



HAL
open science

Conséquences rénales de l'activation de la réponse UPR (Unfolded protein response) par des stress toxique et ischémique

Nicolas Bouvier

► **To cite this version:**

Nicolas Bouvier. Conséquences rénales de l'activation de la réponse UPR (Unfolded protein response) par des stress toxique et ischémique. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05P626 . tel-00793364

HAL Id: tel-00793364

<https://theses.hal.science/tel-00793364>

Submitted on 22 Feb 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Ecole doctorale « médicament, toxicologie, chimie, environnement »

THESE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

Par Monsieur Nicolas BOUVIER

le 28 novembre 2012

Conséquences rénales de l'activation de la réponse UPR (Unfolded protein response) par des stress toxique et ischémique

JURY

Mr le Professeur Thierry HAUET	Rapporteur
Mr le Docteur Eric CHEVET	Rapporteur
Mr le Professeur Christophe LEGENDRE	Examineur
Mr le Professeur Bruno HURAUULT DE LIGNY	Examineur
Mr le Docteur Nicolas PALLET	Co-directeur de thèse
Mr le Professeur Eric THERVET	Directeur de thèse

A Eva

A Hannah et Augustin

REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur Thierry Hauet et le Docteur Eric Chevet de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse,

Je remercie le Professeur Hurault de Ligny de m'avoir permis de rencontrer le Professeur Eric Thervet, de m'avoir incité à faire de la recherche et d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse,

Je remercie le Professeur Christophe Legendre de m'avoir accueilli dans son service pendant 6 mois et d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse,

Je remercie le Docteur Thierry Lobbedez et le Professeur Ryckelynck de m'avoir aidé au financement de cette thèse,

Je remercie le Professeur Eric Thervet de m'avoir permis d'intégrer le laboratoire Inserm UMR-S 775 il y a maintenant 5 ans, de m'avoir fait confiance et d'avoir accepté de diriger mes travaux de recherche,

Je remercie plus spécialement le Docteur Nicolas Pallet, à qui je dois la découverte de la paillasse, le goût pour la recherche et sans lequel je n'en serai pas là ; merci pour ton aide, tes idées et ton dévouement,

Je remercie chaleureusement Sophie, ma co-thésarde pendant 3 ans, qui a fait en sorte que mes cellules ne meurent pas le weekend ; je te souhaite bon voyage et de bonnes recherches,

Je remercie toute l'équipe Inserm UMR-S 775 et plus particulièrement l'équipe « néphro » au sein de laquelle j'ai eu plaisir à travailler,

Je remercie sincèrement Eva pour son amour et sa patience.

SOMMAIRE

Liste des abréviations utiles	7
Liste des illustrations	9
Préambule.....	10
Introduction.....	11
1. L'insuffisance rénale.....	11
2. La transplantation rénale.....	14
A. La reprise retardée de fonction.....	15
B. La néphropathie chronique d'allogreffe.....	16
Chapitre I – Les différents modèles utilisés	19
1. La toxicité des inhibiteurs de la calcineurine.....	19
A. Mécanisme d'action	19
B. Indication thérapeutique des inhibiteurs de la calcineurine.....	21
C. Physiopathologie.....	21
a. Les lésions tissulaires rénales.....	21
b. Médiateurs impliqués	24
D. Différence de profil toxique entre la ciclosporine et le tacrolimus.....	28
2. L'ischémie et ses principales conséquences	30
A. Définition de l'ischémie.....	30
B. Les réponses adaptatives à l'ischémie	33
a. La voie HIF-1alpha	33
b. La voie de signalisation « mechanistic target of rapamycin » (mTOR) (anciennement mammalian target of rapamycin)	38
c. La voie de l'AMP-activated protein kinase (AMPK)	42
d. L'autophagie.....	43
e. La voie de la kinase GCN2 (general control nonrepressed 2).....	48
f. Les micro-ARNs.....	49
C. Les principales réponses tissulaires suite à l'ischémie	50
a. L'angiogenèse	50
b. l'inflammation	58
c. La réponse alloimmune	61

d. La fibrose.....	62
e. La mort cellulaire	65
Chapitre II – Le stress du réticulum endoplasmique, la réponse UPR et ses implications	69
1. Physiologie du réticulum endoplasmique	69
2. Le stress du RE	70
3. La réponse UPR	70
A. Les transducteurs.....	71
B. La phase d’adaptation	73
C. Les phases d’alarme et de mort cellulaire.....	75
D. La régulation de la réponse UPR	77
4. Le stress du RE en physiopathologie rénale	78
A. Le stress du RE et les lésions tubulaires	80
B. Le stress du RE et les lésions glomérulaires	81
C. Le stress du RE et les lésions endothéliales.....	82
D. Le stress du RE et l’inflammation rénale.....	82
E. Le stress du RE et la fibrose rénale.....	83
F. Le stress du RE et la transition épithelio-mesenchymateuse ou les modifications phénotypiques épithéliales rénales.....	84
G. Le stress du RE et la transplantation rénale	85
Chapitre III – Objectifs et Présentation des travaux	88
1. Objectifs de la thèse	88
2. Présentation des travaux.....	88
A. La ciclosporine déclenche le stress du RE dans les cellules endothéliales pouvant jouer un rôle pour des modifications phénotypiques endothéliales et la mort cellulaire.....	88
B. Le stress métabolique induit une inflammation rénale tubulaire par l’intermédiaire de la réponse UPR.....	90
C. La réponse UPR régule la réponse angiogénique de l’épithélium rénal pendant un stress ischémique.....	92
D. Implication du stress du réticulum endoplasmique en transplantation rénale (revue).....	94
Discussion	96
1. Choix des modèles	96
2. Les modifications phénotypiques endothéliales	97

3.	La réponse inflammatoire	98
4.	La réponse angiogénique	99
5.	Biomarqueurs et thérapeutiques futurs	101
A.	Les biomarqueurs	101
B.	Le traitement des lésions d'ischémie-reperfusion.....	102
C.	Le traitement du stress du RE	103
	Conclusion et perspectives	105
	Références bibliographiques.....	106
	Annexes.....	133

LISTE DES ABREVIATIONS UTILES

α SMA : actine α de muscle lisse
AMP : adénosine mono-phosphate
AMPK : AMP-activated protein kinase
ANG : angiogénine
AP1 : activator protein 1
ARNm: ARN messenger
ARNt : ARN de transfert
ATF : activating transcription factor
Atg : autophagy-related protein
ATP : adénosine tri-phosphate
Bak : Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bcl-2 : B-cell lymphoma/leukemia 2
bFGF : basic fibroblast growth factor
BI-1 : Bax inhibitor-1
BiP : immunoglobulin-binding protein [GRP78]
BNip3 : Bcl-2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3
C/EBP : CCAAT/enhance-binding protein
CHOP : CCAAT/enhance-binding protein (C/EBP) homologous protein
CyPA : cyclophiline A
DAMPs : danger-associated molecular patterns
DFG : débit de filtration glomérulaire
EDEM : ER degradation-enhancing α -mannosidase-like lectin
eIF : eukaryotic translation initiation factor
Ero1 : ER oxidoreductin 1
Fas : apoptosis stimulating fragment
FKBP12 : FK506-binding protein 12
FSP1 : fibroblast-specific protein 1
GADD34 : growth arrest and DNA damage gene 34
GCN2 : general control nonrepressed 2
Glut1 : glucose transporter-1
GRP : glucose-related protein
HIF : hypoxia-inducible factor

HO-1 : heme oxygenase 1
HRE : hypoxia response element
HSP : heat shock protein
I κ B : inhibitor of NF- κ B
IKK : I κ B kinase
IL : interleukine
IRCT : insuffisance rénale chronique terminale
JNK : cJun NH₂-terminal kinase
LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3 [Atg8]
LKB1 : liver kidney B1
MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1
mTOR: mechanistic target of rapamycin
NF- κ B : nuclear factor- κ B
NIX : Nip3-like protein X
NO : monoxyde d'azote
ORP150 : 150 kDa oxygen-regulated protein [HSP12A]
PDGF : platelet-derived growth factor
PDI : protein disulfide isomerase
PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PFKFB3 : 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3
PHD : prolyl hydroxylase domain-containing enzyme
PI3 : phosphatidyl-inositol 3
PP1 : protein phosphatase 1
RE : réticulum endoplasmique
SDF1 : stromal cell-derived factor 1
TEM : transition épithélio-mésenchymateuse
TEndM : transition endothélio-mésenchymateuse
TGF β : transforming growth factor β
tiRNA : tRNA-derived stress-induced small RNA
TLRs : toll-like receptors
TRAF : TNF receptor associated factor
TSC : tuberous sclerosis protein
VEGF : vascular endothelial growth factor
XBP1 : X-box binding protein 1

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Facteurs contribuant à la néphropathie d'allogreffe.....	12
Figure 2 : Réparation anormale au cours de l'insuffisance rénale aiguë d'origine ischémique.	14
Figure 3 : Facteurs contribuant à la néphropathie d'allogreffe.	17
Figure 4 : Histopathologie de la néphropathie chronique d'allogreffe.....	17
Figure 5 : Mécanismes d'action des inhibiteurs de la calcineurine.	20
Figure 6 : Lésions histologiques observées au cours de la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine.	23
Figure 7 : Mécanismes des lésions d'ischémie-reperfusion au cours de la transplantation rénale.....	32
Figure 8 : Les principales voies de dégradation de la protéine HIF-1 α	34
Figure 9 : Les principales voies régulées par HIF.....	37
Figure 10 : Les voies de la régulation mTOR.....	40
Figure 11 : Les différentes étapes de l'autophagie.	44
Figure 12 : Les mécanismes moléculaires de la formation d'un vaisseau.....	52
Figure 13 : Sécrétion non conventionnelle du bFGF.....	55
Figure 14 : L'ischémie-reperfusion induit l'inflammation.....	59
Figure 15 : L'origine multiple des myofibroblastes.....	64
Figure 16 : Mécanismes de la nécrose.....	67
Figure 17 : Mécanismes de l'apoptose.	68
Figure 18 : La réponse UPR et ses différentes interactions.....	72
Figure 19 : L'apoptose médiée par le stress du RE.	77
Tableau 1 : Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats en greffe rénale de 2007 à 2011.....	15
Tableau 2 : Les différentes pathologies rénales impliquant le stress du RE.	79

PREAMBULE

Les reins sont des organes solides situés dans la région lombaire, dans le rétropéritoine. Ils jouent un rôle indispensable dans le maintien de l'homéostasie générale : ils permettent d'éliminer les toxines urémiques et de réguler l'homéostasie de nombreux paramètres comme la volémie intra- et extracellulaire, la pression artérielle, l'équilibre acido-basique, le métabolisme phosphocalcique et l'érythropoïèse (Gueutin et al., 2012).

Le rein est un organe fragile du fait que son débit soit important correspondant à 20% du débit cardiaque et qu'il existe un gradient décroissant important de la pression en oxygène entre la région corticale (en périphérie) et la région médullaire (en profondeur) (Lubbers and Baumgartl, 1997) le rendant ainsi sensible à de multiples agressions.

Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la destruction et la réparation du parenchyme rénal est indispensable afin de limiter la dégradation de la fonction rénale chez les patients.

L'une des réponses adaptatives à ces agressions est la réponse UPR (Unfolded protein response) et ses implications sont peu connues en pathologie rénale. L'objectif de cette thèse est donc d'étudier les conséquences rénales de l'activation de la réponse UPR par deux types de stress différents sur deux types cellulaires différents : le stress toxique (ciclosporine) sur des cellules endothéliales artérielles et le stress ischémique (carence en glucose) sur des cellules tubulaires rénales.

Ce travail a permis de montrer que la réponse UPR joue un rôle dans les modifications phénotypiques endothéliales (cellules endothéliales artérielles) et dans les réponses inflammatoire et angiogénique induites par les cellules tubulaires rénales.

INTRODUCTION

L'insuffisance rénale aiguë ou chronique est une situation fréquente et le traitement de choix de l'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) est la transplantation rénale. Les processus ischémiques et toxiques jouent un rôle important dans la survenue d'une insuffisance rénale qu'il s'agisse ou non d'un patient greffé rénal.

1. L'INSUFFISANCE RÉNALE

L'insuffisance rénale se définit par une diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG) qui peut être estimé par la clairance de la créatinine (dont le dosage dans le sang est facilement réalisable en pratique courante).

La prévalence des maladies rénales est de plus en plus fréquente au fil des années. Celle-ci reste difficile à évaluer du fait de la difficulté à réaliser de grandes études de cohortes. En 2007 Coresh *et al.* a évalué aux Etats-Unis la prévalence des personnes présentant une maladie rénale chronique : 8% de la population de 20 ans avait un DFG estimé inférieur à 60 ml/min entre 1999 et 2004. La maladie rénale chronique était d'autant plus fréquente que les patients étaient plus âgés et avaient une hypertension artérielle et/ou un diabète (Coresh et al., 2007). En France, les études sont peu nombreuses et se sont principalement intéressées aux sujets âgés. L'étude des trois cités s'est intéressée à une population âgée de plus de 65 ans et a montré que 13,7% des personnes présentaient un DFG inférieur à 60 ml/min (Stengel et al., 2011). Plus de données existent sur la prévalence de l'IRCT même si les registres ne recensent que les patients ayant recours à une technique d'épuration extrarénale ou les patients transplantés. En effet les registres méconnaissent les patients ayant une IRCT relevant du traitement médical isolé. En France il existe le Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie (REIN) créé en 2002 qui collecte depuis début 2011 les données de l'ensemble des régions françaises. Le rapport 2010 indique une prévalence standardisée de l'IRCT traitée de 1057 patients par million d'habitants (pmh) se divisant entre 587 patients pmh pour l'épuration extrarénale et 469 patients pmh porteurs d'un greffon rénal

(Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie, 2010). En Europe Stel *et al.* a compilé les informations de différents registres européens en 2008 et a retrouvé une prévalence moyenne de 644 patients pmh avec des différences importantes selon les pays (Stel *et al.*, 2011). Aux Etats-Unis, à la fin 2010, la prévalence de l'IRCT traitée était de 1738 patients pmh (U S Renal Data System, 2011). En France les principales étiologies de l'insuffisance rénale chronique sont l'hypertension (24,3%), le diabète (21,2%) et les glomérulonéphrites (11,4%) (Kessler *et al.*, 2012). Aux Etats-Unis les principales étiologies sont sensiblement identiques dans des proportions différentes avec une proportion plus élevée de diabète (43,4%), d'hypertension (28,5%) et moindre de glomérulonéphrites chroniques (6,5%) (U S Renal Data System, 2011).

L'hypoxie au cours des maladies rénales chroniques va pouvoir aggraver les lésions de fibrose. L'hypothèse est que la lésion glomérulaire initiale et les lésions en aval induisent une diminution du flux dans le réseau capillaire péri-tubulaire créant un environnement hypoxique qui va à son tour déclencher des processus profibrosants dans les cellules tubulointerstitielles. Ces lésions vont alors toucher les structures adjacentes saines, exacerber les lésions et l'hypoxie et créer ainsi un cercle vicieux (**Figure 1**) (Fine and Norman, 2008).

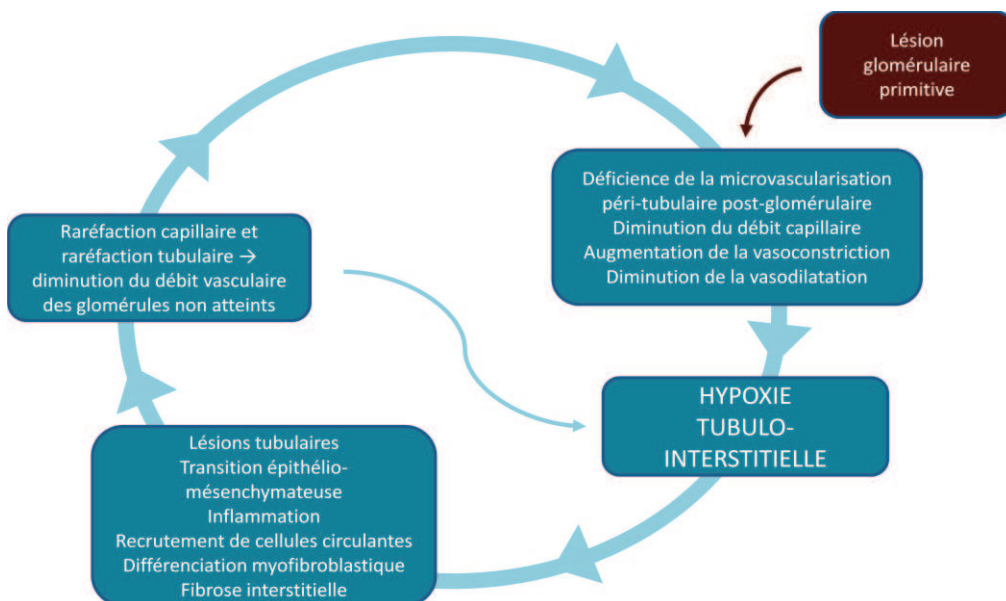


Figure 1 : Hypoxie et progression de la maladie rénale chronique. La lésion glomérulaire primitive va entraîner une hypoxie tubulointerstitielle qui va induire des processus profibrosants. Ceux-ci vont à leur tour aggraver l'hypoxie et engendrer un cercle vicieux. Adapté d'après Fine et Norman, 2008.

Concernant l'insuffisance rénale aiguë, l'incidence dans la population générale varie de 2147 à 4085 patients pmh. En réanimation l'incidence est évidemment plus importante et varie de 10,8% à 67% des patients admis en réanimation selon les études (Srisawat and Kellum, 2011). Les principales étiologies sont l'hypovolémie dont l'origine peut être le sepsis, la déshydratation, la iatrogénie.

Au cours de l'insuffisance rénale aiguë d'origine ischémique, les cellules endothéliales lésées vont modifier leur profil de sécrétion de substances vasoactives et induire une vasoconstriction anormale. Ceci va entraîner l'activation des leucocytes et induire des lésions tubulaires. Tous les types cellulaires vont sécréter des substances proinflammatoires aggravant l'œdème interstitiel et l'ischémie. La réparation va pouvoir se faire *ad integrum* ou bien il va exister une réparation partielle et une inflammation chronique à cause de la persistance d'une hypoxie chronique ou d'une activation permanente des macrophages qui vont induire la fibrose (**Figure 2**) (Bonventre and Yang, 2011).

