

*Etude de l'expression de p-AKT et de p-mTOR
au cours du développement rénal
normal et pathologique*

APOSTOLOU A¹, JOUK P-S², POREAU B², GUIMIOT F³, SARTELET H¹

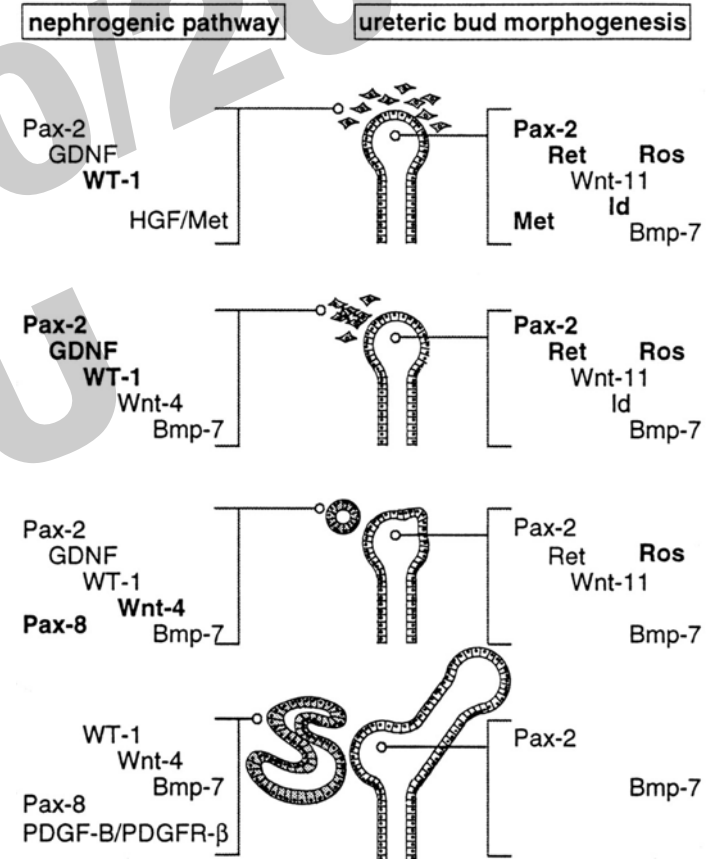
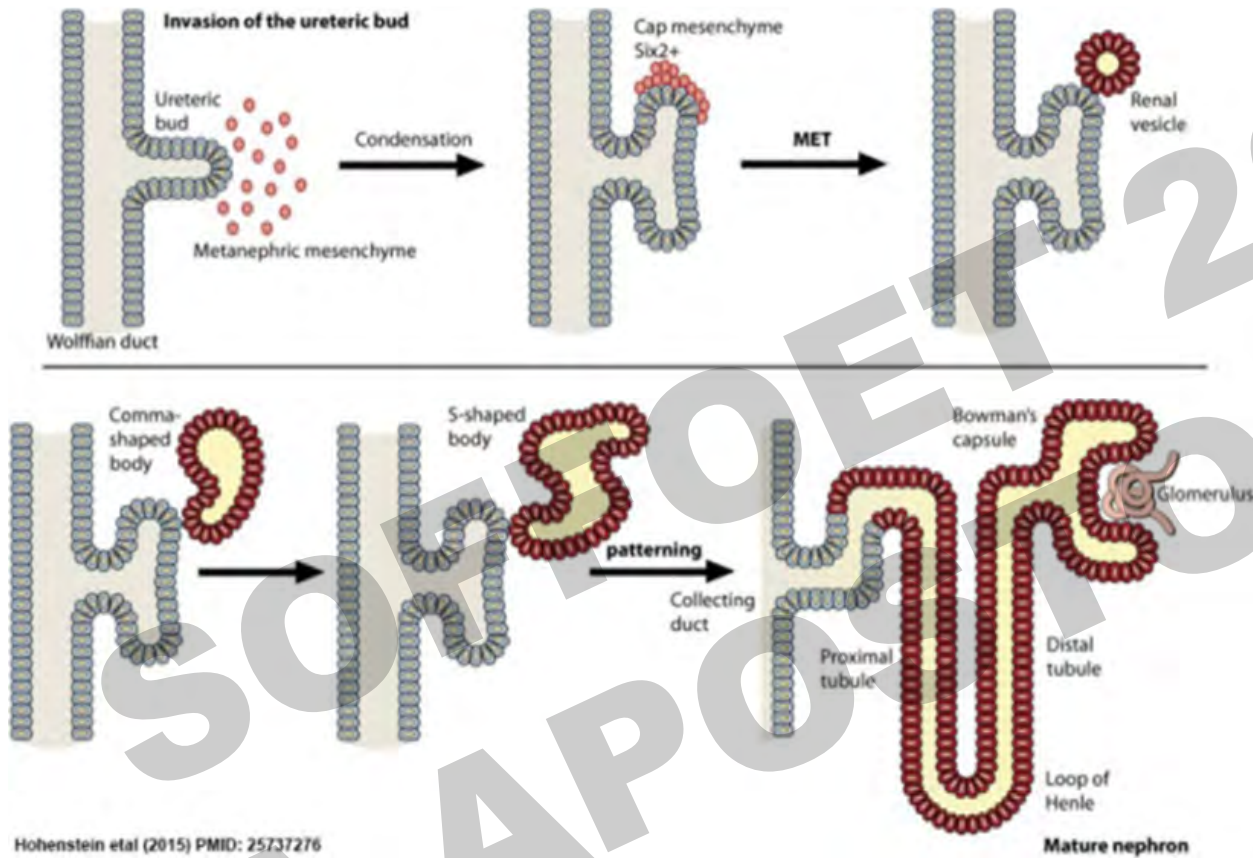
1 DEPARTMENT OF PATHOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY OF GRENOBLE, GRENOBLE, FRANCE

2 DEPARTMENT OF GENETIC, COUPLE CHILDREN'S HOSPITAL, GRENOBLE, FRANCE

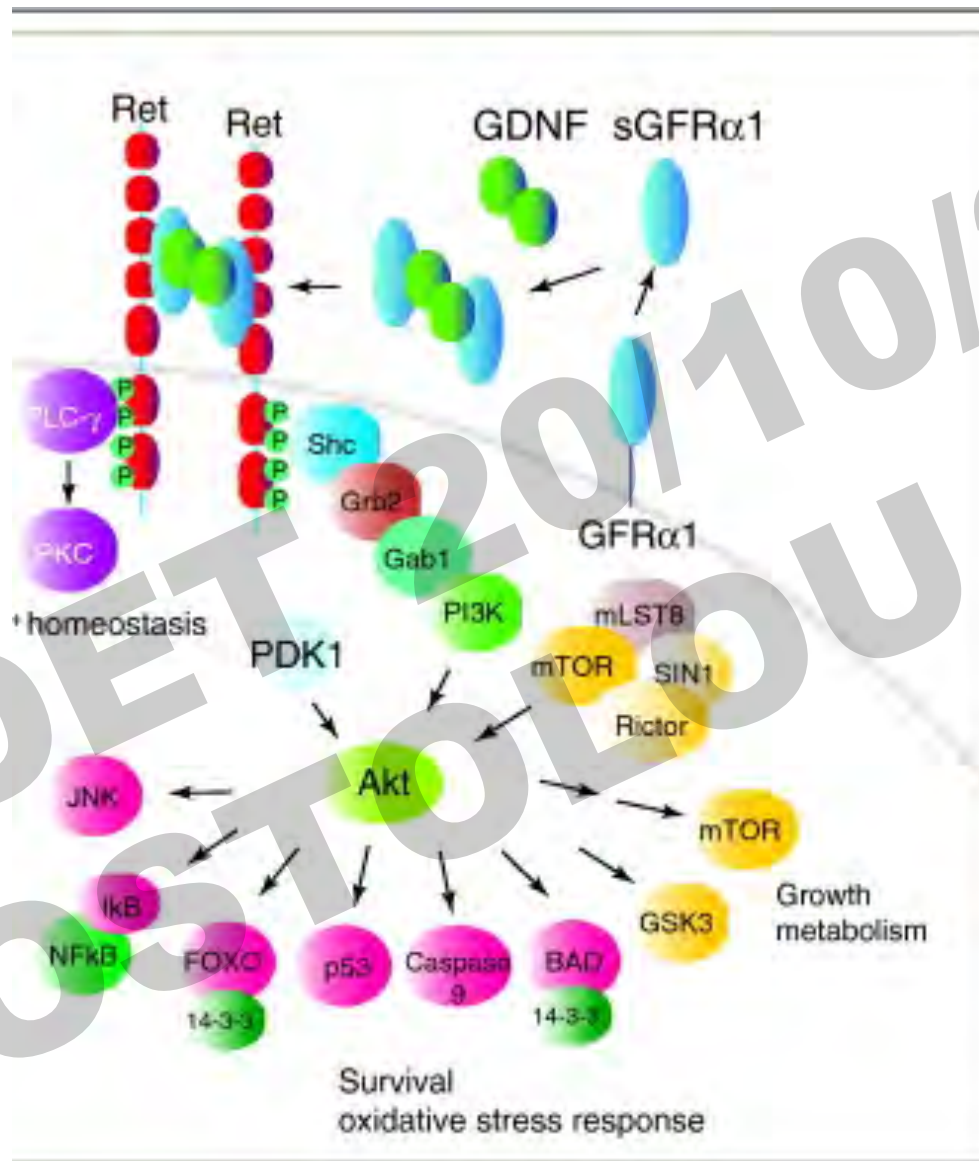
3 CHU ROBERT DEBRE PARIS, FRANCE

Embryologie

- Induction réciproque :



