



Université Lille 2
Droit et Santé

UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ - LILLE 2
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2014

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Etude de la microcirculation rénale dans un modèle ovin d'ischémie-
reperfusion rénale : intérêt de la tétrahydrobioptérine**

Présentée et soutenue publiquement le 12 mai 2014 à 18 heures
au Pôle Recherche
Par Lokmane RAHMANIA

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Daniel MATHIEU

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Benoit TAVERNIER

Monsieur le Professeur Raphaël FAVORY

Monsieur le Docteur Emmanuel ROBIN

Directeur de Thèse :

Monsieur le Professeur Daniel DE BACKER

Laboratoire de recherche expérimentale du Professeur Jean-Louis VINCENT

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Table des matières

I- INTRODUCTION.....	14
1- Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion rénale.....	14
2- L'étude de la microcirculation	15
3- La tétrahydrobioptérine.....	17
4- Objectifs et hypothèses	19
II- MATERIELS ET METHODES	20
1- Animaux d'expérimentation	20
2- Anesthésie.....	20
3- Chirurgie.....	21
4- Surveillance générale	22
5- Microcirculation rénale	23
6- Créatininémie.....	25
7- Randomisation.....	25
8- Analyses statistiques	26
III- RESULTATS	28
1- Au niveau systémique	28
A- Effets de l'ischémie-reperfusion.....	28

<i>B- Effets du BH4</i>	28
2- Au niveau de la microcirculation rénale	32
<i>A- Effets de l'ischémie-reperfusion</i>	32
<i>B- Effets du BH4</i>	32
3- Au niveau de la fonction rénale.....	35
<i>A- Effets de l'ischémie-reperfusion</i>	35
<i>B- Effets du BH4</i>	36
IV- DISCUSSION	37
1-Effets de l'ischémie-reperfusion.....	37
2- Effets du BH4.....	38
3- Limites de l'étude	39
4- Perspectives.....	40
4-Conclusion.....	41
V- REFERENCES	42

I- INTRODUCTION :

1- Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion rénale :

L'ischémie-reperfusion est une entité à part entière source de syndrome inflammatoire systémique voire de syndrome de défaillance d'organes multiples (1). Les mécanismes inflammatoires qui débutent durant l'ischémie sont majorés lors de la reperfusion et ce, des heures durant. L'ischémie-reperfusion (I-R) génère l'activation des protéines d'adhésion et un recrutement des polynucléaires neutrophiles au niveau endothélial aboutissant à des atteintes des réseaux microvasculaires. En effet, cela provoque une diminution voire à un arrêt du flux associé à une augmentation de la perméabilité vasculaire (2).

La reperfusion est responsable de lésions tissulaires par le relargage de radicaux libres et de cytokines pro-inflammatoires (3). Le "no-reflow phenomenon", qui apparaît durant la reperfusion a été décrit comme l'altération de la microcirculation secondaire à la reperfusion par atteinte des cellules endothéliales (4).

L'ischémie-reperfusion est donc pourvoyeuse de défaillance d'organes potentiellement définitive. Dans le cas du rein, elle engendre des anomalies fonctionnelles et structurelles des cellules épithéliales des tubules qui peuvent entraîner une nécrose cellulaire (5).

L'ischémie-reperfusion rénale est retrouvée dans différentes situations cliniques : transplantation d'organe ou clampage sus-rénal dans la chirurgie de l'anévrisme de l'aorte abdominale. Ces situations exposent au risque d'insuffisance rénale aiguë

(IRA) (6, 7). Des lésions microvasculaires post-ischémiques sont décrites dans ces cas (8). Ces atteintes de la microcirculation, liées à la dysfonction endothéliale post-ischémique cellulaire, contribuent de manière significative à l'évolution vers l'IRA. Le mécanisme en est un oedème (swelling) des cellules endothéliales, secondaire à l'ischémie (9,10). Néanmoins, si l'évolution ne se fait pas toujours vers l'IRA, ces lésions peuvent contribuer à l'altération à long terme de la fonction rénale (11, 12).

2- L'étude de la microcirculation :

La microcirculation concerne tous les petits vaisseaux invisibles à l'œil nu. Elle a pour principales fonctions la délivrance en nutriments et l'élimination des déchets. Elle est aussi le site d'échanges des gaz respiratoires (13). L'évaluation clinique de sa fonction (pression artérielle moyenne, débit cardiaque, marbrures, temps de recoloration cutanée) est insuffisante (14). Des tests biologiques existent (lactate, SvcO₂, Gap CO₂) mais ils n'apportent qu'une information globale et indirecte sur la perfusion tissulaire (15). De nombreuses techniques se sont alors développées pour tenter d'en affiner l'exploration.

Des études utilisant des techniques de laser Doppler (16,17) ou pléthysmographie (17, 18) chez les patients atteints de sepsis sévère ont rapporté une déficience du flux sanguin microvasculaire et une réponse hyperémique diminuée après une ischémie transitoire obtenue par gonflage du brassard. Cependant, ces techniques ne donnent qu'une mesure globale de la microcirculation et ne renseignent pas sur son hétérogénéité (14).

Des techniques d'imagerie directe, telles que l'Orthogonal Polarization Spectral (OPS) et Sidestream Dark Field (SDF) ont été développées comme des techniques non invasives pour étudier la microcirculation, par la densité des vaisseaux, la perfusion et surtout leur hétérogénéité (19). Une source lumineuse illumine les tissus profonds et permet la visualisation des globules rouges après analyse de la lumière réfléchie. De ce fait, un capillaire non perfusé ne sera pas visible (figure 1).

Ces nouvelles techniques ont été validées par différents modèles expérimentaux (20,21). De nombreuses études sont faites dans le cadre du choc septique explorant essentiellement la microcirculation sublinguale (22) et cérébrale (23). Peu d'études se sont intéressées à la microcirculation rénale. Wauters et al. l'ont évaluée grâce la technique d'imagerie par SDF au cours du syndrome du compartiment abdominal (24).

Yamamoto et al. demeurent les seuls à avoir étudié la microcirculation rénale après ischémie-reperfusion dans un modèle murin (25). Ils ont utilisé une technique invasive de vidéomicroscopie intravitale. Cette technique utilise la trans-illumination et l'épi-illumination (26). Mais le recours aux colorants fluorescents la rend phototoxique en générant des espèces réactives de l'oxygène (27). Ils ont démontré l'existence au niveau des reins ischémiés d'une vasculopathie corticale plus prononcée dans les capillaires péri-tubulaires qui ne régresse pas après reperfusion (25). Cependant aucune étude ne s'est intéressée à la microcirculation, par des techniques non invasives, dans un modèle d'ischémie-reperfusion rénale chez l'ovine.

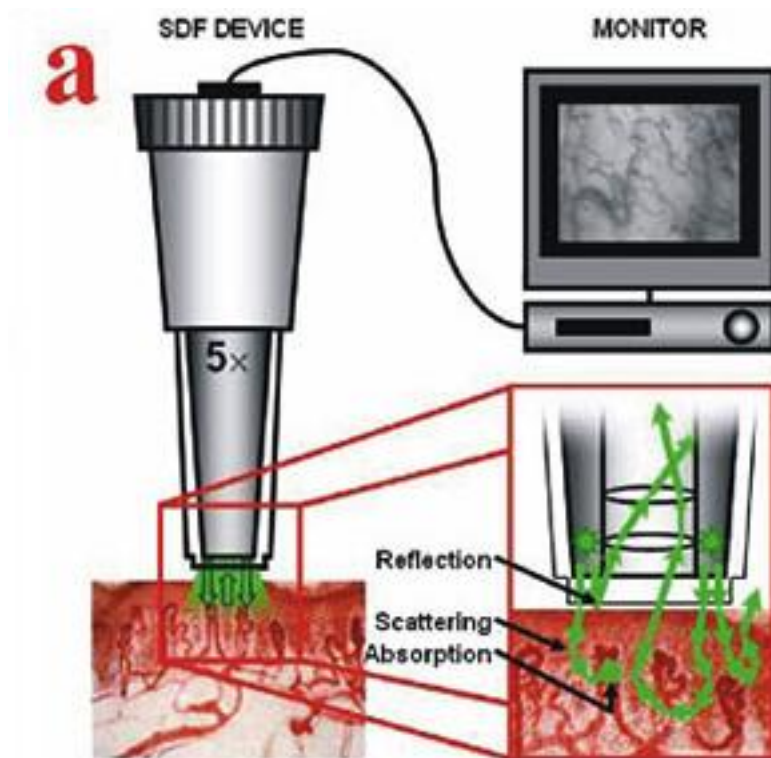


Figure 1 : Sidestream Dark Field

Source : Goedhart PT, Khalilzada M, Bezemer R, Merza J, Ince C. Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. Opt Express. 2007 Nov 12; 15(23):15101-14.

3- La tétrahydrobioptérine :

Le monoxyde d'azote (NO), principal vasodilatateur de l'organisme, est synthétisé par les NO synthases (NOS). En effet à partir de leur substrat, l'arginine, les NOS, grâce à leur cofacteur, génèrent NO et citrulline après deux réactions oxydatives successives. Contrairement aux formes inductibles d'origine macrophagique et potentiellement cytotoxiques, les formes constitutives des NOS, dont la forme endothéliale (eNOS), sont protectrices.

A l'état physiologique la production de NO est suffisante pour contrecarrer les effets de l'anion superoxyde (O⁻²) généré par la xanthine oxydase. En effet, l'anion superoxyde est un acteur majeur des lésions lors de l'I-R. Celle-ci entraîne d'une part une baisse de l'activité des eNOS et d'autre part augmente l'activité de la xanthine oxydase. La reperfusion s'accompagne donc d'un déséquilibre entre NO et O⁻² aboutissant à une majoration des lésions de l'arbre microcirculatoire, installé dès l'ischémie. En outre, ces lésions sont induites par les espèces oxygénées activées (ROS et RNOS), par les leucocytes, les protéines d'adhésion (E-selectine, P-selectine, I-CAM et V-CAM) et également les enzymes cytotoxiques (phospholipases et thromboxane A₂) (28).

