
114. Ishii H, Salem HH, Bell CE, Laposata EA, Majerus PW. Thrombomodulin, an endothelial anticoagulant protein, is absent from the human brain. *Blood.* févr 1986;67(2):362-5.
115. Esmon CT, Owen WG. The discovery of thrombomodulin. *J Thromb Haemost JTH.* févr 2004;2(2):209-13.
116. Tateishi K, Imaoka M, Matsushita M. Dual modulating functions of thrombomodulin in the alternative complement pathway. *Biosci Trends.* 19 juill 2016;10(3):231-4.
117. Boffa MC, Karmochkine M. Thrombomodulin: an overview and potential implications in vascular disorders. *Lupus.* 1998;7 Suppl 2:S120-125.
118. Boehme MW, Deng Y, Raeth U, Bierhaus A, Ziegler R, Stremmel W, et al. Release of thrombomodulin from endothelial cells by concerted action of TNF-alpha and neutrophils: in vivo and in vitro studies. *Immunology.* janv 1996;87(1):134-40.
119. Ohlin A-K, Larsson K, Hansson M. Soluble thrombomodulin activity and soluble thrombomodulin antigen in plasma. *J Thromb Haemost JTH.* mai 2005;3(5):976-82.
120. Loghmani H, Conway EM. Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin. *Blood.* 12 juill 2018;132(2):148-58.
121. Takano S, Kimura S, Ohdama S, Aoki N. Plasma thrombomodulin in health and diseases. *Blood.* 15 nov 1990;76(10):2024-9.
122. Ikezoe T, Takeuchi A, Anabuki K, Kim T, Sakai M, Taniguchi A, et al. Effect Of Recombinant Human Soluble Thrombomodulin On Clinical Outcomes Of patients With Coagulopathy After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood.* 15 nov 2013;122(21):4803-4803.
123. Kawano N, Tasaki A, Kuriyama T, Tahara Y, Yoshida S, Ono N, et al. Effects of recombinant human soluble thrombomodulin treatment for disseminated intravascular coagulation at a single institution--an analysis of 62 cases caused by infectious diseases and 30 cases caused by hematological diseases. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2014;53(3):205-13.
124. Saito H, Maruyama I, Shimazaki S, Yamamoto Y, Aikawa N, Ohno R, et al. Efficacy and safety of recombinant human soluble thrombomodulin (ART-123) in disseminated intravascular coagulation: results of a phase III, randomized, double-blind clinical trial. *J Thromb Haemost JTH.* janv 2007;5(1):31-41.
125. Shin M, Hino H, Tamura M, Ishizuka B, Tanaka M, Suzuki N, et al. Thrombomodulin improves maternal and fetal conditions in an experimental pre-eclampsia rat model. *J Obstet Gynaecol Res.* mai 2014;40(5):1226-34.

126. Caprioli J, Noris M, Brioschi S, Pianetti G, Castelletti F, Bettinaglio P, et al. Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*. 15 août 2006;108(4):1267-79.
127. Kavanagh D, Richards A, Atkinson J. Complement regulatory genes and hemolytic uremic syndromes. *Annu Rev Med*. 2008;59:293-309.
128. Sullivan M, Rybicki LA, Winter A, Hoffmann MM, Reiermann S, Linke H, et al. Age-Related Penetrance of Hereditary Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Ann Hum Genet*. 1 nov 2011;75(6):639-47.
129. Bresin E, Ruruli E, Caprioli J, Sanchez-Corral P, Fremeaux-Bacchi V, Rodriguez de Cordoba S, et al. Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol JASN*. févr 2013;24(3):475-86.
130. Petermann A, Offermann G, Distler A, Sharma AM. Familial hemolytic-uremic syndrome in three generations. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. déc 1998;32(6):1063-7.
131. Sellier-Leclerc A-L, Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey M-A, Macher M-A, Niaudet P, Guest G, et al. Differential impact of complement mutations on clinical characteristics in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol JASN*. août 2007;18(8):2392-400.
132. Fakhouri F, Roumenina L, Provot F, Sallée M, Caillard S, Couzi L, et al. Pregnancy-associated hemolytic uremic syndrome revisited in the era of complement gene mutations. *J Am Soc Nephrol JASN*. mai 2010;21(5):859-67.
133. Huerta A, Arjona E, Portoles J, Lopez-Sanchez P, Rabasco C, Espinosa M, et al. A retrospective study of pregnancy-associated atypical hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*. 1 févr 2018;93(2):450-9.
134. Roumenina LT, Rayes J, Frimat M, Fremeaux-Bacchi V. Endothelial cells: source, barrier, and target of defensive mediators. *Immunol Rev*. 1 nov 2016;274(1):307-29.
135. Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood*. avr 1989;73(5):1109-12.
136. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest*. juill 1989;84(1):92-9.
137. Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol*. 1 oct 1982;95(1):355-60.
138. Pasipoularides A. Historical Perspective: Harvey's epoch-making discovery of the Circulation, its historical antecedents, and some initial consequences on medical practice. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. juin 2013;114(11):1493-503.
139. Pearce JMS. Malpighi and the discovery of capillaries. *Eur Neurol*. 2007;58(4):253-5.
140. Eliseyeva M. Endothelium: A Long Road from Mystery to Discovery. *Int J Biomed*. 2013;3(1):9-11.
141. Florey. The endothelial cell. *Br Med J*. 27 août 1966;2(5512):487-90.

142. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. IDENTIFICATION BY MORPHOLOGIC AND IMMUNOLOGIC CRITERIA. *J Clin Invest.* 1 nov 1973;52(11):2745-56.
143. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2 févr 2007;100(2):158-73.
144. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res.* 2 févr 2007;100(2):174-90.
145. Luft JH. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc.* déc 1966;25(6):1773-83.
146. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* juin 2007;454(3):345-59.
147. Henry CB, Duling BR. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am J Physiol.* août 1999;277(2 Pt 2):H508-514.
148. Rehm M, Zahler S, Lötsch M, Welsch U, Conzen P, Jacob M, et al. Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology.* mai 2004;100(5):1211-23.
149. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JAE. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 sept 2003;23(9):1541-7.
150. Kumar S, West DC, Ager A. Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation.* 1 nov 1987;36(1):57-70.
151. Turner RR, Beckstead JH, Warnke RA, Wood GS. Endothelial cell phenotypic diversity. In situ demonstration of immunologic and enzymatic heterogeneity that correlates with specific morphologic subtypes. *Am J Clin Pathol.* mai 1987;87(5):569-75.
152. Page C, Rose M, Yacoub M, Pigott R. Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am J Pathol.* sept 1992;141(3):673-83.
153. Auerbach R, Alby L, Morrissey LW, Tu M, Joseph J. Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc Res.* mai 1985;29(3):401-11.
154. Kibria G, Heath D, Smith P, Biggar R. Pulmonary endothelial pavement patterns. *Thorax.* mars 1980;35(3):186-91.
155. Hirata A, Baluk P, Fujiwara T, McDonald DM. Location of focal silver staining at endothelial gaps in inflamed venules examined by scanning electron microscopy. *Am J Physiol.* sept 1995;269(3 Pt 1):L403-418.
156. Guerrot D, Bellien J. Editorial: renal endothelial dysfunction: evolving concepts and perspectives. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2014;14(1):1-2.
157. Sun L, Ye RD. Role of G protein-coupled receptors in inflammation. *Acta Pharmacol Sin.* mars 2012;33(3):342-50.

158. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* juill 1989;3(9):2007-18.
159. Yamamoto K, de Waard V, Fearn C, Loskutoff DJ. Tissue distribution and regulation of murine von Willebrand factor gene expression in vivo. *Blood.* 15 oct 1998;92(8):2791-801.
160. Bajaj MS, Kuppuswamy MN, Manepalli AN, Bajaj SP. Transcriptional expression of tissue factor pathway inhibitor, thrombomodulin and von Willebrand factor in normal human tissues. *Thromb Haemost.* sept 1999;82(3):1047-52.
161. Moore KL, Andreoli SP, Esmon NL, Esmon CT, Bang NU. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest.* janv 1987;79(1):124-30.
162. Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1 mars 1986;163(3):740-5.
163. Cucuini W, Poitevin S, Poitevin G, Dignat-George F, Cornillet-Lefebvre P, Sabatier F, et al. Tissue factor up-regulation in proinflammatory conditions confers thrombin generation capacity to endothelial colony-forming cells without influencing non-coagulant properties in vitro. *J Thromb Haemost JTH.* sept 2010;8(9):2042-52.
164. Drake TA, Cheng J, Chang A, Taylor FB. Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis. *Am J Pathol.* mai 1993;142(5):1458-70.
165. Ma C, Jiao Y, Zhang J, Yang Q, Zhang Z, Shen Y, et al. Elevated plasma level of HMGB1 is associated with disease activity and combined alterations with IFN- α and TNF- α in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* févr 2012;32(2):395-402.
166. Yano K, Liaw PC, Mullington JM, Shih S-C, Okada H, Bodyak N, et al. Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality. *J Exp Med.* 12 juin 2006;203(6):1447-58.
167. Sartain SE, Turner NA, Moake JL. TNF Regulates Essential Alternative Complement Pathway Components and Impairs Activation of Protein C in Human Glomerular Endothelial Cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 janv 2016;196(2):832-45.
168. Shimokawa T, Yamamoto K, Kojima T, Saito H. Down-regulation of murine tissue factor pathway inhibitor mRNA by endotoxin and tumor necrosis factor- α in vitro and in vivo. *Thromb Res.* 1 nov 2000;100(3):211-21.
169. Laszik Z, Mitro A, Taylor FB, Ferrell G, Esmon CT. Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation.* 18 nov 1997;96(10):3633-40.
170. Gu J-M, Katsuura Y, Ferrell GL, Grammas P, Esmon CT. Endotoxin and thrombin elevate rodent endothelial cell protein C receptor mRNA levels and increase receptor shedding in vivo. *Blood.* 1 mars 2000;95(5):1687-93.
171. Chasis H, Redish J. EFFECTIVE RENAL BLOOD FLOW IN THE SEPARATE KIDNEYS OF SUBJECTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION [Internet]. 1941 [cité 16 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.jci.org/articles/view/101258/scanned-page/656>