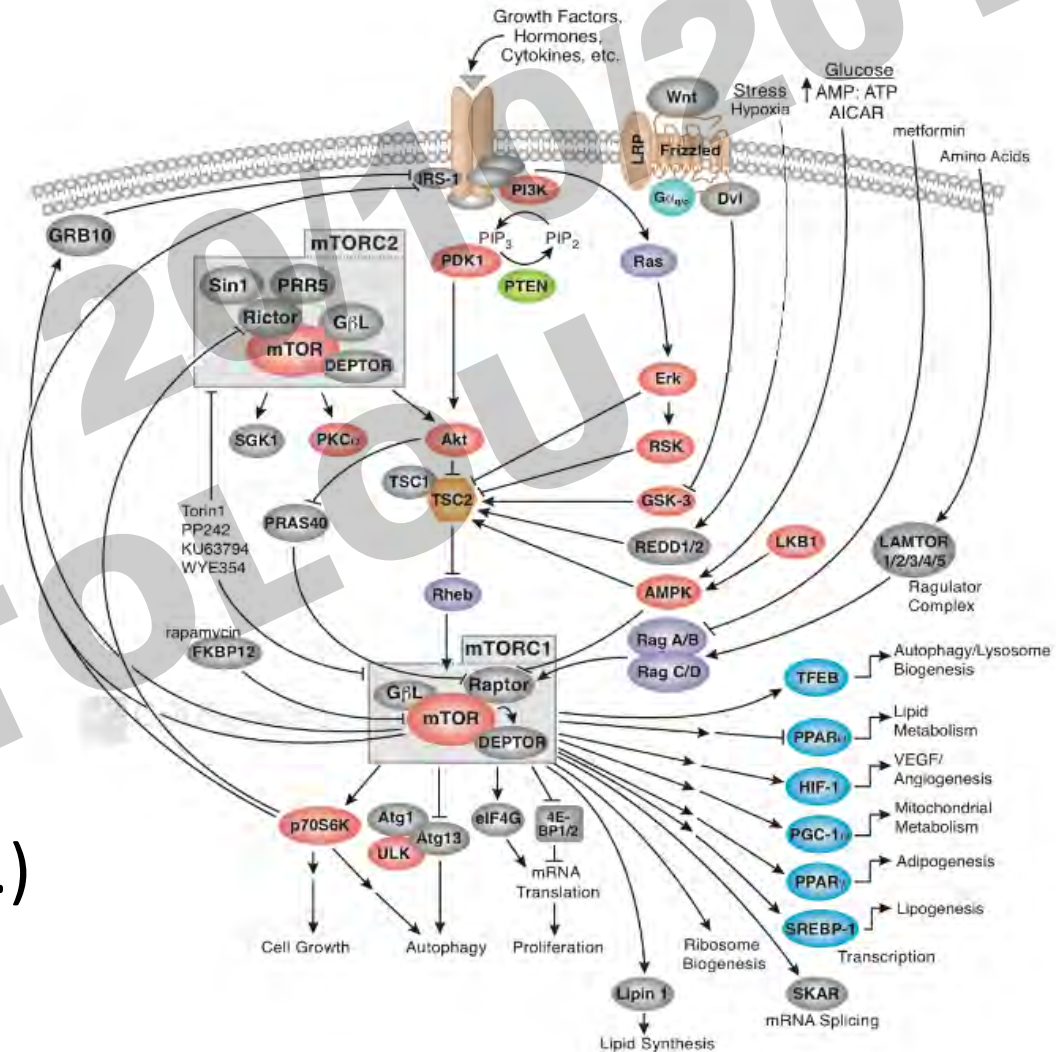
Michael F. Horster Physiological Reviews 1999 Vol. 79 no. 4, 1157-1191



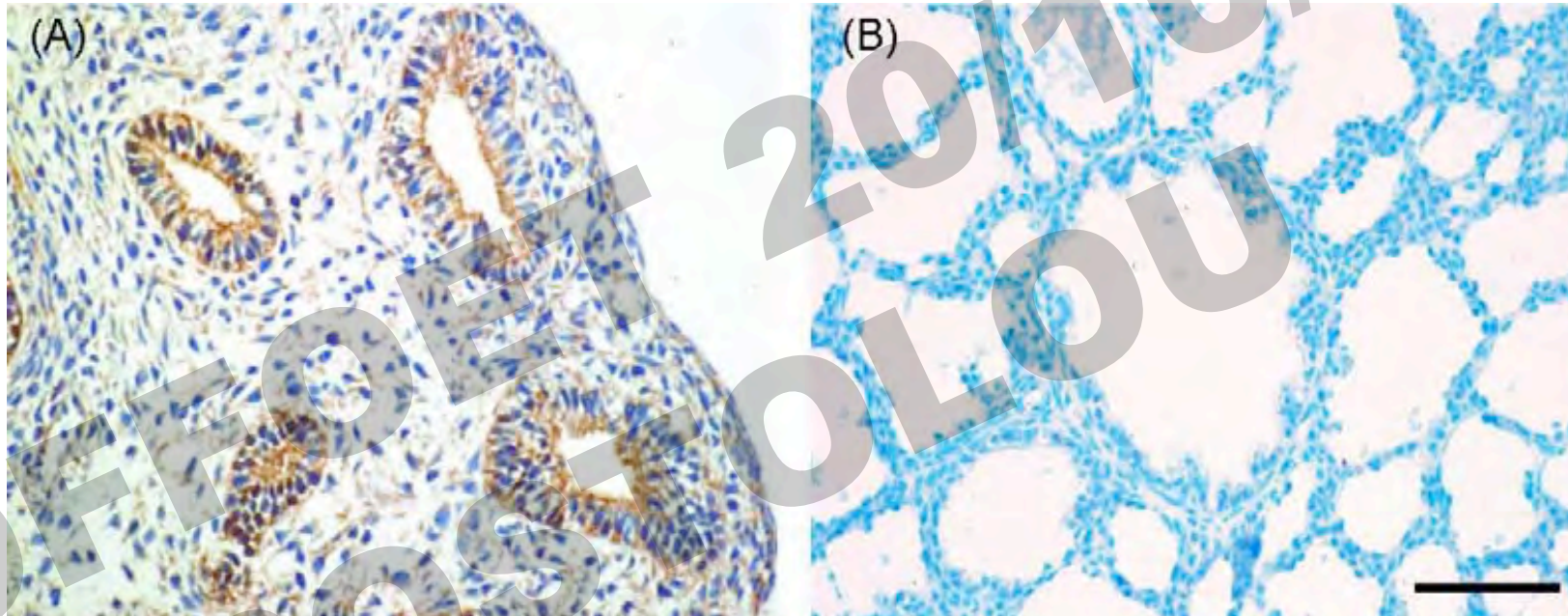
Aron L, Klein R. Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors. Trends Neurosci. 2011 Feb;34(2)

Voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR

- Cascade biochimique
- Rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie cellulaire
- Inhibiteurs
(Analogues à la Rapamycine, ...)



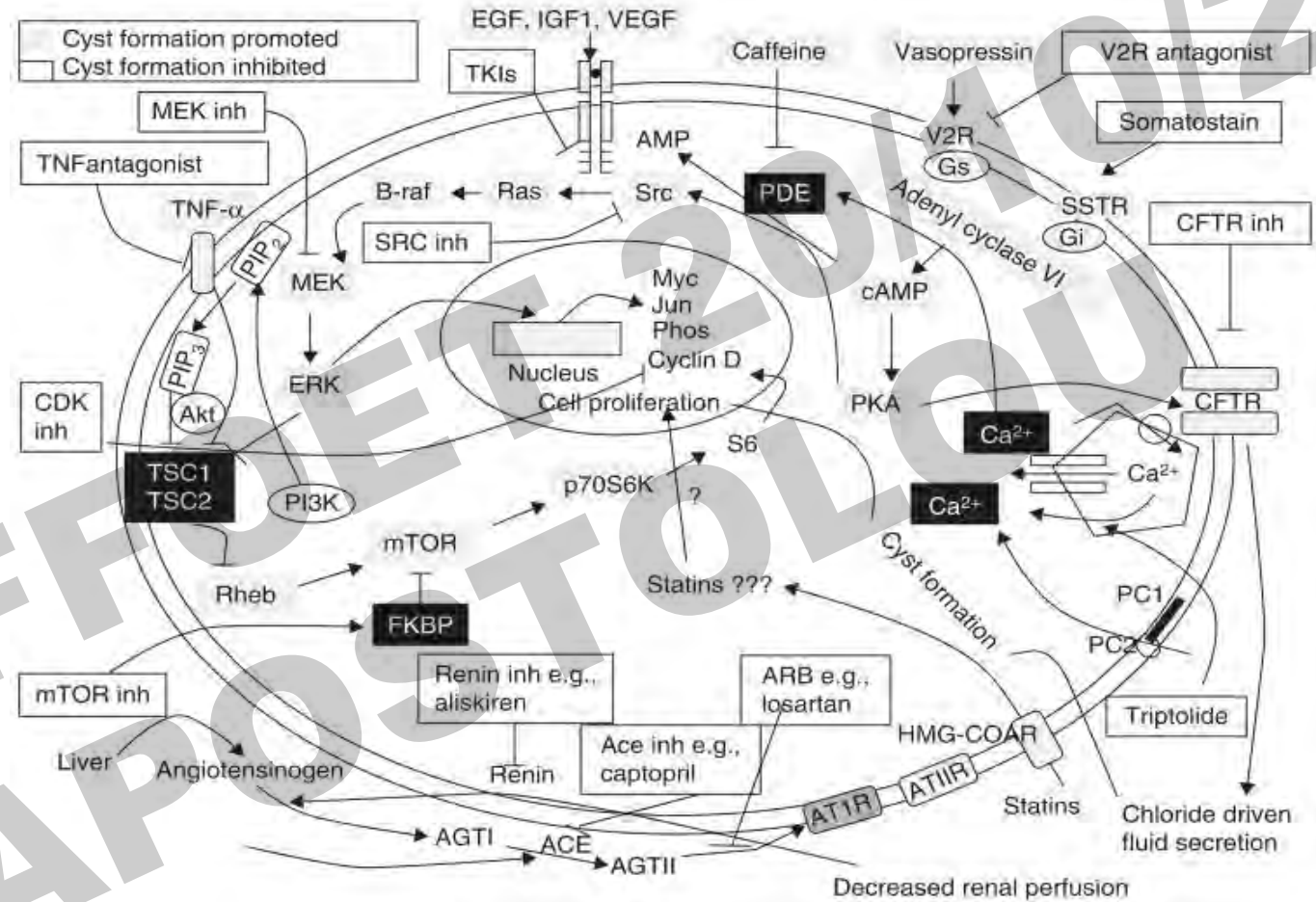
AKT/mTOR développement pulmonaire



pAKT in (A) E14 and (B) E18 mouse lungs.

Wang J, Ito T, Udaka N, Okudela K, Yazawa T, Kitamura H. PI3K-AKT pathway mediates growth and survival signals during development of fetal mouse lung. *Tissue Cell*. 2005 Feb;37(1):25-35.