La tétrahydrobioptérine (BH₄) est le principal cofacteur des NOS. Cette molécule se fixe sur le domaine oxygénase des NOS permettant ainsi la forme homodimérique de ces enzymes et donc leur activation (29). L'I-R semble abaisser le taux BH₄ (30). Cela diminue la biodisponibilité du NO durant la reperfusion et par conséquent génère des espèces oxygénées activées (31). Quelques équipes ont donc avancé l'intérêt d'une supplémentation. Seules deux études, sur des modèles murins d'ischémie-reperfusion rénale, ont évalué le bénéfice du BH₄. Kakoki et al. ont démontré qu'un prétraitement par le BH₄ restaurerait la vasorelaxation endothélium-dépendante (32). Par ailleurs, l'administration de BH₄ préviendrait l'hypoxie et les lésions rénales secondaires à l'ischémie-reperfusion (33) (figure 2)

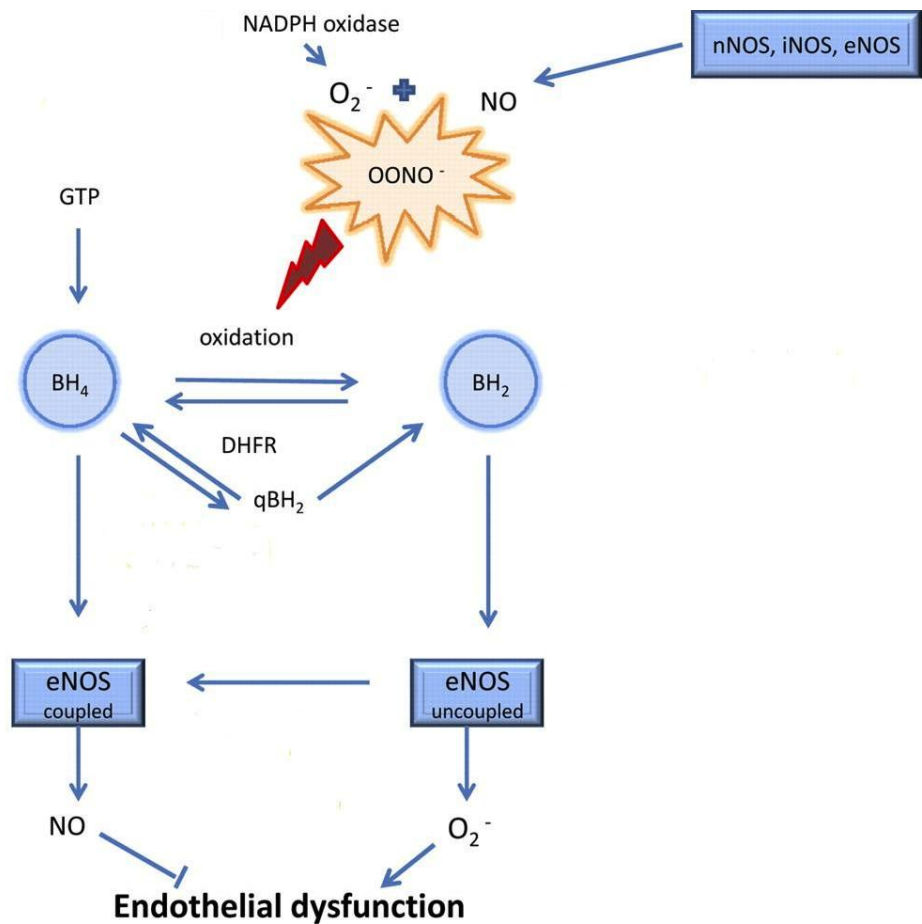


Figure 2 : Rôle du BH₄ dans la dysfonction endothéliale.

Source : Kietadisorn R, Juni RP, Moens AL. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Mar 1; 302(5):E481-95.

4- Objectifs et hypothèses :

L'objectif de l'étude était d'évaluer, dans un modèle ovin, les effets sur la microcirculation rénale, de l'ischémie-reperfusion rénale par clampage sus-rénal de l'aorte (CSRA).

L'hypothèse de l'étude était que l'I-R induirait des anomalies de la microcirculation rénale qu'un préconditionnement pharmacologique par le BH₄ préviendrait.

II- MATERIELS ET METHODES

1-Animaux d'expérimentation :

L'étude a été menée en accord avec les lignes directrices établies par la Commission de révision institutionnelle de protection des animaux de l'Université Libre de Bruxelles (Bruxelles, Belgique). Le soin et la manipulation des animaux étaient en accord avec les lignes directrices de l'Institut National de Santé (Institut of Laboratory Animal Resources). Dix neuf brebis (poids moyen d'environ 30 kg) ont été incluses dans cette étude. Les animaux étaient à jeun pendant 24 heures avec un accès libre à l'eau avant l'expérience.

2-Anesthésie :

Le jour de l'expérience, les animaux ont été d'abord pesés. Ensuite une pré-médication leur a été administrée par voie intramusculaire, associant midazolam 0,25mg/kg (Dormicum; Roche Pharmaceuticals, Attikis, Grèce) et kétamine, 20mg/kg (Imalgine; Merial, Lyon, France). Les brebis étaient installées en décubitus dorsal. La veine brachiale a été canulée avec un cathéter périphérique de calibre 14 Gauge (cathéter IV Surflo; Terumo Corp, Leuven, Belgique). Après administration par voie intraveineuse d'une combinaison de 30 microg/kg de citrate de fentanyl (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgique) et de 1mg/kg de bromure de rocuronium (Esmeron, Organon, Oss, The Netherlands), l'animal a été intubé avec une sonde de 8 mm (Salut- Contour; Mallinckrodt Medical, Athlone, Irlande). La

ventilation mécanique était démarrée en mode volume contrôlé (Servo 900 C ventilateur; Siemens-Eléma, Solna, Suède) avec un volume courant de 10 ml/kg, une pression expiratoire positive de 5 cmH₂O, une fraction d'oxygène inspiré (FiO₂) de 1, et un rapport de temps inspiratoire sur temps expiratoire de 1/2. La fréquence respiratoire était ajustée pour maintenir la pression en fin d'expiration de dioxyde de carbone (47 210 A Capnomètre; Hewlett Packard GmbH, Böblingen, en Allemagne) entre 35 et 45 mm Hg. Tous les animaux étaient sous sédation par l'administration intraveineuse d'une combinaison de 0,5mg/kg par heure de midazolam, 0,5mg/kg par heure de morphine (Janssen Pharmaceutica) et de kétamine 5mg/kg par heure. La curarisation était obtenue en utilisant 0,2mg/ kg par heure de bromure de rocuronium. La ventilation mécanique était ajustée afin d'assurer des conditions de normoxie (80-120 mm Hg) et normocapnie (35-45 mm Hg) grâce à une analyse répétée des gaz du sang (ABL500 OSM3; Radiometer, Copenhague, Danemark). La concentration d'hémoglobine et la saturation en oxygène étaient mesurées avec un analyseur calibré pour les animaux (OSM3; Radiometer).

3-Chirurgie :

Une sonde urinaire Foley 14F (Beiersdorf AG, Hambourg, Allemagne) a été mise en place pour mesurer la diurèse. L'artère carotide et la veine jugulaire internes droites ont été exposées. Un cathéter 4F artériel (Vygon, Cirencester, Angleterre) a été introduit et relié à un capteur de pression (Edwards Lifesciences Corp, Irvine, Calif). Le cathéter était rincé par intermittence avec une solution héparinée (2UI/mL héparine sodique dans 1000 mL de solution saline à 0,9%). Un introducteur a été

inséré à travers la veine jugulaire interne, et un cathéter 7F de Swan-Ganz (Edwards LifeSciences) a été avancé dans l'artère pulmonaire.

Ensuite, une lombotomie gauche a été effectuée en décubitus ventral. Après repérage des artères rénales, un clamp a été placé autour de l'aorte sus-rénale. Une sonde de débit a été placée autour de l'artère rénale gauche pour une mesure continue du débit sanguin rénal (Transonic Systems, Ithaca, USA). Enfin le rein a été exposé. Après une période de stabilisation permettant la prise des données à l'état basal, l'aorte a été clampée pour une durée de 60 minutes. Un remplissage vasculaire (500mL de Hartmann sur 30min) a été démarré avant le déclampage en prévention de l'hypotension induite par ce dernier. Au cours de la préparation chirurgicale, une solution de cristalloïdes (Ringer lactate) a été perfusée à un débit de 10mL/kg/h jusqu'à l'état basal puis à 5mL/kg/h. Le débit était ensuite adapté afin de maintenir une pression artérielle moyenne supérieure à 75mmHg.

4-Surveillance générale :

Toutes les variables mesurées ont été collectées avant le clampage, puis avant le déclampage, à 30 minutes de la reperfusion puis toutes les heures jusqu'à la sixième heure de la reperfusion. La fréquence cardiaque (FC), les mesures de pression, y compris la pression artérielle moyenne (PAM), la pression artérielle pulmonaire (PAP), la pression veineuse centrale (PVC), et la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) ont été mesurées en fin d'expiration (Sirecust 404; Siemens, Erlangen, Allemagne). La température centrale, et le débit cardiaque ont été collectés (Vigilance moniteur; Baxter Healthcare Corp, Irvine, Californie). Le

volume minute, la pression de plateau, le volume expiratoire, et la pression de fin d'expiration de dioxyde de carbone ont été réglés. L'index cardiaque (L/min/m²), le transport d'oxygène (mL/m²/min), la consommation d'oxygène (mL/km²/min), et l'extraction d'oxygène ont été calculés en utilisant des formules standard. Des échantillons artériels et veineux ont été prélevés et utilisés pour analyse des gaz du sang et de l'hémoglobine. La diurèse horaire a également été mesurée.