172. Raij L, Shultz PJ. Endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide: effects on and production by mesangial cells and the glomerulus. *J Am Soc Nephrol JASN*. févr 1993;3(8):1435-41.
173. Sraer J, Foidart J, Chansel D, Mahieu P, Ardaillou R. Prostaglandin synthesis by rat isolated glomeruli and glomerular cultured cells. *Int J Biochem*. 1980;12(1-2):203-7.
174. Orita Y, Fujiwara Y, Ochi S, Takama T, Fukunaga M, Yokoyama K. Endothelin-1 receptors in rat renal glomeruli. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989;13 Suppl 5:S159-161.
175. Satchell SC, Tasman CH, Singh A, Ni L, Geelen J, von Ruhland CJ, et al. Conditionally immortalized human glomerular endothelial cells expressing fenestrations in response to VEGF. *Kidney Int*. mai 2006;69(9):1633-40.
176. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. avr 2006;54(4):385-95.
177. Han K-H, Lim J-M, Kim W-Y, Kim H, Madsen KM, Kim J. Expression of endothelial nitric oxide synthase in developing rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. avr 2005;288(4):F694-702.
178. Zhang J, Hill CE. Differential connexin expression in preglomerular and postglomerular vasculature: accentuation during diabetes. *Kidney Int*. sept 2005;68(3):1171-85.
179. Inai T, Sengoku A, Guan X, Hirose E, Iida H, Shibata Y. Heterogeneity in expression and subcellular localization of tight junction proteins, claudin-10 and -15, examined by RT-PCR and immunofluorescence microscopy. *Arch Histol Cytol*. déc 2005;68(5):349-60.
180. Modde F, Agustian PA, Wittig J, Dämmrich ME, Forstmeier V, Vester U, et al. Comprehensive analysis of glomerular mRNA expression of pro- and antithrombotic genes in atypical haemolytic-uremic syndrome (aHUS). *Virchows Arch Int J Pathol*. avr 2013;462(4):455-64.
181. Sartain SE, Turner NA, Moake JL. Brain microvascular endothelial cells exhibit lower activation of the alternative complement pathway than glomerular microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 19 mars 2018;jbc.RA118.002639.
182. Brooimans RA, van der Ark AA, Buurman WA, van Es LA, Daha MR. Differential regulation of complement factor H and C3 production in human umbilical vein endothelial cells by IFN-gamma and IL-1. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 mai 1990;144(10):3835-40.
183. Couplier M, Andreev S, Lemercier C, Dauchel H, Lees O, Fontaine M, et al. Activation of the endothelium by IL-1 α and glucocorticoids results in major increase of complement C3 and factor B production and generation of C3a. *Clin Exp Immunol*. 101(1):142-9.
184. Kawakami Y, Watanabe Y, Yamaguchi M, Sakaguchi H, Kono I, Ueki A. TNF-alpha stimulates the biosynthesis of complement C3 and factor B by human umbilical cord vein endothelial cells. *Cancer Lett*. 3 juin 1997;116(1):21-6.
185. Sheerin NS, Zhou W, Adler S, Sacks SH. TNF-alpha regulation of C3 gene expression and protein biosynthesis in rat glomerular endothelial cells. *Kidney Int*. mars 1997;51(3):703-10.
186. Turner NA, Moake J. Assembly and activation of alternative complement components on endothelial cell-anchored ultra-large von Willebrand factor links complement and hemostasis-thrombosis. *PLoS One*. 2013;8(3):e59372.

187. Bongrazio M, Pries AR, Zakrzewicz A. The endothelium as physiological source of properdin: role of wall shear stress. *Mol Immunol.* janv 2003;39(11):669-75.
188. Lappin DF, Guc D, Hill A, McShane T, Whaley K. Effect of interferon-gamma on complement gene expression in different cell types. *Biochem J.* 15 janv 1992;281 (Pt 2):437-42.
189. Nolasco L, Nolasco J, Feng S, Afshar-Kharghan V, Moake J. Human complement factor H is a reductase for large soluble von Willebrand factor multimers--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* nov 2013;33(11):2524-8.
190. Schlaf G, Demberg T, Koleva M, Jungermann K, Götze O. Complement factor I is upregulated in rat hepatocytes by interleukin-6 but not by interferon-gamma, interleukin-1beta, or tumor necrosis factor-alpha. *Biol Chem.* juill 2001;382(7):1089-94.
191. Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, Estaquier J, Huart JJ, Ameisen JC, et al. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie.* févr 1998;80(2):173-95.
192. Sassa S. Why Heme Needs to Be Degraded to Iron, Biliverdin IX α , and Carbon Monoxide? *Antioxid Redox Signal.* 1 oct 2004;6(5):819-24.
193. Schmid R. The identification of direct-reacting bilirubin as bilirubin glucuronide. *J Biol Chem.* déc 1957;229(2):881-8.
194. Kay IT, Weimer M, Watson CJ. The Formation in Vitro of (\pm)-Stercobilin from Bilirubin. *J Biol Chem.* 3 janv 1963;238(3):1122-3.
195. Garby L, Noyes WD. Studies on hemoglobin metabolism. I. The kinetic properties of the plasma hemoglobin pool in normal man. *J Clin Invest.* sept 1959;38:1479-83.
196. Haessler H. THE EFFECT OF FLOOD DIURESIS ON HEMOGLOBINURIA. *J Exp Med.* 31 mars 1922;35(4):515-9.
197. Crosby WH, Dameshek W. The significance of hemoglobinemia and associated hemosiderinuria, with particular reference to various types of hemolytic anemia. *J Lab Clin Med.* déc 1951;38(6):829-41.
198. Muller-Eberhard U, Javid J, Liem HH, Hanstein A, Hanna M. Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. *Blood.* nov 1968;32(5):811-5.
199. Lane N. The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) « Concerning little animals ». *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 19 avr 2015;370(1666).
200. Ferry RM. Studies in the Chemistry of Hemoglobin I. the Preparation of Hemoglobin. *J Biol Chem.* 10 janv 1923;57(3):819-28.
201. Strandberg B. Chapter 1: building the ground for the first two protein structures: myoglobin and haemoglobin. *J Mol Biol.* 11 sept 2009;392(1):2-10.
202. Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett.* 4 juill 2005;157(3):175-88.

203. Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, et al. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 13 juill 2007;282(28):20221-9.
204. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood.* 16 janv 2014;123(3):377-90.
205. Fortes GB, Alves LS, de Oliveira R, Dutra FF, Rodrigues D, Fernandez PL, et al. Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. *Blood.* 8 mars 2012;119(10):2368-75.
206. Gräsbeck R, Kouvonen I, Lundberg M, Tenhunen R. An intestinal receptor for heme. *Scand J Haematol.* juill 1979;23(1):5-9.
207. Vacher M, Nicot C, Pflumm M, Luchins J, Beychok S, Waks M. A heme binding site on myelin basic protein: characterization, location, and significance. *Arch Biochem Biophys.* 15 mai 1984;231(1):86-94.
208. Kay WW, Phipps BM, Ishiguro EE, Trust TJ. Porphyrin binding by the surface array virulence protein of *Aeromonas salmonicida*. *J Bacteriol.* déc 1985;164(3):1332-6.
209. Galbraith RA, Sassa S, Kappas A. Heme binding to murine erythroleukemia cells. Evidence for a heme receptor. *J Biol Chem.* 10 mai 1985;260(22):12198-202.
210. Galbraith RA. Heme binding to Hep G2 human hepatoma cells. *J Hepatol.* mai 1990;10(3):305-10.
211. Dimitrov JD, Vassilev TL. Cofactor-mediated protein promiscuity [Internet]. *Nature Biotechnology.* 2009 [cité 5 juill 2018]. Disponible sur: <https://www-nature-com.gate2.inist.fr/articles/nbt1009-892a>
212. Caughey WS, Raymond LD, Horiuchi M, Caughey B. Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13 oct 1998;95(21):12117-22.
213. Atamna H. Heme binding to Amyloid-beta peptide: mechanistic role in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD.* nov 2006;10(2-3):255-66.
214. Bhoite-Solomon V, Kessler-Icekson G, Shaklai N. Association of iron-protoporphyrin-IX (hemin) with myosins. *FEBS Lett.* 18 juin 1990;266(1-2):9-12.
215. Spolaore B, De Filippis V, Fontana A. Heme binding by the N-terminal fragment 1-44 of human growth hormone. *Biochemistry.* 13 déc 2005;44(49):16079-89.
216. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell.* 9 sept 2005;122(5):789-801.
217. Raghuram S, Stayrook KR, Huang P, Rogers PM, Nosie AK, McClure DB, et al. Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERBalpha and REV-ERBbeta. *Nat Struct Mol Biol.* déc 2007;14(12):1207-13.

218. Graça-Souza AV, Arruda MAB, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood*. 1 juin 2002;99(11):4160-5.
219. Porto BN, Alves LS, Fernández PL, Dutra TP, Figueiredo RT, Graça-Souza AV, et al. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *J Biol Chem*. 17 août 2007;282(33):24430-6.
220. Dutra FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol*. 2014;5:115.
221. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter AN, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med*. déc 2002;8(12):1383-9.
222. Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graça-Souza AV. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 août 2004;173(3):2023-30.
223. Vinchi F, De Franceschi L, Ghigo A, Townes T, Cimino J, Silengo L, et al. Hemopexin therapy improves cardiovascular function by preventing heme-induced endothelial toxicity in mouse models of hemolytic diseases. *Circulation*. 26 mars 2013;127(12):1317-29.
224. Balla J, Balla G, Jeney V, Kakuk G, Jacob HS, Vercellotti GM. Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. *Blood*. 1 juin 2000;95(11):3442-50.
225. Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*. 15 janv 2000;28(2):289-309.
226. Balla J, Vercellotti GM, Nath K, Yachie A, Nagy E, Eaton JW, et al. Haem, haem oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. juill 2003;18 Suppl 5:v8-12.
227. Belcher JD, Beckman JD, Balla G, Balla J, Vercellotti G. Heme degradation and vascular injury. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12(2):233–248.
228. Immenschuh S, Vijayan V, Janciauskiene S, Gueler F. Heme as a Target for Therapeutic Interventions. *Front Pharmacol [Internet]*. 2017 [cité 31 août 2018];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00146/full>
229. Vincent SH. Oxidative effects of heme and porphyrins on proteins and lipids. *Semin Hematol*. avr 1989;26(2):105-13.
230. Schmitt TH, Frezzatti WA, Schreier S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch Biochem Biophys*. 15 nov 1993;307(1):96-103.
231. Balla G, Vercellotti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS. Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. mai 1991;64(5):648-55.

232. Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*. 1 août 2002;100(3):879-87.
233. Chou AC, Fitch CD. Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX. *J Clin Invest*. sept 1981;68(3):672-7.
234. Ghosh S, Adisa OA, Chappa P, Tan F, Jackson KA, Archer DR, et al. Extracellular heme crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice. *J Clin Invest*. nov 2013;123(11):4809-20.
235. Wagener FA, Feldman E, de Witte T, Abraham NG. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. déc 1997;216(3):456-63.
236. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*. 2001;98(6):1802-1811.
237. Green D, Furby FH, Berndt MC. The interaction of the factor VIII/von Willebrand factor complex with hematin. *Thromb Haemost*. 15 déc 1986;56(3):277-82.
238. Vallelian F, Schaer CA, Deuel JW, Ingoglia G, Humar R, Buehler PW, et al. Revisiting the putative role of heme as a trigger of inflammation. *Pharmacol Res Perspect*. 2018;6(2):e00392.
239. Dimitrov JD, Ivanovska ND, Lacroix-Desmazes S, Doltchinkova VR, Kaveri SV, Vassilev TL. Ferrous ions and reactive oxygen species increase antigen-binding and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G. *J Biol Chem*. 6 janv 2006;281(1):439-46.
240. Dimitrov JD, Roumenina LT, Doltchinkova VR, Vassilev TL. Iron ions and haeme modulate the binding properties of complement subcomponent C1q and of immunoglobulins. *Scand J Immunol*. mars 2007;65(3):230-9.
241. Roumenina LT, Radanova M, Atanasov BP, Popov KT, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S, et al. Heme interacts with c1q and inhibits the classical complement pathway. *J Biol Chem*. 6 mai 2011;286(18):16459-69.
242. Smith DJ, Winslow RM. Effects of extraerythrocytic hemoglobin and its components on mononuclear cell procoagulant activity. *J Lab Clin Med*. févr 1992;119(2):176-82.
243. Waitumbi JN, Opollo MO, Muga RO, Misore AO, Stoute JA. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe plasmodium falciparum anemia. *Blood*. 15 févr 2000;95(4):1481-6.
244. Stoute JA, Odindo AO, Owuor BO, Mibei EK, Opollo MO, Waitumbi JN. Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia. *J Infect Dis*. 1 févr 2003;187(3):522-5.
245. Stoute JA. Complement-regulatory proteins in severe malaria: too little or too much of a good thing? *Trends Parasitol*. mai 2005;21(5):218-23.
246. Abdalla S, Weatherall DJ. The direct antiglobulin test in *P. falciparum* malaria. *Br J Haematol*. juill 1982;51(3):415-25.

247. Goka BQ, Kwarko H, Kurtzhals JAL, Gyan B, Ofori-Adjei E, Ohene SA, et al. Complement binding to erythrocytes is associated with macrophage activation and reduced haemoglobin in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 sept 2001;95(5):545-9.
248. Stanley HA, Mayes JT, Cooper NR, Reese RT. Complement activation by the surface of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Immunol.* févr 1984;21(2):145-50.
249. Sharma S, Kumar G, Vashishta M, Pandey R, Rathore S, Chourasia BK, et al. Biochemical characterization of *Plasmodium* Complement Factors Binding Protein for its role in immune modulation. *Biochem J.* 26 juill 2018;
250. Del Conde I, Cruz MA, Zhang H, López JA, Afshar-Kharghan V. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J Exp Med.* 21 mars 2005;201(6):871-9.
251. Merle NS, Grunenwald A, Rajaratnam H, Gnemmi V, Frimat M, Figueres M-L, et al. Intravascular hemolysis activates complement via cell-free heme and heme-loaded microvesicles. *JCI Insight* [Internet]. 21 juin 2018 [cité 28 juin 2018];3(12). Disponible sur: <https://insight.jci.org/articles/view/96910>
252. Berger J. Phenylhydrazine haematotoxicity. *J Appl Biomed.* 2007;125-30.
253. Gołab J, Olszewska D, Mróz P, Kozar K, Kamiński R, Jalili A, et al. Erythropoietin restores the antitumor effectiveness of photodynamic therapy in mice with chemotherapy-induced anemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* mai 2002;8(5):1265-70.
254. Lenox LE, Perry JM, Paulson RF. BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood.* 1 avr 2005;105(7):2741-8.
255. Rodriguez F, Kemp R, Balazy M, Nasjletti A. Effects of exogenous heme on renal function: role of heme oxygenase and cyclooxygenase. *Hypertens Dallas Tex* 1979. oct 2003;42(4):680-4.
256. Nath KA, Balla J, Croatt AJ, Vercellotti GM. Heme protein-mediated renal injury: a protective role for 21-aminosteroids in vitro and in vivo. *Kidney Int.* févr 1995;47(2):592-602.
257. Gonzalez-Michaca L, Farrugia G, Croatt AJ, Alam J, Nath KA. Heme: a determinant of life and death in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* févr 2004;286(2):F370-377.
258. Tabibzadeh N, Estournet C, Placier S, Perez J, Bilbault H, Girshovich A, et al. Plasma heme-induced renal toxicity is related to a capillary rarefaction. *Sci Rep.* 10 2017;7:40156.
259. Nath KA, Vercellotti GM, Grande JP, Miyoshi H, Paya CV, Manivel JC, et al. Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int.* janv 2001;59(1):106-17.
260. Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(20):10925–10930.
261. Nath KA, Belcher JD, Nath MC, Grande JP, Croatt AJ, Ackerman AW, et al. Role of TLR4 signaling in the nephrotoxicity of heme and heme proteins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1 mai 2018;314(5):F906-14.

262. Nakajima H. Studies on Heme α -Methenyl Oxygenase II. THE ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE FINAL REACTION PRODUCT, A POSSIBLE PRECURSOR OF BILIVERDIN. *J Biol Chem.* 11 janv 1963;238(11):3797-801.
263. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* oct 1968;61(2):748-55.
264. Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem.* 5 janv 1986;261(1):411-9.
265. Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. *J Biol Chem.* 25 août 1986;261(24):11131-7.
266. Kutty RK, Maines MD. Characterization of an NADH-dependent haem-degrading system in ox heart mitochondria. *Biochem J.* 1 sept 1987;246(2):467-74.
267. Cruse I, Maines MD. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J Biol Chem.* 3 mai 1988;263(7):3348-53.
268. Abraham NG, Rezzani R, Rodella L, Kruger A, Taller D, Li Volti G, et al. Overexpression of human heme oxygenase-1 attenuates endothelial cell sloughing in experimental diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* déc 2004;287(6):H2468-2477.
269. Docherty JC, Firneisz GD, Schacter BA. Methene bridge carbon atom elimination in oxidative heme degradation catalyzed by heme oxygenase and NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Arch Biochem Biophys.* déc 1984;235(2):657-64.
270. Montellano PR. The mechanism of heme oxygenase. *Curr Opin Chem Biol.* avr 2000;4(2):221-7.
271. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature.* 11 janv 2001;409(6817):198-201.
272. Hvidberg V, Maniecki MB, Jacobsen C, Højrup P, Møller HJ, Moestrup SK. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood.* 1 oct 2005;106(7):2572-9.
273. Chen X-L, Varner SE, Rao AS, Grey JY, Thomas S, Cook CK, et al. Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *J Biol Chem.* 10 janv 2003;278(2):703-11.
274. Fledderus JO, Boon RA, Volger OL, Hurttala H, Ylä-Herttua S, Pannekoek H, et al. KLF2 primes the antioxidant transcription factor Nrf2 for activation in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juill 2008;28(7):1339-46.
275. Kassovska-Bratinova S, Yang G, Igarashi K, Dennery PA. Bach1 modulates heme oxygenase-1 expression in the neonatal mouse lung. *Pediatr Res.* févr 2009;65(2):145-9.
276. Schmidt WN, Mathahs MM, Zhu Z. Heme and HO-1 Inhibition of HCV, HBV, and HIV. *Front Pharmacol* [Internet]. 2012 [cité 31 août 2018];3. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2012.00129/full>

277. Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest.* 1 janv 1999;103(1):129-35.
278. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 27 févr 1987;235(4792):1043-6.
279. Gopinathan V, Miller NJ, Milner AD, Rice-Evans CA. Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS Lett.* 1 août 1994;349(2):197-200.
280. Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC, James BC, Vincent GM, Williams RR. Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* févr 1996;16(2):250-5.
281. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med.* 2 oct 2000;192(7):1015-26.
282. Bussolati B, Ahmed A, Pemberton H, Landis RC, Carlo FD, Haskard DO, et al. Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration. *Blood.* 1 févr 2004;103(3):761-6.
283. Mason JC, Steinberg R, Lidington EA, Kinderlerer AR, Ohba M, Haskard DO. Decay-accelerating factor induction on vascular endothelium by vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via a VEGF receptor-2 (VEGF-R2)- and protein kinase C-alpha/epsilon (PKCalpha/epsilon)-dependent cytoprotective signaling pathway and is inhibited by cyclosporin A. *J Biol Chem.* 1 oct 2004;279(40):41611-8.
284. Nakagami T, Toyomura K, Kinoshita T, Morisawa S. A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *Biochim Biophys Acta.* 3 oct 1993;1158(2):189-93.
285. Detsika MG, Duann P, Atsaves V, Papalois A, Lianos EA. Heme Oxygenase 1 Up-Regulates Glomerular Decay Accelerating Factor Expression and Minimizes Complement Deposition and Injury. *Am J Pathol.* nov 2016;186(11):2833-45.
286. Gburek J, Verroust PJ, Willnow TE, Fyfe JC, Nowacki W, Jacobsen C, et al. Megalin and Cubilin are Endocytic Receptors Involved in Renal Clearance of Hemoglobin. *J Am Soc Nephrol.* 2 janv 2002;13(2):423-30.
287. Yang Y, Ohta K, Shimizu M, Morimoto K, Goto C, Nakai A, et al. Selective protection of renal tubular epithelial cells by heme oxygenase (HO)-1 during stress-induced injury. *Kidney Int.* oct 2003;64(4):1302-9.
288. Yorke W, Nauss RW. The Mechanism of the Production of Suppression of Urine in Blackwater Fever. *Ann Trop Med Parasitol.* 1 août 1911;5(2):287-312.
289. Baker SL, Dodds EC. Obstruction of the Renal Tubules during the Excretion of Hæmoglobin. *Br J Exp Pathol.* oct 1925;6(5):247-60.
290. Harrison HE, Bunting H, Ordway NK, Albrink WS. The Pathogenesis of the Renal Injury Produced in the Dog by Hemoglobin or Methemoglobin. *J Exp Med.* 1 oct 1947;86(4):339-56.

291. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet Lond Engl.* 12 janv 2013;381(9861):142-51.
292. Renaudier P. [Sickle cell pathophysiology]. *Transfus Clin Biol J Soc Francaise Transfus Sang.* nov 2014;21(4-5):178-81.
293. Nath KA, Katusic ZS, Gladwin MT. The perfusion paradox and vascular instability in sickle cell disease. *Microcirc N Y N* 1994. mars 2004;11(2):179-93.
294. Belhassen L, Pelle G, Sediame S, Bachir D, Carville C, Bucherer C, et al. Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. *Blood.* 15 mars 2001;97(6):1584-9.
295. Audard V, Moutereau S, Vandemelebrouck G, Habibi A, Khellaf M, Grimbert P, et al. First evidence of subclinical renal tubular injury during sickle-cell crisis. *Orphanet J Rare Dis.* 29 avr 2014;9:67.
296. Wang RH, Phillips G, Medof ME, Mold C. Activation of the alternative complement pathway by exposure of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine on erythrocytes from sickle cell disease patients. *J Clin Invest.* sept 1993;92(3):1326-35.
297. Test ST, Woolworth VS. Defective regulation of complement by the sickle erythrocyte: evidence for a defect in control of membrane attack complex formation. *Blood.* 1 févr 1994;83(3):842-52.
298. Mold C, Tamerius JD, Phillips G. Complement activation during painful crisis in sickle cell anemia. *Clin Immunol Immunopathol.* sept 1995;76(3 Pt 1):314-20.
299. van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol.* nov 2006;22(11):503-8.
300. Fernandez V, Treutiger CJ, Nash GB, Wahlgren M. Multiple adhesive phenotypes linked to rosetting binding of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* juin 1998;66(6):2969-75.
301. Barber BE, Grigg MJ, Piera KA, William T, Cooper DJ, Plewes K, et al. Intravascular haemolysis in severe *Plasmodium knowlesi* malaria: association with endothelial activation, microvascular dysfunction, and acute kidney injury. *Emerg Microbes Infect.* 6 juin 2018;7(1):106.
302. Wenisch C, Spitzauer S, Florris-Linau K, Rumpold H, Vannaphan S, Parschalk B, et al. Complement activation in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Immunol Immunopathol.* nov 1997;85(2):166-71.
303. Patel SN, Berghout J, Lovegrove FE, Ayi K, Conroy A, Serghides L, et al. C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria. *J Exp Med.* 12 mai 2008;205(5):1133-43.
304. Dasari P, Heber SD, Beisele M, Torzewski M, Reifenberg K, Orning C, et al. Digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* released during erythrocyte rupture dually activates complement and coagulation. *Blood.* 3 mai 2012;119(18):4301-10.

305. Holmberg V, Onkamo P, Lahtela E, Lahermo P, Bedu-Addo G, Mockenhaupt FP, et al. Mutations of complement lectin pathway genes MBL2 and MASP2 associated with placental malaria. *Malar J.* 2 mars 2012;11:61.
306. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell.* 20 oct 2016;167(3):610-24.
307. Fairhurst RM, Baruch DI, Brittain NJ, Ostera GR, Wallach JS, Hoang HL, et al. Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria. *Nature.* 23 juin 2005;435(7045):1117-21.
308. Garcia-Carrasco M, Mendoza-Pinto C, Macias-Diaz S, Vazquez de Lara F, Etchegaray-Morales I, Galvez-Romero JL, et al. The role of infectious diseases in the catastrophic antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev.* nov 2015;14(11):1066-71.
309. Barratt-Due A, Fløisand Y, Orrem HL, Kvam AK, Holme PA, Bergseth G, et al. Complement activation is a crucial pathogenic factor in catastrophic antiphospholipid syndrome. *Rheumatol Oxf Engl.* juill 2016;55(7):1337-9.
310. Demyanova KA, Kozlovskaya NL, Bobrova LA, Kozlov LV, Andina SS, Yurova VA, et al. Complement System Abnormalities in Patients with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and Catastrophic Antiphospholipid Syndrome. *Vestn Ross Akad Med Nauk.* 2017;72(1):42-52.
311. Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, Liu X, Espinola RG, Salmon J. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum.* juill 2005;52(7):2120-4.
312. Romay-Penabad Z, Liu X X, Montiel-Manzano G, De Martinez EP, Pierangeli SS. C5a Receptor-Deficient Mice Are Protected from Thrombophilia and Endothelial Cell Activation Induced by Some Antiphospholipid Antibodies. *Ann N Y Acad Sci.* 1 juin 2007;1108(1):554-66.
313. Hachulla É. La crise rénale sclérodermique. *Réanimation.* 1 nov 2014;23(6):653-8.
314. Mouthon L, Bérezné A, Bussone G, Noël L-H, Villiger PM, Guillevin L. Scleroderma renal crisis: a rare but severe complication of systemic sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* avr 2011;40(2):84-91.
315. Ramirez GA, Franchini S, Rovere-Querini P, Sabbadini MG, Manfredi AA, Maugeri N. The role of platelets in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Front Immunol [Internet].* 18 juin 2012;3. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3376452/>
316. Teixeira L, Mouthon L, Mahr A, Berezné A, Agard C, Mehrenberger M, et al. Mortality and risk factors of scleroderma renal crisis: a French retrospective study of 50 patients. *Ann Rheum Dis.* janv 2008;67(1):110-6.
317. Batal I, Domsic RT, Shafer A, Medsger TA, Kiss LP, Randhawa P, et al. Renal biopsy findings predicting outcome in scleroderma renal crisis. *Hum Pathol.* mars 2009;40(3):332-40.
318. Okrój M, Johansson M, Saxne T, Blom AM, Hesselstrand R. Analysis of complement biomarkers in systemic sclerosis indicates a distinct pattern in scleroderma renal crisis. *Arthritis Res Ther.* 18 2016;18(1):267.

319. Devresse A, Aydin S, Le Quintrec M, Demoulin N, Stordeur P, Lambert C, et al. Complement activation and effect of eculizumab in scleroderma renal crisis. *Medicine (Baltimore)*. juill 2016;95(30):e4459.
320. Thomas CP, Nester CM, Phan AC, Sharma M, Steele AL, Lenert PS. Eculizumab for rescue of thrombotic microangiopathy in PM-Scl antibody-positive autoimmune overlap syndrome. *Clin Kidney J*. déc 2015;8(6):698-701.
321. Weatherall DJ. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood*. 3 juin 2010;115(22):4331-6.
322. Taher AT, Musallam KM, Cappellini MD, Weatherall DJ. Optimal management of β thalassaemia intermedia. *Br J Haematol*. mars 2011;152(5):512-23.
323. Musallam KM, Taher AT. Mechanisms of renal disease in β -thalassemia. *J Am Soc Nephrol JASN*. août 2012;23(8):1299-302.
324. Ponticelli C, Musallam KM, Cianciulli P, Cappellini MD. Renal complications in transfusion-dependent beta thalassaemia. *Blood Rev*. nov 2010;24(6):239-44.
325. Sumboonnanonda A, Sanpakit K, Piyaphanee N. Renal tubule function in beta-thalassemia after hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Nephrol*. 1 janv 2009;24(1):183.
326. Landing BH, Gonick HC, Nadorra RL, Hyman CB, Wells TR, Villarreal-Engelhardt G, et al. Renal lesions and clinical findings in thalassemia major and other chronic anemias with hemosiderosis. *Pediatr Pathol*. 1989;9(5):479-500.
327. Davis LE, Hohimer AR. Hemodynamics and organ blood flow in fetal sheep subjected to chronic anemia. *Am J Physiol*. déc 1991;261(6 Pt 2):R1542-1548.
328. Lafferty HM, Anderson S, Brenner BM. Anemia: a potent modulator of renal hemodynamics in models of progressive renal disease. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. mai 1991;17(5 Suppl 1):2-7.
329. Cappellini MD, Porter JB, Musallam KM, Kattamis A, Viprakasit V, Galanello R, et al. Development of a new disease severity scoring system for patients with non-transfusion-dependent thalassemia. *Eur J Intern Med*. 1 mars 2016;28:91-6.
330. Chapin J, Terry HS, Kleinert D, Laurence J. The role of complement activation in thrombosis and hemolytic anemias. *Transfus Apher Sci*. avr 2016;54(2):191-8.
331. Ghafourian M, Esmaili M, Dashti-Gerdabi N, Sadeghi A, Malekei Naseri A, Kazemi A. Evaluation of serum levels of C3 and C4 complement factors in patients with beta thalassemia major in Khuzestan Province, Southwest Iran. *J Immunoassay Immunochem*. 2017;38(6):629-38.
332. Obaid JMAS, El-Nazar SYA, Ghanem AM, El-Hadidi AS, Mersal BHM. Expression of CD55 on Red Blood Cells of β -Thalassemia Patients. *Hemoglobin*. 1 oct 2014;38(5):339-44.
333. Gavriilaki E, Christodoulou I, Koravou E-E, Paleta A, Koutra M, Zerva P, et al. Pre- and Post-transfusion Complement Activation in Transfusion-dependent β -thalassaemia. *HemaSphere* [Internet]. 13 août 2018 [cité 30 août 2018];Latest Articles. Disponible sur:

https://journals.lww.com/hemasphere/Citation/latest/Pre__and_Post_transfusion_Complement_Activation_in.99961.aspx

334. Daroux M, Prévost G, Maillard-Lefebvre H, Gaxatte C, D'Agati VD, Schmidt AM, et al. Advanced glycation end-products: implications for diabetic and non-diabetic nephropathies. *Diabetes Metab.* févr 2010;36(1):1-10.
335. Frimat M, Daroux M, Litke R, Nevière R, Tessier FJ, Boulanger E. Kidney, heart and brain: three organs targeted by ageing and glycation. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 1 juin 2017;131(11):1069-92.
336. Teissier T, Quersin V, Gnemmi V, Daroux M, Howaam M, Delguste F, et al. Knock-out of receptor or advanced glycation end-products (RAGE) attenuates age-related renal lesions, *IN PRESS. Aging Cell.* 2018;
337. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* sept 1985;82(17):5588-92.
338. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem.* 25 juill 1992;267(21):14987-97.
339. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res.* 19 mars 1999;84(5):489-97.
340. Boulanger E, Wautier M-P, Wautier J-L, Boval B, Panis Y, Wernert N, et al. AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression. *Kidney Int.* janv 2002;61(1):148-56.
341. Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* sept 2010;65(9):963-75.
342. Yatime L, Andersen GR. Structural insights into the oligomerization mode of the human receptor for advanced glycation end-products. *FEBS J.* déc 2013;280(24):6556-68.
343. Dattilo BM, Fritz G, Leclerc E, Kooi CWV, Heizmann CW, Chazin WJ. The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry.* 12 juin 2007;46(23):6957-70.
344. Koch M, Chitayat S, Dattilo BM, Schiefner A, Diez J, Chazin WJ, et al. Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. *Struct Lond Engl* 1993. 13 oct 2010;18(10):1342-52.
345. Xue J, Rai V, Frolov S, Singer D, Chabierski S, Xie J, et al. Advanced glycation end product (AGE) recognition by the receptor for AGEs (RAGE). *Struct Lond Engl* 1993. 11 mai 2011;19(5):722-32.
346. Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, Gee AD. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem.* 14 sept 2017;60(17):7213-32.