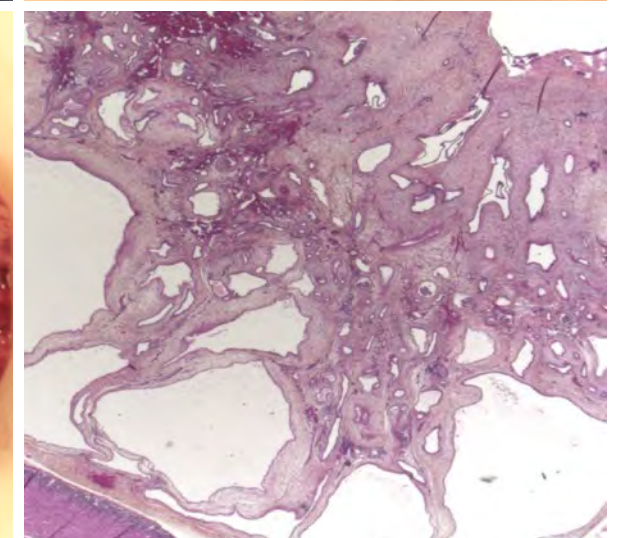
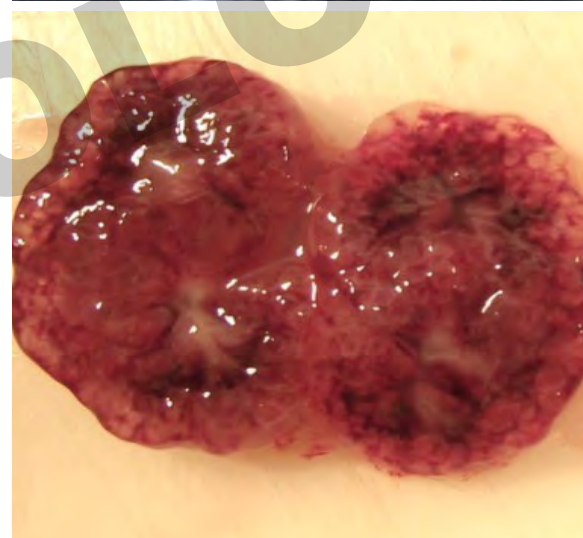
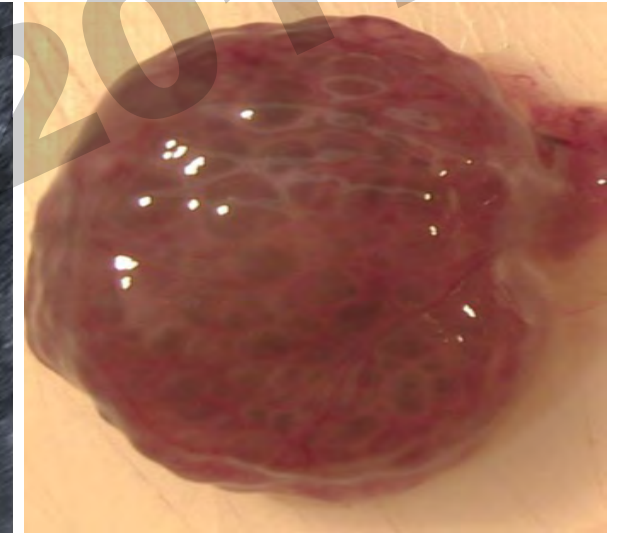
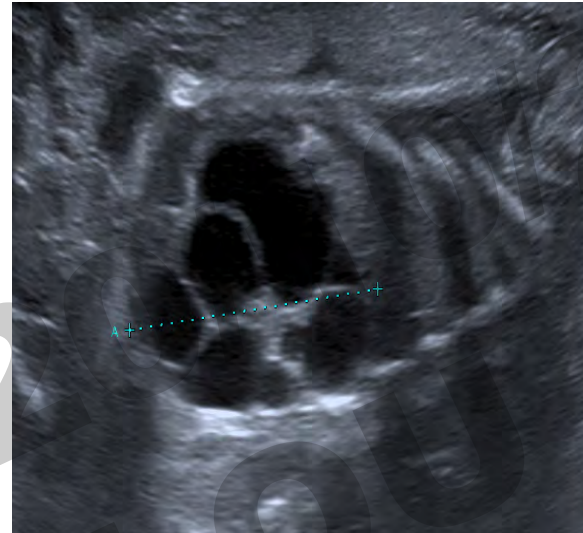
AKT/mTOR développement rénale



Belibi FA, Edelstein CL. Novel targets for the treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease. Expert Opin Investig Drugs. 2010 Mar;19(3):315-28.

Pathologies rénales kystiques: mécanique

- DMK:
 - Anomalie fréquente (1/4 300)
 - Uropathie malformative ++
 - Echographie : kystes
 - Histologie :
 - Tubes primitifs + mésenchyme
 - Tissu hétérotopique
 - Kystes de tailles variables



- Pathologies rénales kystiques: génétique

- PKAR:

- Maladie génétique rare (incidence : 1/20 000)
- PKHD1 gene on chromosome 6p12
- Décès fréquent en périnatale
- Echographie : hyperplasies bilatérales, hyperéchogènes, kystes
- Macroscopie : taille augmentée
- Histologie : kystes allongés, architecture radiée en rayon de miel
- Foie : FHC

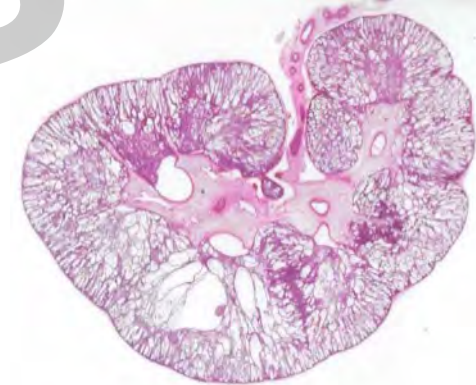
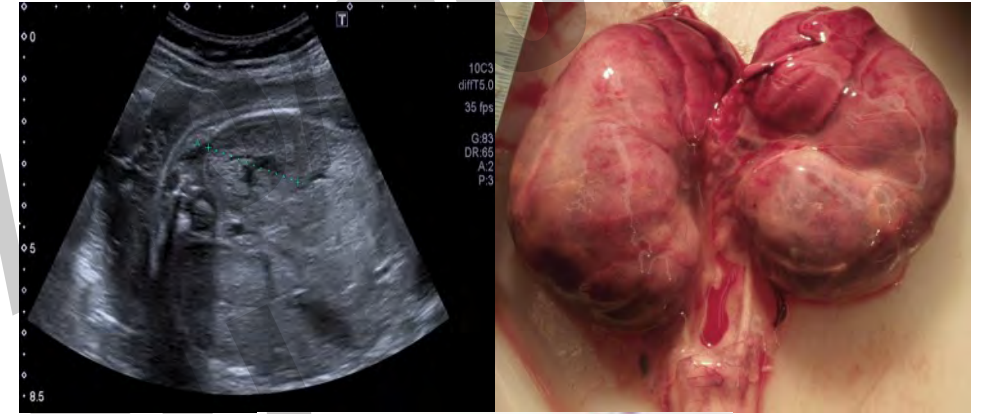
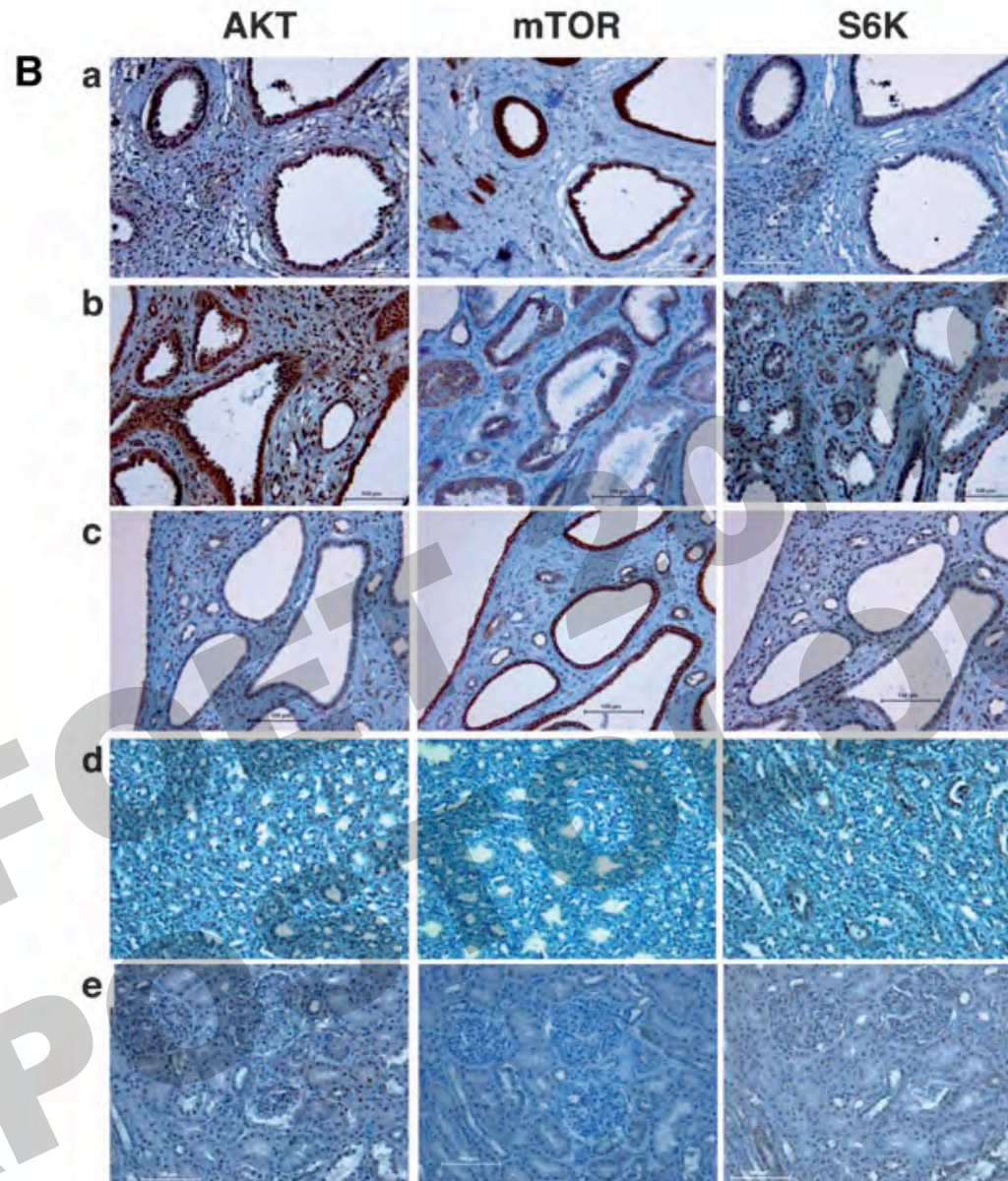


Table 1. Clinical data of ARPKD patients at the time of nephrectomy

ID	Gender	Age			Height at the time of nephrectomy		Extrarenal manifestations						
		at the time of diagnosis	at the start of dialysis	at the time of nephrectomy	(cm)	(SD score)	Hepatosplenomegaly	Hepatic fibrosis	Portal hypertension	Directional reversal of pvf ^a	Caroli-synd.	Cholangiodysplasia	
HRO2 ^b	F	prenatal/at birth	2.75 years	2.75 years	90	-1.21	Yes	Yes	No	No	No	No	Likely
H3	M	prenatal/at birth	1 year	1.33 years	78	-1.69	Yes	Yes	No	No	No	No	No
H4	M	at birth	6 years	9.17 years	119	-2.72	Yes ^c	Yes ^c	Yes ^c	Yes	No	No	No
MS5 ^b	M	prenatal/at birth	5 years	6.67 years	109	-2.37	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes
H6	M	2 weeks	n.a. ^d	3.08 years	88	-2.4	Yes	Yes	No	No	No	No	No
H7	M	at birth	1 year	1.42 years	72	-3.83	Yes ^c	Yes ^c	Yes ^c	Yes	Yes	Yes	Yes
H8	F	2 weeks	3 years	3.42 years	89	-3.18	Yes	No	No	No	No	No	No
B9	F	6 days	4 years	4.17 years	95	-2.15	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
HH10 ^b	F	prenatal	2 days	11 days	50	0.0	No	No	No	No	No	No	No
H11	F	prenatal/at birth	n.a. ^d	7 months	62	-1.99	Yes	Yes	No	No	No	No	No
H12	M	at birth	3 months	3 months	55	-2.25	Yes	Yes	No	No	No	No	No
H13	F	6 years	4 years	15 years	154	-1.52	Yes ^c	Yes ^c	Yes ^c	No	No	No	No