5- Microcirculation rénale :

Le réseau microvasculaire de la corticale rénale a été étudié grâce à la vidéomicroscopie SDF (Microscan TM, MicroVisonMedical Inc, Amsterdam, Netherlands). Le sang et les sécrétions ont été au préalable éliminés en douceur avec des compresses. Le dispositif a été appliqué sans pression sur la surface du rein. Les enregistrements ont été réalisés à l'état basal puis à 1, 4 et 6 heures de la reperfusion. A chaque moment, cinq vidéos de 20 secondes ont été enregistrées à différentes régions du cortex renal, en utilisant un ordinateur et une carte vidéo (miroVIDEO; Pinnacle Systems, Mountain View, CA).

Les images ont été ensuite stockées par la désignation d'un nombre aléatoire pour une analyse plus approfondie. Un investigateur en aveugle sur le moment et le groupe d'appartenance de ces séquences a effectué une analyse semi-quantitative. Sur chaque vidéo une diagonale était tracée (figure 3). En effet, contrairement aux vidéos sublinguales, les séquences du cortex rénal ne permettent pas l'obtention de 4 coins interprétables. Les vaisseaux sont séparés en petits ou grands vaisseaux, en utilisant une valeur seuil de diamètre de 20 µm. Le type de flux a été défini comme

continu (vaisseaux perfusés), intermittent, ou absent (vaisseaux non perfusés). Le nombre de vaisseaux qui traversent cette diagonale, le nombre de petits et grands vaisseaux et le nombre de vaisseaux non perfusés (petits et grands) ont été comptabilisés (19).

Pour chaque animal, les données de cinq zones ont été moyennées. La densité vasculaire a été calculée comme le nombre de vaisseaux par la longueur de cette diagonale (v/mm). La densité des vaisseaux perfusés (PVD) a été calculée comme le nombre de vaisseaux perfusés par la longueur de cette diagonale (v/mm). La proportion des vaisseaux perfusés (PPV) a été obtenue par le rapport des vaisseaux perfusés sur le nombre total de vaisseaux. Enfin a été déterminée l'hétérogénéité du flux sanguin microvasculaire entre les cinq domaines (PVD-HI et PPV-HI pour respectivement hétérogénéité de PVD et hétérogénéité de PPV).

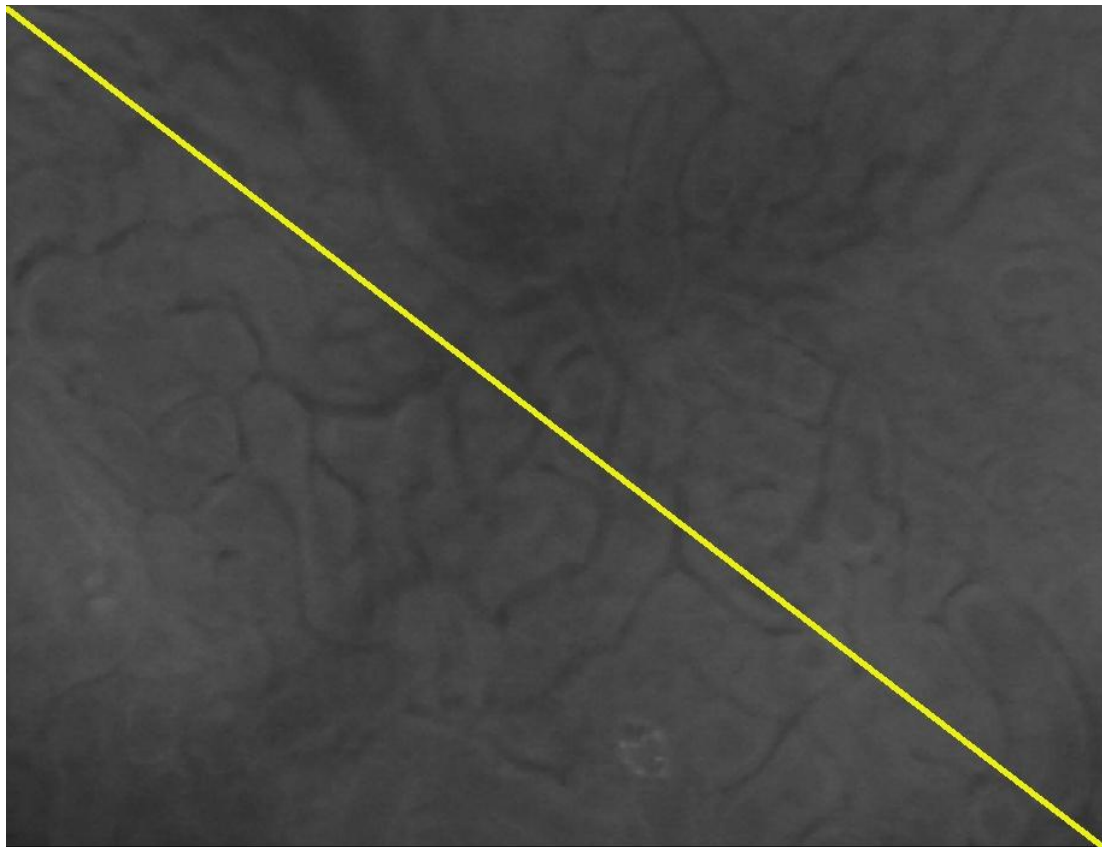


Figure 3 : Microcirculation rénale par SDF

6-Créatininémie :

Des mesures de la créatinine plasmatique ont également été effectuées, avant le clampage (baseline), à 30 minutes et à 6 heures de la reperfusion.

7- Randomisation:

Après la chirurgie, une période de stabilisation a été attendue. L'état basal (baseline) a été atteint par les objectifs suivants :

- PAM supérieure à 75mmHg ;
- Lactate artériel inférieur à 2mmol/L ;
- SvO2 supérieure à 65% ;
- PaO2 entre 80 et 120mmHg ;
- PaCO2 entre 35 et 45mmHg ;
- Kaliémie entre 3,5 et 5,0mEq/L ;

Après stabilisation, les animaux ont été ensuite randomisés en trois groupes :

- Un groupe sans ischémie-reperfusion : groupe contrôle=5 ;
- Un groupe avec ischémie-reperfusion seule: groupe I-R=7 ;
- Un groupe avec ischémie-reperfusion et BH4: groupe I-R+BH4=7.

Le groupe contrôle a subi une chirurgie sans clampage aortique. Les groupes I-R ont été exposés à une heure de CSRA. Le groupe BH4+I-R a reçu, 30 minutes avant le clampage, un prétraitement par 20mg/kg de BH4 (Laboratoires Schriks, Genève, Suisse).

Tous les sujets ont été surveillés jusqu'à 6 heures après la reperfusion (figure 4). A la fin de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés par une perfusion d'une dose létale de chlorure potassium sous anesthésie.

8- Analyses statistiques :

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le programme statistique IBM SPSS Statistics 22 pour Windows (IBM Corporation, Somers, NY). Les variables continues sont exprimées en médiane (percentile 25 - percentile 75). Les mesures répétées sont comparées à l'aide de l'approche basée sur les équations d'estimation généralisées (GEE). Les valeurs de p inférieures à 5% sont considérées statistiquement significatives.

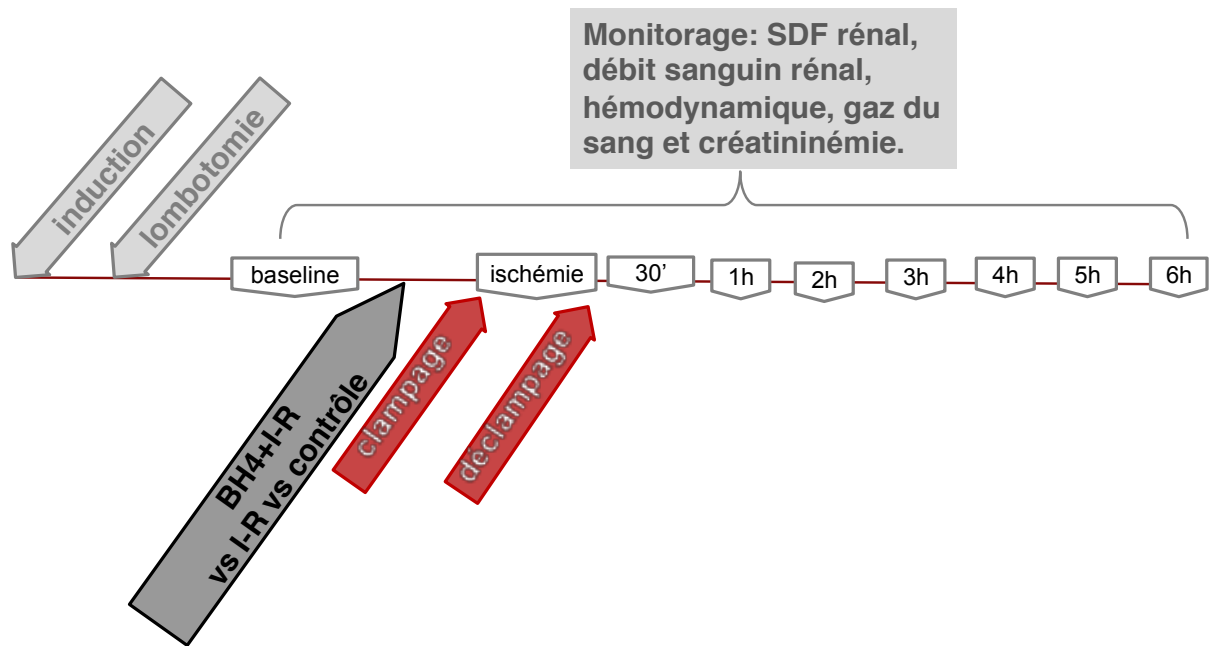


Figure 4 : Protocole

III- RESULTATS :

Les résultats sont présentés dans les tableaux 1 et les figures 5 à 10. Les valeurs à l'état basal étaient similaires entre les groupes.