Qu'il s'agisse de l'insuffisance rénale chronique ou aiguë, il est primordial de noter que la baisse ou l'arrêt du débit sanguin joue un rôle important. Dans l'insuffisance rénale aiguë, il s'agit fréquemment d'une baisse transitoire du débit sanguin liée à une hypovolémie malgré des vaisseaux indemnes de lésions. Dans l'insuffisance rénale chronique, la baisse du débit sanguin est souvent liée à des vaisseaux pathologiques dont le calibre est diminué ou dont la densité est moindre. Ces phénomènes peuvent donc respectivement entraîner une ischémie aiguë ou chronique. On peut également envisager des phénomènes d'ischémie aiguë dans un parenchyme présentant une ischémie chronique.

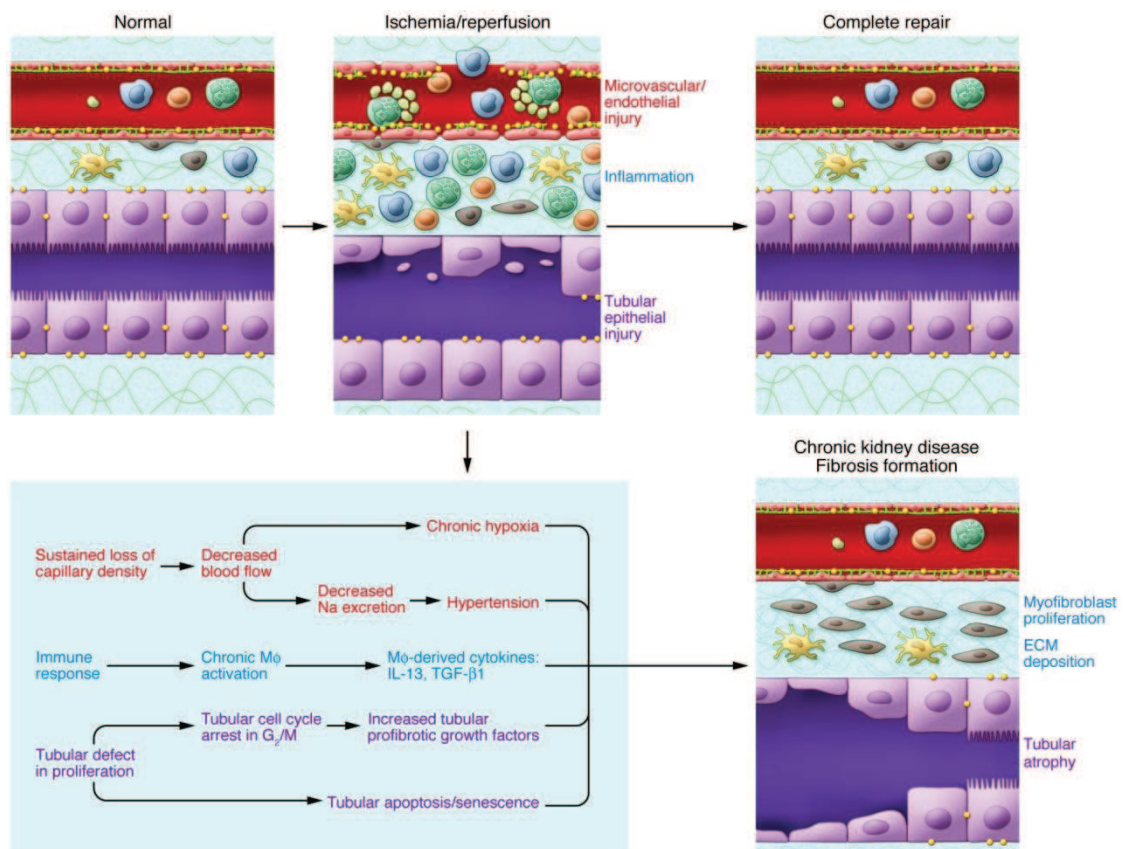


Figure 2 : Réparation anormale au cours de l'insuffisance rénale aiguë d'origine ischémique. La réparation suite à une ischémie rénale aiguë peut être incomplète à cause d'une hypoxie chronique, de l'activation permanente de cellules inflammatoires et la sécrétion de facteurs profibrosants par les cellules épithéliales. D'après Bonventre et Yang, 2011.

2. LA TRANSPLANTATION RENALE

Le traitement de suppléance de l'IRCT est l'épuration extrarénale par dialyse ou la transplantation rénale. Celle-ci est le traitement de choix pour différentes raisons : une meilleure survie, une meilleure qualité de vie et un coût moindre pour la société (Blotiere et al., 2010; Howard et al., 2009; Riano-Galan et al., 2009; Wolfe et al., 1999).

L'accès à la greffe est plus difficile car le nombre de greffes reste stable alors que le nombre de patients en attente de greffe ne cesse d'augmenter. Il existe actuellement une inadéquation entre les besoins en greffons et leur existence mais aussi un problème de qualité dû à une augmentation de l'âge et des comorbidités du donneur (**Tableau 1**) (Agence de la Biomédecine, 2011).

ÉVOLUTION DE LA LISTE D'ATTENTE ET DEVENIR DES CANDIDATS EN GREFFE RÉNALE

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Liste d'attente						
Malades restant en attente au 1 ^{er} janvier	6 157	6 481	6 869	7 585	8 436	8 942
Nouveaux inscrits dans l'année	3 546	3 726	3 898	4 132	3 884	
Décédés dans l'année	152	218	206	212	200	
Sortis de la liste d'attente	158	183	150	177	202	
Greffes						
dont greffes avec donneur vivant	2 912	2 937	2 826	2 892	2 976	
dont greffes avec donneur décédé après arrêt cardiaque	236	222	223	283	302	
	43	52	70	79	65	
Greffes par million d'habitants	46,1	46,2	44,2	44,7	45,7	

Tableau 1 : Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats en greffe rénale de 2007 à 2011. D'après le rapport 2011 de l'agence de la biomédecine.

La transplantation d'organes implique *de facto* un épisode d'ischémie-reperfusion plus ou moins long puisqu'il va exister un arrêt du flux sanguin lors du prélèvement du greffon, son transport tandis que l'implantation chez le receveur va induire la reperfusion du greffon. Les deux phénomènes, l'ischémie et la reperfusion, vont induire des lésions tissulaires spécifiques qui seront détaillées dans le chapitre lié à l'ischémie.

A. LA REPRISE RETARDEE DE FONCTION

Suite à ces phénomènes d'ischémie-reperfusion, l'une des complications précoces les plus fréquentes après la transplantation est la reprise retardée de fonction. Celle-ci apparaît dans 20 à 30% des cas, elle est le plus souvent transitoire à l'exception de moins de 5% des cas. La définition n'est pas consensuelle puisque Yarlagadda *et al.* n'a recensé pas moins de 18 définitions différentes : il peut s'agir d'une baisse inférieure à 30% entre le premier et le deuxième jour post-greffe ou une créatininémie supérieure à 265 $\mu\text{mol/l}$ au cinquième jour ou le recours à la dialyse au cours de la première semaine. La définition la plus communément admise est la dernière citée. La plupart du temps, celle-ci est due à une nécrose tubulaire aiguë (Yarlagadda *et al.*, 2008). Les facteurs favorisants sont la survenue d'un collapsus chez le donneur ou le receveur, des phénomènes d'ischémie chaude, un temps prolongé d'ischémie froide, la longue durée des gestes d'anastomose vasculaire (ischémie tiède), entraînant des lésions d'ischémie-reperfusion. Par ailleurs, sont fréquemment retenus, l'âge du donneur inférieur à 5 ans ou supérieur à

50 ans, l'âge extrême du receveur et la présence de vaisseaux athéromateux et calcifiés, la vasoconstriction liée aux immunosuppresseurs tels que les inhibiteurs de la calcineurine. Les autres causes de reprise retardée de fonction sont principalement le rejet hyperaigu ou la thrombose vasculaire. Les conséquences de la reprise retardée de fonction sont un risque augmenté de rejet aigu, une diminution de la survie des greffons et un rôle possible dans la survenue d'une dysfonction chronique du greffon (Mourad et al., 2005; Siedlecki et al., 2011). Néanmoins, Kayler *et al.* a récemment publié deux travaux comparant de grandes cohortes : ceux-ci montrent que la durée d'ischémie froide influence peu le devenir des greffons à long terme (Kayler et al., 2011a; Kayler et al., 2011b). Ainsi Terasaki a commenté dans un éditorial le résultat de ces deux articles : il écrit qu'il a déjà été montré que les longues durées d'ischémie froide induisent une reprise retardée de fonction mais que la survie à 10 ans était de 72%. Il évoque le fait que l'impact délétère de l'ischémie froide est peut-être plutôt dépendant des conditions de conservation que de la durée d'ischémie froide (Terasaki, 2011).

B. LA NEPHROPATHIE CHRONIQUE D'ALLOGREFFE

A plus long terme, la survie des greffons rénaux a peu évolué depuis de nombreuses années malgré l'amélioration importante de la survie à court terme. La néphropathie chronique d'allogreffe est la cause la plus fréquente de perte du greffon (plus d'un tiers des pertes) après les pertes liées au décès du patient avec un greffon fonctionnel. Les facteurs favorisant la néphropathie chronique d'allogreffe sont multiples. Il peut s'agir d'agressions immunologiques telles que les séquelles de rejet ou d'agressions non immunologiques telles que les facteurs de risque d'athérosclérose, la toxicité des inhibiteurs de la calcineurine (**Figure 3**) (Pascual et al., 2002).

La néphropathie chronique d'allogreffe est une entité pléomorphe avec une histologie et une physiopathologie mixte comportant différents stades de progression. Elle devrait être considérée comme des lésions terminales non spécifiques touchant les tubules, l'interstitium, les microvaisseaux et les glomérules (**Figure 4**). Actuellement la classification de Banff définit la néphropathie d'allogreffe par de la fibrose interstitielle

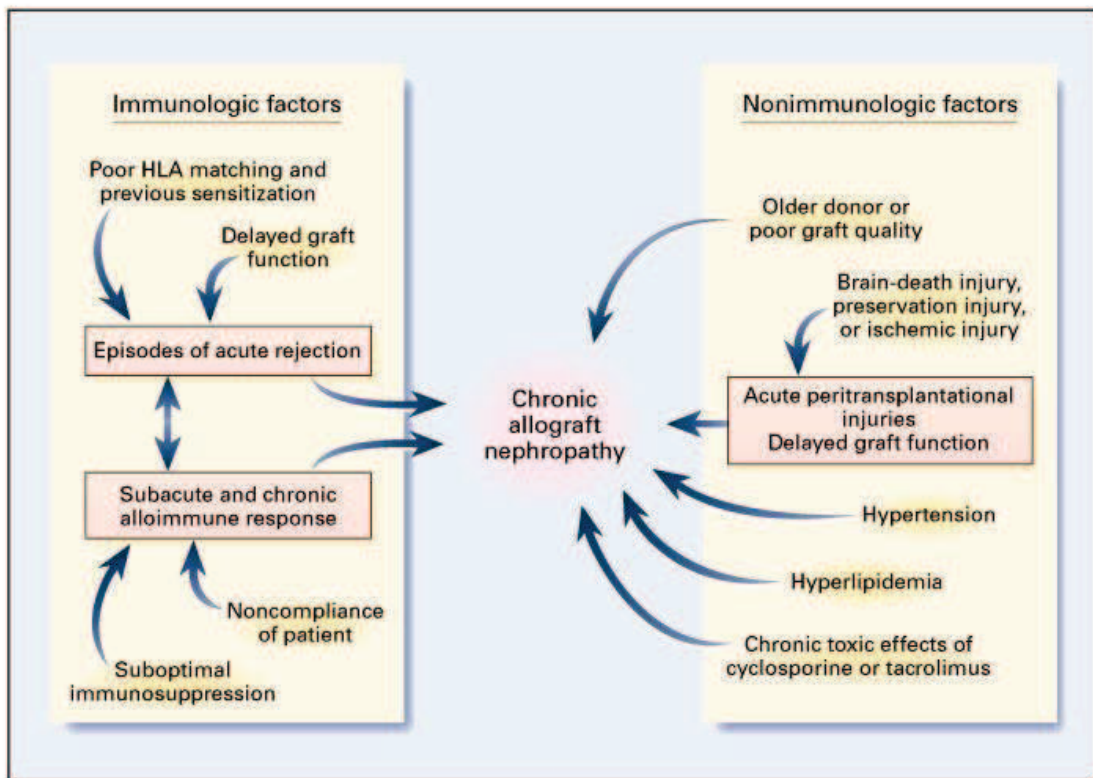


Figure 3 : Facteurs contribuant à la néphropathie d'allogreffe. Des facteurs immunologiques et non immunologiques vont progressivement entraîner la destruction du parenchyme rénal et conduire à la néphropathie d'allogreffe. D'après Pascual *et al.*, 2002.

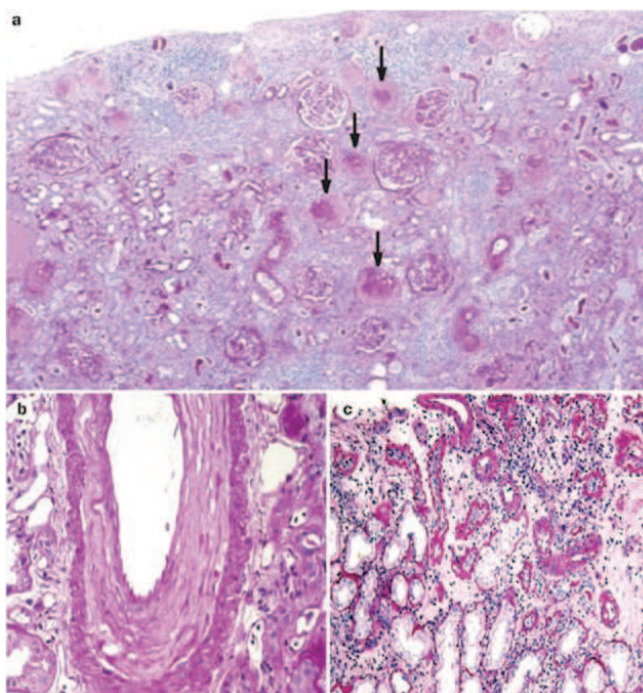


Figure 4 : Histopathologie de la néphropathie chronique d'allogreffe. a. glomérulosclérose (grossissement x40) ; b. fibrose intimale artérielle (grossissement x400) ; c. fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (grossissement x100). Coloration par acide périodique de Schiff. D'après Li and Yang, 2009.

et de l'atrophie tubulaire qui sont cotées en fonction de la sévérité et de l'extension des lésions d'un grade I (6-25% de la surface corticale) à un grade III (plus de 50%). Il existe aussi une nuance entre des lésions chroniques non spécifiques et des lésions chroniques pouvant être spécifiques d'un rejet chronique (humoral ou cellulaire) ou liées à des processus spécifiques tels que la toxicité des inhibiteurs de la calcineurine, la néphropathie à BK virus, la récurrence de la maladie primitive... (Li and Yang, 2009)

En 2003 Nankivell *et al.* décrivait « l'histoire naturelle de la néphropathie chronique d'allogreffe » dans le *New England Journal of Medicine*. Son groupe réalisa pendant 10 ans 961 biopsies de greffon sur 120 patients diabétiques de type I et ayant reçu une greffe rein-pancréas. Il montra qu'il existe deux phases distinctes de lésions. Une phase initiale de lésions tubulointerstitielles prédominantes liées à des lésions de nécrose tubulaire aiguë, des rejets aigus cliniques et infracliniques existe au cours de la première année. Au-delà d'un an, une deuxième phase débute avec des lésions microvasculaires (hyalinose artériolaire), glomérulaires (glomérulosclérose) et tubulointerstitielles (atrophie tubulaire et fibrose interstitielle) caractérisant la néphropathie chronique d'allogreffe. Après 10 ans de greffe tous les greffons présentent des lésions de néphrotoxicité (Nankivell et al., 2003).

Le greffon rénal est donc soumis à de multiples stress : le stress ischémique (lésions d'ischémie-reperfusion, artériosclérose), le stress toxique (inhibiteurs de la calcineurine), le stress immunologique (rejet aigu et/ou chronique). Les réponses adaptatives à ces différents stress vont à la fois être des réponses protectrices comme les processus de survie cellulaire mais aussi des réponses délétères induisant des lésions structurelles comme la fibrose.

CHAPITRE I – LES DIFFERENTS MODELES UTILISES

Nous avons vu dans l'introduction que le rein natif ou le rein greffé peuvent être soumis à de nombreux stress (stress ischémique, toxique, immunologique). Nous avons choisi deux types de stress : le stress toxique avec la ciclosporine qui a fait l'objet de nombreuses publications au sein de notre laboratoire (Anglicheau et al., 2006; Anglicheau et al., 2004; Pallet et al., 2008a; Pallet et al., 2008b; Pallet et al., 2008c) car cet immunosuppresseur est connu pour une vasoconstriction artériolaire conduisant à une ischémie. On a également vu précédemment que l'ischémie joue un rôle dans les maladies rénales et on s'est donc intéressé à la carence en glucose qui est une des composantes de l'ischémie.

1. LA TOXICITE DES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE

La première molécule de la classe des inhibiteurs de la calcineurine, la ciclosporine est apparue au début des années 1980 suivie du tacrolimus, une dizaine d'années plus tard. L'indication initiale de ces traitements est la greffe d'organes et ils ont révolutionné le pronostic à court terme en réduisant significativement l'incidence des rejets aigus (Hariharan et al., 2000).

A. MECANISME D'ACTION

Les inhibiteurs de la calcineurine exercent une action immunosuppressive dans le lymphocyte T en inhibant la calcineurine qui est activée lors de la présentation de l'antigène par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de la cellule présentatrice d'antigènes au récepteur de la cellule T (TCR/CD3) (Halloran, 2004). Le mécanisme d'action des inhibiteurs de la calcineurine est dû à la liaison de ceux-ci à des protéines se nommant immunophilines. La ciclosporine se lie majoritairement à la

cyclophiline A (CyPA) et le tacrolimus à la FK506-binding protein 12 (FKBP12) entraînant une augmentation d'affinité de ces protéines pour la calcineurine. Ceci va entraîner une inhibition de l'action de la calcineurine. La calcineurine qui est une serine/threonine protein phosphatase calcium calmoduline-dépendante ne va plus pouvoir se lier et activer le facteur transcriptionnel NFAT (Nuclear factor of activated T cells). Cela va entraîner une diminution de la translocation de NFAT dans le noyau et par conséquent une diminution de la transcription de gènes tels que l'interleukine 2 (IL-2) essentiels à l'activation des lymphocytes T (**Figure 5**) (Stepkowski, 2000).