^a At the time of diagnosis, clinical guidelines for ARPKD were absent. ^b Ultrastructural examination of kidneys. ^c For all patients the symptoms of extrarenal manifestation at the time of nephrectomy. ^d n.a. at the



Nephrol Dial Transplant (2009) 24: 1819–1827

OBJECTIF PRINCIPAL

- Expression de p-AKT et de p-mTOR dans le développement rénal normal
- Expression de p-AKT et de p-mTOR sur une série de cas de DMK et de PKAR

MATERIEL
ET
METHODES

SOFFOET 2010/2017
A APOSTOLOU

Matériel

- Rétrospective de 2009 à 2017.
- Diagnostic prénatal pluridisciplinaire d'anomalies génétiques et/ou malformatives d'une gravité extrême ou incompatibles avec la vie ex-utéro.
- Autopsies foétales suite aux demandes d'IMG
- Pathologie du CHU de Grenoble + agglomération
- Critère d'exclusion = MFIU
- 17 reins normaux (3 cas de 12 SA, 8 cas de 13 SA à 24 SA et 6 cas de 26 SA à 35 SA)
- 13 cas de DMK, 5 cas de PKAR (dont 3 du CHU RB à Paris).

Méthode

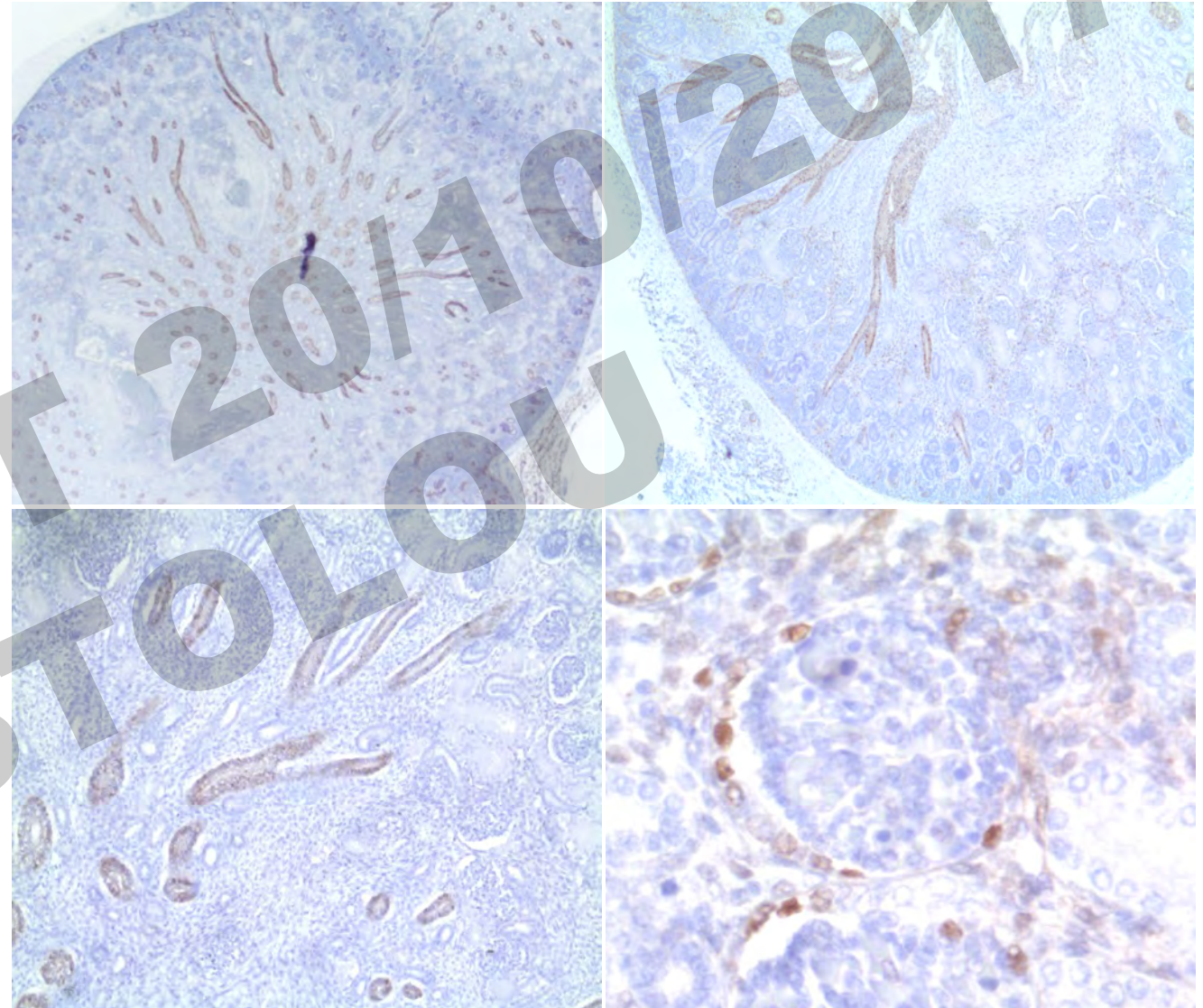
- Fixés au formol pendant 48h au minimum
- Inclusion dans des blocs de paraffine
- Histologie des lames en coloration HES
- Lecture des lames immunohistochimiques
- Expression topographique de p-AKT et de p-mTOR dans les reins normaux au cours des 3 trimestres et dans les reins kystiques pathologiques.

RESULTATS

SOFFOET 2010/2017
A APOSTOLOU

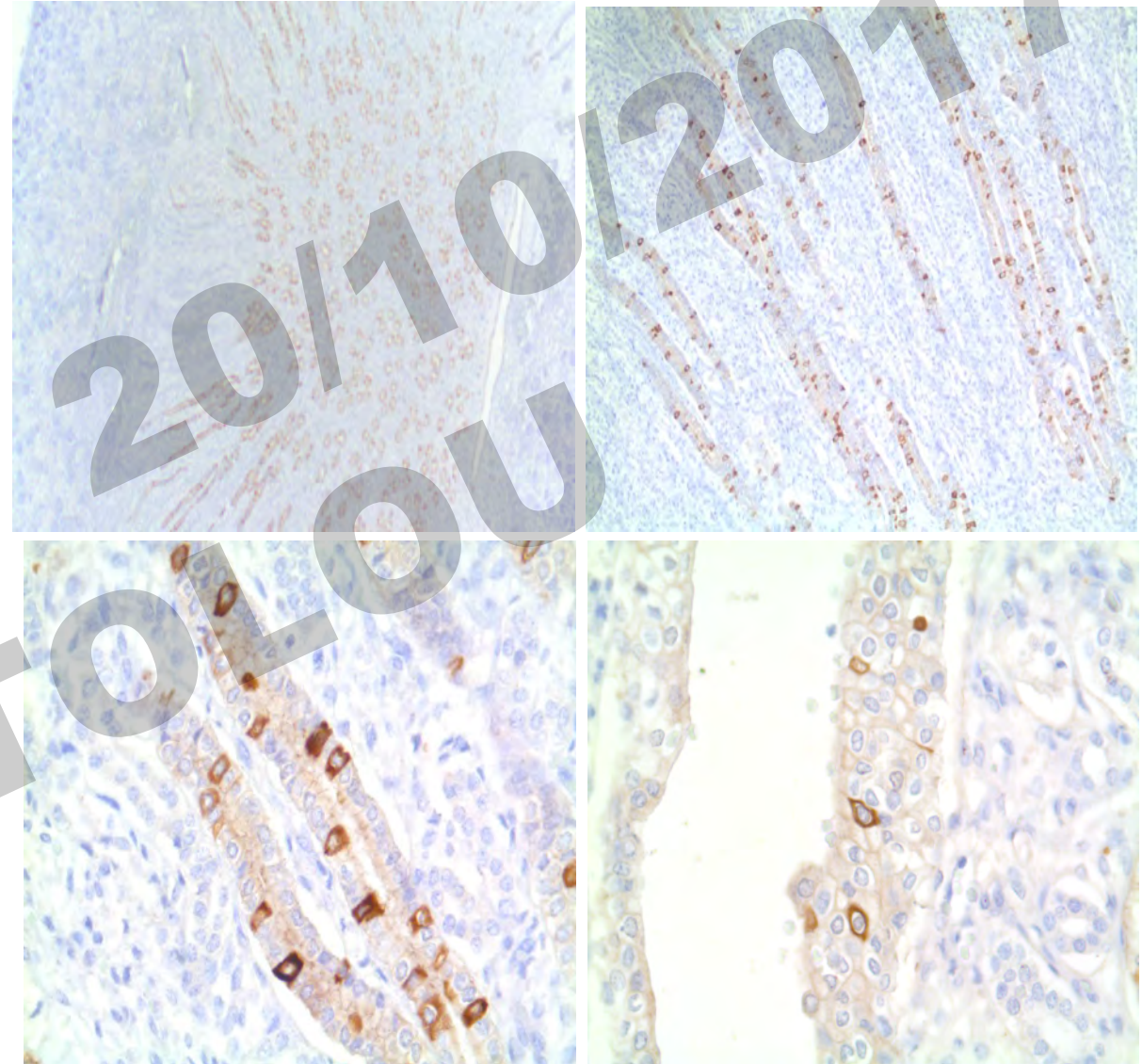
Développement rénal normal

- Immunohistochimie: p-AKT
 - 1^{er} trimestre
 - Marquage nucléaire ++
 - Bourgeon urétérale (TC + ampoules urétrales)
 - Capsule de Bowman
 - Urothélium