1-Au niveau systémique :

Le tableau 1 présente les principaux résultats.

A-Effets de l'ischémie-reperfusion:

Le CSRA a induit une augmentation de la fréquence cardiaque de la pression artérielle moyenne et de l'index cardiaque. Il a entraîné une augmentation de la SvO₂ du transport en O₂ et une baisse de l'extraction de l'O₂. Il a majoré également le lactate durant les 30 premières minutes de la reperfusion.

B-Effets du BH4:

Le BH4 a atténué les effets de l'I-R sur la fréquence cardiaque, l'index cardiaque sans retentissement significatif sur la pression artérielle moyenne. Il a également augmenté l'extraction en O₂ et diminué le lactate.

Tableau 1 Variables hémodynamiques, ventilatoires et métaboliques

	Groupes	Temps									P groupe *temps
		baseline	ischémie	30min	1h	2h	3h	4h	5h	6h	
FC	Contrôle	135 (123-141)	135 (123-141)	122 (120-122)	127 (119-128) c	120 (108-121) c	126 (106-127)	110 (101-120)	112 (107-120) c	113 (108-131) c	P<0,05
	I-R	122 (93-133)	137 (127-143) c	139 (132-144) a, c	135 (132-155) a, c	144 (129-155) a, c	153 (128-155) a, c	136(107-145)	142 (113-150) a, c	139 (106-153) c	
	I-R+BH4	112 (109-139)	123 (119-136)	139 (128-148) c	134 (109-130)	114 (97-123) b	118 (91-128) b	119 (90-144)	113 (94-153)	118 (105-152)	
PAM	Contrôle	107 (100-108)	107 (100-108)	90(90-97) c	92 (90-98) c	89 (83-92) c	90 (88-93) c	88 (86-90) c	87 (84-87) c	83 (77-84) c	P<0,05
	I-R	100 (88-102)	115 (101-117) c	113(102-121) a, c	108 (100-116) a	103 (100-108) a	103 (95-111) a	103 (86-107) a	99(84-110) a	91 (90-109) a	
	I-R+BH4	96 (95-111)	119 (108-125) c	112(106-113) c	103 (96-108)	96 (86-98)	93 (82-97)	91 (89-97)	90(81-97) c	93 (81-94) c	
IC	Contrôle	6.8 (5.7-6.9)	6.8 (5.7-6.9)	6.1 (5.8-6.5)	5.8 (5.3-5.9)	6.1 (5.2-7.8)	6.1 (5.2-7.6)	5.7 (5.1-7.1)	6.3 (5.1-7.1)	5.4 (5.1-6.5)	P<0,05
	I-R	5.0 (4.8-6.8)	5.9 (4.5-6.9)	6.9 (5.4-7.8) c	7.1 (5.6-7.7) c	7.3 (5.5-8.0) c	6.6 (4.6-7.9)	6.8 (4.8-6.9)	6.4 (5.2-7.8) c	6.3 (5.1-6.8)	
	I-R+BH4	6.4 (5.0-7.3)	5.4 (4.8-6.6)	6.9 (5.6-7.5) c	5.5 (5.4-5.7) b, c	5.6 (5.0-6.2) b, c	5.3 (4.8-6.6) c	5.9 (5.1-6.2)	5.5 (4.8-6.8)	5.6 (5.1-6.5)	
PAPM	Contrôle	15 (12-16)	15 (12-16)	15 (12-17) c	15 (13-18) c	16 (15-18) c	17 (15-18) c	16 (11-16)	13 (12-17)	14 (12-17)	P<0,05
	I-R	13 (11-18)	13 (12-17)	15 (14-19) c	14 (11-18) c	16 (12-17) c	14 (14-16) c	13 (12-16)	15 (13-18) c	15 (14-20) c	
	I-R+BH4	13 (12-16)	17 (13-17)	17 (15-19) c	17 (13-18)	16 (12-17)	14 (12-19)	15 (12-19)	14 (13-17)	13 (12-17)	
PAPO	Contrôle	7 (4-7)	7 (4-7)	7 (5-8) c	7 (6-8)c	9 (8-9) c	5 (5-7)	6 (5-6)	8 (6-8)	6 (6-8)	P<0,05
	I-R	6 (5-7)	6 (4-7)	6 (6-9) c	6 (5-8) c	6 (5-11)	7 (6-11)	5 (4-9)	7 (4-10)	5 (4-12)	
	I-R+BH4	7 (4-9)	7 (7-11) c	7 (5-12)	6 (4-12)	8 (4-10)	9 (3-9)	9 (3-9)	8 (4-9)	6 (5-10)	
SvO2	Contrôle	76 (73-78)	76 (73-78)	75 (72-76)	76 (75-77)	76 (75-78)	75 (75-79)	74 (72-78)	73 (71-74)	73 (72-75)	P<0,05
	I-R	71 (68-72)	77 (72-82) c	71 (70-84) c	72 (70-84) c	75 (71-83) c	74 (69-79) c	68 (65-80)	68 (67-83)	72 (65-75)	
	I-R+BH4	70 (67-72)	69 (65-73)	70 (65-71)	70 (64-75)	65 (53-66) b, c	66 (64-70) c	67 (59-73)	66 (62-77)	66 (58-76)	

dTO2	Contrôle	0	0(0-0)	-9(-11-8)	-15(-23-4)	6(-8-10)	9(-9-18)	-5(-7-8)	3(-25-4)	-19(-20--5)	P<0,05
	I-R	0	7(-5-17)	15(4-33)	19(11-19) a	20(18-46) a	21(-5-41)	11(-6-32)	9(1-47) a	14(0-26) a	
	I-R+BH4	0	-7(-13--1)	9(0-19)	-16(-19-7) b	-12(-19--2) b	-7(-28-3) b	-10(-17-8)	-16(-26-38)	0(-25-6)	
dVO2	Contrôle	0	0(0-0)	-7(-8-16)	-18(-62-24)	-15(-62-18)	-7(-56-22)	-9(-57-28)	-12(-57-47)	-10(-61-26)	P<0,05
	I-R	0	-19(-22--5)	3(-9-19)	-8(-25-16)	6(-18-21)	4(-22-11)	7(-20-32)	6(-7-17)	11(4-18)	
	I-R+BH4	0	-3(-12-2)	6(2-9)	-22(-30-10)	14(-18-23)	-11(-16-13)	3(-33-14)	-2(-20-19)	7(-15-23)	
dEO2	Contrôle	0	0(0-0)	8(5-8)	4(-48-29)	-6(-57-27)	-4(-62-38)	-2(-59-44)	18(-42-47)	17(-46-43)	P<0,05
	I-R	0	-21(-38--13) a	-10(-46--3) a	-12(-46--3) a	-17(-42--3)	-16(-30--3)	7(-31-13)	-8(-42-7) a	0(-6-4)	
	I-R+BH4	0	7(-19-12) b	1(-15-8)	-7(-15-8)	14(-5-34) b	10(-7-28) b	1(-19-8)	-3(-16-16)	3(-15-51)	
Pha	Contrôle	7.36 (7.35-7.4)	7.36 (7.35-7.40)	7.34 (7.29-7.39) c	7.32 (7.29-7.40)	7.31 (7.3-7.40) c	7.34 (7.29-7.40) c	7.34 (7.29-7.42)	7.33 (7.33-7.39) c	7.35 (7.32-7.4) c	P<0,05
	I-R	7.41 (7.36-7.43)	7.38 (7.38-7.41)	7.38 (7.37-7.40)	7.38 (7.36-7.42)	7.39 (7.32-7.49)	7.38 (7.34-7.48)	7.37 (7.35-7.43)	7.41 (7.32-7.46)	7.39 (7.3-7.42)	
	I-R+BH4	7.41 (7.35-7.44)	7.4 (7.38-7.43)	7.36 (7.33-7.41) c	7.37 (7.32-7.39) c	7.35 (7.29-7.38) c	7.35 (7.31-7.36) c	7.35 (7.3-7.36) c	7.30 (7.29-7.34) b, c	7.32 (7.3-7.35) c	
dPaO2	Contrôle	0	0(0-0)	2(2-3)	6(4-7)	3(-3-5)	-1(-2-3)	2(-13-5)	-1(-3-3)	-4(-4-4)	P<0,05
	I-R	0	1(-5-3)	2(-20-7)	-13(-20-10)	-3(-24-7)	-9(-17-2) a	-9(-32--4)	-9(-17-2) c	-14(-30-1) c	
	I-R+BH4	0	-3(-7-0)	-13(-19--3) c	-6(-12-13)	-7(-12-2)	-5(-16-5)	-5(-17-5)	-8(-15-0)	-6(-12--3)	
PaCO2	Contrôle	39 (36-41)	39 (36-41)	38 (35-41)	41 (34-42)	39 (36-44)	38 (37-40)	40 (38-40)	37 (36-37)	37 (36-37)	P<0,05
	I-R	36 (36-39)	36 (35-41)	35 (34-43)	39 (35-40)	36 (35-40)	39 (33-40)	34 (34-39)	37 (34-39)	37 (35-42)	
	I-R+BH4	36 (35-38)	34 (33-34) c	39 (35-41)	37 (33-39)	39 (35-43)	39 (37-40)	38 (34-40)	39 (36-42)	40 (37-44)	