347. Xie J, Reverdatto S, Frolov A, Hoffmann R, Burz DS, Shekhtman A. Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem*. 3 oct 2008;283(40):27255-69.
348. Xue J, Ray R, Singer D, Böhme D, Burz DS, Rai V, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) specifically recognizes methylglyoxal-derived AGEs. *Biochemistry*. 27 mai 2014;53(20):3327-35.
349. Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem*. 9 juill 1999;274(28):19919-24.
350. Kosaka T, Fukui R, Matsui M, Kurosaka Y, Nishimura H, Tanabe M, et al. RAGE, receptor of advanced glycation endproducts, negatively regulates chondrocytes differentiation. *PLoS One*. 2014;9(9):e108819.
351. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J*. 15 mars 2003;370(Pt 3):1097-109.
352. Schlueter C, Hauke S, Flohr AM, Rogalla P, Bullerdiek J. Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms--a result of regulated alternative splicing? *Biochim Biophys Acta*. 20 oct 2003;1630(1):1-6.
353. Maillard-Lefebvre H, Boulanger E, Daroux M, Gaxatte C, Hudson BI, Lambert M. Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases. *Rheumatol Oxf Engl*. oct 2009;48(10):1190-6.
354. Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, et al. Receptor for Advanced Glycation End Products Is Subjected to Protein Ectodomain Shedding by Metalloproteinases. *J Biol Chem*. 19 déc 2008;283(51):35507-16.
355. Braley A, Kwak T, Jules J, Harja E, Landgraf R, Hudson BI. Regulation of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Ectodomain Shedding and Its Role in Cell Function. *J Biol Chem*. 6 mars 2016;291(23):12057-73.
356. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol*. déc 1993;143(6):1699-712.
357. Shirasawa M, Fujiwara N, Hirabayashi S, Ohno H, Iida J, Makita K, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech*. févr 2004;9(2):165-74.
358. Schraml P, Bendik I, Ludwig CU. Differential messenger RNA and protein expression of the receptor for advanced glycosylated end products in normal lung and non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res*. 1 sept 1997;57(17):3669-71.
359. Bartling B, Hofmann H-S, Weigle B, Silber R-E, Simm A. Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis*. févr 2005;26(2):293-301.

360. Ramsgaard L, Englert JM, Tobolewski J, Tomai L, Fattman CL, Leme AS, et al. The role of the receptor for advanced glycation end-products in a murine model of silicosis. *PloS One*. 19 mars 2010;5(3):e9604.
361. Ramsgaard L, Englert JM, Manni ML, Milutinovic PS, Gefter J, Tobolewski J, et al. Lack of the receptor for advanced glycation end-products attenuates *E. coli* pneumonia in mice. *PloS One*. 2011;6(5):e20132.
362. He M, Kubo H, Ishizawa K, Hegab AE, Yamamoto Y, Yamamoto H, et al. The role of the receptor for advanced glycation end-products in lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. déc 2007;293(6):L1427-1436.
363. Miller MC, Tavares R, Johanson CE, Hovanesian V, Donahue JE, Gonzalez L, et al. Hippocampal RAGE immunoreactivity in early and advanced Alzheimer's disease. *Brain Res*. 16 sept 2008;1230:273-80.
364. Abel M, Ritthaler U, Zhang Y, Deng Y, Schmidt AM, Greten J, et al. Expression of receptors for advanced glycosylated end-products in renal disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 1995;10(9):1662-7.
365. Son M, Chung W-J, Oh S, Ahn H, Choi CH, Hong S, et al. Age dependent accumulation patterns of advanced glycation end product receptor (RAGE) ligands and binding intensities between RAGE and its ligands differ in the liver, kidney, and skeletal muscle. *Immun Ageing A*. 2017;14:12.
366. Tessier FJ. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol Biol (Paris)*. juin 2010;58(3):214-9.
367. Wautier M-P, Tessier FJ, Wautier J-L. Les produits de glycation avancée : un risque pour la santé humaine. *Ann Pharm Fr*. nov 2014;72(6):400-8.
368. Méndez JD, Xie J, Aguilar-Hernández M, Méndez-Valenzuela V. Trends in advanced glycation end products research in diabetes mellitus and its complications. *Mol Cell Biochem*. août 2010;341(1-2):33-41.
369. Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem*. 15 avr 1986;261(11):4889-94.
370. Tessier FJ, Niquet-Léridon C, Jacolot P, Jouquand C, Genin M, Schmidt A-M, et al. Quantitative assessment of organ distribution of dietary protein-bound ¹³C-labeled N^ε-carboxymethyllysine after a chronic oral exposure in mice. *Mol Nutr Food Res*. nov 2016;60(11):2446-56.
371. Araki N, Higashi T, Mori T, Shibayama R, Kawabe Y, Kodama T, et al. Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur J Biochem*. 1 juin 1995;230(2):408-15.
372. Thornalley PJ. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr*. nov 1998;44(7):1013-23.

373. Jono T, Miyazaki A, Nagai R, Sawamura T, Kitamura T, Horiuchi S. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). *FEBS Lett.* 30 janv 2002;511(1-3):170-4.
374. Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, et al. CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products. *Ann N Y Acad Sci.* déc 2001;947:350-5.
375. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system. *J Biol Chem.* 27 oct 1995;270(43):25752-61.
376. Penumutthu SR, Chou R-H, Yu C. Structural insights into calcium-bound S100P and the V domain of the RAGE complex. *PloS One.* 2014;9(8):e103947.
377. Leclerc E, Fritz G, Weibel M, Heizmann CW, Galichet A. S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains. *J Biol Chem.* 26 oct 2007;282(43):31317-31.
378. Turovskaya O, Foell D, Sinha P, Vogl T, Newlin R, Nayak J, et al. RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1 oct 2008;29(10):2035-43.
379. Katte R, Yu C. Blocking the interaction between S100A9 protein and RAGE V domain using S100A12 protein. *PloS One.* 2018;13(6):e0198767.
380. Huang Y-K, Chou R-H, Yu C. Tranilast Blocks the Interaction between the Protein S100A11 and Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) V Domain and Inhibits Cell Proliferation. *J Biol Chem.* 1 juill 2016;291(27):14300-10.
381. Xie J, Burz DS, He W, Bronstein IB, Lednev I, Shekhtman A. Hexameric calgranulin C (S100A12) binds to the receptor for advanced glycation end products (RAGE) using symmetric hydrophobic target-binding patches. *J Biol Chem.* 9 févr 2007;282(6):4218-31.
382. Rani SG, Sepuru KM, Yu C. Interaction of S100A13 with C2 domain of receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Biochim Biophys Acta.* sept 2014;1844(9):1718-28.
383. Sousa MM, Yan SD, Stern D, Saraiva MJ. Interaction of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) with transthyretin triggers nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) activation. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* juill 2000;80(7):1101-10.
384. Deane R, Singh I, Sagare AP, Bell RD, Ross NT, LaRue B, et al. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* avr 2012;122(4):1377-92.
385. Abedini A, Cao P, Plesner A, Zhang J, He M, Derk J, et al. RAGE binds preamyloid IAPP intermediates and mediates pancreatic β cell proteotoxicity. *J Clin Invest.* 1 févr 2018;128(2):682-98.
386. Guo ZJ, Niu HX, Hou FF, Zhang L, Fu N, Nagai R, et al. Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway. *Antioxid Redox Signal.* oct 2008;10(10):1699-712.

387. He M, Kubo H, Morimoto K, Fujino N, Suzuki T, Takahasi T, et al. Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO Rep.* 1 avr 2011;12(4):358-64.
388. Serratos IN, Castellanos P, Pastor N, Millán-Pacheco C, Rembao D, Pérez-Montfort R, et al. Modeling the interaction between quinolinate and the receptor for advanced glycation end products (RAGE): relevance for early neuropathological processes. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120221.
389. Murakami Y, Fujino T, Kurachi R, Hasegawa T, Usui T, Hayase F, et al. Identification of pyridinoline, a collagen crosslink, as a novel intrinsic ligand for the receptor for advanced glycation end-products (RAGE). *Biosci Biotechnol Biochem.* 26 mai 2018;0(0):1-7.
390. Buyannemekh D, Nham S-U. Characterization of α X I-Domain Binding to Receptors for Advanced Glycation End Products (RAGE). *Mol Cells.* 31 mai 2017;40(5):355-62.
391. Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Motoyoshi S, et al. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 mars 2011;186(5):3248-57.
392. Rai V, Touré F, Chitayat S, Pei R, Song F, Li Q, et al. Lysophosphatidic acid targets vascular and oncogenic pathways via RAGE signaling. *J Exp Med.* 17 déc 2012;209(13):2339-50.
393. Somensi N, Brum PO, de Miranda Ramos V, Gasparotto J, Zanotto-Filho A, Rostirolla DC, et al. Extracellular HSP70 Activates ERK1/2, NF- κ B and Pro-Inflammatory Gene Transcription Through Binding with RAGE in A549 Human Lung Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2017;42(6):2507-22.
394. Ma W, Rai V, Hudson BI, Song F, Schmidt AM, Barile GR. RAGE binds C1q and enhances C1q-mediated phagocytosis. *Cell Immunol.* 2012;274(1-2):72-82.
395. Hudson BI, Kalea AZ, Del Mar Arriero M, Harja E, Boulanger E, D'Agati V, et al. Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem.* 5 déc 2008;283(49):34457-68.
396. Lin Y-N, Windhorst S. Diaphanous-related formin 1 as a target for tumor therapy. *Biochem Soc Trans.* 15 oct 2016;44(5):1289-93.
397. Touré F, Fritz G, Li Q, Rai V, Daffu G, Zou YS, et al. Formin mDia1 mediates vascular remodeling via integration of oxidative and signal transduction pathways. *Circ Res.* 11 mai 2012;110(10):1279-93.
398. Rai V, Maldonado AY, Burz DS, Reverdatto S, Yan SF, Schmidt AM, et al. Signal transduction in receptor for advanced glycation end products (RAGE): solution structure of C-terminal rAge (ctRAGE) and its binding to mDia1. *J Biol Chem.* 10 févr 2012;287(7):5133-44.
399. Manigrasso MB, Pan J, Rai V, Zhang J, Reverdatto S, Quadri N, et al. Small Molecule Inhibition of Ligand-Stimulated RAGE-DIAPH1 Signal Transduction. *Sci Rep.* 3 mars 2016;6:22450.
400. Xu Y, Toure F, Qu W, Lin L, Song F, Shen X, et al. Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling and Up-regulation of Egr-1 in Hypoxic Macrophages. *J Biol Chem.* 23 juill 2010;285(30):23233-40.

401. Peng J, Wallar BJ, Flanders A, Swiatek PJ, Alberts AS. Disruption of the Diaphanous-Related Formin Drf1 Gene Encoding mDia1 Reveals a Role for Drf3 as an Effector for Cdc42. *Curr Biol.* 1 avr 2003;13(7):534-45.
402. Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S, Nakajima M, Kasaoka T. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS Lett.* 28 août 2003;550(1-3):107-13.
403. Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the Receptor for Advanced Glycation End Products Triggers a p21 ras -dependent Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Regulated by Oxidant Stress. *J Biol Chem.* 7 nov 1997;272(28):17810-4.
404. Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, et al. TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. *PLoS One.* 2011;6(8):e23132.
405. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response--the evidence mounts. *J Leukoc Biol.* sept 2009;86(3):505-12.
406. Li J, Schmidt AM. Characterization and Functional Analysis of the Promoter of RAGE, the Receptor for Advanced Glycation End Products. *J Biol Chem.* 27 juin 1997;272(26):16498-506.
407. Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes.* janv 2010;59(1):249-55.
408. Constien R, Forde A, Liliensiek B, Gröne HJ, Nawroth P, Hämmerling G, et al. Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line. *Genes N Y N* 2000. mai 2001;30(1):36-44.
409. Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol.* juill 2013;94(1):55-68.
410. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* janv 2007;8(1):49-62.
411. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem.* 4 janv 1994;269(13):9889-97.
412. Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov.* déc 2002;1(12):939-50.
413. Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjercke RJ, et al. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes.* juin 2001;50(6):1495-504.
414. Harja E, Bu D, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, et al. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *J Clin Invest.* janv 2008;118(1):183-94.

415. Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiol Aging*. avr 2010;31(4):665-77.
416. Qin Q, Niu J, Wang Z, Xu W, Qiao Z, Gu Y. Heparanase induced by advanced glycation end products (AGEs) promotes macrophage migration involving RAGE and PI3K/AKT pathway. *Cardiovasc Diabetol*. 26 févr 2013;12:37.
417. Xu D, Kyriakis JM. Phosphatidylinositol 3'-Kinase-dependent Activation of Renal Mesangial Cell Ki-Ras and ERK by Advanced Glycation End Products. *J Biol Chem*. 10 oct 2003;278(41):39349-55.
418. Chen Q, Dong L, Wang L, Kang L, Xu B. Advanced glycation end products impair function of late endothelial progenitor cells through effects on protein kinase Akt and cyclooxygenase-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 3 avr 2009;381(2):192-7.
419. HU P, LAI D, LU P, GAO J, HE H. ERK and Akt signaling pathways are involved in advanced glycation end product-induced autophagy in rat vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med*. avr 2012;29(4):613-8.
420. Hou X, Hu Z, Xu H, Xu J, Zhang S, Zhong Y, et al. Advanced glycation endproducts trigger autophagy in cardiomyocyte Via RAGE/PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cardiovasc Diabetol*. 14 avr 2014;13(1):78.
421. Cai Z, Liu N, Wang C, Qin B, Zhou Y, Xiao M, et al. Role of RAGE in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol*. mai 2016;36(4):483-95.
422. Xia W, Xu Y, Mao Q, Dong G, Shi R, Wang J, et al. Association of RAGE polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 27 studies. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. févr 2015;32(2):442.
423. Hofmann MA, Drury S, Hudson BI, Gleason MR, Qu W, Lu Y, et al. RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. *Genes Immun*. mai 2002;3(3):123-35.
424. Park M-J, Lee SH, Moon S-J, Lee J-A, Lee E-J, Kim E-K, et al. Overexpression of soluble RAGE in mesenchymal stem cells enhances their immunoregulatory potential for cellular therapy in autoimmune arthritis. *Sci Rep*. 02 2016;6:35933.
425. Mahajan N, Mahmood S, Jain S, Dhawan V. Receptor for advanced glycation end products (RAGE), inflammatory ligand EN-RAGE and soluble RAGE (sRAGE) in subjects with Takayasu's arteritis. *Int J Cardiol*. 20 sept 2013;168(1):532-4.
426. Boulanger E, Puisieux F, Gaxatte C, Wautier J-L. Vieillesse: rôle et contrôle de la glycation. *Rev Médecine Interne*. déc 2007;28(12):832-40.
427. Collins AJ, Foley RN, Gilbertson DT, Chen S-C. United States Renal Data System public health surveillance of chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl*. juin 2015;5(1):2-7.
428. Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, et al. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol JASN*. sept 2000;11(9):1656-66.

429. Yamamoto Y, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, Takeuchi M, et al. Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *J Clin Invest.* juill 2001;108(2):261-8.
430. Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y, et al. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol.* avr 2003;162(4):1123-37.
431. Fukami K, Cooper ME, Forbes JM. Agents in development for the treatment of diabetic nephropathy. *Expert Opin Investig Drugs.* mars 2005;14(3):279-94.
432. Fukami K, Yamagishi S, Coughlan MT, Harcourt BE, Kantharidis P, Thallas-Bonke V, et al. Ramipril inhibits AGE-RAGE-induced matrix metalloproteinase-2 activation in experimental diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr* [Internet]. 13 août 2014;6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4138378/>
433. Flyvbjerg A, Denner L, Schrijvers BF, Tilton RG, Mogensen TH, Paludan SR, et al. Long-term renal effects of a neutralizing RAGE antibody in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes.* janv 2004;53(1):166-72.
434. Myint K-M, Yamamoto Y, Doi T, Kato I, Harashima A, Yonekura H, et al. RAGE control of diabetic nephropathy in a mouse model: effects of RAGE gene disruption and administration of low-molecular weight heparin. *Diabetes.* sept 2006;55(9):2510-22.
435. Reiniger N, Lau K, McCalla D, Eby B, Cheng B, Lu Y, et al. Deletion of the Receptor for Advanced Glycation End Products Reduces Glomerulosclerosis and Preserves Renal Function in the Diabetic OVE26 Mouse. *Diabetes.* 1 août 2010;59(8):2043-54.
436. Touré F, Zahm J-M, Garnotel R, Lambert E, Bonnet N, Schmidt AM, et al. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) modulates neutrophil adhesion and migration on glycosylated extracellular matrix. *Biochem J.* 1 déc 2008;416(2):255-61.
437. Prevost G, Fajardy I, Besmond C, Balkau B, Tichet J, Fontaine P, et al. Polymorphisms of the Receptor of Advanced Glycation Endproducts (RAGE) and the development of nephropathy in type 1 diabetic patients. */data/revues/12623636/00310001/35/* [Internet]. 17 févr 2008 [cité 1 sept 2018]; Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/en/article/80351>
438. Kang P, Tian C, Jia C. Association of RAGE gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus, diabetic retinopathy and diabetic nephropathy. *Gene.* 25 mai 2012;500(1):1-9.
439. Hocine A, Belmokhtar K, Bauley K, Jaisson S, Gaha K, Oubaya N, et al. Serum and Tissue Accumulation of Advanced Glycation End-Products Correlates with Vascular Changes. *Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial.* 2015;35(5):592-4.
440. Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, Huisman RJ, Links TP, den Hollander NC, et al. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol JASN.* déc 2005;16(12):3687-93.
441. Couppe C, Dall CH, Svensson RB, Olsen RH, Karlsen A, Praet S, et al. Skin autofluorescence is associated with arterial stiffness and insulin level in endurance runners and healthy controls - Effects of aging and endurance exercise. *Exp Gerontol.* 2017;91:9-14.

442. Kim JJ, Jeong B, Cho Y, Kwon M, Lee Y, Kang U, et al. The association between skin auto-fluorescence of palmoplantar sites and microvascular complications in Asian patients with type 2 diabetes mellitus. *Sci Rep [Internet]*. 20 avr 2018 [cité 1 sept 2018];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5910431/>
443. Belmokhtar K, Robert T, Ortilon J, Braconnier A, Vuiblet V, Boulagnon-Rombi C, et al. Signaling of Serum Amyloid A Through Receptor for Advanced Glycation End Products as a Possible Mechanism for Uremia-Related Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(5):800-9.
444. Khakurel S, Agrawal RK, Hada R. Pattern of end stage renal disease in a tertiary care center. *JNMA J Nepal Med Assoc*. juin 2009;48(174):126-30.
445. WANG X-C, LIU C-H, CHEN Y-J, WU Y, YANG L-S, LIU H-M, et al. Clinical and pathological analysis of the kidney in patients with hypertensive nephropathy. *Exp Ther Med*. nov 2013;6(5):1243-6.
446. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 10 nov 2000;87(10):840-4.
447. Thomas MC, Tikellis C, Burns WM, Bialkowski K, Cao Z, Coughlan MT, et al. Interactions between renin angiotensin system and advanced glycation in the kidney. *J Am Soc Nephrol JASN*. oct 2005;16(10):2976-84.
448. Matsui T, Yamagishi S-I, Takeuchi M, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Irbesartan inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced proximal tubular cell injury in vitro by suppressing receptor for AGEs (RAGE) expression. *Pharmacol Res*. janv 2010;61(1):34-9.
449. Fukami K, Yamagishi S-I, Okuda S. Role of AGEs-RAGE system in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des*. 2014;20(14):2395-402.
450. Cooke C-LM, Brockelsby JC, Baker PN, Davidge ST. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is elevated in women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2003;22(2):173-84.
451. Chekir C, Nakatsuka M, Noguchi S, Konishi H, Kamada Y, Sasaki A, et al. Accumulation of advanced glycation end products in women with preeclampsia: possible involvement of placental oxidative and nitrative stress. *Placenta*. mars 2006;27(2-3):225-33.
452. Oliver EA, Buhimschi CS, Dulay AT, Baumbusch MA, Abdel-Razeq SS, Lee SY, et al. Activation of the receptor for advanced glycation end products system in women with severe preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. mars 2011;96(3):689-98.
453. Yu Y, Hanssen KF, Kalyanaraman V, Chirindel A, Jenkins AJ, Nankervis AJ, et al. Reduced soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) scavenger capacity precedes pre-eclampsia in Type 1 diabetes. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. nov 2012;119(12):1512-20.
454. Vaughan JE, Walsh SW. Activation of NF- κ B in placentas of women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2012;31(2):243-51.
455. Vishnyakova PA, Volodina MA, Tarasova NV, Marey MV, Kan NE, Khodzhaeva ZS, et al. Alterations in antioxidant system, mitochondrial biogenesis and autophagy in preeclamptic myometrium. *BBA Clin*. déc 2017;8:35-42.