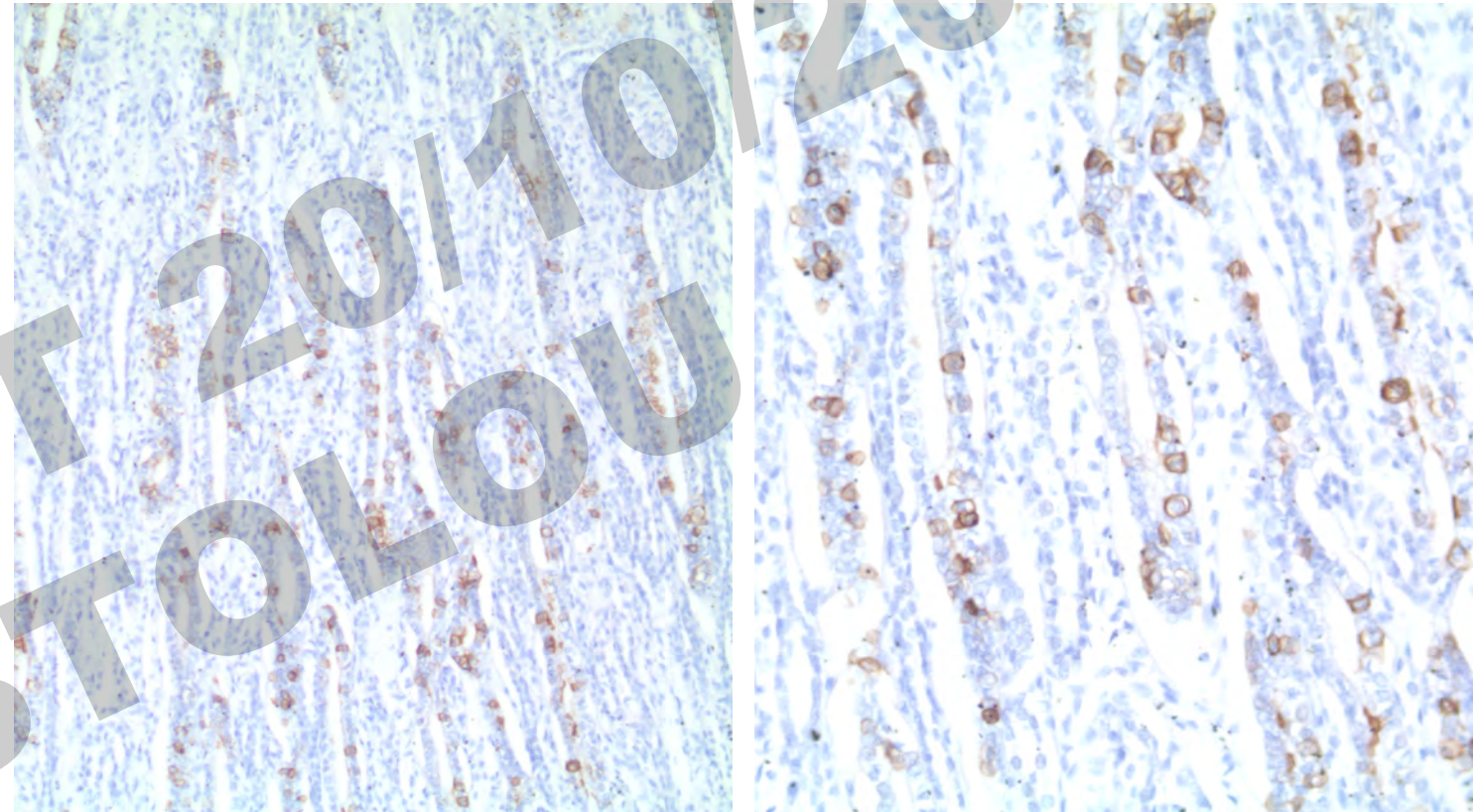
Développement rénal normal

- Immunohistochimie: p-AKT
 - 2^{ème} trimestre
 - Marquage cytoplasmique ++
 - Cellules intercalaires des TC + ampoules urétérales
 - Cellules intermédiaires de l'urothélium



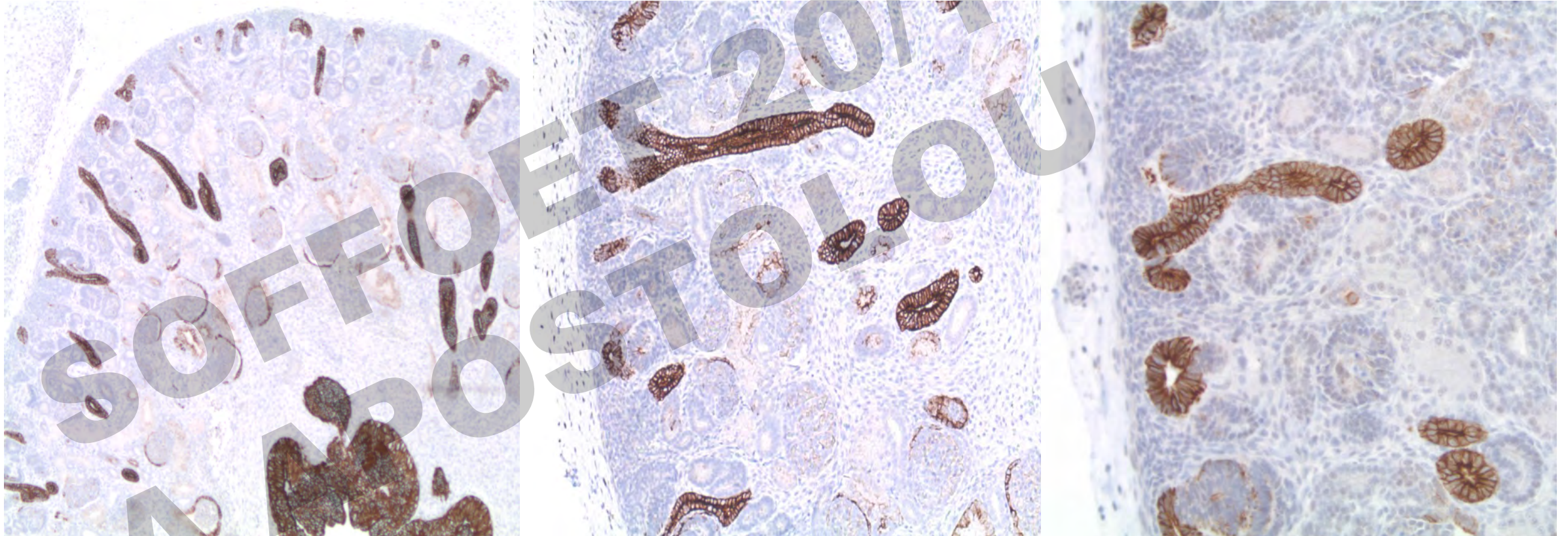
Développement rénal normal

- Immunohistochimie: p-AKT
 - **3^{ème} trimestre :**
 - Marquage cytoplasmique++
 - **Avant fin glomérulogénèse :**
 - Cellules intercalaires des TC et des ampoules urétérales.
 - Absence urothélium
 - **Après la fin glomérulogénèse :**
 - Absence d'expression



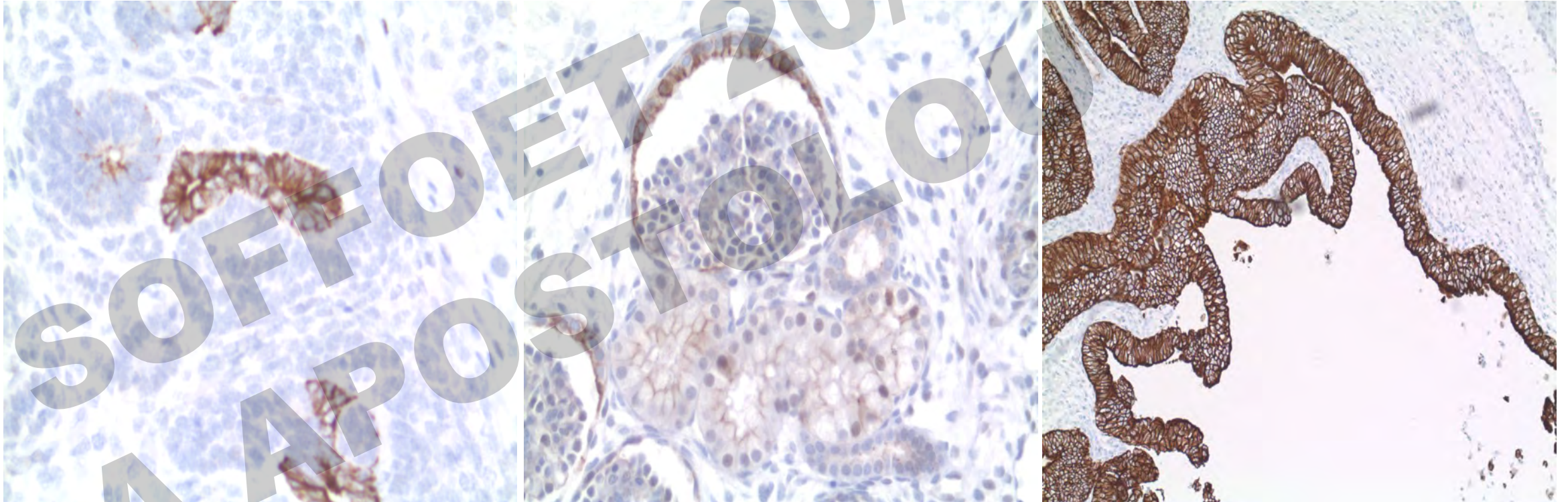
Développement rénal normal

- Immunohistochimie: p-mTOR
 - 1^{er} trimestre : marquage cytoplasmique + membranaire