lactate	Contrôle	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-0.9)	P<0,05
	I-R	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-1.1)	1.5 (0.9-1.8) a, c	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-1.1) a	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-1)	0.9 (0.9-1.1) a	
	I-R+BH4	0.9 (0.9-1.3)	0.9 (0.9-1.1)	0.9 (0.9-1.4)	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-0.9) b	0.9 (0.9-0.9)	0.9 (0.9-1.1)	0.9 (0.9-0.9)	
dDSR	Contrôle	0	0(0-0)	0(-6-2)	-6(-7--3)	-6(-16-6)	-9(-9-11)	2(0-6)	-9(-18-6)	-6(-22-0)	P<0,05
	I-R	0	-100(-100--100) a	-24(-34-6)	-14(-31-23)	-7(-19-55)	-14(-16-55)	-19(-26-32)	-9(-23-0)	3(-23-10)	
	I-R+BH4	0	-100(-100--100)	-35(-42--24)	-24(-31--19)	-20(-29--7) b	-20(-31--4)	-15(-31--4)	-18(-35--5)	-18(-27--4)	
diurèse	Contrôle	1.4 (1.1-4.1)	1.4 (1.1-4.1)	(-)	1.9 (1-2.3)	1.7 (1.2-1.9)	2.4 (2.2-2.8)	2.2 (1.6-2.5)	2.8 (1.8-3.6)	3(1.6-4.6)	P<0,05
	I-R	1.1 (1-1.7)	0.1 (0-0.2) a, c	(-)	1.7 (1-3.2)	3.1 (1.9-5.7) c	2.9 (1.3-4.7) c	2.7 (1.7-3.8)	5.7 (3.6-6.4) c	3.3 (1.6-5.8) c	
	I-R+BH4	1.2 (1.1-2.4)	0.1 (0-0.1) c	(-)	4.1 (1.1-7.1) b,c	3.3 (2-5.4) c	2.9 (1.6-4.8)	3.1 (2.5-4.1) c	3.7 (3.2-7.5) c	3.4 (3.2-6.6) c	
dBH	Contrôle	0	0(0-0)	(-)	173(4-200)	168(-2-200)	117(-27-172)	-2(-35-220)	-24(-65-117)	-47(-50--3)	P<0,05
	I-R	0	24(4-45)	(-)	428(333-474)	-38(-121--22) a	-12(-71-31) a	-17(-71-484)	-117(-160--69)	-46(-119--15)	
	I-R+BH4	0	32(17-82)	(-)	308(188-442)	-30(-111-8)	-4(-17-150)	-17(-100-137)	33(-167-294) b	50(-30-230) b	

Valeurs représentées en médiane et l'intervalle interquartile.

FC pour fréquence cardiaque (battements/min), PAM pour pression artérielle moyenne (mmHg), IC pour index cardiaque (L/min/m²), PAMP pour pression artérielle pulmonaire moyenne (mmHg), PAPO pour pression artérielle pulmonaire d'occlusion (mmHg), SvO₂ pour saturation veineuse en oxygène (%), dTO₂ pour variation du transport d'oxygène par rapport au baseline (%), dVO₂ pour variation de la consommation d'oxygène par rapport au baseline (%), dEO₂ pour variation de l'extraction d'oxygène par rapport au baseline (%), Pha pour Ph artériel, dPaO₂ pour variation de la pression artérielle d'oxygène par rapport au baseline (%), PaCO₂ pour pression artérielle en dioxyde de carbone (mmHg), lactate (mmol/L), dDSR pour variation du débit sanguin rénal par rapport au baseline (%), diurèse (ml/kg/h), dBH pour variation du bilan hydrique par rapport au baseline (%).

a : P<0,05 entre les groupes I-R contrôle

b : P<0,05 entre les groupes I-R et BH4+I-R

c : P<0,05 par rapport au baseline.

2-Au niveau de la microcirculation rénale :

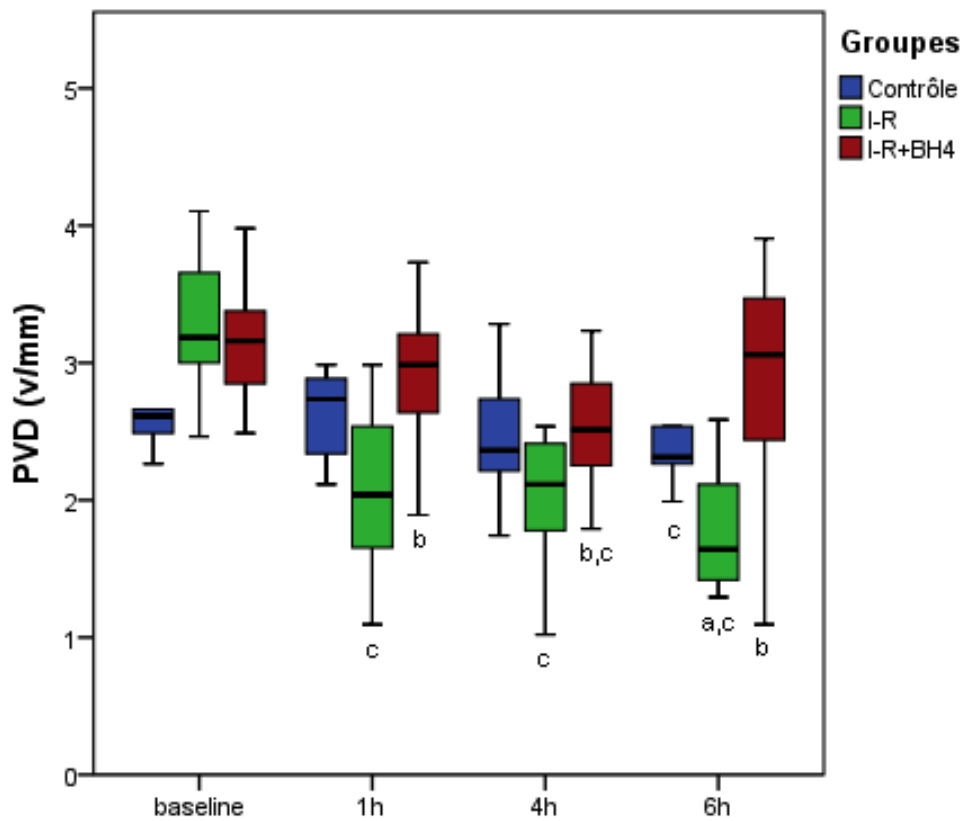
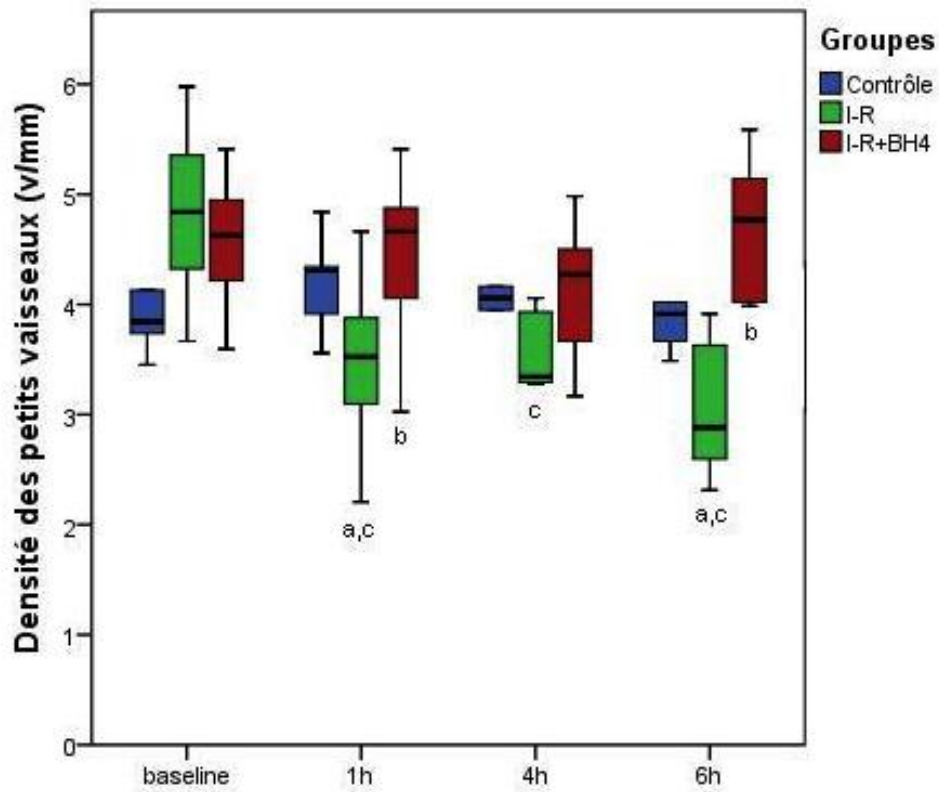
Les figures 5 à 9 représentent les principaux résultats.

A-Effets de l'ischémie-reperfusion:

L'I-R rénale a induit une baisse de la densité des petits vaisseaux, de la PVD et de la PPV. Parallèlement, elle a généré l'augmentation des index d'hétérogénéité (PVD-HI et PPV-HI).

B-Effets du BH4:

Le BH4 a significativement augmenté la densité des petits vaisseaux, la PVD et la PPV par rapport au groupe I-R. Il a aussi abaissé l'index d'hétérogénéité de PVD (PPV-HI) ainsi que l'index d'hétérogénéité de PPV (PPV-HI) par rapport au groupe I-R à la première heure de la reperfusion (P=0,056).