Les inhibiteurs de la calcineurine ont également d'autres cibles telles que les protéines IκB (inhibitor of NF-κB), Na-K-ATPase et la NO (monoxyde d'azote) synthase (Kapturczak et al., 2004).

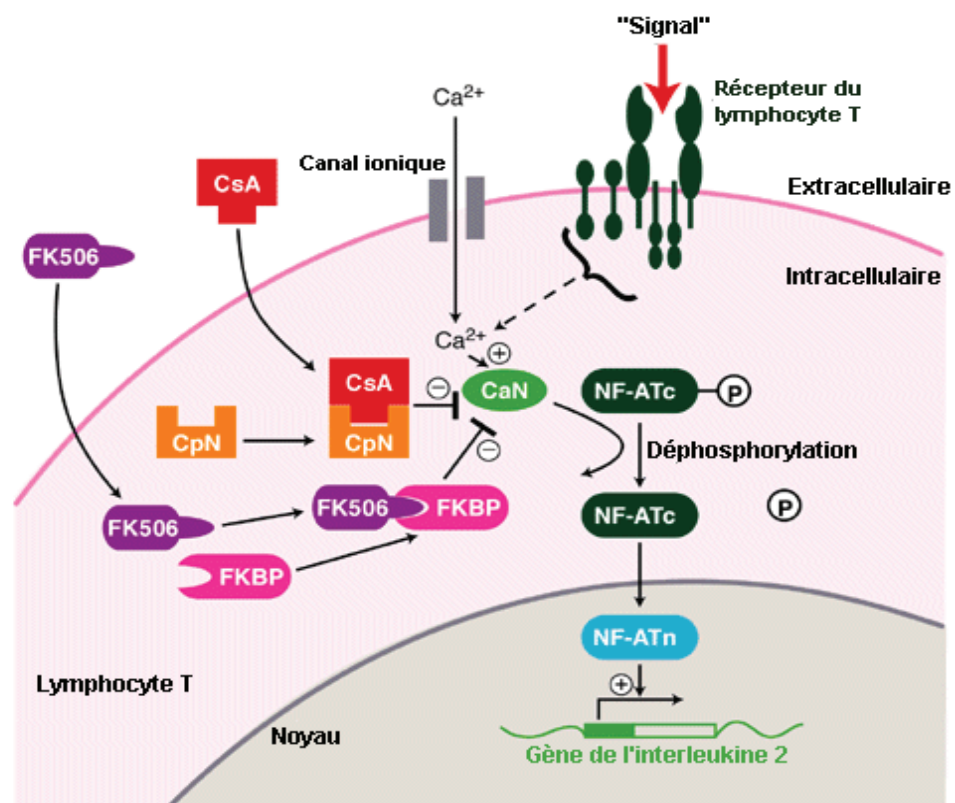


Figure 5 : Mécanismes d'action des inhibiteurs de la calcineurine. La ciclosporine (CsA) se lie à la cyclophiline (CpN) formant un complexe qui se lie à la calcineurine (CaN) et bloque son activité enzymatique rendant inactif le facteur NFAT et inhibant ainsi la transcription de gènes codant des cytokines essentielles à l'activation lymphocytaire T tels que l'interleukine 2. D'après Stepkowski, 2000.

B. INDICATION THERAPEUTIQUE DES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE

Les indications des inhibiteurs de la calcineurine sont multiples et ont largement dépassé le domaine de la transplantation d'organes pour être utilisés dans le traitement des maladies autoimmunes. Les principales indications de la ciclosporine et du tacrolimus sont la prévention et le traitement du rejet lors de la transplantation d'organes solides ; en allogreffe de moelle, la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte ; en néphrologie, le traitement du syndrome néphrotique corticorésistant, la néphropathie lupique ; en dermatologie, les formes sévères de psoriasis et de dermatite atopique ; en rhumatologie, la polyarthrite rhumatoïde, certaines myosites, ; en gastroentérologie, certaines formes d'hépatites auto-immunes et de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ; en ophtalmologie, certaines uvéites.

C. PHYSIOPATHOLOGIE

a. LES LESIONS TISSULAIRES RENALES

Les inhibiteurs de la calcineurine sont responsables de deux formes de néphrotoxicité : une néphrotoxicité aiguë ou fonctionnelle et une néphrotoxicité chronique ou structurelle.

La néphrotoxicité aiguë, dose-dépendante et réversible, est associée à des altérations de l'hémodynamique intra-rénale et à une réduction du débit de filtration glomérulaire qui débute précocement après l'initiation du traitement. Cette vasoconstriction est la conséquence d'une augmentation du tonus sympathique (Scherrer et al., 1990), d'une activation du système rénine-angiotensine impliquant l'angiotensine II (Ramirez et al., 2000) et l'aldostérone (Bobadilla and Gamba, 2007), d'une diminution de la production de molécules vasodilatatrices (prostaglandines (Chang et al., 2005), NO) et d'une augmentation de la production d'endothéline-1 (Ramzy et al., 2006). Les inhibiteurs de la calcineurine entraînent également des lésions tubulaires : il existe une vacuolisation isométrique du cytoplasme tubulaire dont le mécanisme n'est pas élucidé et des corps d'inclusion sont parfois présents dans le cytoplasme tubulaire. Ces inclusions

représentent des mitochondries géantes et des autolysosomes. Il existe également des troubles hydroélectrolytiques et l'excrétion urinaire de la retinol-binding protein est augmentée (Naesens et al., 2009). Cette ischémie parenchymateuse a comme conséquence une insuffisance rénale aiguë fonctionnelle régressant à la réduction des posologies des inhibiteurs de la calcineurine. Il est cependant admis que ces phénomènes ischémiques aigus induisent progressivement des lésions structurelles irréversibles. Enfin les inhibiteurs de la calcineurine peuvent entraîner une microangiopathie thrombotique qui serait due à des lésions endothéliales secondaires à la vasoconstriction induite par ces molécules.

La néphrotoxicité chronique de la ciclosporine a été découverte après la néphrotoxicité aiguë. Elle a été mise en évidence en 1984 dans une cohorte de patients greffés cardiaques (Myers et al., 1984). Cette toxicité est inévitable malgré une immunosuppression bien conduite avec une surveillance pharmacocinétique. L'étude longitudinale de Nankivell *et al.* conduite chez des patients ayant bénéficié d'une transplantation rénale et pancréatique a montré qu'à 10 ans 100% des patients présentent des lésions de toxicité des inhibiteurs de la calcineurine (Nankivell et al., 2003).

Différents types cellulaires semblent être simultanément les cibles de la néphrotoxicité chronique des inhibiteurs de la calcineurine. La néphrotoxicité chronique se caractérise par une artériolopathie faite de dépôts hyalins dits « en collier de perle », une atrophie tubulaire, une fibrose interstitielle en bandes et une glomérulosclérose. La vasoconstriction et les lésions des cellules endothéliales peuvent conduire à une nécrose des cellules musculaires lisses et une hyalinisation des parois vasculaires, réduisant le diamètre de la lumière du vaisseau à l'origine d'une ischémie chronique contribuant ainsi à la fibrose interstitielle en bandes (**Figure 6**). Cependant les lésions tubulointerstitielles peuvent se développer indépendamment de l'artériolopathie puisque les inhibiteurs de la calcineurine peuvent directement activer les gènes de l'apoptose. Ils pourraient également induire une inflammation avec infiltration macrophagique dans l'interstitium. L'atteinte glomérulaire se caractérise habituellement par une glomérulosclérose globale. Des lésions secondaires aux lésions tubulointerstitielles existent comme des glomérules atubulaires qui ont une diminution de leur taille et qui sont entourés d'une fibrose. Enfin il peut exister des lésions de hyalinose segmentaire et focale associées aux lésions précédentes (Naesens et al., 2009).

Néanmoins certaines de ces lésions peuvent exister mais dans une moindre mesure chez des patients n'ayant jamais eu de ciclosporine témoignant de leur faible spécificité pour la toxicité des inhibiteurs de la calcineurine (Snanoudj et al., 2011).

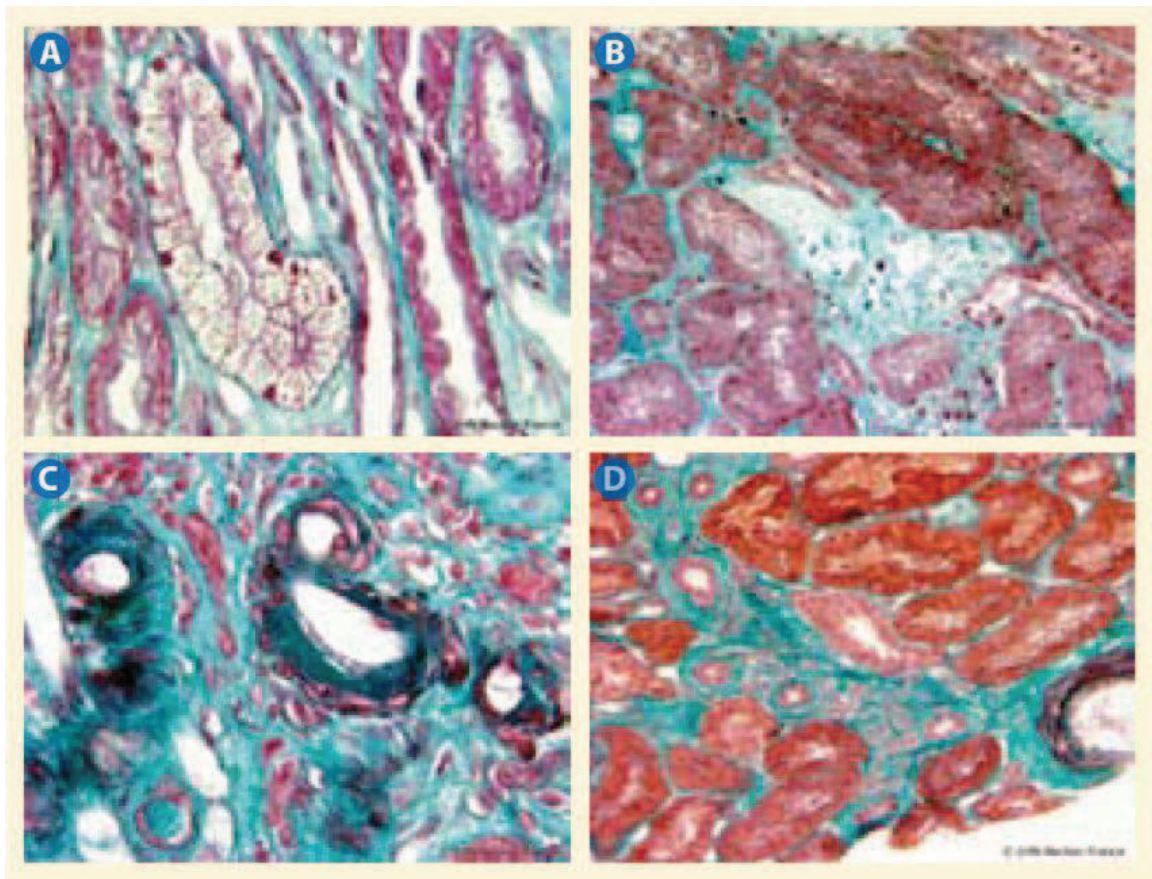


Figure 6 : Lésions histologiques observées au cours de la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine. A : vacuoles isovolumétriques dans les tubes proximaux ; B : calcifications interstitielles ; C : dépôts hyalins intermyocytaires et sous-intimaux ; D : fibrose interstitielle en bandes. Coloration au trichrome x 250 (A et C) ou x 400 (B et D) (© Laure-Hélène Noël, laboratoire d'anatomie pathologique, hôpital Necker). D'après Pallet et Anglicheau, 2008.

b. MEDiateURS IMPLIQUES

De multiples mécanismes impliquant les différents types cellulaires du parenchyme rénal conduisent à la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine. Pour expliquer la vasculopathie, il est souvent admis qu'il existe un déséquilibre entre les facteurs vasoconstricteurs et les facteurs vasodilatateurs avec notamment l'implication de l'endothéline, des thromboxanes, le système rénine-angiotensine-aldostérone, le NO et les prostaglandines. Une modification du tonus sympathique et la formation de radicaux libres pourraient également jouer un rôle.

En ce qui concerne les lésions tubulointerstitielles, le transforming growth factor β (TGF β) semble jouer un rôle important. D'autres facteurs comme les radicaux libres, les espèces réactives de l'oxygène, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) sont également impliqués (Pallet and Anglicheau, 2008).

Nous décrirons ci-dessous les principaux mécanismes et médiateurs pouvant intervenir dans la toxicité des inhibiteurs de la calcineurine.

i. L'ENDOTHÉLINE

L'endothéline est un puissant vasoconstricteur. Il a été montré chez l'animal et chez l'homme que la ciclosporine entraîne la production accrue d'endothéline et entraîne une vasoconstriction (Cauduro et al., 2005; Perico et al., 1990). Par ailleurs il a été montré que l'administration d'un antagoniste du récepteur de l'endothéline diminue les effets vasoconstricteurs de la ciclosporine dans l'artériole rénale afférente isolée du rat (Lanese and Conger, 1993).

ii. LE SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE-ALDOSTERONE

Le système rénine-angiotensine-aldostérone est un régulateur important de la pression artérielle et du DFG. Les principaux effets de l'angiotensine II sont la contraction des cellules musculaires lisses, l'augmentation de la production d'endothéline, la stimulation de la libération de catécholamines, la libération

d'aldostérone entraînant la réabsorption du sodium au niveau du tubule rénal et l'inhibition de la libération de la rénine (Kim and Iwao, 2000). La ciclosporine active le système rénine-angiotensine-aldostérone par des effets directs sur les cellules juxtaglomérulaires et des effets indirects secondaires à la vasoconstriction artériolaire aggravant ainsi la vasoconstriction et créant alors un cercle vicieux (Lassila, 2002). Une étude en immunohistochimie sur des biopsies rénales d'enfants ayant un syndrome néphrotique a montré qu'un traitement par ciclosporine entraîne des modifications de distribution et une augmentation de la rénine dans le rein. Elle a également montré que les lésions artériolaires sont souvent proches des régions où la rénine est augmentée et que la rénine diminue lorsque le traitement par ciclosporine est interrompu (Iijima et al., 2000). Néanmoins l'angiotensine II possède d'autres rôles qui vont au-delà de la régulation de la pression artérielle. En effet celle-ci joue un rôle dans l'inflammation en activant le facteur transcriptionnel NF- κ B (nuclear factor- κ B) entraînant une cascade de chémokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion. Elle induit également la croissance des cellules mésangiales, des cellules endothéliales glomérulaires et des fibroblastes ou, à l'inverse, induit l'apoptose. Elle peut induire la fibrose par augmentation de l'expression de certaines protéines du collagène, du TGF β (voir chapitre « Le transforming growth factor β ») et en diminuant le plamsinogen activator inhibitor-1 ou le tissu inhibitor of matrix metalloproteinases-1 ce qui conduit à l'accumulation de matrice extracellulaire (Ruster and Wolf, 2006). Par ailleurs une étude a décrit des lésions rénales identiques chez des rats ayant reçu de l'angiotensine II ou de la ciclosporine (Pichler et al., 1995). Plusieurs études ont montré que l'utilisation des inhibiteurs du système rénine-angiotensine permet d'empêcher l'apparition de la fibrose interstitielle chez le rat et de diminuer la néphrotoxicité chez l'homme (Naesens et al., 2009).

De nombreux travaux ont également impliqué l'aldostérone dans la genèse des lésions rénales dues à la ciclosporine puisque l'administration de spironolactone ou d'éplérénone, qui sont des bloqueurs du récepteur à l'aldostérone, permet d'obtenir des lésions histologiques moins importantes (Feria et al., 2003; Nielsen et al., 2008) mais ne permet pas une régression des lésions préexistantes (Perez-Rojas et al., 2007).

La dysfonction endothéliale joue un rôle essentiel dans la néphrotoxicité liée aux inhibiteurs de la calcineurine. La ciclosporine et le tacrolimus inhibent partiellement la synthèse de NO (Hortelano et al., 2000) et modifient ainsi l'équilibre entre les facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. La vasoconstriction due à la ciclosporine entraînerait des lésions d'ischémie-reperfusion rénale engendrant la formation de radicaux libres (Zhong et al., 1998). Par ailleurs la ciclosporine peut induire la production de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène par l'activation du cytochrome P450 3A4, de la NADPH oxydase ainsi que par l'inhibition de la glutathion synthétase (Buetler et al., 2000). Il est aussi établi que ces radicaux libres tels que les ions superoxydes entraînent une consommation de NO et diminue ainsi la biodisponibilité de celui-ci (Navarro-Antolin et al., 2001). Enfin pour conforter le rôle délétère de la diminution du NO et du stress oxydant, plusieurs travaux ont montré un effet des thérapies anti-oxydantes au cours d'un traitement par la ciclosporine avec une diminution de la vasoconstriction et des lésions histologiques (Parra Cid et al., 2003; Zhong et al., 1998).