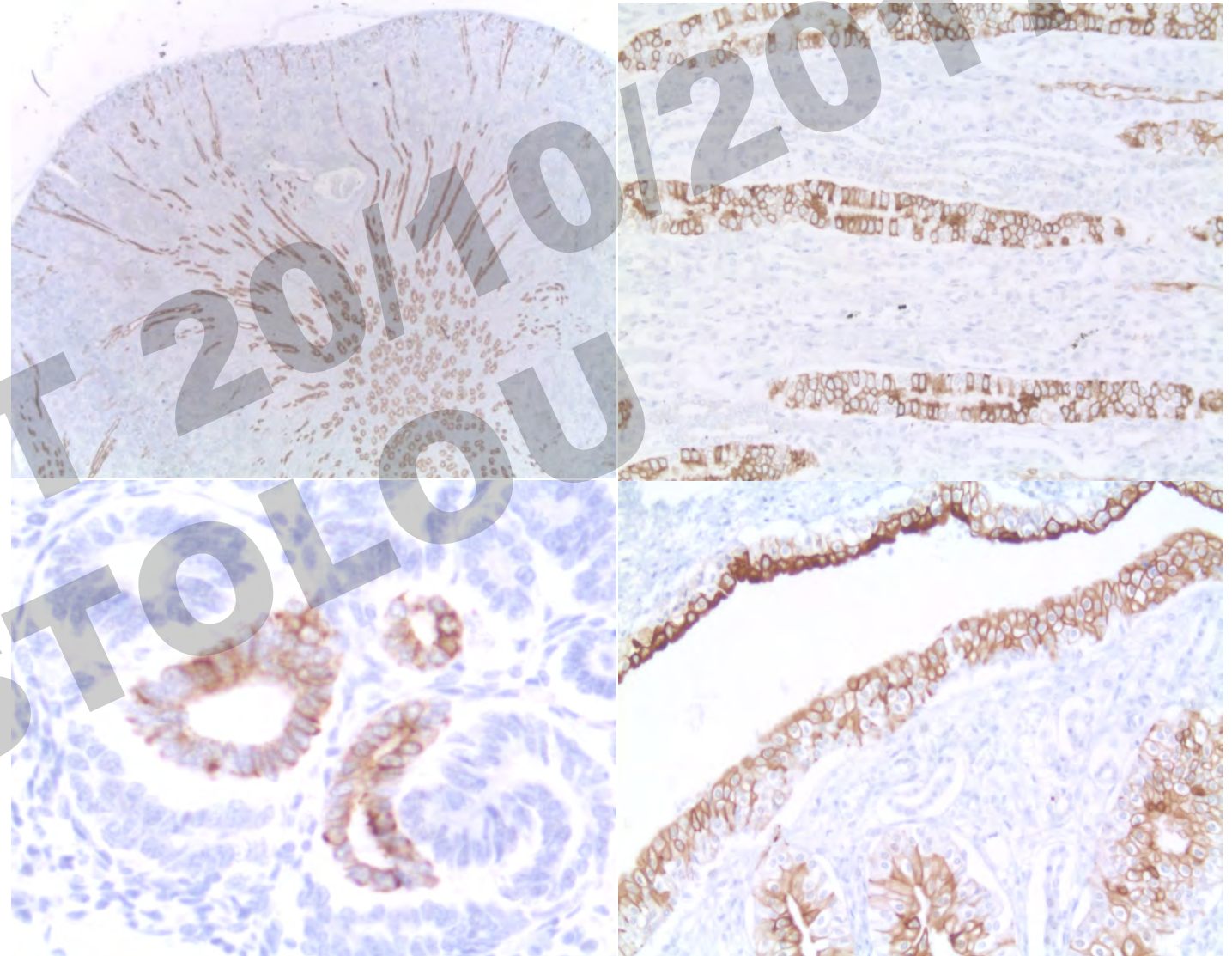
Développement rénal normal

- Bourgeon urétéral (TC et ampoules urétérales)
- Pôle urinaire de la capsule de Bowman
- Marquage de toutes les cellules de l'urothélium



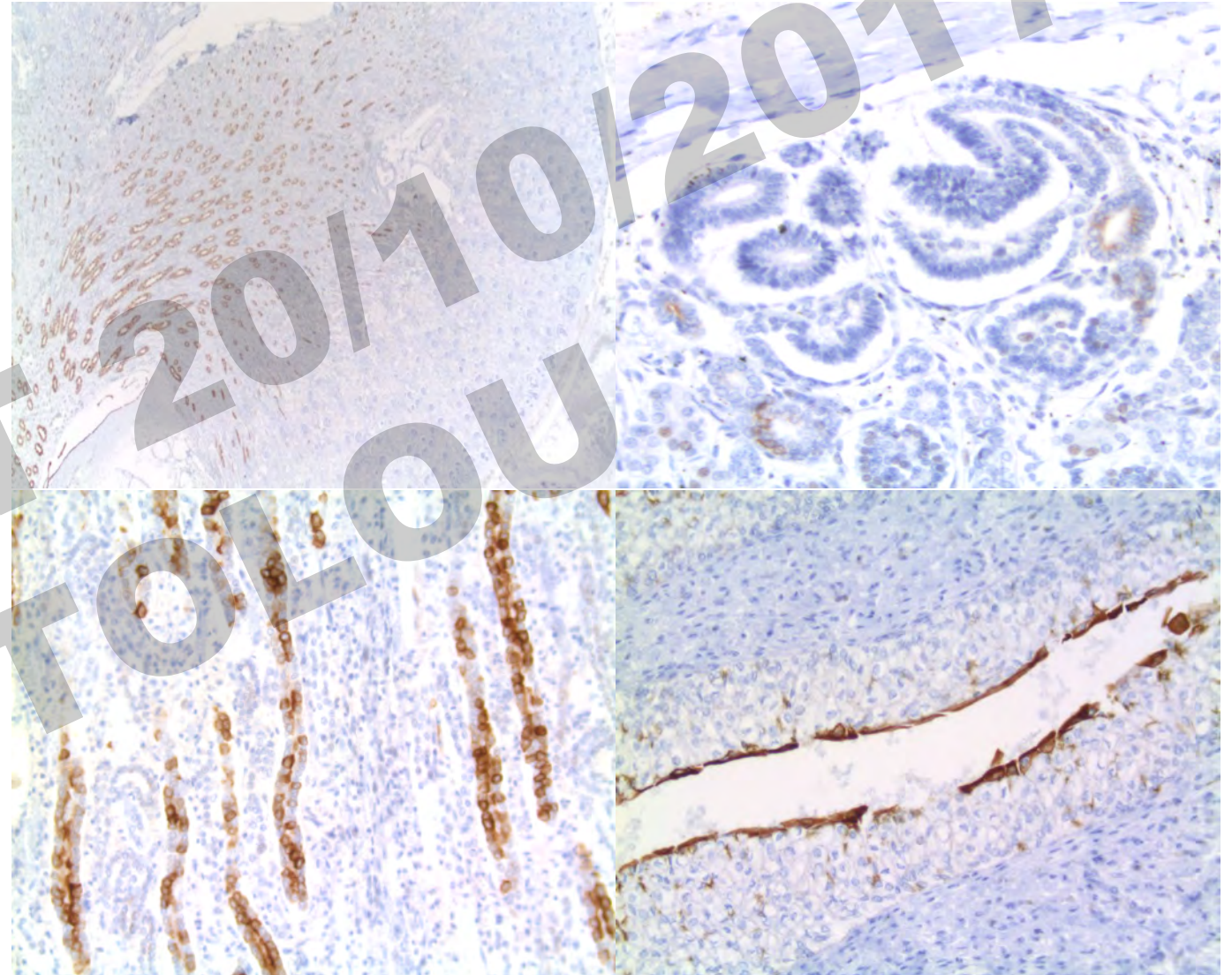
Développement rénal normal

- Immunohistochimie: p-mTOR
 - 2^{ème} trimestre
 - Cellules principales des TC
 - Ampoules urétérales
 - Capsule de Bowman.
 - Urothélium



Développement rénal normal

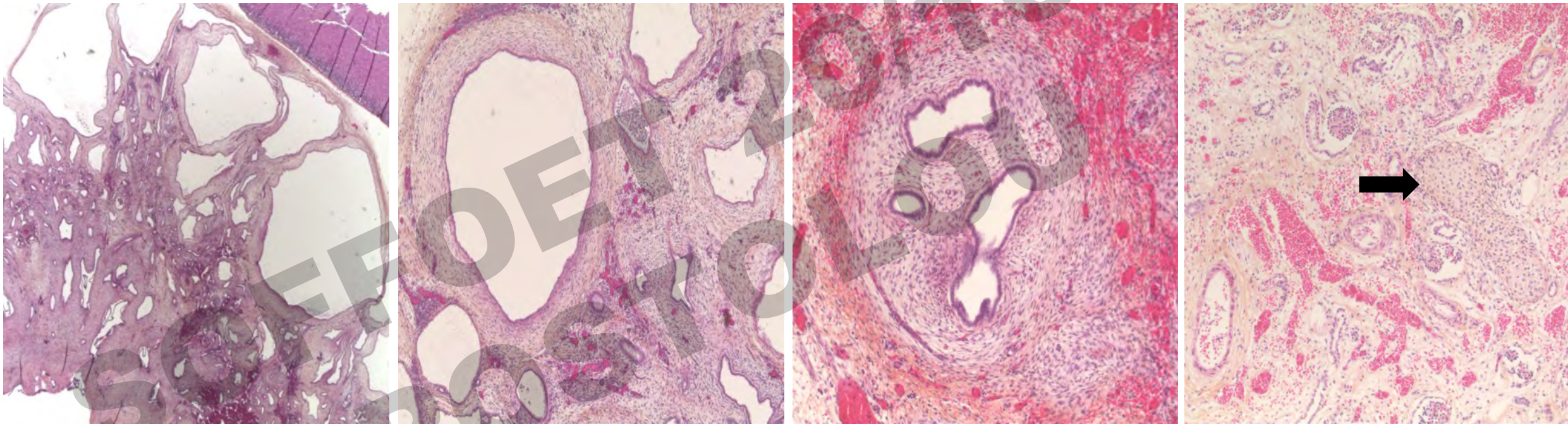
- Immunohistochimie: p-mTOR
 - **3^{ème} trimestre**
 - **Avant fin glomérulogénèse**
 - Cellules principales des TC
 - Ampoules urétérales
 - Cellules parapluies
 - **Après fin glomérulogénèse**
 - Cellules principales des TC
 - Cellules parapluies