456. Hou FF, Ren H, Owen WF, Guo ZJ, Chen PY, Schmidt AM, et al. Enhanced Expression of Receptor for Advanced Glycation End Products in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 7 janv 2004;15(7):1889-96.
457. Boulanger E, Daroux M. Peritoneal aging during PD: implication of RAGE, the receptor for AGEs. *Nefrol Publicacion Of Soc Espanola Nefrol.* 2008;28 Suppl 6:5-10.
458. Boulanger E, Grossin N, Wautier M-P, Taamma R, Wautier J-L. Mesothelial RAGE activation by AGEs enhances VEGF release and potentiates capillary tube formation. *Kidney Int.* 2 janv 2007;71(2):126-33.
459. Müller-Krebs S, Kihm LP, Zeier B, Gross M-L, Wieslander A, Haug U, et al. Glucose degradation products result in cardiovascular toxicity in a rat model of renal failure. *Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial.* févr 2010;30(1):35-40.
460. Brodska H, Malickova K, Valenta J, Fabio A, Drabek T. Soluble receptor for advanced glycation end products predicts 28-day mortality in critically ill patients with sepsis. *Scand J Clin Lab Invest.* déc 2013;73(8):650-60.
461. Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci.* 6 janv 2004;101(1):296-301.
462. Lu CY, Hartono J, Senitko M, Chen J. The inflammatory response to ischemic acute kidney injury: a result of the « right stuff » in the « wrong place »? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* mars 2007;16(2):83-9.
463. Martens H, Nienhuis H, Gross S, der Steege G van, Brouwer E, Berden J, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus and disease severity in lupus nephritis
Receptor for advanced glycation end products (RAGE) polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus and disease severity in lupus nephritis. *Lupus.* 1 août 2012;21(9):959-68.
464. Röcken C, Kientsch-Engel R, Mansfeld S, Stix B, Stubenrauch K, Weigle B, et al. Advanced glycation end products and receptor for advanced glycation end products in AA amyloidosis. *Am J Pathol.* avr 2003;162(4):1213-20.
465. Anan I, Kiuru-Enari S, Obayashi K, Ranløv PJ, Ando Y. Investigation of AGE, their receptor and NF-kappaB activation and apoptosis in patients with ATTR and Gelsolin amyloidosis. *Histol Histopathol.* 2010;25(6):691-9.
466. Matsunaga N, Anan I, Rosenberg P, Nagai R, Lundström O, Horiuchi S, et al. Advanced glycation end product is implicated in amyloid-related kidney complications. *Scand J Clin Lab Invest.* 2005;65(4):263-71.
467. Park EY, Seo MJ, Park JH. Effects of specific genes activating RAGE on polycystic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2010;32(2):169-78.
468. Park EY, Kim BH, Lee EJ, Chang E, Kim DW, Choi SY, et al. Targeting of receptor for advanced glycation end products suppresses cyst growth in polycystic kidney disease. *J Biol Chem.* 28 mars 2014;289(13):9254-62.

469. Yoshizaki A, Komura K, Iwata Y, Ogawa F, Hara T, Muroi E, et al. Clinical significance of serum HMGB-1 and sRAGE levels in systemic sclerosis: association with disease severity. *J Clin Immunol.* mars 2009;29(2):180-9.
470. Davies CA, Herrick AL, Cordingley L, Freemont AJ, Jeziorska M. Expression of advanced glycation end products and their receptor in skin from patients with systemic sclerosis with and without calcinosis. *Rheumatol Oxf Engl.* août 2009;48(8):876-82.
471. Dadoniene J, Cypiene A, Ryliskyte L, Ruginiene R, Ryliškiene K, Laucevičius A. Skin Autofluorescence in Systemic Sclerosis Is Related to the Disease and Vascular Damage: A Cross-Sectional Analytic Study of Comparative Groups. *Dis Markers.* 2015;2015:837470.
472. Son M, Porat A, He M, Suurmond J, Santiago-Schwarz F, Andersson U, et al. C1q and HMGB1 reciprocally regulate human macrophage polarization. *Blood.* 03 2016;128(18):2218-28.
473. Yu SL, Wong CK, Szeto CC, Li EK, Cai Z, Tam LS. Members of the receptor for advanced glycation end products axis as potential therapeutic targets in patients with lupus nephritis. *Lupus.* juin 2015;24(7):675-86.
474. Ueda T, Rieu P, Brayer J, Arnaout MA. Identification of the complement iC3b binding site in the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25 oct 1994;91(22):10680-4.
475. Xu S, Wang J, Wang J-H, Springer TA. Distinct recognition of complement iC3b by integrins $\alpha X\beta 2$ and $\alpha M\beta 2$. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 2017;114(13):3403-8.
476. Bajic G, Yatime L, Sim RB, Vorup-Jensen T, Andersen GR. Structural insight on the recognition of surface-bound opsonins by the integrin I domain of complement receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8 oct 2013;110(41):16426-31.
477. Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. *Struct Lond Engl* 1993. 13 avr 2011;19(4):447-59.
478. Chang ZL. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* oct 2010;59(10):791-808.
479. Tian J, Avalos AM, Mao S-Y, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol.* mai 2007;8(5):487-96.
480. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock Augusta Ga.* août 2006;26(2):174-9.
481. Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* mai 2008;42(2):145-51.
482. Ma L, Sun P, Zhang J-C, Zhang Q, Yao S-L. Proinflammatory effects of S100A8/A9 via TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells. *Int J Mol Med.* juill 2017;40(1):31-8.
483. Kessel C, Fühner S, Brockmeyer S, Wittkowski H, Föll D. Hexameric S100A12 is required for pro-inflammatory TLR4-signalling. *Pediatr Rheumatol Online J.* 28 sept 2015;13(Suppl 1):O30.
484. Cheng N, He R, Tian J, Ye PP, Ye RD. Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 juill 2008;181(1):22-6.

485. Udan MLD, Ajit D, Crouse NR, Nichols MR. Toll-like receptors 2 and 4 mediate Abeta(1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *J Neurochem.* janv 2008;104(2):524-33.
486. Kovačić M, Mitrović-Ajtić O, Beleslin-Čokić B, Djikić D, Subotički T, Diklić M, et al. TLR4 and RAGE conversely mediate pro-inflammatory S100A8/9-mediated inhibition of proliferation-linked signaling in myeloproliferative neoplasms. *Cell Oncol Dordr.* 26 juin 2018;
487. Salem A, Almahmoudi R, Vehviläinen M, Salo T. Role of the high mobility group box 1 signalling axes via the receptor for advanced glycation end-products and toll-like receptor-4 in the immunopathology of oral lichen planus: a potential drug target? *Eur J Oral Sci.* juin 2018;126(3):244-8.
488. Nielsen TB, Pantapalangkoor P, Yan J, Luna BM, Dekitani K, Bruhn K, et al. Diabetes Exacerbates Infection via Hyperinflammation by Signaling through TLR4 and RAGE. *mBio* [Internet]. 22 août 2017 [cité 19 juill 2018];8(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5565964/>
489. Wang C, Wang H, Chang D-Y, Hao J, Zhao M-H, Chen M. High mobility group box 1 contributes to anti-neutrophil cytoplasmic antibody-induced neutrophils activation through receptor for advanced glycation end products (RAGE) and Toll-like receptor 4. *Arthritis Res Ther.* 18 mars 2015;17:64.
490. Regan RF, Wang Y, Ma X, Chong A, Guo Y. Activation of extracellular signal-regulated kinases potentiates heme toxicity in astrocyte cultures. *J Neurochem.* 79(3):545-55.
491. Chen N, Shao W, Lv P, Zhang S, Chen Y, Zhu L, et al. Hemin-induced Erk1/2 activation and heme oxygenase-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Free Radic Res.* 1 janv 2007;41(9):990-6.
492. Lin S, Yin Q, Zhong Q, Lv F-L, Zhou Y, Li J-Q, et al. Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage. *J Neuroinflammation.* 6 mars 2012;9:46.
493. Okinaga S, Takahashi K, Takeda K, Yoshizawa M, Fujita H, Sasaki H, et al. Regulation of human heme oxygenase-1 gene expression under thermal stress. *Blood.* 15 juin 1996;87(12):5074-84.
494. Taha H, Skrzypek K, Guevara I, Nigisch A, Mustafa S, Grochot-Przeczek A, et al. Role of heme oxygenase-1 in human endothelial cells – lesson from the promoter allelic variants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* août 2010;30(8):1634-41.
495. Nath KA. Heme oxygenase-1 and acute kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* janv 2014;23(1):17-24.
496. Guénéguou A, Leynaert B, Bénessiano J, Pin I, Demoly P, Neukirch F, et al. Association of lung function decline with the heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism in a general population sample. Results from the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS), France. *J Med Genet.* août 2006;43(8):e43.
497. Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest.* juin 2004;113(11):1641-50.

498. Kyung SY, Byun KH, Yoon JY, Kim YJ, Lee SP, Park J-W, et al. Advanced glycation end-products and receptor for advanced glycation end-products expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and NSIP. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(1):221-8.
499. Benz K, Amann K. Pathological aspects of membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN) and haemolytic uraemic syndrome (HUS) / thrombocytic thrombopenic purpura (TTP). *Thromb Haemost.* févr 2009;101(2):265-70.
500. Lusco MA, Fogo AB, Najafian B, Alpers CE. AJKD Atlas of Renal Pathology: Thrombotic Microangiopathy. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* déc 2016;68(6):e33-4.
501. Vernon KA, Ruseva MM, Cook HT, Botto M, Malik TH, Pickering MC. Partial Complement Factor H Deficiency Associates with C3 Glomerulopathy and Thrombotic Microangiopathy. *J Am Soc Nephrol JASN.* mai 2016;27(5):1334-42.
502. Lindenblatt N, Bordel R, Schareck W, Menger MD, Vollmar B. Vascular Heme Oxygenase-1 Induction Suppresses Microvascular Thrombus Formation In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 mars 2004;24(3):601-6.
503. Kang K, Nan C, Fei D, Meng X, Liu W, Zhang W, et al. Heme Oxygenase 1 Modulates Thrombomodulin and Endothelial Protein C Receptor Levels to Attenuate Septic Kidney Injury: Shock. août 2013;40(2):136-43.
504. Wong EKS, Kavanagh D. Diseases of complement dysregulation—an overview. *Semin Immunopathol.* 2018;40(1):49-64.
505. Kawasaki Y, Suyama K, Ono A, Oikawa T, Ohara S, Suzuki Y, et al. Efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin for childhood hemolytic uremic syndrome: Efficacy of rhTM for HUS. *Pediatr Int.* oct 2013;55(5):e139-42.
506. Suyama K, Kawasaki Y, Miyazaki K, Kanno S, Ono A, Ohara S, et al. The efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin for the treatment of shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome model mice. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* juin 2015;30(6):969-77.
507. Yada N, Fujioka M, Bennett CL, Inoki K, Miki T, Watanabe A, et al. STEC:O111-HUS complicated by acute encephalopathy in a young girl was successfully treated with a set of hemodiafiltration, steroid pulse, and soluble thrombomodulin under plasma exchange. *Clin Case Rep.* avr 2015;3(4):208-12.
508. Blann AD, Seigneur M, Steiner M, Boisseau MR, McCollum CN. Circulating endothelial cell markers in peripheral vascular disease: relationship to the location and extent of atherosclerotic disease. *Eur J Clin Invest.* nov 1997;27(11):916-21.
509. Morigi M, Galbusera M, Gastoldi S, Locatelli M, Buelli S, Pezzotta A, et al. Alternative Pathway Activation of Complement by Shiga Toxin Promotes Exuberant C3a Formation That Triggers Microvascular Thrombosis. *J Immunol.* 1 juill 2011;187(1):172-80.
510. Aitoufella H, Maury E, Guidet B, Offenstadt G. L'endothélium : un nouvel organe. *Réanimation.* mars 2008;17(2):126-36.