Récemment il a été montré que Nox2 (phagocytic NADPH oxidase), dont la fonction est de générer des espèces réactives de l'oxygène, peut jouer un rôle dans la fibrogenèse rénale liée aux inhibiteurs de la calcineurine. Ce processus serait dépendant du TGFβ (Djamali et al., 2012).

iv. LE TONUS SYMPATHIQUE

L'activation induite du tonus sympathique par les inhibiteurs de la calcineurine pourrait jouer un rôle dans l'hypertension et la vasoconstriction des artérioles rénales. Les premières études chez l'animal ou chez l'homme montraient une augmentation du tonus sympathique (Moss et al., 1985; Scherrer et al., 1990). Une étude récente chez des volontaires sains a montré que l'administration ponctuelle d'une dose unique faible ou élevée de ciclosporine augmente l'activité nerveuse sympathique tandis que l'administration pendant 15 jours entraîne la diminution de celle-ci. Ces mêmes études ont été menées avec le tacrolimus : lors de l'administration ponctuelle, il n'y a pas de modification de l'activité nerveuse sympathique mais celle-ci diminue lors de l'administration chronique (Klein et al., 2010). Une étude chez 24 greffés rénaux chez qui le greffon n'est pas innervé ne retrouvait pas de modifications de l'activité nerveuse

sympathique après l'arrêt de la ciclosporine mais mettait en évidence une diminution de la pression artérielle (Hausberg et al., 2006).

v. LE TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA

La ciclosporine et le tacrolimus induisent tous les deux l'expression du TGF β (Khanna et al., 2002). Cette molécule joue un rôle important dans l'apparition des lésions tubulointerstitielles chroniques liées aux inhibiteurs de la calcineurine. Le TGF β induit la fibrose interstitielle en diminuant la dégradation et en augmentant la production des protéines de la matrice extracellulaire (Border and Noble, 1994) mais aussi en induisant la TEM (voir chapitre « La transition épithélio-mésenchymateuse »). Par ailleurs, il a été montré que l'utilisation d'anticorps anti-TGF β permet une réduction de la fibrogenèse rénale chez le rat traité par ciclosporine renforçant le rôle du TGF β dans l'apparition de la néphrotoxicité liée à la ciclosporine (Khanna et al., 2004).

vi. LA TRANSITION ÉPITHÉLIO-MÉSENCHYMATEUSE

Les myofibroblastes constituent une source majeure de matrice extracellulaire. Bien que leur rôle au cours de la fibrogénèse rénale soit reconnu, une controverse existe quant à leur origine (Liu, 2004). Lors de ce processus, environ 30% des myofibroblastes présents dans le rein auraient comme origine les cellules tubulaires par le processus de TEM (Iwano et al., 2002). La TEM existe chez l'homme au cours de diverses néphropathies mais sa contribution à l'évolution de la fibrose rénale est encore peu étudiée chez l'homme (Liu, 2004) même si de forts arguments expérimentaux l'impliquent dans la progression de la fibrose interstitielle. La TEM se caractérise par l'acquisition par les cellules tubulaires d'un phénotype myofibroblastique au cours d'un processus dynamique : perte d'adhésion intercellulaire et d'expression membranaire de protéines constituant les jonctions intercellulaires, expression *de novo* de marqueurs mésenchymateux tels que le fibroblast-specific protein 1 (FSP1) (Iwano et al., 2002) ou l'actine α de muscle lisse (α SMA) (Hinz et al., 2007), la réorganisation du cytosquelette d'actine avec la formation de fibres d'actine de stress permettant la migration cellulaire, la redistribution périphérique de la vinculine au niveau des filopodiæ et la production de

composants de la matrice extracellulaire. La TEM est déclenchée par de nombreux stimuli extracellulaires avec le TGF β comme acteur central. Il a été récemment montré *in vitro* que la CsA peut induire une TEM sur des cellules tubulaires rénales proximales humaines et que ce phénomène est lié à la sécrétion de TGF β et à son action autocrine (Slattery et al., 2005). En 2008 nous avons montré au laboratoire que la ciclosporine induit *in vitro* et *in vivo* des changements phénotypiques tubulaires par un mécanisme original, le stress du réticulum endoplasmique (RE) (Pallet et al., 2008a). Plus récemment, il a été montré que la TEM était un facteur de risque indépendant de la dégradation de la fonction rénale dans une cohorte de transplantés rénaux recevant de la ciclosporine, par rapport au groupe qui avait arrêté leur traitement 3 mois après la transplantation (Hazzan et al., 2011). Néanmoins ce processus a été remis en question récemment évoquant les péricytes comme source principal de myofibroblastes (voir chapitre « Le stress du RE et la transition épithelio-mesenchymateuse ou les modifications phénotypiques épithéliales rénales ») (Humphreys et al., 2010).

D. DIFFERENCE DE PROFIL TOXIQUE ENTRE LA CICLOSPORINE ET LE TACROLIMUS

La ciclosporine et le tacrolimus ne sont pas des molécules apparentées mais ont des effets sensiblement identiques en ce qui concerne l'immunosuppression et la néphrotoxicité. Les efficacités de la ciclosporine et du tacrolimus ont été comparées dans une méta-analyse en 2005 : la majorité des études sont en faveur du tacrolimus en montrant une meilleure survie du greffon à 6 mois, un an et 3 ans, une moindre survenue de rejets avec une créatininémie moyenne moindre. Il faut cependant noter qu'il y avait plus de diabète (Webster et al., 2005). Il est également établi que ces molécules partagent le même potentiel fibrogénique, et *in fine*, produisent la même néphrotoxicité (Roos-van Groningen et al., 2006). Il est donc licite de supposer que les effets néphrotoxiques des inhibiteurs de la calcineurine passent par les mêmes mécanismes à savoir l'inhibition de la calcineurine. Néanmoins il existe des profils de réponse différents entre les deux molécules : la ciclosporine va engendrer plus de dyslipidémies, d'hyperplasie gingivale et d'hirsutisme alors que le tacrolimus va induire plus de diabète. Une étude récente portant sur la voie de signalisation des effets délétères de l'angiotensine II sur des

fibroblastes cardiaques a montré par exemple que le tacrolimus diminue l'activation des MAP (mitogen-activated protein) kinases stimulées par l'angiotensine II alors que la ciclosporine inhibe les réponses pro-fibrotiques et pro-inflammatoires également induites par l'angiotensine II (White et al., 2012).

La calcineurine comporte deux sous-unités A et B. Trois isoformes existent pour la sous-unité A : α , β et γ tandis qu'il existe deux isoformes pour la sous-unité B à savoir B1, exprimée de façon ubiquitaire et B2 exclusivement dans le testicule. La sous-unité A α est fortement exprimée dans les tubules proximaux, tandis que la sous-unité β est la première isoforme dans le système immunitaire (Gooch, 2006). La délétion de la sous-unité α induit une augmentation de synthèse de matrice extracellulaire car des souris n'exprimant pas la sous-unité α développent des lésions histologiques analogues à celles induites par la ciclosporine alors que la perte de la sous-unité β n'induit aucune pathologie (Gooch et al., 2007). *In vitro*, la délétion de la sous-unité α dans des fibroblastes induit une augmentation de sécrétion de TGF- β et de fibronectine (Gooch et al., 2004).

Une meilleure compréhension des mécanismes de néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine implique également l'étude du rôle de l'inhibition de leurs cibles cellulaires, la CyPA et la FKBP12. En effet le rôle de l'inhibition des immunophilines dans la survenue de la néphrotoxicité a été suggéré. La CyPA, ligand endogène de la ciclosporine, constitue la principale isoforme des cyclophilines chez les mammifères. Les cyclophilines sont des isomérases qui induisent des modifications structurales post-traductionnelles. La CyPA est aussi impliquée dans la différenciation cellulaire, la réplication virale, la transduction du signal et le trafic intracellulaire. La ciclosporine inhibe l'activité isomérase de la CyPA. Les souris surexprimant la CyPA sont résistantes à la néphrotoxicité de la ciclosporine alors que celles exprimant une CyPA mutée développent spontanément des lésions évocatrices de néphrotoxicité de la ciclosporine et sont plus sujettes à l'insuffisance rénale lors d'un traitement par ciclosporine (Hong et al., 2004). Les FKBP12 partagent certaines fonctions enzymatiques avec les cyclophilines, notamment l'activité isomérase, mais avec un spectre de substrats plus réduit. FKBP12 est l'isoforme majoritaire et se lie à la rapamycine et au tacrolimus. L'inhibition de l'activité isomérase de FKBP12 ne semble pas capable d'induire une néphrotoxicité : un analogue du tacrolimus, le L-615,818, inhibiteur de la fonction isomérase de FKBP12,

mais dépourvu d'effet inhibiteur de la calcineurine, n'est responsable d'aucune néphrotoxicité *in vivo* (Dumont et al., 1992).

2. L'ISCHEMIE ET SES PRINCIPALES CONSEQUENCES

A. DEFINITION DE L'ISCHEMIE

L'ischémie se caractérise par l'absence ou la baisse de flux sanguin dans un organe, une de ses régions ou un organisme entier. Elle entraîne, si celle-ci perdure trop longtemps une nécrose du tissu et une perte de fonction. Les composantes de l'ischémie sont la diminution ou l'arrêt d'apport en oxygène mais aussi la diminution ou l'arrêt de tout élément transporté dans le sang, à savoir, le glucose, les acides aminés, les cytokines, les facteurs de croissance et l'apparition d'une acidose.

Il existe également des situations où seul l'un de ces éléments est déficient : l'hypoxie seule peut être liée à une faible pression partielle en oxygène dans le sang artériel à cause de maladies pulmonaires ou les hautes altitudes. Il peut aussi exister un défaut de transport à cause d'une anémie. On peut enfin également observer des carences en glucose comme dans les intoxications par l'insuline.

La diminution voire l'arrêt du flux sanguin va entraîner une diminution du tonus vasculaire et activer le système rénine-angiotensine-aldostérone et la sécrétion d'endothéline 1 afin de maintenir la pression de perfusion. Le métabolisme aérobie s'arrête et induit la formation de radicaux libres et l'inflammation. Les espèces réactives de l'oxygène et le pH acide vont entraîner des lésions membranaires de la cellule endothéliale et la formation de microthrombi dans les capillaires. L'absence d'oxygène au niveau des cellules épithéliales va entraîner une diminution de l'ATP, permettre la formation d'ions superoxydes, une dégradation des métalloprotéines et un arrêt des pompes Na/K ATP-dépendantes. L'ischémie prolongée peut entraîner la mort cellulaire par apoptose ou nécrose.

La reperfusion peut apparaître après l'ischémie dans certaines situations telles que la fibrinolyse naturelle, médicamenteuse ou mécanique ou après l'implantation d'un organe

transplanté. Le flux sanguin va à nouveau revasculariser l'organe ischémié et va entraîner des lésions spécifiques liées à la reperfusion. Les cellules de l'endothélium vasculaire lésées vont libérer de l'endothéline 1 et induire une vasoconstriction importante. Lors de la reperfusion, la quantité de NO va brutalement augmenter afin de contrecarrer les effets vasoconstricteurs de l'endothéline mais également entraîner une production d'ions peroxy-nitrites. Il va y avoir une infiltration du tissu par des polynucléaires neutrophiles et des macrophages suite à la libération de chémokines par les cellules endothéliales comme MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1). Les leucocytes vont activer la synthèse de chémokines par les cellules dendritiques et permettre l'activation des lymphocytes T. L'infiltration du tissu par les leucocytes va engendrer une réaction inflammatoire avec formation de radicaux libres. Les cellules épithéliales lésées vont libérer des DAMPs (danger-associated molecular patterns) qui vont être reconnus par des TLRs (toll-like receptors) des leucocytes et activer la cascade inflammatoire (voir chapitre « L'inflammation »). Au cours de la reperfusion, les molécules du complément vont interagir avec les cellules ci-dessus et aggraver les lésions cellulaires. Les cellules de la réponse immunitaire adaptative (lymphocytes B et T) vont également jouer un rôle précoce lié à la reconnaissance alloimmune (en ce qui concerne les greffes) au cours de la reperfusion (voir chapitre « La réponse alloimmune ») (**Figure 7**) (Siedlecki et al., 2011). Lorsque les deux phénomènes arrivent, on parle de lésions d'ischémie-reperfusion.

Suite aux agressions liées à l'ischémie ou l'ischémie-reperfusion, plusieurs réponses adaptatives vont être mises en route afin de préserver les viabilités cellulaire et tissulaire. La principale voie adaptative est la voie HIF1 α liée à l'hypoxie mais d'autres voies existent et sont à la fois dépendantes de la pression partielle en oxygène mais également liées à la concentration en glucose ou en acides aminés.

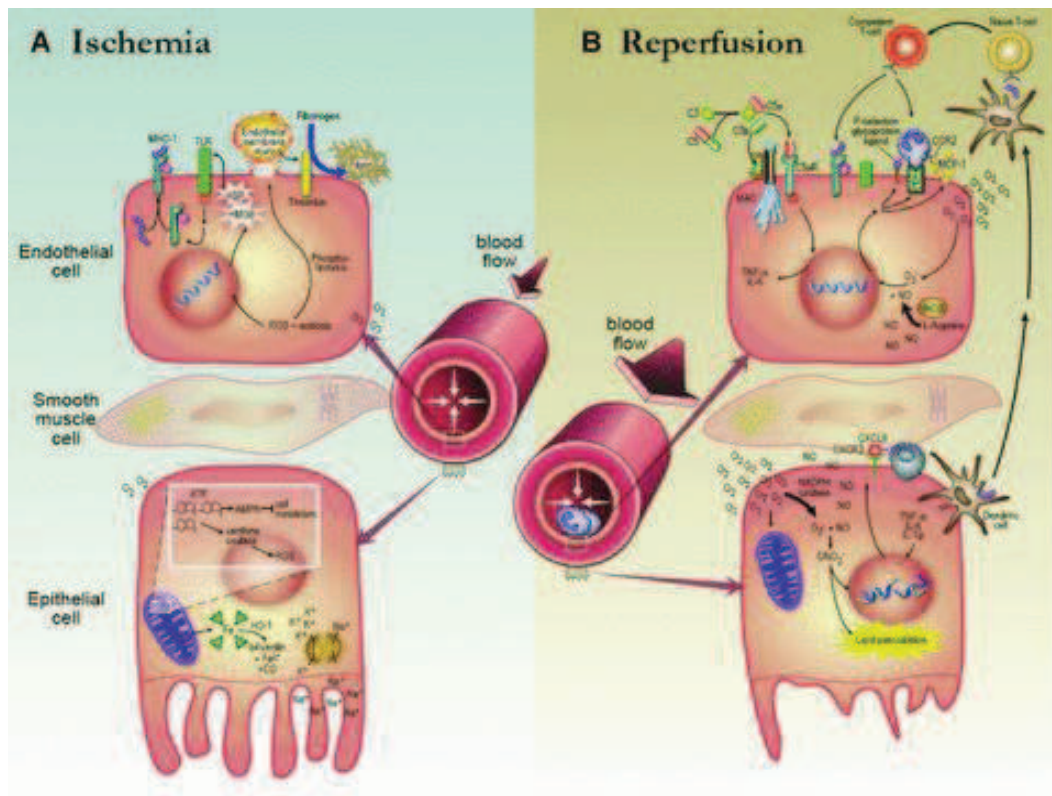


Figure 7 : Mécanismes des lésions d'ischémie-reperfusion au cours de la transplantation rénale. **A (ischémie)** : il existe une vasoconstriction liée à l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone et la libération d'endothéline 1. Les espèces réactives de l'oxygène et le milieu acide vont induire des lésions endothéliales et la formation de microthrombi. La dégradation de l'ATP dans la cellule épithéliale va induire la formation d'ions superoxydes et l'arrêt de la machinerie enzymatique. **B (reperfusion)** : l'apparition de NO va entraîner une vasodilatation mais aussi la formation d'ions peroxynitrites. La sécrétion de cytokines et chémokines va entraîner l'afflux de cellules inflammatoires de la réponse immunitaire innée et adaptative et activer la voie du complément aggravant les lésions tissulaires. D'après Siedlecki *et al.*, 2011.

B. LES REPONSES ADAPTATIVES A L'ISCHEMIE

Dans ce chapitre, vont être abordées les principales voies de signalisation régulées par l'hypoxie, la carence en glucose, en acides aminés ou en facteurs de croissance. La réponse UPR est une des réponses adaptatives à l'ischémie mais sera abordée dans un chapitre distinct (voir chapitre « Le stress du réticulum endoplasmique, la réponse UPR et ses implications »).

a. LA VOIE HIF-1ALPHA

Les hypoxia-inducible factors (HIF) sont des facteurs transcriptionnels hétérodimériques constitués d'une sous-unité α et β . La sous-unité α est l'une des trois isoformes suivantes 1α , 2α et 3α . Elle est labile à l'oxygène tandis que la sous-unité β est insensible à l'oxygène. HIF1 a été découvert il y a une vingtaine d'années par Semenza qui cherchait les gènes régulant l'érythropoïétine (Semenza et al., 1991). HIF- 1α et HIF- 1β sont respectivement des protéines de 826 et de 789 acides aminés. Les HIFs sont des facteurs transcriptionnels appartenant à la famille bHLH-PAS (basic helix-loop-helix / Per-ARNT-Sim). HIF 1α est exprimé de façon ubiquitaire dans tous les tissus (Majmundar et al., 2010).

i. RÉGULATION

La régulation de HIF est originale et très conservée chez les animaux. Elle permet une adaptation rapide aux modifications de la concentration en oxygène par un mécanisme post-traductionnel oxygène-dépendant.

L'expression et la traduction de HIF- 1α sont constitutives et principalement contrôlées par le facteur transcriptionnel Sp1 mais également par AP1, AP2 et NF- κ B.

En condition de normoxie, HIF- 1α est non fonctionnel (la demi-vie de ce facteur est très courte puisqu'elle est de moins de 5 minutes). En effet dans un environnement bien oxygéné, les sous-unités α sont hydroxylées par des prolyl hydroxylase domain-containing enzymes (PHDs) sur des résidus proline bien conservée dans une région

spécifique se nommant oxygen-dependent degradation domain. En conséquence, HIF est reconnu, marqué par la protéine von Hippel-Lindau (VHL) qui est un composant du complexe ubiquitine ligase E3 pour être dirigé vers le protéasome et être dégradé (**Figure 8**) (Majmundar et al., 2010).