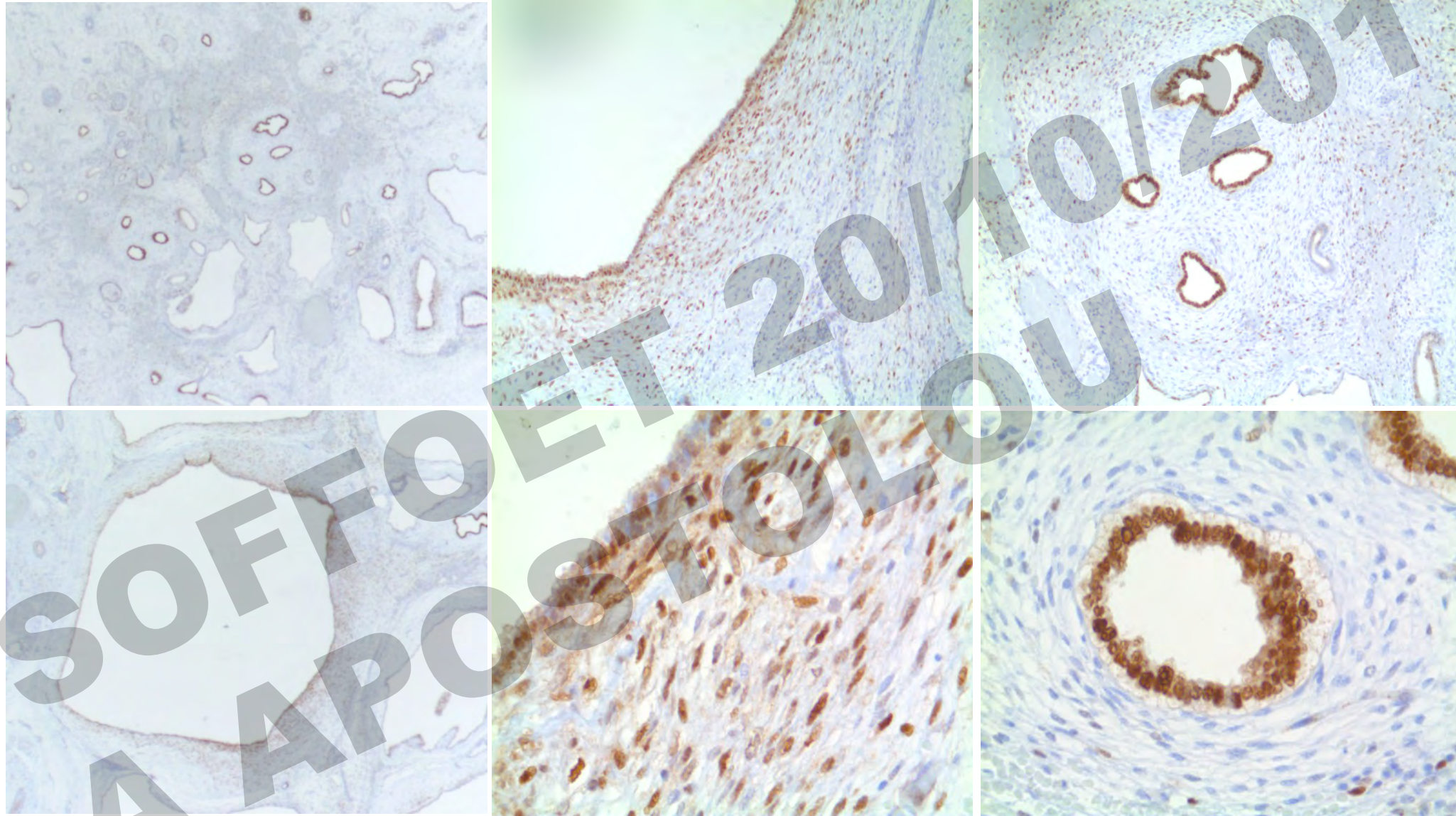
	p-AKT	p-mTOR
Fin 1 ^{er} T et début 2 ^{ème} T	<ul style="list-style-type: none"> - Bourgeon urétéral (TC + papilles rénales + Ampoules) - Pôle urinaire de la CB - Urothélium toutes cellules 	<ul style="list-style-type: none"> - Bourgeon urétéral (TC + papilles rénales + Ampoules) - Pôle urinaire de la CB - Urothélium toutes cellules
Fin 2 ^{ème} et début 3 ^{ème} T	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules intercalaires des TC + papilles rénales - Ampoules urétérales - Cellules intermédiaires de l'urothélium 	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules principales des TC + papilles rénales - Ampoules urétérales - Pôle urinaire de la CB - Urothélium toutes cellules
3 ^{ème} T avant la fin de la glomérulogénèse	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules intercalaires des TC + papilles rénales - Ampoules urétérales 	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules principales des TC + papilles rénales - Ampoules urétérales - Cellules parapluies de l'urothélium
3 ^{ème} T après la fin de la glomérulogénèse	<ul style="list-style-type: none"> - Absence d'expression 	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules principales des TC + papilles rénales - Cellules parapluies de l'urothélium

DMK

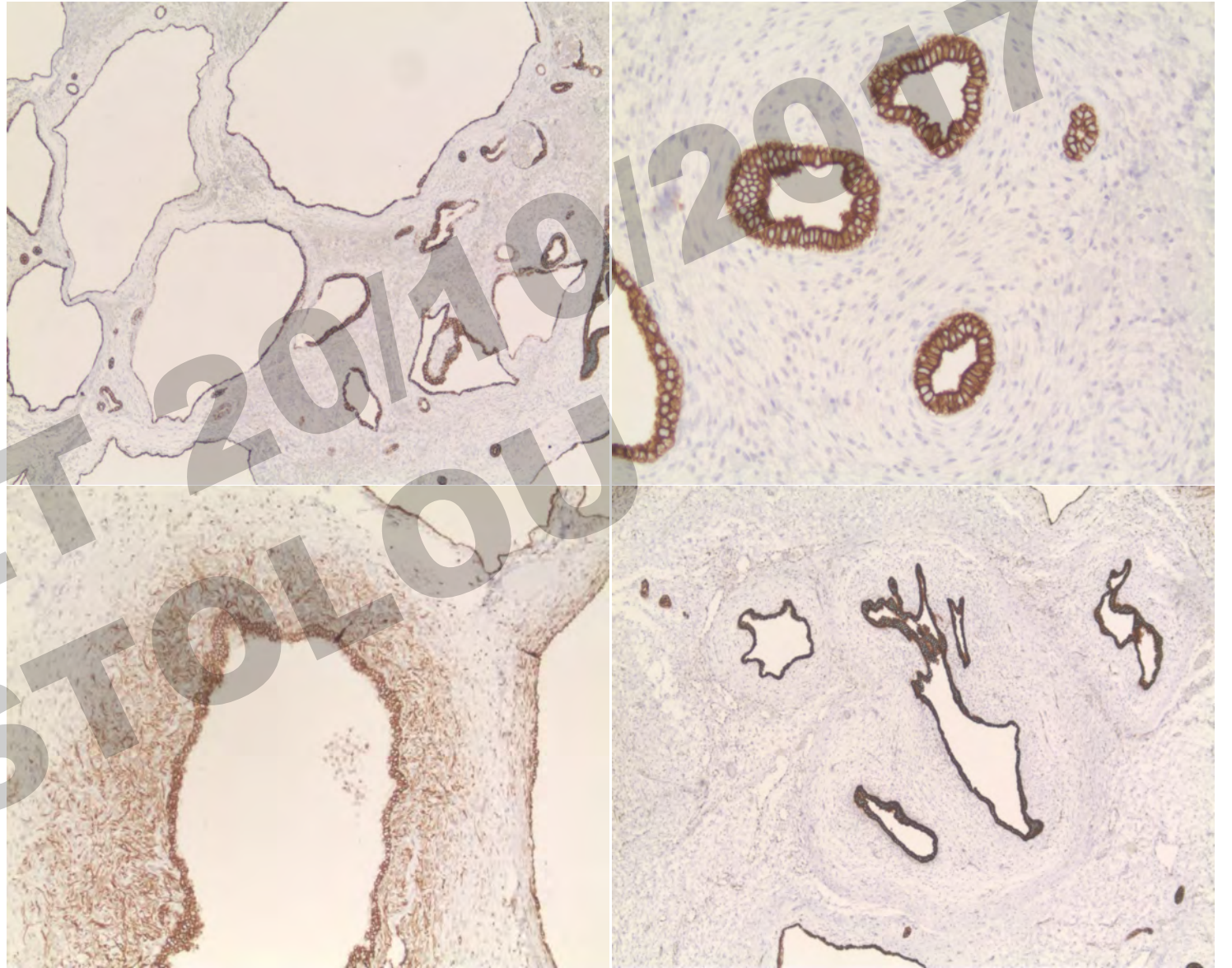
Coloration HES :