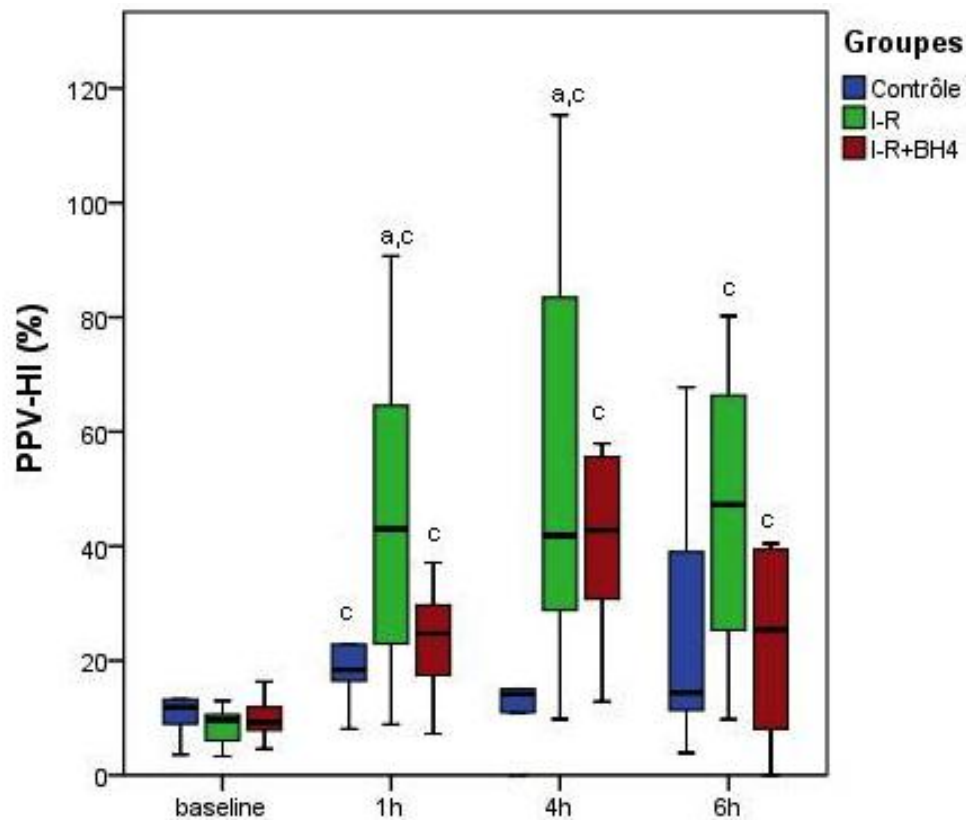
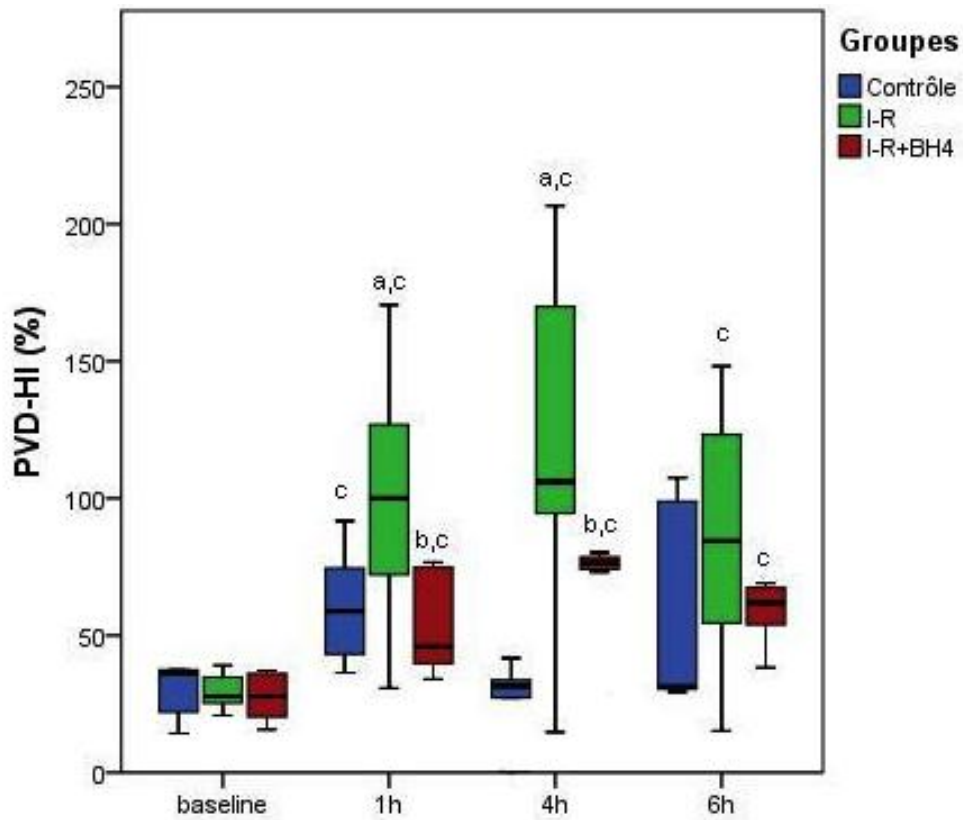
Figures 5 et 6 : Densité des petits vaisseaux en haut, PVD en bas (v/mm)

Valeurs représentées en médiane et l'intervalle interquartile.

a $P < 0.05$ différence significative entre groupes I-R et contrôle

b $P < 0.05$ différence significative entre groupes I-R et I-R+BH4.

c $P < 0.05$ différence significative par rapport au baseline.



Figures 7 et 8 : PVD-HI en haut, PPV-HI en bas (%)

Valeurs représentées en médiane et l'intervalle interquartile.

a $P < 0.05$ différence significative entre groupes I-R et contrôle

b $P < 0.05$ différence significative entre groupes I-R et I-R+BH4.

c $P < 0.05$ différence significative par rapport au baseline.

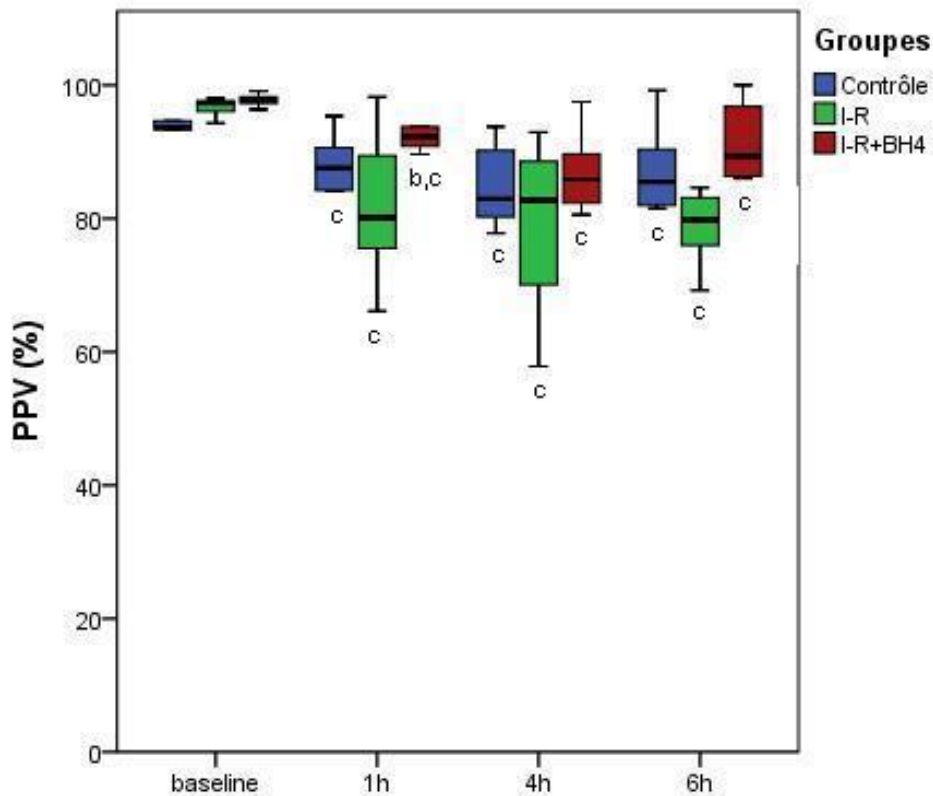


Figure 9 : PPV (%)

Valeurs représentées en médiane et l'intervalle interquartile.

a $P < 0.05$ différence significative entre groupes I-R et contrôle

b $P < 0.05$ différence significative entre groupes I-R et I-R+BH4.

c $P < 0.05$ différence significative par rapport au baseline.

3-Au niveau de la fonction rénale :

Le tableau 1 ainsi que la figure 6 représentent les principaux résultats.

A-Effets de l'ischémie-reperfusion:

Durant le clampage, le débit sanguin rénal (DSR) a bien été nul. Par ailleurs, dans le groupe I-R la diurèse et le bilan hydrique ont été globalement stables.

Cependant, une majoration notable de la créatininémie était constatée aussi bien à la phase précoce qu'à la phase tardive de la reperfusion.

B-Effets du BH4:

Dans le groupe I-R+BH4 la diurèse et le bilan hydrique étaient superposables au groupe I-R sauf que le bilan hydrique se positivait davantage à distance de la reperfusion. Cependant, le BH4 a réduit la créatininémie à 6h de la reperfusion (14 mg/L (13-17)) par rapport au groupe I-R (16 mg/L (16-22)) (P=0.072).