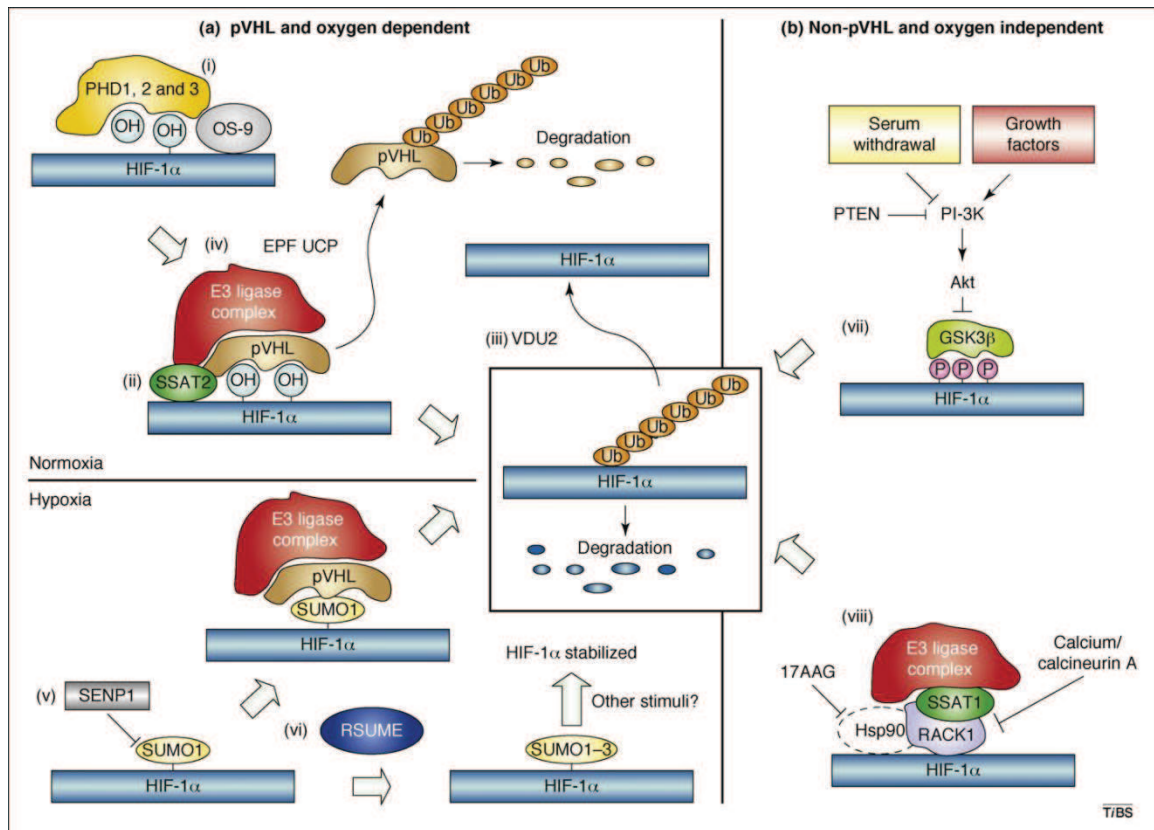


Figure 8 : Les principales voies de dégradation de la protéine HIF-1 α . (a) Processus oxygénodépendants et (b) processus oxygénéindépendants. D’après Yee Koh *et al.*, 2008.

Les protéines PHD appartiennent à la famille des dioxygénases dépendant du fer et du 2-oxoglutarate ce qui implique une dépendance absolue à l’oxygène. La transcription des PHDs est sous le contrôle de HIF et cela constitue donc un rétrocontrôle négatif.

En plus de l’hydroxylation des résidus proline par les PHDs, le factor inhibiting HIF 1 (FIH1) qui est une enzyme appartenant à la même famille que les PHDs et donc dépendante de l’oxygène hydroxyle en situation de normoxie ou d’hypoxie modérée un résidu asparagine conduisant à un encombrement stérique qui empêche le recrutement

des coactivateurs p300/CBP ((CREB)-binding protein). FIH1 reste actif à de plus faibles concentrations en oxygène que les PHDs permettant ainsi une réponse variable selon le degré d'hypoxie (Kaelin and Ratcliffe, 2008).

L'acétylation de HIF-1 α sur une lysine par ARD1 (arrest-defective 1 protein), une acétyl-transférase, en situation de normoxie, augmente son interaction avec le facteur VHL et ainsi sa dégradation par le protéasome (Jeong et al., 2002).

En condition d'hypoxie, les hydroxylations et l'acétylation sont inhibées ce qui permet l'accumulation de la sous-unité α . Elle va ensuite se dimériser avec la sous-unité β par leur domaine HLH et PAS ; HIF se lie alors à la protéine p300 pour être ensuite transloqué dans le noyau et se fixe à des régions du génome spécifiques (hypoxia response elements, HREs) qui sont semblables aux motifs « enhancer box » et ont une séquence consensus G/ACGTG par des domaines de transactivation (Majmundar et al., 2010) .

D'autres régulations oxygène-dépendantes semblent exister mais ne sont pas encore bien décrites : les modifications liées aux protéines SUMO (small ubiquitin-like modifier) (SUMOylation ou dé-SUMOylation) permettraient une stabilisation et une augmentation de l'activité de HIF-1 α en SUMOylant HIF-1 α (Bae et al., 2004; Carbi-Nagashima et al., 2007) ou en deSUMOylant le coactivateur p300 (Huang et al., 2009) mais certains auteurs ont montré que la SUMOylation de HIF-1 α (Berta et al., 2007) ou de HIF-1 β (Tojo et al., 2002) entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α (**Figure 8**).

D'autres protéines interviennent également comme HDAC7 (histone deacetylase 7) qui faciliterait la liaison à des coactivateurs comme p300 et CBP pour HIF-1 α ou Int6 (translation initiation factor 6) qui induirait une instabilité et la dégradation de HIF-2 α indépendamment de la protéine VHL (Chen et al., 2009). HIF-1 α peut aussi être dégradé indépendamment de la protéine VHL et de façon oxygène-indépendante par RACK1 (receptor of activated protein kinase (PK)C) lorsque la protéine HSP90 (heat shock protein 90) est inhibée. Son inhibition conduit alors à une ubiquitylation par le complexe E3 ligase ou à l'inhibition de la voie PI3 (phosphatidyl-inositol 3) kinase-Akt qui permet l'activation de protéines telles que GSK3 (glycogen synthase kinase 3) et FOXO3a (forkhead box (FOX)O4) qui facilitent la dégradation de HIF-1 α (Yee Koh et al., 2008). L'hypoxia-associated factor (HAF) qui est une E3 ligase atypique permet également la

dégradation de HIF-1 α indépendamment de la protéine VHL et de l'oxygène (**Figure 8**) (Koh et al., 2008).

De nombreuses autres situations peuvent activer cette voie : des facteurs de croissance, des cytokines, des hormones, des protéines virales. Le principal mécanisme est l'augmentation de sa traduction impliquant la voie PI3 kinase-Akt avec ses effecteurs mTOR (mechanistic target of rapamycin) et p70S6 kinase contrecarrant les processus de dégradation (Dery et al., 2005; Jung et al., 2003; Melillo, 2004). D'autres situations peuvent également activer la voie HIF-1 α comme l'insuline, l'insulin-like growth factor-1 (Carroll and Ashcroft, 2006; Treins et al., 2006), les espèces réactives de l'oxygène (Biswas et al., 2007; Xia et al., 2007), avec des mécanismes pouvant impliquer la dé-SUMOylation de p300 de façon oxygène-indépendante (Huang et al., 2009), au cours de la diminution du pH induisant une séquestration de la protéine VHL dans le nucléole (Mekhail et al., 2004), le chlorure de cobalt (Yuan et al., 2003), en cancérogenèse, avec des mutations inactivatrices de PTEN (phosphatase and tensin homolog), TSC2 (tuberous sclerosis protein 2) ou de la protéine VHL ou activatrices de PI3 kinase ou Akt (Brugarolas and Kaelin, 2004; Majmundar et al., 2010).

ii. HIF-1A ACTIVE DE MULTIPLES VOIES DE SIGNALISATION

HIF-1 α active plus d'une centaine de gènes différents impliqués dans l'érythropoïèse (érythropoïétine, transferrine), l'angiogenèse (VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor)), la prolifération cellulaire (insulin-like growth factor-2, Myc), le tonus vasculaire (NO synthase, heme oxygenase 1 (HO-1)), le remodelage de la matrice extracellulaire (matrix metalloproteinase 1, LOX (lysyl oxidase), le métabolisme du glucose (glucose transporter-1 (Glut1), 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3)), l'apoptose (nineteen kD interacting protein 3 (NIP3), Nip3-like protein X (NIX)), l'autophagie (Bcl-2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3 (BNip3), l'inflammation (NF- κ B), la transition épithélio-mésenchymateuse (Jiang et al., 2011), la prolifération cellulaire et l'invasion (C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4), Twist1, stromal cell-derived factor 1 (SDF1), les micro-ARNs (miR210) (**Figure 9**) (Gunaratnam and Bonventre, 2009; Hirota and Semenza, 2006; Ke and Costa, 2006; Majmundar et al., 2010). Les mécanismes

d'activation sont le plus souvent liés à la fixation de HIF-1 α sur les séquences HRE des promoteurs mais peuvent également se faire par des mécanismes indépendants des HRE tels que l'activation de Notch (Keith and Simon, 2007), Wnt (Kaidi et al., 2007) et Myc (Koshiji et al., 2004).

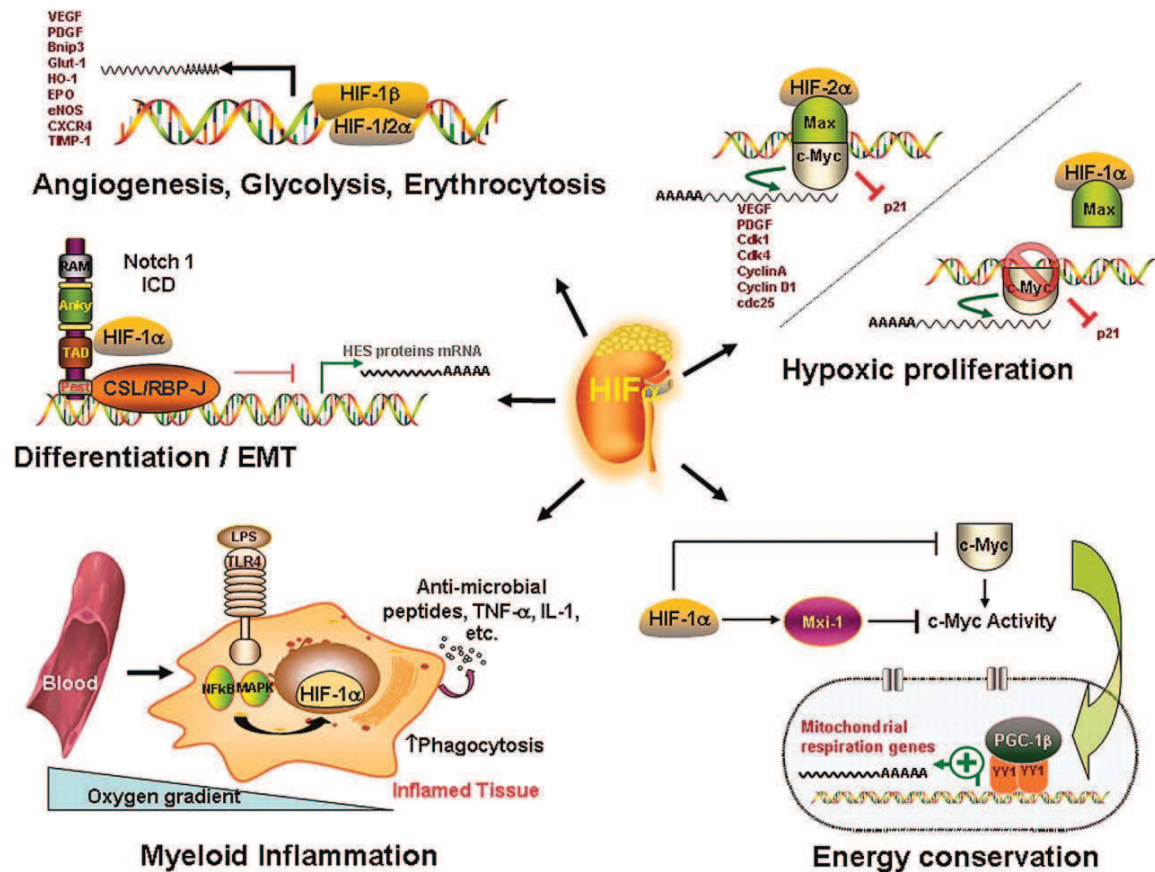


Figure 9 : Les principales voies régulées par HIF. HIF-1 α joue un rôle dans le contrôle de l'angiogenèse, la glycolyse, l'érythropoïèse, l'inflammation, l'EMT, l'énergie. D'après Gunaratnam et Bonventre, 2009.

iii. DIFFERENCES ENTRE HIF-1A, HIF-2A ET HIF-3A

Toutes les isoformes HIF- α possèdent des homologies de séquence et appartiennent à la famille bHLH-PAS, peuvent se lier à HIF-1 β et se fixer sur des HREs mais diffèrent par leur domaine de transactivation pour HIF-2 α et son absence pour HIF-3 α .

HIF-1 α est ubiquitaire dans tous les tissus tandis que HIF-2 α et HIF-3 α sont exprimés dans certains types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les pneumocytes de type II, les cellules rénales interstitielles (Majmundar et al., 2010).

HIF-1 α et HIF-2 α possèdent des cibles communes mais également exclusives les unes des autres. Ceci est lié à des différences dans le domaine de transactivation et de dimérisation. Dans les cellules exprimant les deux isoformes, de grandes différences d'activité de HIF-2 α peuvent être observées. HIF-2 α est surexprimé dans les carcinomes rénaux et les cibles communes aux deux isoformes deviennent alors plus dépendantes de HIF-2 α alors qu'elles sont dépendantes de HIF-1 α dans les cellules embryonnaires (Kaelin and Ratcliffe, 2008). Le fait que des embryons n'exprimant pas HIF-1 α ou HIF-2 α ne survivent pas montre bien que les deux isoformes ne sont pas redondantes et ne peuvent se substituer l'une à l'autre (Compernelle et al., 2002; Ryan et al., 1998).

HIF-2 α ne régule pas le métabolisme du glucose contrairement à HIF-1 α (Hu et al., 2003) alors que Oct4, TGF α sont plus spécifiques de HIF-2 α (Covello et al., 2006). HIF-2 α est complémentaire de HIF-1 α dans le remodelage de nouveaux vaisseaux via la voie de signalisation Notch (Skuli et al., 2012). La régulation du NO semble diamétralement opposée entre HIF-1 α et HIF-2 α car l'inhibition de HIF-1 α entraîne une réduction de la synthèse de NO par les cellules endothéliales, un retard de la migration des cellules à travers la couche de cellules endothéliales et une diminution des métastases tandis que l'inhibition de HIF-2 α entraîne les effets opposés (Branco-Price et al., 2012). Par ailleurs HIF-2 α est indispensable dans les pneumocytes de type II pour la maturation des alvéoles et la production de phospholipides (Huang et al., 2012).

Les études concernant HIF-3 α sont peu nombreuses. HIF-3 α ne contient pas de domaine d'activation et peut ainsi réguler de façon négative l'angiogenèse dans la cornée de souris lui permettant ainsi de rester avasculaire (Makino et al., 2001).

b. LA VOIE DE SIGNALISATION « MECHANISTIC TARGET OF RAPAMYCIN » (MTOR) (ANCIENNEMENT MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN)

mTOR est comme son nom l'indique la cible de la rapamycine, un macrolide découvert dans les années 1970 qui présentait des propriétés anti-prolifératives. mTOR

est une serine/threonine protein kinase appartenant à la famille des kinases liées à la PI3 kinase. mTOR va s'associer à différentes protéines pour former deux complexes mTOR distincts mTORC1 et mTORC2. Le complexe mTORC1 est composé de six autres protéines dont certaines sont communes aux deux complexes et d'autres spécifiques au complexe mTORC1 telles que raptor (regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin) et PRAS40 (proline-rich Akt substrate 40kDa) (Laplante and Sabatini, 2012b).

La voie de signalisation mTOR contrôle de multiples processus et joue un rôle important dans les phénomènes de croissance et de prolifération cellulaire (**Figure 10**).

i. RÉGULATION

Le complexe mTORC1 est sensible à de nombreux stimuli tels que les acides aminés, l'oxygène, le statut énergétique, le stress, les facteurs de croissance et la rapamycine (**Figure 10**) (Laplante and Sabatini, 2012a).

La carence en oxygène impacte de façon négative la synthèse protéique en inhibant la voie mTOR. En effet la carence en oxygène, et notamment l'hypoxie prolongée, va diminuer la quantité d'ATP (adénosine tri-phosphate) et entraînerait une augmentation d'AMP (adénosine mono-phosphate) déclenchant la phosphorylation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK). Cette kinase va phosphoryler la protéine TSC2 (tuberous sclerosis 2) et faciliter l'activité du complexe hétérodimérique TSC1/2 qui fonctionne comme une GAP (GTPase-activating protein) pour Rheb (Ras homolog enriched in brain). Rheb-GTP (guanidine tri-phosphate) active le complexe mTORC1. Le complexe TSC1/2 empêche la transformation de la forme Rheb-GDP à la forme Rheb-GTP et inhibe donc le complexe mTORC1. AMPK va également directement interagir avec le complexe mTORC1 en phosphorylant Raptor permettant la liaison de la protéine 14-3-3 qui induit un encombrement allostérique du complexe mTORC1. Il existe une autre voie d'inhibition du complexe mTORC1 médiée par REDD1 (regulated in development and DNA damage response 1) qui va activer TSC2 (Laplante and Sabatini, 2012b; Simon et al., 2008). BNip3 peut également diminuer la forme Rheb-GTP induisant l'inhibition du complexe mTORC1 (Li et al., 2007). Enfin un dernier mécanisme d'inhibition de

mTORC1 serait la translocation nucléaire de mTOR par le suppresseur de tumeur PML (promyelocytic leukemia) (Simon et al., 2008).