- Immunohistochimie: p-AKT : marquage nucléaire et cytoplasmique



- Immunohistochimie: p-mTOR : cytoplasmique et membranaire

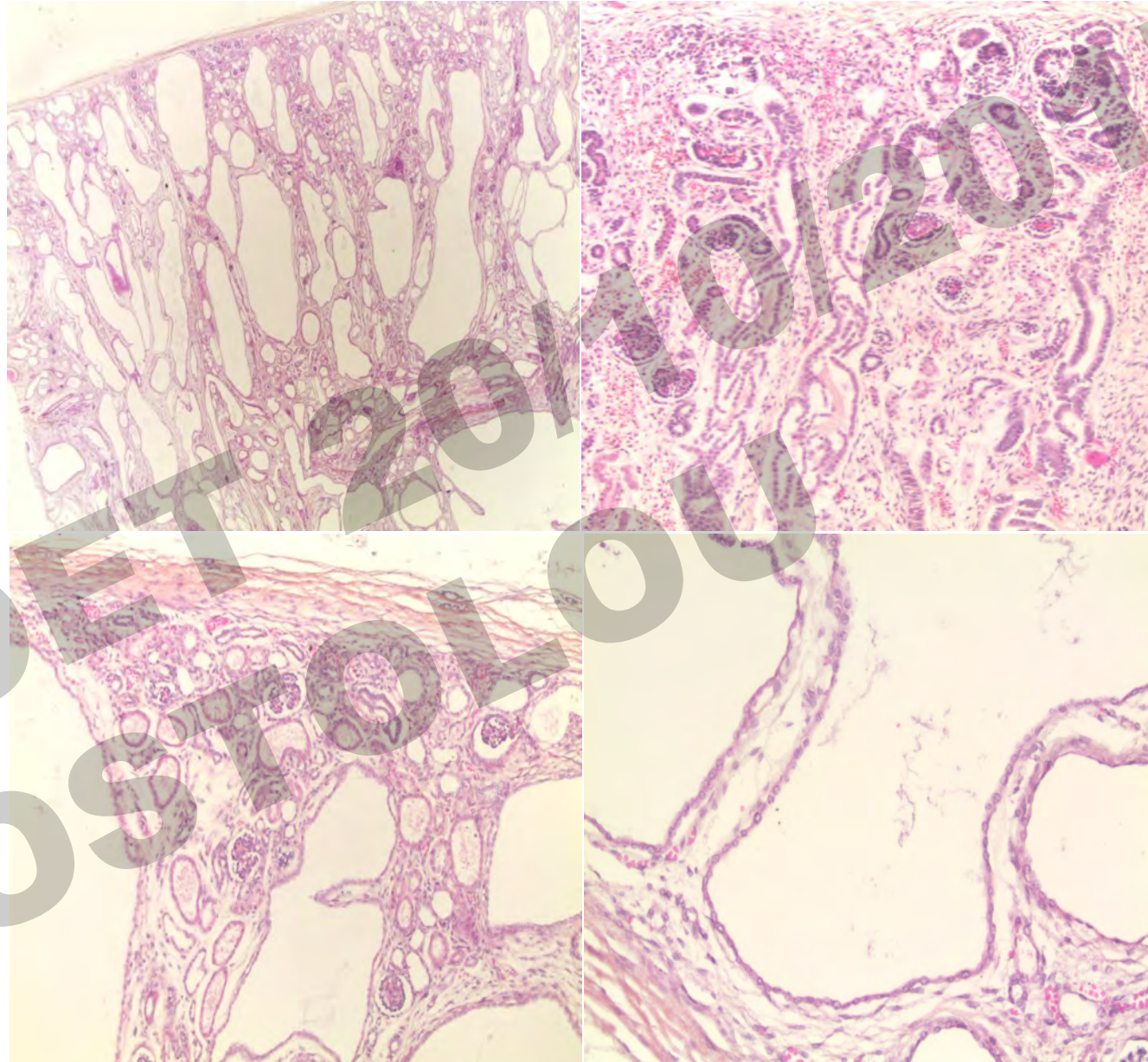


DMK

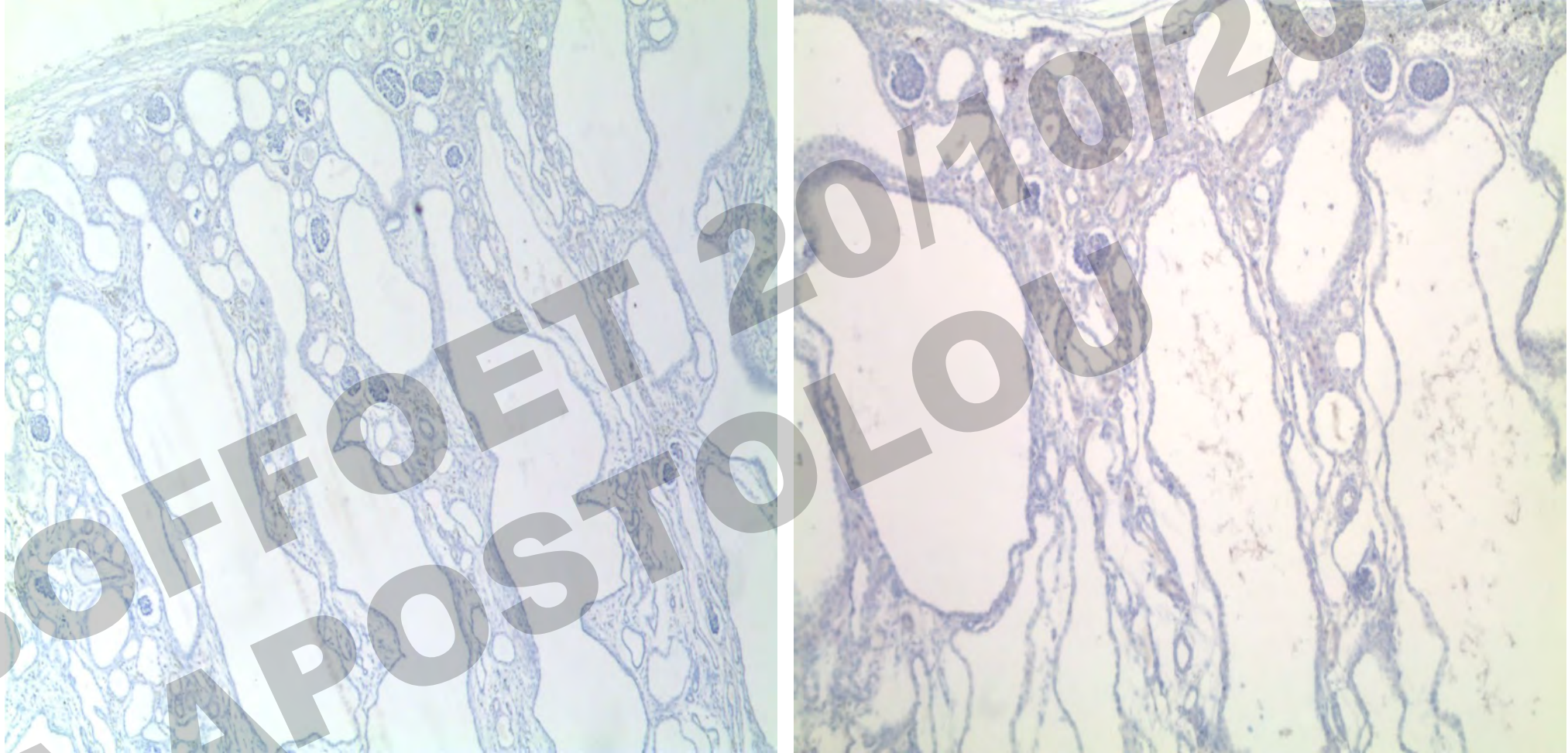
p-AKT	p-mTOR
<ul style="list-style-type: none">- les cellules bordant les tubes primitifs (absence d'expression au niveau du mésenchyme dense)- revêtement épithélial kystique et du mésenchyme lâche- Les structures rénales non atteintes ont le même marquage que les fœtus du même âge gestationnel.	<ul style="list-style-type: none">- les cellules bordant les tubes primitifs (absence d'expression au niveau du mésenchyme dense)- revêtement épithélial kystique et du mésenchyme lâche- Les structures rénales non atteintes ont le même marquage que les fœtus du même âge gestationnel.

PKAR

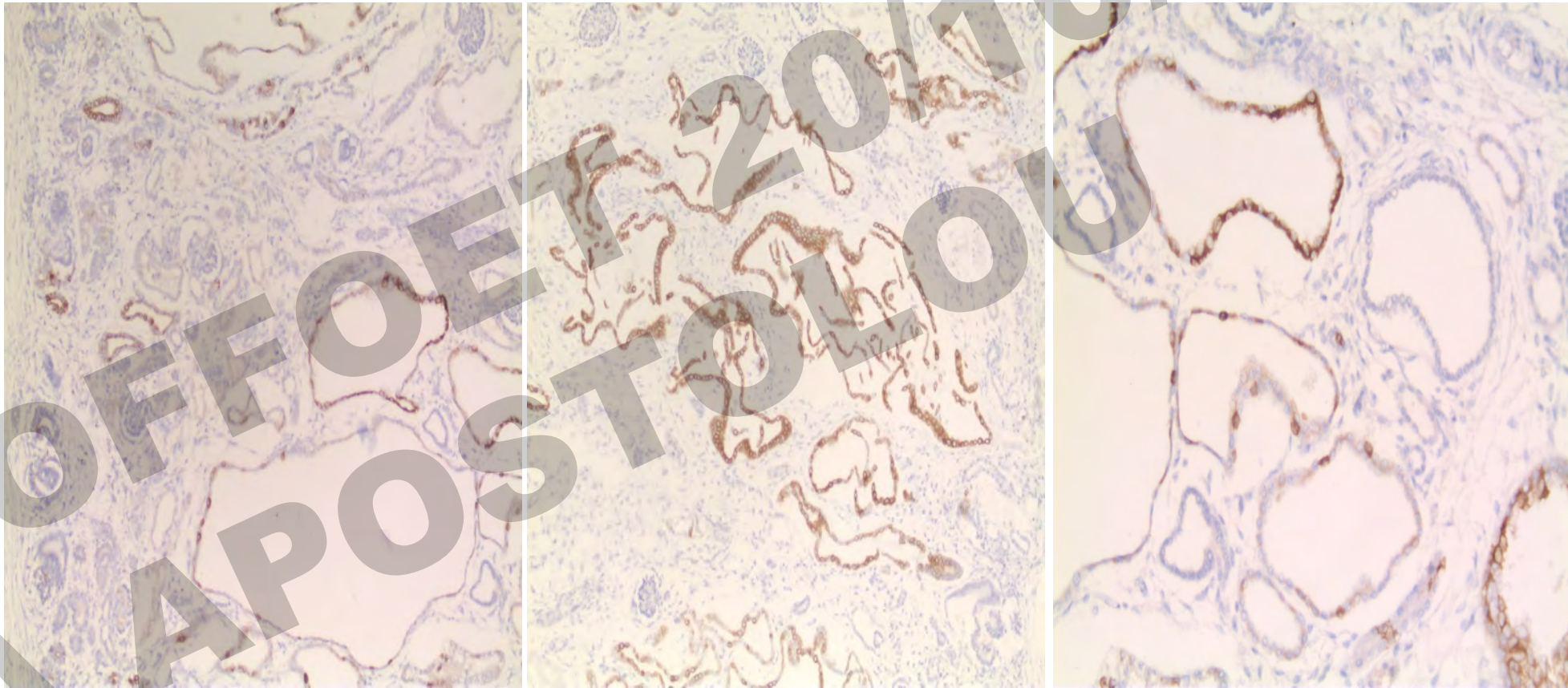
- Coloration HES



- Immunohistochemie: p-AKT



- Immunohistochimie: p-mTOR
 - L'épithélium kystique



PKAR

p-AKT	p-mTOR
<ul style="list-style-type: none">- absence totale de marquage au niveau des kystes- absence de marquage au niveau du parenchyme résiduel	<ul style="list-style-type: none">- revêtement épithélial kystique- structures du parenchyme résiduel et ce de manière identique à un fœtus de même âge gestationnel

DISCUSSION

SOFFOER 20/10/2017
A APOSTOLU

Perspectives dans l'organogénèse

- AKT :
 - Maladie rénale chronique: expression dans les zones de fibrose⁴
- mTOR :
 - Modèle murin KO mTOR⁶ :
 - Anomalies phénotypiques = primordiales dans l'organogénèse
 - Phénotype identique lors de l'utilisation de la Rapamycine

⁴ Lan A, Du J. Potential role of Akt signaling in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2015 Mar;30(3):385–94.

⁵ Fuentes-Calvo I, Crespo P, Santos E, López-Novoa JM, Martínez-Salgado C. The small GTPase N-Ras regulates extracellular matrix synthesis, proliferation and migration in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1833(12):2734–44.

⁶ Hentges KE, Sirry B, Gingeras A-C, Sarbassov D, Sonenberg N, Sabatini D, et al. FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. *Proc Natl Acad Sci.* 2001 Nov 20;98(24):13796–801.

DMK

- Activation :
 - PI3K/AKT/mTOR
 - Formation des kystes
- Piste thérapeutique...

⁹ Chatterjee R, Ramos E, Hoffman M, VanWinkle J, Martin DR, Davis TK, et al. Traditional and targeted exome sequencing reveals common, rare and novel functional deleterious variants in RET-signaling complex in a cohort of living US patients with urinary tract malformations. Hum Genet. 2012 Nov;131(11):1725–38.

PKAR

- PKAR :
 - forte concentration en p-mTOR sur coupes histologiques^{12, 13}
 - mutant murin mimant la PKAR = diminution des kystes sous Rapamycine¹⁰

¹⁰ Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, Low SH, Hedgepeth R, Brown N, et al. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Apr 4;103(14):5466–71.

¹¹ Serra AL, Poster D, Kistler AD, Krauer F, Raina S, Young J, et al. Sirolimus and kidney growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. N Engl J Med. 2010 Aug 26;363(9):820–9.

¹² Fischer D-C, Jacoby U, Pape L, Ward CJ, Kuwertz-Broeking E, Renken C, et al. Activation of the AKT/mTOR pathway in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 2009 Jun;24(6):1819–27.

¹³ Becker JU, Opazo Saez A, Zerres K, Witzke O, Hoyer PF, Schmid KW, et al. The mTOR pathway is activated in human autosomal-recessive polycystic kidney disease. Kidney Blood Press Res. 2010;33(2):129–38.

Perspectives de l'étude

- Cas d'IVG et de fausses couches précoces.
- Protéine S6K, dans le but de développer de nouveaux inhibiteurs de cette voie de signalisation.

SOFFOET 2010/2017
A APOSTOLOU

Merci pour votre attention

SOFFOET 2010/2017
A APOSTOLOU