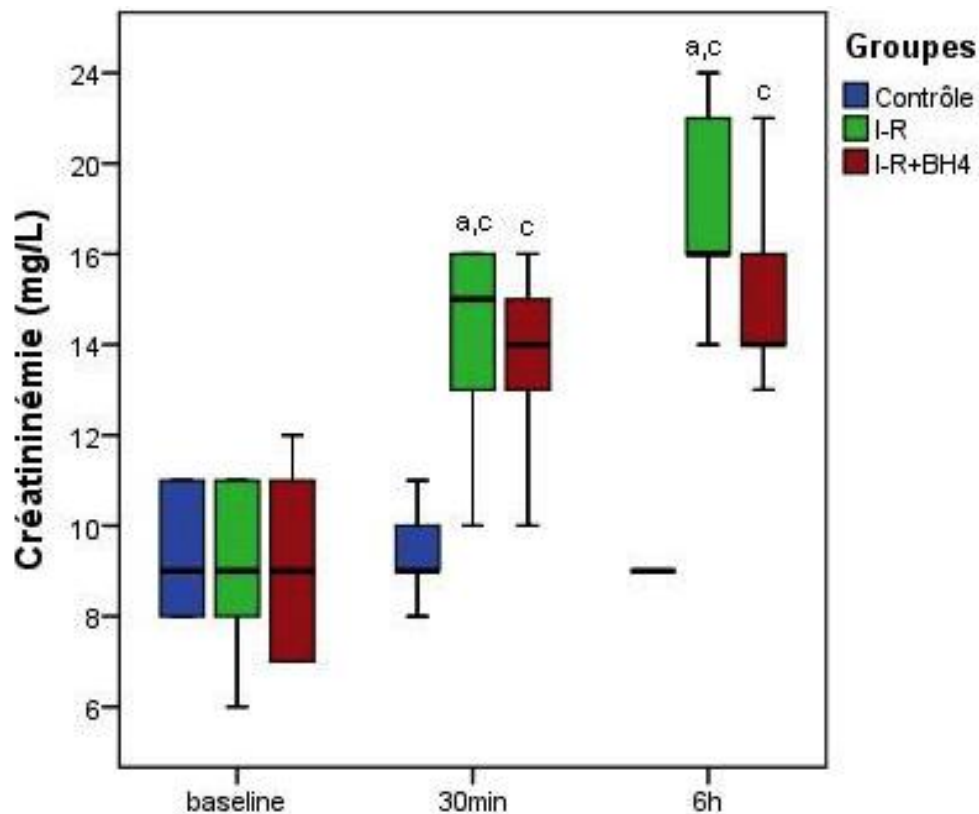


Figure 10 : Créatininémie (mg/L)

Valeurs représentées en médiane et l'intervalle interquartile.

a P<0.05 différence significative entre groupes I-R et contrôle

b P<0.05 différence significative entre groupes I-R et I-R+BH4.

c P<0.05 différence significative par rapport au baseline.

IV- DISCUSSION :

1-Effets de l'ischémie-reperfusion :

Les modifications systémiques de l'ischémie-reperfusion à savoir un état hyperdynamique étaient attendues (34). Mais l'I-R a aussi altéré la perfusion globale comme en ont témoigné les modifications du lactate, de la SvO₂ et l'extraction en oxygène. De plus, l'I-R a entraîné une altération de la fonction rénale comme l'indique l'ascension précoce (dès 30min) et persistante (à 6h) de la créatininémie.

Par ailleurs, l'ischémie-reperfusion a induit des anomalies de la microcirculation rénale. En effet, dans le groupe I-R on a constaté non seulement une baisse de la densité des petits vaisseaux et la PVD et de la PPV mais également une hausse de l'index d'hétérogénéité. Cette dysfonction a persisté 6 heures après la reperfusion.

Cette étude confirme l'existence d'anomalies microcirculatoires révélées par la vidéomicroscopie intravitale (25). Cependant, le SDF a l'avantage d'être non invasif. Il permet de visualiser directement le lit microvasculaire et d'évaluer de manière semi-quantitative les anomalies de la densité, de la perfusion mais aussi de l'hétérogénéité. Ces constatations sont en accord avec le "no-reflow phenomenon" selon lequel la reperfusion s'accompagne d'une perturbation de la perfusion (4). Ces perturbations trouvent leurs explications non seulement par des mécanismes cellulaires mais aussi biochimiques. Au niveau cellulaire, les cellules endothéliales subissent un œdème (9,10). De plus le recrutement des polynucléaires neutrophiles

contribue à l'altération de la perfusion (2). Au niveau biochimique, le relargage de cytokines pro-inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène (3) par leur cytotoxicité compromettent la microcirculation (28) et in fine diminuent la vasorelaxation endothélium-dépendante (32).

2-Effets du BH4 :

Dans le groupe IR+BH4, l'hémodynamique était préservée. Cependant Le BH4 a amélioré la perfusion globale comme en ont témoigné l'amélioration du lactate, de la SvO2 et l'extraction en oxygène.

La tétrahydrobioptérine a amélioré la microcirculation rénale surtout à la phase précoce de la reperfusion (PPV et PPV-HI). Enfin, le BH4 a modéré l'altération de la fonction rénale comme en témoigne la baisse de la créatininémie à 6h.

Le BH4 cofacteur des NOS est transformé en une forme inactive (le BH2) par le stress oxydatif comme lors de l'ischémie-reperfusion (35). Cela aboutit à la multiplication des espèces réactives de l'oxygène et donc à des lésions de l'arbre microcirculatoire (28) et une dysfonction d'organe (1). Cette étude montre que la supplémentation par le BH4 améliore d'une part la perfusion globale mais aussi la densité des vaisseaux, la perfusion et l'hétérogénéité.

Les mécanismes du BH4 sont multiples. D'une part, Kakoki et al. ont montré que le BH4 restaurait la vasorelaxation endothélium-dépendante par la libération du NO (32). D'autre part, Legrand et al. ont montré que la supplémentation par BH4 permettait l'amélioration de l'oxygénation et l'extraction d'oxygène au niveau rénale (33).

3- Limites de l'étude :

Cette étude présente plusieurs limites.

Tout d'abord, ces observations sont limitées par l'analyse semi-quantitative des images de SDF. Cependant, De Backer et al. ont rapporté précédemment avec cette analyse semi-quantitative que la variabilité inter-observateurs est d'environ 5% (36).

Deuxièmement, le nombre de sujets testés était restreint. Il faut souligner cependant que la recherche sur le grand animal ne permet pas d'utiliser un nombre important de sujets.

Troisièmement, les sujets étant sains (sans facteur ni marqueur de risque cardiovasculaire) il est difficile d'extrapoler le bénéfice du BH4 chez les patients nécessitant une chirurgie d'un anévrysme de l'aorte abdominale qui sont souvent polyvasculaires. Cependant, des études ont montré l'intérêt du BH4 en cas d'hypercholestérolémie (37) et d'athérosclérose (38). En effet, le BH4 lutterait contre la dysfonction endothéliale.

Quatrièmement, l'absence d'étude anatomopathologique du rein ou de la mesure des espèces oxygénées activées (ROS et RNOS) nous privent de comprendre certains mécanismes sous jacents du BH4. En effet, Legrand et al. ont montré une diminution de l'infiltration glomérulaire et péri tubulaire par des cellules inflammatoires après administration de BH4 chez des rats ayant subi une ischémie-reperfusion rénale. Effectivement, ils ont noté une baisse de l'activité de la myéloperoxydase au niveau glomérulaire et péri tubulaire après étude histologique des reins (33).

Cinquièmement, la surveillance après la reperfusion a été relativement courte (6 heures). Ceci dit, il est difficile aussi bien sur un plan technique qu'aseptique d'envisager une surveillance prolongée. D'autres études sont nécessaires pour confirmer le bénéfice à moyen et long terme du BH4.

4-Perspectives :

Le monitoring de la microcirculation rénale par une technique non invasive a démontré son intérêt expérimental. Une évaluation de la microcirculation sublinguale pourrait être utile au clinicien. En effet, l'I-R étant une source de syndrome inflammatoire systémique (1) une altération systémique de la microcirculation est possible. En effet, il est démontré dans le choc septique une altération de la microcirculation sublinguale (39). Des essais cliniques utilisant cette technique pourraient être pertinents.

Le bénéfice du BH4 sur la microcirculation rénale n'a pas été prolongé. Une réinjection durant la reperfusion pourrait davantage entretenir ses effets.

En tant qu'étude préclinique, malgré ses limites, celle-ci invite à un essai clinique pour confirmer l'intérêt néphroprotecteur de la tétrahydrobioptérine. Des essais cliniques dans des modèles d'ischémie-reperfusion rénale sembleraient pertinents. La transplantation rénale et la chirurgie de l'anévrisme de l'aorte par clampage sus-rénal de l'aorte sont des situations fréquentes et à risque de dysfonction rénale qu'un préconditionnement par le BH4 pourrait prévenir. De plus, le BH4 étant

abaissé par certains facteurs de risques cardiovasculaires et par l'athérosclérose en général, le bénéfice du BH4 en chirurgie cardiaque semble prometteur et des essais cliniques sont justifiés. Leucker et al. ont montré, dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion myocardique, un effet cardioprotecteur du BH4 (40).

5-Conclusion :

L'ischémie-reperfusion rénale par clampage de l'aorte sus-rénale a eu pour conséquences:

- des lésions et une dysfonction de la microcirculation rénale.
- des altérations fonctionnelles (hausse de la créatininémie).

Cependant le BH4 a atténué ces altérations secondaires à l'ischémie-reperfusion avec un état hémodynamique préservé.

L'I-R induit une baisse de la biodisponibilité du NO par la baisse du BH4 aboutissant à la synthèse de l'anion superoxyde. La tétrahydrobioptérine, en tant que cofacteur des NOS, permet donc de limiter les lésions microcirculatoires et fonctionnelles en restaurant la biodisponibilité du NO (32). Ainsi, le BH4 améliore la dysfonction endothéliale et la fonction rénale en limitant la formation de l'anion superoxyde et donc les lésions cellulaires (28).