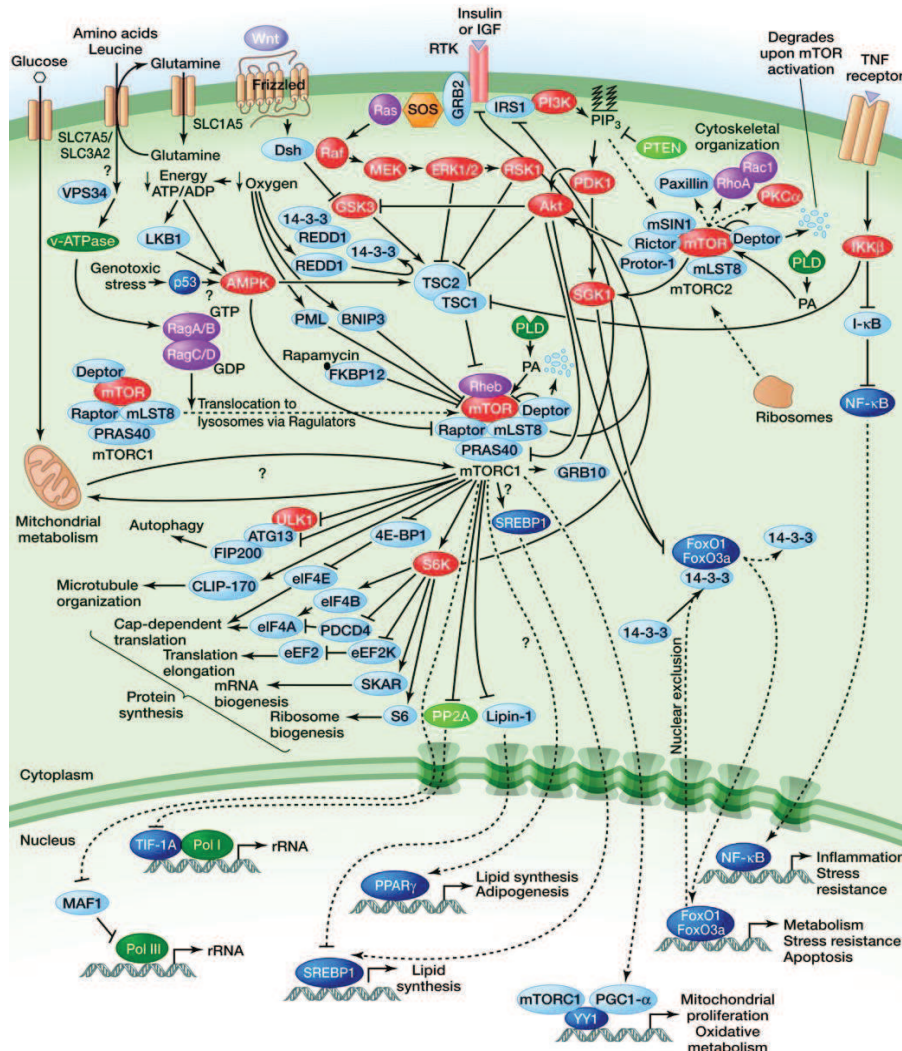


Figure 10 : Les voies de la régulation mTOR. D'après Laplante et Sabatini, 2012a.

La carence en glucose va entraîner une diminution de l'ATP intracellulaire avec une augmentation du rapport AMP/ATP et induire l'activation directe de l'AMPK qui va inhiber le complexe mTORC1 par les différentes voies décrites ci-dessus (Foster and Fingar, 2010). La diminution de l'ATP va également entraîner une activation de LKB1 (liver kidney B1), un suppresseur de tumeur, qui va activer l'AMPK (Shaw et al., 2004). Enfin des microARNs comme miR-451, qui est diminué lors de la carence en glucose et

régule LKB1, sont également une autre voie de signalisation médiée par la carence en glucose (Godlewski et al., 2010).

La carence en acides aminés (particulièrement la leucine et l'arginine) entraîne une inhibition de la voie mTOR qui se fait indépendamment du complexe TSC1/2. La régulation de mTORC dépend des GTPases Rag (Ras-related GTPase) au nombre de quatre chez les mammifères (Rag A à Rag D) qui forment obligatoirement des hétérodimères. Les acides aminés entraînent une augmentation de la liaison entre RagA/B avec une molécule de GTP permettant l'interaction avec Raptor. Le complexe mTORC1 est ensuite dirigé vers la surface lysosomale où il se fixe au complexe Ragulator. Cela permettrait l'activation du complexe mTORC1 seulement en présence d'acides aminés indépendamment des autres signaux (Laplane and Sabatini, 2012b). La vacuolar H⁺-adenoside triphosphate ATPase (v-ATPase) permettrait de transmettre le signal des acides aminés présents dans la lumière lysosomale en interagissant avec Ragulator et les protéines Rag (Zoncu et al., 2011). D'autres protéines ont été décrites dans la régulation de mTORC1 par les acides aminés comme mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP4k3), mammalian vacuolar protein sorting 34 homolog (hVPS34) et inositol polyphosphate monokinase (IPMK) (Laplane and Sabatini, 2012b).

ii. mTORC1 CONTROLE DE NOMBREUSES VOIES DE SIGNALISATION

La voie mTOR contrôle le métabolisme cellulaire, la croissance, la prolifération et la survie cellulaire en régulant la synthèse protéique, la synthèse des lipides, le métabolisme oxydatif, l'autophagie et la prolifération mitochondriale (**Figure 10**).

Le complexe mTORC1 contrôle la synthèse protéique. mTORC1 va phosphoryler les régulateurs de traduction 4E-BP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1) et S6K1 (S6 kinase 1) qui vont ensuite initier la traduction. 4E-BP1 phosphorylée ne pouvant pas se fixer à eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) permet la formation du complexe eIF4F qui est nécessaire à l'initiation de la traduction cap-dépendante. S6K1 permet une augmentation de synthèse des ARNm, des ribosomes ainsi que l'initiation de la traduction et l'élongation via de multiples intermédiaires. Le complexe mTORC augmente la synthèse protéique en activant la protéine TIF-1A (tripartite motif-containing protein-24) qui va se fixer à l'ARN polymérase I et

augmenter l'ARN ribosomal. Il inhibe également Maf1, un répresseur de l'ARN polymérase III qui induit l'ARN ribosomal 5S et la transcription des ARN de transfert (ARNt) (Laplante and Sabatini, 2012b).

Le complexe mTORC1 permet également la synthèse des lipides servant à la formation des membranes cellulaires via les facteurs de transcription SREBP1 et 2 (sterol regulatory element-binding protein1/2) qui contrôlent de nombreux gènes impliqués dans la synthèse des acides gras et du cholestérol. mTORC1 régule SREBP au moins par l'intermédiaire de S6K1 et de la lipin-1. Par ailleurs il active le PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), régulateur de l'adipogenèse (Laplante and Sabatini, 2012b).

L'activation du complexe mTORC1 va permettre d'augmenter le métabolisme cellulaire en augmentant la traduction de protéines impliquées dans la glycolyse via l'activation de HIF-1 α et en augmentant le métabolisme mitochondrial en s'associant au PPAR- γ coactivator 1 α (PGC1 α) et au facteur transcriptionnel Ying-Yang 1 (YY1) (Laplante and Sabatini, 2012b).

Enfin mTORC1 contrôle la croissance cellulaire en inhibant l'autophagie et la synthèse des lysosomes. Concernant l'autophagie, mTORC1 inhibe le complexe ULK1/Atg13/FIP200 (unc-51-like kinase 1/mammalian autophagy-related gene 13/focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa) qui permet l'initiation de l'autophagie, régule la protéine DAP1 (death-associated protein 1) qui est un inhibiteur de l'autophagie et pourrait également contrôler Atg18 (autophagy-related protein 18), un régulateur de la formation précoce des autophagosomes. Concernant l'inhibition de la synthèse des lysosomes, mTORC1 empêcherait l'entrée dans le noyau du facteur transcriptionnel EB (TFEB) qui régule des gènes impliqués dans l'autophagie et la formation des lysosomes (Laplante and Sabatini, 2012b).

c. LA VOIE DE L'AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE (AMPK)

Il a été décrit plus haut que l'AMPK régule la voie mTOR via les modifications du rapport AMP/ATP mais cette kinase active également d'autres voies de signalisation.

L'AMPK est un complexe hétérotrimérique comprenant une sous-unité α , β , et γ . AMPK peut fixer l'AMP ou l'ATP sur la sous-unité γ de façon antagoniste. La fixation de l'AMP, qui est un marqueur de basse énergie cellulaire, faciliterait la phosphorylation (l'activation) de l'AMPK par LKB1 (Hardie, 2011). AMPK pourrait également être un détecteur des stocks de glycogène (et donc d'énergie) grâce à un domaine pouvant lier le glycogène sur la sous-unité β (McBride and Hardie, 2009). La Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase kinase β (CaMKK β) est une autre kinase pouvant activer AMPK en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire qui peut témoigner d'un besoin d'énergie à venir (Hurley et al., 2005).

AMPK va être activée lors de l'ischémie-reperfusion (Kudo et al., 1995), l'hypoxie (Marsin et al., 2000) et la carence en glucose (Salt et al., 1998).

AMPK va inhiber la voie mTOR (voir chapitre « La voie mTOR ») mais va également permettre une recapture du glucose par les transporteurs Glut1 et Glut4 ainsi que la glycolyse par la formation du fructose-2,6-biphosphate. AMPK inactive aussi l'acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC)-1 impliquée dans la synthèse des acides gras, l'ACC-2 augmentant l'oxydation des acides gras, la β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA reductase impliquée dans la synthèse des stérols, la glycogen synthase et d'autres protéines ayant comme finalité la formation d'énergie dans un environnement carencé (Hardie, 2011). Enfin l'AMPK contrôle l'autophagie par l'intermédiaire de la voie mTOR ou p27 (He and Klionsky, 2009).

d. L'AUTOPHAGIE

L'autophagie est un phénomène adaptatif lors de conditions défavorables telles la carence en nutriments qui va permettre le recyclage de macromolécules. Des vésicules avec une double membrane, appelées autophagosomes, vont séquestrer des macromolécules ou des organelles endommagés voire des pathogènes. Ces autophagosomes vont ensuite fusionner avec des lysosomes et le contenu va ensuite être dégradé par des hydrolases acides afin que celui-ci soit recyclé (**Figure 11**) (He and Klionsky, 2009). Les processus d'autophagie à l'état de base sont très faibles. L'autophagie a des fonctions qui dépassent le stress carenciel car des dysfonctionnements

de ce processus vont avoir des répercussions en cancérologie, au cours des maladies neurodégénératives, maladies cardiovasculaires et infectieuses (Lum et al., 2005).

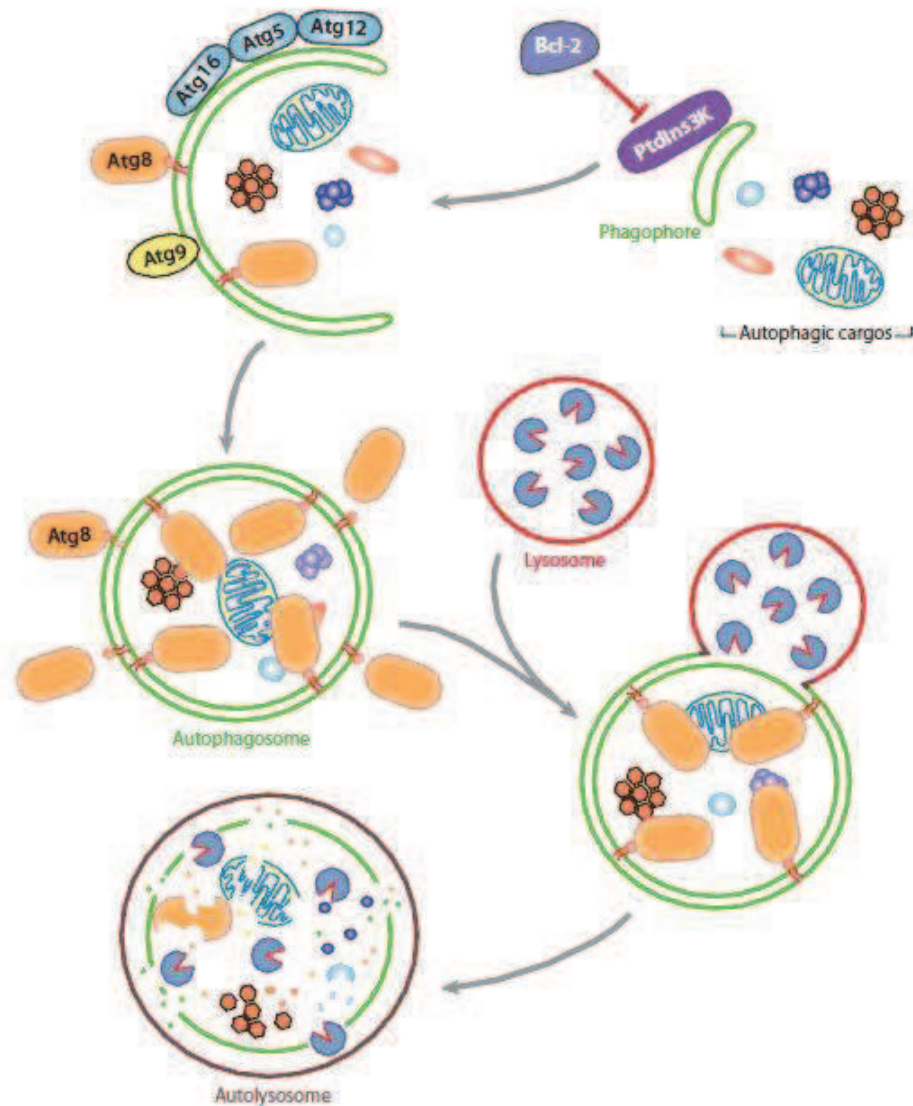


Figure 11 : Les différentes étapes de l'autophagie. Le phagophore va être formé par la formation d'un complexe de plusieurs protéines Atg. Celui-ci va former une vésicule, l'autophagosome qui va ensuite fusionner avec le lysosome pour former l'autolysosome et lyser les différents macromolécules et organelles. D'après He et Klionsky, 2009.

i. DESCRIPTION DE L'AUTOPHAGIE ET DE SES MOLECULES

L'autophagie se décompose en plusieurs étapes distinctes qui sont l'induction, la reconnaissance et la sélection du futur contenu, la formation des vésicules, la fusion de l'autophagosome avec le lysosome et la libération du contenu vésiculaire. Ces phénomènes impliquent principalement des protéines de la famille Atg.

L'induction va débuter lorsque ULK1 et ULK2 (Unc-51-like kinase) (équivalents d'Atg1 chez les mammifères) vont phosphoryler Atg13 et FIP200 dans le complexe ULK-Atg13-FIP200. Atg101, une nouvelle protéine, pourrait également être nécessaire à l'initiation de l'autophagie chez les mammifères (Mercer et al., 2009).

La protéine p62/sequestosome 1 va permettre la reconnaissance en se liant aux protéines ubiquitinylées via le domaine UBA (ubiquitin-associated) et la protéine LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) (Pankiv et al., 2007).

La formation du phagophore va s'effectuer chez les mammifères de façon aléatoire dans le cytosol et requiert le complexe PI3 kinase de classe III composé de Vps34 (vacuolar protein sorting 34), de p150, d'Atg14L ou Barkor et de Beclin1 qui va produire du PI3-phosphate. Barkor pourrait diriger le complexe PI3 kinase de classe III vers le phagophore pour initier le recrutement des différentes protéines Atg (Zhong et al., 2009). Atg12 et LC3 [Atg8] sont des protéines ubiquitin-like et subissent une conjugaison semblable à celle de l'ubiquitine. Atg12 va se conjuguer à Atg5 par l'intermédiaire d'Atg7 et Atg10 puis le complexe Atg12-Atg5 va se conjuguer à Atg16. Ceci va permettre la fixation du complexe de conjugaison Atg12-Atg5-Atg16 au phagophore. La protéine LC3 va se fixer au phosphatidylethanolamine après une interaction avec Atg4, Atg7 et Atg3 pour former le complexe LC3-PE (ou LC3-II) qui peut servir de marqueur de l'activité autophagique. Ces deux systèmes de conjugaison, Atg12-Atg5-Atg16 et LC3-PE, vont jouer un rôle important dans la régulation de l'extension et de la formation de l'autophagosome sans que les mécanismes soient encore bien compris (**Figure 11**). Par ailleurs l'origine des membranes n'est pas encore bien définie également mais pourrait provenir des autres organelles sans que le mécanisme soit bien compris. Atg9 semble avoir un rôle important et pourrait servir de transporteur entre le réseau *trans*-Golgi et les endosomes tardifs afin d'apporter les éléments nécessaires de l'autophagosome. Chez les mammifères les microtubules jouent un rôle car le nocodazole, un inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules, inhibe l'autophagie mais aussi les protéines HDAC6 (histone deacetylase 6) et la dynéine (He and Klionsky, 2009). VMP1 (vacuole membrane protein 1) est également nécessaire pour l'autophagie en interagissant avec Beclin1 et d'autres composants du complexe PI3K de classe III (Ropolo et al., 2007).

Lorsque l'autophagosome est formé, la forme lipidée de LC3 (LC3-II) qui est présente sur les deux faces de la membrane, va se détacher de la membrane externe et retourner dans le cytosol. La fusion avec le lysosome nécessite les protéines LAMP2 (lysosome-associated membrane protein-2) et Rab7. Après la fusion, la membrane va être dégradée et de multiples enzymes telles que les protéinases A et B, les cathepsines B, D et L vont dégrader le contenu de l'autophagolysosome afin que celui-ci soit recyclé (Tanida et al., 2005). Enfin, la libération dans le cytosol des acides aminés s'effectue par l'intermédiaire de la protéine Atg22 et de perméases vacuolaires qui vont servir de pompes à efflux des acides aminés (Yang and Klionsky, 2007).

ii. RÉGULATION

Les processus d'autophagie sont peu présents en l'absence de stress carenciel mais sont fortement induits lorsque celui-ci survient. La régulation est très complexe et fait intervenir de multiples voies de signalisation ayant parfois des effets contraires selon le type cellulaire ou l'élément initiateur, c'est-à-dire pouvant entraîner la survie ou la mort de la cellule.

L'une des principales voies de régulation est la voie mTOR. mTORC1 est activé de différentes manières par la présence d'acides aminés (voir chapitre « La voie mTOR ».). Il inhibe l'autophagie en inhibant l'activation d'Atg1 mais aussi en activant PP2A (serine/threonine protein phosphatase 2A), un inhibiteur de l'autophagie via Tap42 (Yorimitsu et al., 2009). Lors d'une carence en nutriment, Atg1 pourrait inhiber la protéine S6K qui est une protéine effectrice de mTORC1 (Lee et al., 2007). Vps34/PI3 kinase de classe III active à la fois mTOR et permet aussi l'assemblage des protéines Atg lors de la formation de l'autophagosome suggérant qu'il existe des sous-populations dans la cellule ayant des rôles différents (Juhász et al., 2008).