511. Mrad MF, Mouawad CA, Al-Hariri M, Eid AA, Alam J, Habib A. Statins modulate transcriptional activity of heme-oxygenase-1 promoter in NIH 3T3 Cells. *J Cell Biochem.* nov 2012;113(11):3466-75.
512. Motterlini R, Foresti R. Heme Oxygenase-1 As a Target for Drug Discovery. *Antioxid Redox Signal.* 10 avr 2014;20(11):1810-26.
513. Kimpara T, Takeda A, Watanabe K, Itoyama Y, Ikawa S, Watanabe M, et al. Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson disease. *Hum Genet.* 1 juin 1997;100(1):145-7.
514. Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med.* 15 oct 2004;37(8):1097-104.
515. Exner M, Böhmig GA, Schillinger M, Regele H, Watschinger B, Hörl WH, et al. Donor heme oxygenase-1 genotype is associated with renal allograft function. *Transplantation.* 27 févr 2004;77(4):538-42.
516. Baan C, Peeters A, Lemos F, Uitterlinden A, Doxiadis I, Claas F, et al. Fundamental role for HO-1 in the self-protection of renal allografts. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* mai 2004;4(5):811-8.
517. Tolosano E, Hirsch E, Patrucco E, Camaschella C, Navone R, Silengo L, et al. Defective recovery and severe renal damage after acute hemolysis in hemopexin-deficient mice. *Blood.* 1 déc 1999;94(11):3906-14.
518. Quaye IK. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* août 2008;102(8):735-42.
519. Heinrich L, Tissot N, Hartmann DJ, Cohen R. Comparison of the results obtained by ELISA and surface plasmon resonance for the determination of antibody affinity. *J Immunol Methods.* 31 janv 2010;352(1-2):13-22.
520. Wu MC, Gilmour TD, Mantovani S, Woodruff TM. The Receptor for Advanced Glycation Endproducts Does Not Contribute to Pathology in a Mouse Mesenteric Ischemia/Reperfusion-Induced Injury Model., The Receptor for Advanced Glycation Endproducts Does Not Contribute to Pathology in a Mouse Mesenteric Ischemia/Reperfusion-Induced Injury Model. *Front Immunol Front Immunol.* 2015;6, 6:614-614.
521. Charrin E. Étude des mécanismes impliqués dans l'inflammation, le stress oxydant et le métabolisme de l'oxyde nitrique chez des souris transgéniques drépanocytaires : approches sportive et pharmacologique. [Internet]. Lyon; 2016 [cité 18 juill 2018]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01443701v2/document>
522. Charrin E, Ofori-Acquah SF, Nader E, Skinner S, Connes P, Pialoux V, et al. Inflammatory and oxidative stress phenotypes in transgenic sickle cell mice. *Blood Cells Mol Dis.* 2016;62:13-21.
523. Nur E, Brandjes DP, Schnog J-JB, Otten H-M, Fijnvandraat K, Schalkwijk CG, et al. Plasma levels of advanced glycation end products are associated with haemolysis-related organ complications in sickle cell patients. *Br J Haematol.* oct 2010;151(1):62-9.

524. Somjee SS, Warriar RP, Thomson JL, Ory-Ascani J, Hempe JM. Advanced glycation end-products in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* janv 2005;128(1):112-8.
525. Lutfullah, Sharma S, Rahman N, Azmi SNH, Hidaifi HJSA, AlQasmi MMA. Spectrophotometric determination of Fe(III) via complexation with piroxicam in synthetic mixture and soil samples. *JSIR Vol6902 Febr 2010* [Internet]. févr 2010 [cité 8 sept 2018]; Disponible sur: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/7288>
526. Chao K-C, Chen S-H, Chang C-C, Lee Y-C, Wang C-M, Chang J-S. Effects of ferric citrate supplementation on advanced glycation end products in a rat model of streptozotocin/nicotinamide-induced diabetes. *Mol Nutr Food Res.* mai 2017;61(5):1600753.
527. Ornellas FM, Ornellas DS, Martini SV, Castiglione RC, Ventura GM, Rocco PR, et al. Bone Marrow-Derived Mononuclear Cell Therapy Accelerates Renal Ischemia-Reperfusion Injury Recovery by Modulating Inflammatory, Antioxidant and Apoptotic Related Molecules. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2017;41(5):1736-52.
528. Shen C, Ma Y, Zeng Z, Yin Q, Hong Y, Hou X, et al. RAGE-Specific Inhibitor FPS-ZM1 Attenuates AGEs-Induced Neuroinflammation and Oxidative Stress in Rat Primary Microglia. *Neurochem Res.* oct 2017;42(10):2902-11.
529. Wang G, Liu L, Zhang Y, Han D, Liu J, Xu J, et al. Activation of PPAR γ attenuates LPS-induced acute lung injury by inhibition of HMGB1-RAGE levels. *Eur J Pharmacol.* 5 mars 2014;726:27-32.
530. Cheng K, Yang A, Hu X, Zhu D, Liu K. Curcumin Attenuates Pulmonary Inflammation in Lipopolysaccharide Induced Acute Lung Injury in Neonatal Rat Model by Activating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) Pathway. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 26 févr 2018;24:1178-84.
531. Lee H, Lee J, Hong S-H, Rahman I, Yang S-R. Inhibition of RAGE Attenuates Cigarette Smoke-Induced Lung Epithelial Cell Damage via RAGE-Mediated Nrf2/DAMP Signaling. *Front Pharmacol.* 2018;9:684.
532. Wang G, Han D, Zhang Y, Xie X, Wu Y, Li S, et al. A novel hypothesis: up-regulation of HO-1 by activation of PPAR γ inhibits HMGB1-RAGE signaling pathway and ameliorates the development of ALI/ARDS. *J Thorac Dis.* oct 2013;5(5):706-10.
533. Hendrickson RJ, Cappadona C, Yankah EN, Sitzmann JV, Cahill PA, Redmond EM. Sustained pulsatile flow regulates endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression in co-cultured vascular endothelial and smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* mars 1999;31(3):619-29.
534. Li Y, Zheng J, Bird IM, Magness RR. Effects of pulsatile shear stress on nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase expression by ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Biol Reprod.* sept 2003;69(3):1053-9.
535. Davies PF, Spaan JA, Krams R. Shear Stress Biology of the Endothelium. *Ann Biomed Eng.* 1 déc 2005;33(12):1714-8.
536. Galbusera M, Remuzzi A, Benigni A, Rossi C, Remuzzi G. A novel interpretation of the role of von Willebrand factor in thrombotic microangiopathies based on platelet adhesion studies at high shear rate flow. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* oct 2000;36(4):695-702.

537. Yagi H, Yamaguchi N, Shida Y, Sugimoto M, Tubaki K, Fujimura Y, et al. Highly elevated plasma level of von Willebrand factor accelerates the formation of platelet thrombus under high shear stress in plasma with deficient ADAMTS13 activity. *Thromb Res.* nov 2017;159:91-5.
538. Akimoto T, Muto S, Ito C, Takahashi H, Takeda S, Ando Y, et al. Clinical features of malignant hypertension with thrombotic microangiopathy. *Clin Exp Hypertens N Y N* 1993. 2011;33(2):77-83.
539. Hauglustaine D, Van Damme B, Vanrenterghem Y, Michielsen P. Recurrent hemolytic uremic syndrome during oral contraception. *Clin Nephrol.* mars 1981;15(3):148-53.

Nom : MAY

Prénom : Olivia

Date de soutenance : 30/10/2018

Titre de la thèse : Etude du tropisme rénal du syndrome hémolytique et urémique atypique : *susceptibilité endothéliale glomérulaire à l'hème et découverte de RAGE comme un nouveau récepteur de l'hème*

Mots clefs : cellules endothéliales, hème, microangiopathie thrombotique, récepteur aux produits de glycation avancés, syndrome hémolytique et urémique

Le syndrome hémolytique et urémique atypique (SHUa) est une microangiopathie thrombotique complément-dépendante dont l'atteinte majoritairement rénale reste, à ce jour, incomprise. L'objectif de ce travail était d'améliorer la compréhension de ce tropisme d'organe au moyen de deux axes d'étude : i) la susceptibilité de l'endothélium glomérulaire à l'hémolyse, celle-ci étant à la fois la conséquence des microthromboses dans le SHUa et un amplificateur de la voie alterne du complément via l'hème libre, molécule issue des globules rouges lysés ; ii) le rôle potentiel du récepteur aux produits de glycation avancés ou RAGE. Ce récepteur membranaire aux fortes propriétés proinflammatoires et prothrombotiques a en effet été impliqué dans de nombreuses pathologies rénales, et sa liaison au C3a - anaphylatoxine libérée dans l'activation du complément - a été rapportée par une équipe.

La première partie de ce travail a visé à expliquer la vulnérabilité de l'endothélium glomérulaire sous l'effet d'une hémolyse. Nous avons étudié plusieurs types de cellules endothéliales exposées +/- à l'hème, et mis au point un modèle murin traité par de l'hème. En conditions hémolytiques, plusieurs facteurs pouvant participer à cette susceptibilité endothéliale glomérulaire ont ainsi été mis en avant : i) une moindre liaison du facteur H, principal régulateur du complément, à sa surface ; ii) une faible expression de la thrombomoduline, protéine de la coagulation et régulatrice du complément ; iii) une faible expression de l'enzyme principale de dégradation de l'hème, l'hème-oxygénase 1. Ces deux derniers points étaient rattachés à une faible induction endothéliale glomérulaire de leurs facteurs de transcription, KLF2 et KLF4.

La seconde partie de ce travail s'est concentrée sur le RAGE. N'ayant pas réussi à reproduire l'interaction RAGE/C3a, nous avons exploré l'hypothèse d'une liaison du RAGE à l'hème. En effet, le seul récepteur endothélial connu jusqu'à présent est le Toll Like Receptor 4 (TLR4), qui partage plusieurs ligands communs avec le RAGE (LPS - lipopolysaccharide, HMGB1 - high-mobility group box 1). Nous avons découvert que le RAGE était un récepteur de l'hème, et identifié que le site de liaison se trouvait sur le domaine V. A l'aide d'un modèle murin invalidé pour le RAGE et traité +/- par l'hème, nous avons mis en évidence que : i) l'invalidation de RAGE avait un effet protecteur en cas d'exposition à l'hème, marqué par une diminution de l'expression de gènes de l'inflammation (IL1 β , TNF α) et du facteur tissulaire au niveau pulmonaire, organe exprimant le plus fortement RAGE ; ii) l'hème activait la phosphorylation des voies ERK1/2 et Akt via le RAGE.

Par ces travaux, nous avons précisé les liens entre activation du complément, hémolyse et susceptibilité endothéliale glomérulaire dans le SHUa. Parallèlement, nous avons identifié le RAGE comme un nouveau récepteur à l'hème, dont la liaison à ce récepteur activerait différentes voies de signalisation de l'inflammation. Le contrôle de l'hème et du RAGE pourrait ainsi constituer de nouvelles voies thérapeutiques dans le SHUa et les maladies hémolytiques.