V- REFERENCES

- 1- Neary P, Redmond HP. Ischemia-reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome. In: Grace PA, Mathie RT editor. *Ischaemia-Reperfusion Injury*. London: Blackwell Science; 1999. p 123-136.
- 2- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000 Feb; 190: 255-66.
- 3- Ramesh G, Reeves WB, Inflammatory cytokines in acute renal failure. *Kidney Int Suppl*. 2004 Oct; (91):S56-61.
- 4- Vrints CJ. Pathophysiology of the no-reflow phenomenon. *Acute Card Care*. 2009; 11(2):69-76.
- 5- Zappitelli M. Epidemiology and diagnosis of acute kidney injury. *Semin Nephrol*. 2008 Sep; 28(5):436-46.
- 6- Sturm JT, Billiar TR, Luxenberg MG, Perry JF. Risk factors for the development of renal failure following the surgical treatment of traumatic aortic rupture. *Ann Thorac Surg*. 1987 Apr; 43(4):425-7.
- 7- Hoste EA, Kellum JA, Katz NM, Rosner MH, Haase M, Ronco C. Epidemiology of acute kidney injury. *Contrib Nephrol*. 2010; 165:1-8.
- 8- Brodsky SV, Yamamoto T, Tada T et al. Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Jun; 282(6):F1140-9.
- 9- Flores J, DiBona DR, Beck CH, Leaf A. The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. *J Clin Invest*. 1972 Jan; 51(1):118-26.

- 10-Leaf A. Cell swelling. A factor in ischemic tissue injury. *Circulation*. 1973 Sep; 48(3):455-8.
- 11-Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int*. 2007 Jul; 72(2):151-6.
- 12-Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Nov; 281(5):F887-99.
- 13-Johnson PC. Overview of the microcirculation. In:TumaRF, DuranVN, Ley K, editors. *Handbook of physiology: microcirculation*. Oxford: Elsevier Science; 2002. p. xi–xxiv.
- 14-Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 2004 Sep; 32(9):1825-31.
- 15-Sakr Y. Techniques to assess tissue oxygenation in the clinical setting. *Transfus Apher Sci*. 2010 Aug; 43(1):79-94.
- 16-Nevière R, Mathieu D, Chagnon JL, Lebleu N, Millien JP, Wattel F. Skeletal muscle microvascular blood flow and oxygen transport in patients with severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Jan; 153(1):191-5.
- 17-Sair M, Etherington PJ, Peter Winlove C, Evans TW. Tissue oxygenation and perfusion in patients with systemic sepsis. *Crit Care Med*. 2001 Jul; 29(7):1343-9.
- 18-Kirschenbaum LA, Astiz ME, Rackow EC, Saha DC, Lin R. Microvascular response in patients with cardiogenic shock. *Crit Care Med*. 2000 May; 28(5):1290-4.

- 19-De Backer D, Hollenberg S, Boerma C, Goedhart P, Büchele G, Ospina-Tascon G, Dobbe I, Ince C. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care*. 2007; 11(5):R101.
- 20-Harris AG, Sinitsina I, Messmer K. The Cytoscan Model E-II, a new reflectance microscope for intravital microscopy: comparison with the standard fluorescence method. *J Vasc Res*. 2000 Nov-Dec; 37(6):469-76.
- 21-Mathura KR, Vollebregt KC, Boer K, De Graaff JC, Ubbink DT, Ince C. Comparison of OPS imaging and conventional capillary microscopy to study the human microcirculation. *J Appl Physiol*. 2001 Jul; 91(1):74-8.
- 22-Ospina-Tascon G, Neves AP, Occhipinti G, Donadello K, Büchele G, Simion D, Chierago ML, Silva TO, Fonseca A, Vincent JL, De Backer D. Effects of fluids on microvascular perfusion in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2010 Jun; 36(6):949-55.
- 23-Taccone FS, Su F, Pierrakos C, He X, James S, Dewitte O, Vincent JL, De Backer D. Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study. *Crit Care*. 2010; 14(4):R140.
- 24-Wauters J, Claus P, Brosens N, McLaughlin M, Malbrain M, Wilmer A. Pathophysiology of renal hemodynamics and renal cortical microcirculation in a porcine model of elevated intra-abdominal pressure. *J Trauma*. 2009 Mar; 66(3):713-9.
- 25-Yamamoto T, Tada T, Brodsky SV et al. Intravital videomicroscopy of peritubular capillaries in renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Jun; 282(6):F1150-5.

- 26-Harris AG, Sinitsina I, Messmer K. The Cytoscan Model E-II, a new reflectance microscope for intravital microscopy: comparison with the standard fluorescence method. *J Vasc Res* 2000; 37: 469–76.
- 27-Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, et al. Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1997; 45:505–13.
- 28-Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000 Feb; 190(3):255-66.
- 29-Wever RM, van Dam T, van Rijn HJ, de Groot F, Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Aug 18; 237(2):340-4.
- 30-Landmesser U, Dikalov S, Price SR et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 2003 Apr; 111(8):1201-9.
- 31-Grisham MB, Granger DN, Lefer DL. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med.* 1998 Sep; 25(4-5):404-33.
- 32-Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H et al. Effects of tetrahydrobiopterin on endothelial dysfunction in rats with ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Feb; 11(2):301-9.
- 33-Legrand M, Kandil A, Payen D, Ince C. Effects of sepiapterin infusion on renal oxygenation and early acute renal injury after suprarenal aortic clamping in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011 Aug; 58(2):192-8.

- 34-Siegemund M, van Bommel J, Stegenga ME et al. Aortic cross-clamping and reperfusion in pigs reduces microvascular oxygenation by altered systemic and regional blood flow distribution. *Anesth Analg*. 2010 Aug; 111(2):345-53.
- 35-Kietadisorn R, Juni RP, Moens AL. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Mar 1; 302(5):E481-95.
- 36-De Backer D, Creteur J, Preiser JC, et al: Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:98 –104.
- 37-Stroes E, Kastelein J, Cosentino F et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest*. 1997 Jan 1; 99(1):41-6.
- 38-Katusic ZS. Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Sep; 281(3):H981-6
- 39-De Backer D, Donadello K, Sakr Y et al. Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome. *Crit Care Med*. 2013 Mar; 41(3):791-9.
- 40-Leucker TM, Ge ZD, Procknow J, Liu Y, Shi Y, Bienengraeber M, Warltier DC, Kersten JR. Impairment of endothelial-myocardial interaction increases the susceptibility of cardiomyocytes to ischemia/reperfusion injury. *PLoS One*. 2013 Jul ; 22; 8(7):e70088.

AUTEUR : Rahmania Lokmane

Date de Soutenance : 12 mai 2014

Titre de la Thèse :

Etude de la microcirculation rénale dans un modèle ovin d'ischémie-reperfusion rénale par clampage sus-rénal de l'aorte : intérêt de la tétrahydrobioptérine

Thèse - Médecine - Lille 2014

Cadre de classement : Anesthésie-Réanimation

DES + spécialité : Anesthésie-Réanimation

Mots-clés : ischémie-reperfusion, insuffisance rénale, dysfonction endothéliale, tétrahydrobioptérine, densité des petits vaisseaux perfusés, proportion des petits vaisseaux perfusés, index d'hétérogénéité.

Résumé :

Contexte :

La chirurgie de l'anévrisme de l'aorte abdominale par clampage sus-rénale de l'aorte (CSRA) est pourvoyeuse d'insuffisance rénale. L'ischémie-reperfusion (I-R) induite par cette procédure entrainerait une dysfonction endothéliale avec une baisse de la tétrahydrobioptérine (BH4), cofacteur des NO synthases. L'objectif de l'étude est de montrer que l'I-R par CSRA induit une altération de la microcirculation rénale que le BH4 préviendrait.

Méthodes :

Dix neuf brebis adultes ont été anesthésiées, ventilées mécaniquement et monitorées de manière invasive. Après une lombotomie gauche, le débit sanguin rénal était mesuré en continu à l'aide d'une sonde de débit placée autour de l'artère rénale et un clamp était positionné au niveau de l'aorte sus-rénale. Les animaux ont été randomisés en 3 groupes (contrôle=5, I-R=7, I-R+BH4=7). Le groupe contrôle a été opéré sans CSRA. Les groupes I-R ont été exposés à une heure de CSRA. Le groupe BH4+I-R a bénéficié d'un prétraitement par 20mg/kg de BH4. Tous les sujets ont été surveillés jusqu'à 6 heures après la reperfusion. La microcirculation rénale a été évaluée par la vidéomicroscopie Sidestream Dark-Field à l'état basal à 1, 4 et 6 heures après la reperfusion. Nous avons calculé la densité des petits vaisseaux perfusés (PVD) comme le nombre de petits vaisseaux perfusés/mm (v/mm), la proportion des petits vaisseaux perfusés (PPV) et l'hétérogénéité de PPV (PPV-HI).

Résultats :

Les variables hémodynamiques étaient conservées dans les 3 groupes. Le BH4 a amélioré la PVD (3.0 (2.6-3.3), 2.5 (2.0-3.1) 3.1 (2.4-3.8) v/mm) comparé au groupe I-R (2.0 (1.5-2.8) 2.1 (1.7-2.7) 1.6 (1.3-2.3) v/mm) respectivement à 1, 4, et 6 heures de la reperfusion ($P < 0.05$). A 1 heure de la reperfusion, le groupe I-R+BH4 a présenté une PPV et une PPV-HI mieux préservées par rapport au groupe I-R (PPV 92.3 (89.8- 93.8) versus 80.1 (73.5- 90.2)%, $P < 0.05$ et PPV-HI 24.7 (17.1- 32.8) vs 43.0 (22.2- 84.0)%, $P = 0.056$). Le BH4 a été associé à une amélioration de la fonction rénale, évaluée par la créatininémie à 6 heures de la reperfusion, dans le groupe I-R+BH4 (14 mg/L (13-17)) par rapport au groupe I-R (16 mg/L (16-22)) ($P = 0.072$).

Conclusion :

Dans un modèle ovin d'I-R rénale un prétraitement par BH4 a amélioré les lésions et les dysfonctions microvasculaires. Des essais cliniques sont nécessaires pour évaluer la prévention par le BH4 de l'insuffisance rénale induite par l'ischémie-reperfusion.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur Daniel Mathieu

Assesseurs : Monsieur le Professeur Daniel De Backer, Monsieur le Professeur Benoit Tavernier, Monsieur le Professeur Raphaël Favory, Monsieur le Docteur Emmanuel Robin.