L'absence de facteurs de croissance tels que l'insuline et l'insulin-like growth factor (IGF) va activer l'autophagie indépendamment de la présence de nutriments. La fixation de l'insuline et de l'IGF sur leur récepteur va entraîner la phosphorylation de IRS 1 et 2 (insulin receptor substrate) permettant l'activation de la voie PI3 kinase de classe I/Akt. Akt permet la phosphorylation de la protéine TSC2 entraînant l'inhibition de la voie mTOR. L'absence de facteurs de croissance va donc inhiber la voie mTOR et activer

l'autophagie (He and Klionsky, 2009). Néanmoins il existe un effet opposé de la voie PI3 kinase de classe I/Akt puisqu'elle active les facteurs transcriptionnels FOXO (Forkhead box O) lors d'une carence en nutriments. Cela permettrait l'activation de l'autophagie en régulant l'activité de la glutamine synthetase qui empêche la translocation du complexe mTORC1 vers la membrane lysosomale (van der Vos et al., 2012). FOXO3 active également la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'autophagie (He and Klionsky, 2009).

Il existe une régulation dépendant de l'AMPK qui détecte la diminution d'énergie : AMPK contrôle l'autophagie par l'inhibition de la voie mTOR mais aussi, indépendamment de cette voie, par l'activation de p27^{kip1} (He and Klionsky, 2009). La proline dehydrogenase (oxidase) (PRODH/POX) est activée par l'AMPK dans des conditions hypoxiques et déclenche l'autophagie suite à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Liu and Phang, 2012).

Les protéines Rag vont également réguler l'autophagie en permettant la formation d'un compartiment spécifique nommé TASC (TOR-autophagy spatial coupling compartment) permettant l'activation concomitante de mTOR et de l'autophagie (Narita and Inoki, 2012).

Beclin1, qui est une protéine « Bcl-2-homology (BH)-3 domain only », est une protéine clé dans la régulation de l'autophagie. Les facteurs antiapoptotiques de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia 2) inhibent l'autophagie en se fixant à Beclin1. La protéine UVRAG (ultraviolet irradiation resistance-associated gene) va également interagir avec Beclin1 pour former un complexe excluant Atg14L permettant l'interaction avec Bif-1 (Bax-interacting factor 1) qui servirait à la déformation des membranes et avec les protéines Vps de classe C permettant la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. En revanche, Rubicon (RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin1-interacting), une protéine de découverte récente, va former un complexe avec UVRAG et Beclin1 et ainsi inhiber la maturation de l'autophagosome et inhibe l'autophagie (Kang et al., 2011).

La voie de signalisation Ras/PKA (cAMP-dependent protein kinase A) inhibe l'autophagie chez la levure lorsqu'elle est activée. Lors d'une carence en nutriments, Ras1 et Ras2 augmentent le pool de cAMP (cyclic AMP) qui va se lier et inhiber PKA. PKA inhiberait l'autophagie en inhibant plusieurs protéines dont Atg1. Ras, qui est activé

par les récepteurs de facteurs de croissance, va également inhiber l'autophagie par l'intermédiaire de la voie Ras-PI3 kinase de classe I mais va l'activer par la voie Ras-Raf-1-ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) car Raf-1 stimule l'autophagie lors de la carence en acides aminés (Pattingre et al., 2003).

L'autophagie peut également être la conséquence du stress du RE qui conduit à l'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE (voir chapitre « Le stress du RE »). BiP (immunoglobulin-binding protein) semble jouer un rôle important puisque de l'ARN interférence dirigée contre elle empêche la formation de l'autophagosome car il n'y a pas de séparation entre Beclin1 et PI3 kinase de classe III (Li et al., 2008). Les voies Ire1 (inositol-requiring protein 1) et Perk (double-stranded RNA-activated protein kinase RNA-like ER kinase) sont également impliquées puisque JNK (cJun NH₂-terminal kinase), qui est sous la dépendance de Ire1 et eIF2 α , joue un rôle dans la lipidation de LC3 (He and Klionsky, 2009). Il a également été montré dans notre laboratoire que la ciclosporine induit l'autophagie par l'intermédiaire du stress du RE afin d'augmenter la survie cellulaire, que la voie Perk serait impliquée puisque le salubrinal, un inhibiteur de la déphosphorylation de eIF2 α , diminue l'expression de LC3-II et que l'inhibition de Beclin1 par ARN interférence lors d'un traitement par ciclosporine augmente la mortalité cellulaire (Pallet et al., 2008b). D'autres travaux montrent au contraire que l'autophagie médiée par le stress du RE induit la mort cellulaire selon le type cellulaire et le stimulus (Ding et al., 2007; He and Klionsky, 2009).

L'hypoxie peut également induire l'autophagie par l'intermédiaire de HIF-1 α . HIF-1 α va activer BNip3 qui va entrer en compétition avec Beclin1 pour se lier à Bcl-2 permettant l'initiation de l'autophagie (Zhang et al., 2008). NIX, une autre protéine régulée par HIF-1 α va jouer un rôle dans la maturation des érythrocytes en permettant l'élimination des mitochondries par l'autophagie (Sandoval et al., 2008). Enfin l'hypoxie, en inhibant la voie mTOR et en activant le stress du RE, peut également activer l'autophagie par ces différents mécanismes (He and Klionsky, 2009).

e. LA VOIE DE LA KINASE GCN2 (GENERAL CONTROL NONREPPRESSED 2)

La kinase GCN2 est une serine/threonine protein kinase dont le seul substrat est la sérine 52 de eIF2 α . Elle est activée lors d'une carence en acides aminés car GCN2 contient une région régulatrice liée à l'histidyl-tRNA synthetase qui peut fixer de multiples ARNt non chargés en acide aminé et servir ainsi de détecteur de la carence en acides aminés dans la cellule (Dong et al., 2000).

Une fois activée, la kinase GCN2 va phosphoryler eIF2 α et permettre une diminution de la traduction globale ainsi qu'une synthèse spécifique de protéines chaperonnes telles que ATF4 (activating transcription factor 4) liée à la présence de cadres ouverts de lecture en 5' de l'ARNm puis active, entre autres, CHOP (CCAAT/enhance-binding protein (C/EBP) homologous protein) (Ma and Hendershot, 2004) (voir chapitre « Le stress du réticulum endoplasmique »), l'asparagine synthetase et IGFBP-1 (insulin-like growth factor-binding protein 1) (Jousse et al., 2004). GCN2 permet également la traduction de GCN4 dont la synthèse est également liée à la présence de 4 cadres ouverts de lecture en 5' et dont la fonction est la transcription de gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés (Hinnebusch, 2000).

f. LES MICRO-ARNS

Les micro-ARNS (miR) sont de petits ARNs simple brin non-codants d'environ 22 bases qui ont un rôle de régulateur post-transcriptionnel. En se fixant aux ARNm, ils inhibent leur traduction. On leur découvre un rôle croissant dans la régulation de multiples processus physiopathologiques. Plusieurs études montrent la variation d'expression ou l'implication de multiples micro-ARNS au cours des phénomènes d'ischémie ou d'ischémie-reperfusion.

Ainsi l'expression de miR-21 et miR-155 est augmentée dans le cortex rénal de rats et diminuée dans le sang et les urines après 30 minutes d'ischémie suivie d'une reperfusion (Saikumar et al., 2012). MiR-21 inhibe l'activation du ligand de Fas (apoptosis stimulating fragment) empêchant ainsi l'apoptose de cellules microgliales suite à une hypoxie (Zhang et al., 2012).

Certains micro-ARNS stimulent l'angiogenèse tandis que d'autres l'inhibent. MiR-130a inhibe deux gènes homeobox, GAX (growth arrest-specific homeobox) et HOXA5

(homeobox A5), ayant des actions antiangiogéniques dans les cellules endothéliales (Chen and Gorski, 2008). MiR-23 et mir-27 favorisent l'angiogenèse en réprimant les protéines sprouty2, semaphorin6A et 6D (Bang et al., 2012).

MiR-92a inhibe l'angiogenèse en régulant de façon négative les sous-unités $\alpha 5$ et αv des intégrines, S1P₁ (sphingosine-1-phosphate receptor 1), MKK4 (mitogen-activated kinase kinase 4) et eNOS (endothelial NO-synthase) (Bonauer et al., 2009). MiR-24 inhibe aussi l'angiogenèse en inhibant HO-1 et sirtuin-1 (Bang et al., 2012). MiR-15a inhibe également l'angiogenèse suite à une ischémie en se fixant au VEGF et au bFGF (basic fibroblast growth factor) et empêchant ainsi leur traduction (Yin et al., 2012).

C. LES PRINCIPALES REPONSES TISSULAIRES SUITE A L'ISCHEMIE

Les réponses adaptatives à l'ischémie vont à la fois entraîner une diminution de la consommation d'énergie en diminuant la synthèse protéique, l'activité des canaux ATP-dépendants mais aussi tendre à augmenter les apports avec une mise en place des mécanismes d'angiogenèse, de l'érythropoïèse, de l'autophagie permettant de recycler les protéines, et une augmentation de la synthèse de nouveaux transporteurs du glucose ou des acides aminés. Néanmoins certaines conséquences semblent néfastes comme l'activation de cytokines proinflammatoires, la transition épithélio-mésenchymateuse ou l'activation d'une réponse alloimmune engendrant *in fine* la fibrose.

Les conséquences biologiques de l'ischémie sont donc multiples et dépassent les processus qui vont être discutés ci-dessous et qui semblent pertinents pour les travaux réalisés au cours de cette thèse, à savoir, l'angiogenèse, la réponse inflammatoire, la réponse alloimmune, la fibrose et la mort cellulaire.

a. L'ANGIOGENESE

i. PHYSIOPATHOLOGIE

Le réseau vasculaire se crée initialement pendant l'embryogenèse. Des hémangioblastes, provenant des cellules du mésoderme, vont se différencier en angioblastes puis en cellules endothéliales afin de former un réseau de petits vaisseaux se nommant le plexus capillaire primaire : ce phénomène se nomme la vasculogenèse (Karamysheva, 2008). Après la formation de ce réseau primitif, celui-ci continue à s'étoffer par des mécanismes de bourgeonnement et de branchement de nouveaux vaisseaux, c'est l'étape d'angiogenèse. L'angiogenèse a principalement lieu au cours de l'embryogenèse et les cellules endothéliales chez l'adulte ne sont que peu renouvelées sauf pendant le cycle ovarien, les processus de réparation et les processus tumoraux. Les nouveaux vaisseaux vont alors être recouverts par les péricytes ou les cellules musculaires lisses empêchant ainsi les cellules endothéliales de proliférer : ce phénomène s'appelle l'artériogenèse et l'un des stimuli principaux est la force de cisaillement du sang dans le vaisseau (Carmeliet and Jain, 2011; Papetti and Herman, 2002). D'autres phénomènes d'angiogenèse vont permettre la formation de nouveaux vaisseaux : l'intussusception lorsqu'un vaisseau se divise en deux vaisseaux, la cooption qui permet à des cellules tumorales de proliférer à proximité d'un vaisseau déjà existant sans avoir recours à une angiogenèse importante et le mimétisme vasculaire lorsque des cellules tumorales vont remplacer des cellules endothéliales dans le vaisseau. Enfin des tumeurs agressives peu différenciées peuvent générer un endothélium d'origine tumorale (Carmeliet and Jain, 2011).

Sous l'action de signaux angiogéniques tels que le VEGF, le bFGF, les chémokines, libérés par une situation d'hypoxie, d'inflammation ou par des cellules tumorales, les péricytes vont se détacher du vaisseau, la membrane basale des cellules endothéliales et la matrice extracellulaire sont dégradées, les cellules perdent leurs jonctions et il existe une augmentation de la perméabilité capillaire permettant la formation d'une nouvelle matrice. Les cellules endothéliales vont migrer et proliférer dans cette matrice sous l'influence d'intégrines. Une seule cellule endothéliale (nommée « tip cell ») va diriger, sous l'influence de multiples médiateurs tels que les récepteurs du VEGF, les ligands de Notch, la migration des autres cellules qui, sous la dépendance de molécules comme Notch, le PlGF (placental growth factor) et les FGFs, vont se diviser afin d'allonger le tube et former la lumière du vaisseau. D'autres molécules comme le PDGF-B, l'angiopoïétine 1, le TGF β et Notch vont ensuite permettre le recouvrement des cellules endothéliales par les péricytes. Enfin une membrane basale autour des cellules

endothéliales et les jonctions entre elles sont rétablies afin de fournir un vaisseau fonctionnel (**Figure 12**) (Carmeliet and Jain, 2011).

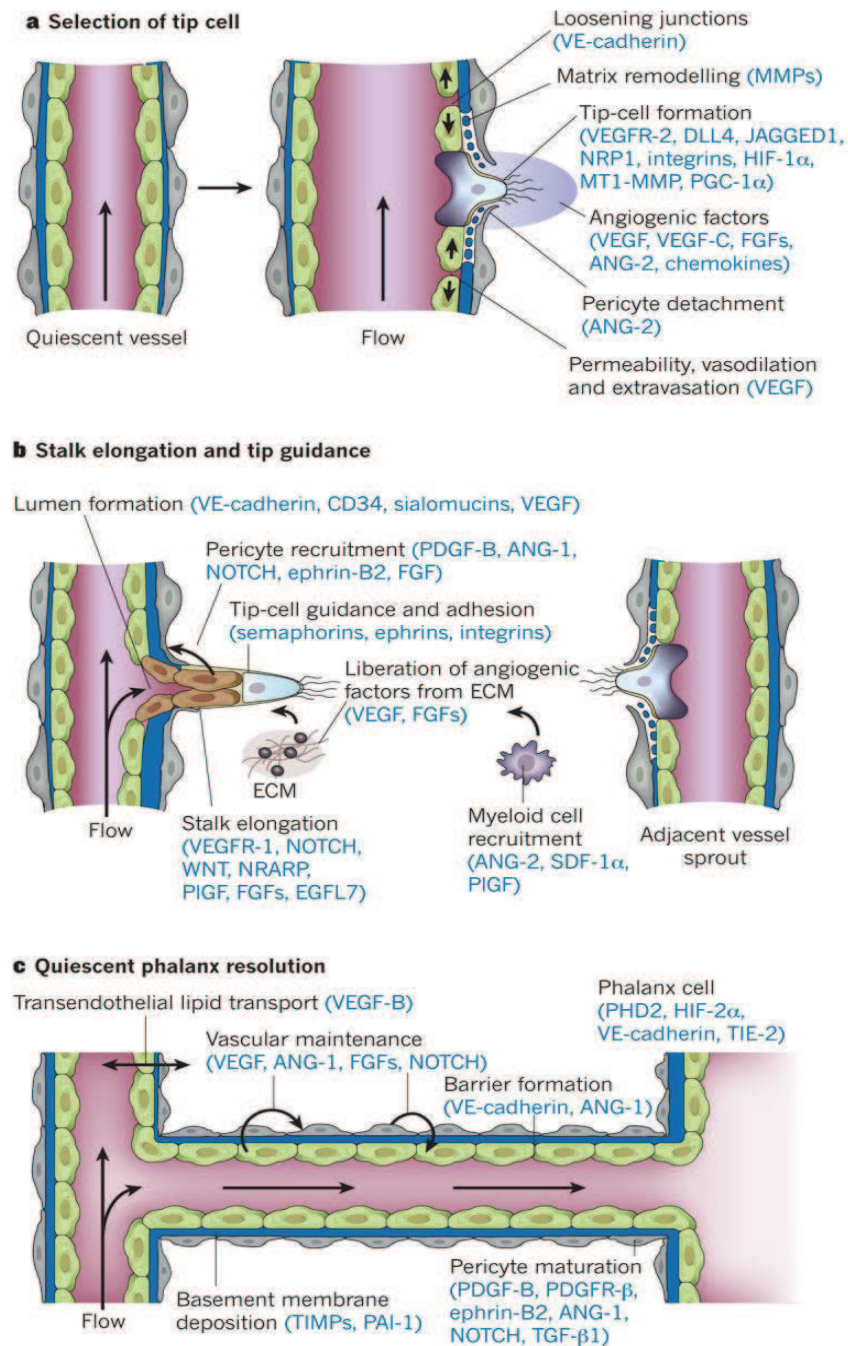


Figure 12 : Les mécanismes moléculaires de la formation d'un vaisseau. a : sélection de la « tip cell » ; b : les étapes d'élongation ; c : les étapes de stabilisation. D'après Carmeliet et Jain, 2011.

ii. LES PRINCIPAUX FACTEURS ANGIOGÉNIQUES

1. La famille des VEGFs

Le VEGF (ou VEGF-A) a été découvert en 1971 comme un agent responsable de l'angiogenèse tumorale initialement appelé TAF (tumor angiogenesis factor) (Folkman et al., 1971) puis comme un facteur d'hyperperméabilité (Senger et al., 1983) en 1983, et enfin comme un facteur de croissance (Ferrara and Henzel, 1989) et angiogénique (Plouet et al., 1989) en 1989. Le VEGF est le principal composant de la famille des VEGFs qui sont des glycoprotéines homodimériques. Il possède plusieurs isoformes. Les autres membres de la famille sont le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, le PlGF (Papetti and Herman, 2002), le VEGF-E (exprimé par le virus Orf) (Wise et al., 2012) et le VEGF-F (dans le venin de serpent) (Yamazaki et al., 2009). Le VEGF va activer l'angiogenèse en se fixant sur le VEGF receptor 2 (VEGFR-2). Les neuropilines 1 et 2 sont des protéines qui vont principalement jouer le rôle de corécepteurs et permettre une augmentation de l'activité du VEGFR-2 mais le VEGF va également pouvoir se fixer sur les neuropilines indépendamment du VEGFR-2 (Neufeld and Kessler, 2008). Le VEGF se fixe aussi au VEGFR-1 mais celui semble plutôt limiter l'angiogenèse en empêchant le VEGF de se fixer au VEGFR-2 et permettrait plutôt un remodelage des vaisseaux.

Les différents rôles du VEGF sont une augmentation de la perméabilité des vaisseaux, de protéases permettant de remodeler la matrice extracellulaire ; il permet la prolifération des cellules endothéliales, leur migration et empêche leur apoptose (Papetti and Herman, 2002). Par ailleurs le VEGF est également un facteur pro-inflammatoire et pourrait avoir un rôle délétère et profibrosant (Mayer, 2011).

2. La famille des FGFs

Le bFGF fut caractérisé en 1984 (Shing et al., 1984). Il existe 18 FGFs chez les mammifères (FGF1 – FGF10 et FGF16 – FGF23) divisés en 6 sous-familles selon leurs homologies de séquence. Les FGFs ont des rôles pléiotropes. Ils régulent de nombreux processus au cours de l'embryogenèse tels que le développement des vaisseaux, du cœur, du cerveau, du squelette, des muscles, des membres et des organes génitaux. Chez l'adulte, ils ont un rôle dans la cicatrisation, la régulation des acides biliaires, de la

vitamine D, l'homéostasie du phosphore et la cancérogenèse (Beenken and Mohammadi, 2009).

La sous-famille du FGF1 comprend l'acide FGF (aFGF ou FGF1) et le bFGF (FGF2). Parmi les FGFs, ce sont ces deux molécules qui jouent le rôle le plus important au cours de l'angiogenèse. Ces deux protéines n'ont pas de séquence signal pour leur excrétion ce qui leur impose une excrétion non conventionnelle indépendamment de la voie de sécrétion dépendant du RE et de l'appareil de Golgi. Le bFGF se lie au phosphatidylinositol(4,5)biphosphate permettant le recrutement du bFGF au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique. Ensuite le bFGF pourrait traverser la membrane par des transporteurs ABC ou classiques. Néanmoins il a été évoqué plus récemment que le phosphatidylinositol(4,5)biphosphate pourrait induire une dimérisation voire une oligomérisation de bFGF dans le cytoplasme permettant une pénétration dans la membrane dans un état de conformation correcte. Les protéoglycanes héparanes sulfates semblent également jouer un rôle important dans la sécrétion du bFGF (**Figure 13**) (Nickel, 2011).

A l'extérieur de la cellule, les FGFs se fixent sur les FGF receptors des cellules endothéliales afin de les activer directement, ou, indirectement, en se fixant sur d'autres types cellulaires et induisant l'excrétion d'autres facteurs angiogéniques tels que hedgehog, l'angiopoïétine 2 et le VEGF-B, (Carmeliet and Jain, 2011). bFGF stimule la migration et la prolifération des cellules endothéliales, a des effets antiapoptotiques, permet la prolifération des fibroblastes et des cellules musculaires lisses. Il joue également un rôle dans l'inflammation (Beenken and Mohammadi, 2009).

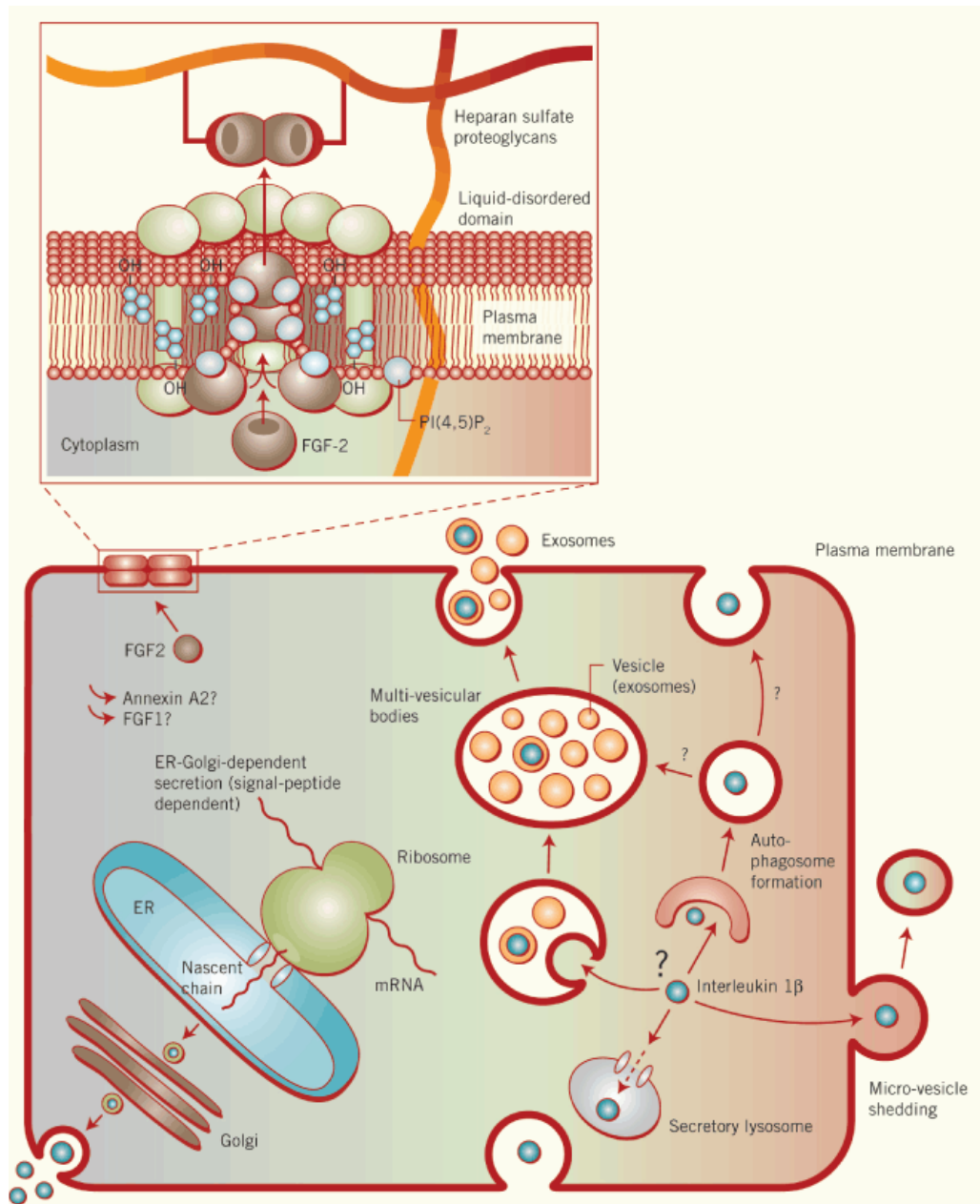


Figure 13 : Sécrétion non conventionnelle du bFGF. La sécrétion du bFGF impliquerait le phosphatidylinositol(4,5)biphosphate et les héparanes sulfates. D’après Nickel, 2011.

3. La famille des PDGFs

Le PDGF a été découvert en 1974 (Kohler and Lipton, 1974; Ross et al., 1974) : c’était un facteur de croissance sécrété par les plaquettes. La famille des PDGF comporte 4 isoformes (A, B, C et D). Ce sont des polypeptides homo- ou hétérodimériques. Les formes homodimériques sont dominantes (Andrae et al., 2008). Les PDGF-A et B sont

secrétés par de nombreux types cellulaires (Raines, 2000) et les différents PDGFs sont exprimés dans le parenchyme rénal par différents types cellulaires (Floege et al., 2008) : le PDGF-B est notamment sécrété par les cellules tubulaires rénales humaines (Frank et al., 1993). Le PDGF-AA va aller se fixer sur le PDGF receptor α (PDGFR- α) et le PDGF-BB sur le PDGFR- β .

Par son action au cours de l'angiogenèse, le PDGF-B va permettre le recrutement des péricytes autour des cellules endothéliales empêchant ainsi la fragilité et la tortuosité des vaisseaux, la formation de microanévrismes (Carmeliet and Jain, 2011). Les PDGFs jouent d'autres rôles au cours de l'organogenèse, dans le développement du système nerveux central, du squelette et des dents (Andrae et al., 2008).

4. L'angiogénine

L'angiogénine fait partie de la superfamille des ribonucléases (RNases) spécifiques des vertébrés. L'angiogénine ou RNase 5 est une protéine soluble de 14 kDa. L'une des principales actions de l'angiogénine est une activité angiogénique qui n'est pas présente pour les autres membres de la superfamille, due à l'absence d'un quatrième pont disulfure. Pour activer l'angiogenèse, l'angiogénine se fixe probablement à la cellule endothéliale tout en lui permettant une liaison avec son substrat. Son action semble ensuite liée à son endocytose via un récepteur membranaire puis à l'activation de différents signaux et à sa translocation dans le noyau. Par ailleurs elle peut également se lier à l'actine entraînant des cascades protéolytiques ou se lier à l' α -actinine-2, une protéine permettant les croisements de fibres d'actine. Ceci va permettre l'activation de la voie c-Jun N-terminal kinase. Toutes ces cascades contribuent donc à la prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses pour la formation de nouveaux vaisseaux (Tello-Montoliu et al., 2006).

L'angiogénine est un constituant normal de la circulation et du contenu vasculaire. Elle est régulée naturellement au cours du développement, son taux est plus élevé chez l'adulte que chez le nouveau-né par exemple (Pavlov and Badet, 2001).

L'angiogénine contribue à l'angiogenèse durant la grossesse, les cancers, pourrait jouer un rôle dans l'artériopathie, certaines maladies inflammatoires, l'obésité, la sclérose latérale amyotrophique et aurait une activité antimicrobienne et

immunomodulatrice (Tello-Montoliu et al., 2006). Il a été montré que l'angiogénine peut être sécrétée par les cellules tubulaires rénales en condition hypoxique (Nakamura et al., 2006).

Au-delà de ses fonctions angiogéniques, l'angiogénine possède également une activité ribonucléasique. En 2008, il a été décrit que l'angiogénine peut cliver des ARNt au niveau de la boucle anticodon dans des conditions de stress en « tRNA-derived stress-induced small RNAs » (tiRNAs) dans des cellules de mammifères (Yamasaki and Anderson, 2008). Ces tiRNAs induits par l'angiogénine inhibent la traduction globale des protéines. Seuls quelques-uns des tiRNAs ayant l'extrémité 5' sont actifs comme 5'-tiRNA^{Ala} et 5'-tiRNA^{Cys} qui contiennent un motif oligo-G en 5' tandis que les tiRNAs ayant l'extrémité 3' ne sont jamais actifs. Ce motif empêche la liaison entre eIF4G/A et les ARNm non capés ou entre eIF4E/G/A et les ARNm capés avec m⁷G et permet ainsi l'inhibition de la traduction (Ivanov et al., 2011). Néanmoins la traduction médiée par les IRES (internal ribosome entry site), qui est souvent impliqué dans les processus de survie et anti-apoptotiques, est préservée et permet ainsi la traduction de nombreux gènes dont HIF-1 α , VEGF, bFGF (Li and Hu, 2012).

5. Les angiopoïétines

Les angiopoïétines (ANGPT) humaines sont au nombre de trois, ANGPT 1, 2 et 4, et leurs récepteurs au nombre de deux, TIE1 (Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1) et TIE2. Les récepteurs furent découverts avant leurs ligands. Pour activer TIE2, ANGPT1 doit être présente sous forme tétramérique ou plus complexe grâce au domaine SCD (super-clustering domain) en N-terminal. ANGPT1 permet la survie et la prolifération des cellules endothéliales et la maturation des vaisseaux jouant ainsi un rôle complémentaire avec le VEGF (Fagian and Christofori, 2012). ANGPT2 qui est sécrétée par les cellules endothéliales bourgeonnantes et « tip cell », semble jouer le rôle d'antagoniste compétitif d'ANGPT1 sur TIE2 afin de permettre la dissociation des péricytes, d'augmenter la perméabilité capillaire et de permettre le bourgeonnement des cellules endothéliales (Carmeliet and Jain, 2011).

6. La superfamille du TGF β

La superfamille du TGF β joue de multiples rôles. Le TGF β peut être un des médiateurs de la néphropathie chronique d'allogreffe liée aux inhibiteurs de la calcineurine (voir chapitre « Le TGF β »). Le TGF β joue également un rôle dans l'angiogenèse. Ceci a été découvert en étudiant une maladie qui se nomme la télangiectasie hémorragique héréditaire (incidence : 1 sur 5000 personnes) où il existe une mutation sur l'un des récepteurs du TGF β , ALK-1 (activin receptor-like kinase 1) ou l'endogline, un corécepteur. Des mutations de ces récepteurs provoquent des malformations artérioveineuses. (Mahmoud et al., 2011). Néanmoins le mécanisme n'est pas bien compris puisque le TGF β 1, sur des cellules endothéliales, active préférentiellement le TGF β receptor 1 (TGFBR1) qui active les SMAD2/3 entraînant une quiescence des cellules endothéliales tandis qu'il peut activer aussi ALK-1 qui va activer les SMAD1/5/8 conduisant à la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse. Par ailleurs le recrutement de l'endogline par le complexe TGFBR2-ALK-1-TGFBR1 va activer les SMAD1/5/8 et indirectement inhiber les SMAD2/3. BMP9 (bone morphogenetic protein 9), un autre membre de la superfamille du TGF β , peut également se lier à ALK-1 et induire un effet opposé au TGF β . Il peut inhiber la prolifération cellulaire et l'angiogenèse et induire la quiescence cellulaire. En revanche il peut agir de façon synergique avec le TGF β pour sensibiliser la cellule endothéliale au VEGF (Mahmoud et al., 2011).

b. L'INFLAMMATION

L'inflammation est un processus obligatoire dans les suites de lésions d'ischémie-reperfusion. Elle va à la fois entraîner des phénomènes tardifs de fibrose mais est aussi nécessaire pour l'artériogenèse puisque des souris déficientes pour le gène TNF α ont une artériogenèse retardée et que les anti-inflammatoires tels que l'aspirine ralentissent l'artériogenèse (Schirmer et al., 2009).

L'ischémie cardiaque va engendrer à la phase initiale un stress oxydatif dû au dysfonctionnement de la mitochondrie, au découplage de la NO synthase endothéliale, aux cytochromes p450, à la xanthine oxydase et aux polynucléaires neutrophiles (**Figure 14**). Le stress oxydatif et les troubles ioniques vont entraîner la formation de microembolies, des lésions endothéliales, l'activation des plaquettes, le recrutement de

polynucléaires neutrophiles pouvant conduire à une ischémie dans les capillaires adjacents à la zone ischémique. Ce phénomène s'appelle le phénomène de no-reflow (Marchant et al., 2012). Ceci va entraîner une libération de nombreuses cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-17 et IL-18...) à la fois par les cardiomyocytes alentour mais aussi par les leucocytes infiltrant le tissu ischémié. Des chémokines telles que SDF1 et MCP-1 vont aussi être libérées par les cardiomyocytes permettant le recrutement de cellules comme les monocytes (Coggins and Rosenzweig, 2012). C'est aussi le cas pour des facteurs de croissance (VEGF, bFGF, PDGF...) (Schirmer et al., 2009). HIF-1 α va également jouer un rôle dans l'expression de molécules inflammatoires (Kimura et al., 2008a).

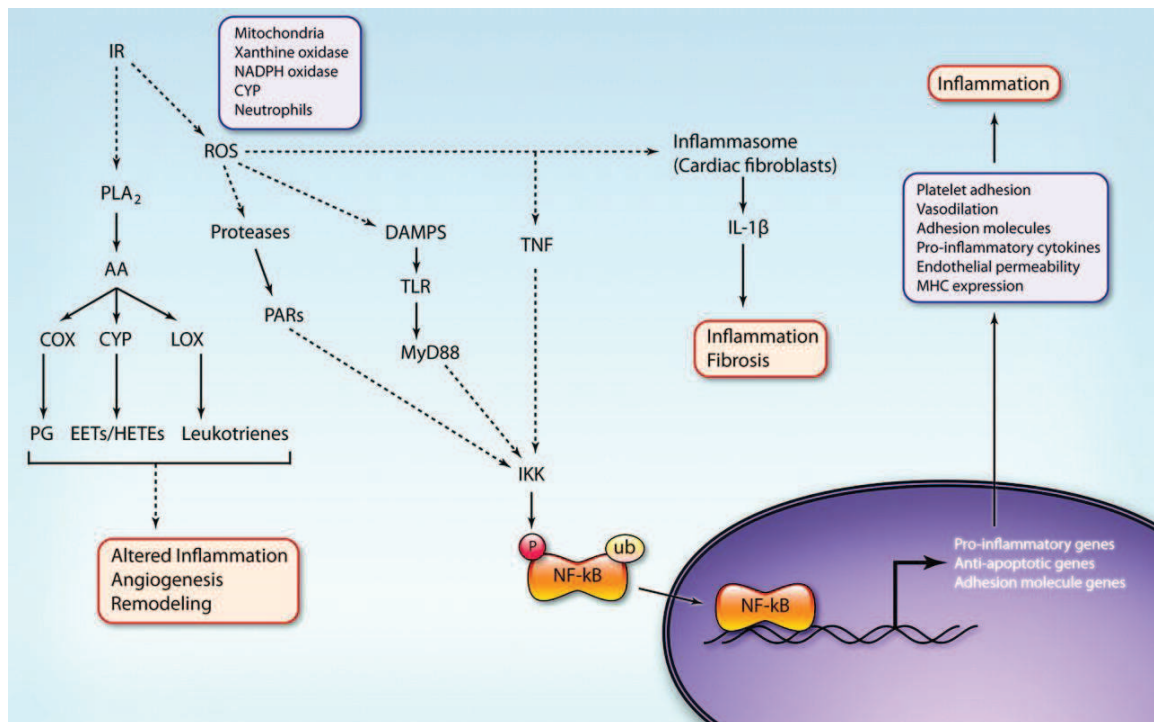


Figure 14 : L'ischémie-reperfusion induit l'inflammation. L'ischémie-reperfusion induit l'inflammation par l'intermédiaire de l'acide arachidonique (AA), les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les DAMPs, le TNF et l'inflammasome et active la voie NF- κ B. D'après Marchant *et al.*, 2012.

L'activation et le recrutement des neutrophiles et des leucocytes vont augmenter la sécrétion de cytokines, le stress oxydatif, activer le complément exacerbant d'autant plus les lésions tissulaires. En effet, cette réponse inflammatoire engendre jusqu'à 50% de la

taille finale de l'infarctus (Yellon and Hausenloy, 2007). Les mastocytes jouent également un rôle en libérant des cytokines et des protéases (Marchant et al., 2012).

Les cellules de l'immunité innée jouent un rôle important car elles vont servir de détecteurs du danger. En effet, les cellules endommagées ou stressées peuvent libérer des DAMPs qui peuvent être des cellules nécrotiques ou lésées, des produits de dégradation de la matrice extracellulaire, des protéines oxydées... Ces DAMPs vont être reconnus par des récepteurs transmembranaires, les TLRs, qui ne reconnaissent pas que des molécules pathogènes de microorganismes comme on le pensait précédemment (Mann, 2011; Matzinger, 1994). Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I comprenant un motif extracellulaire de répétition riche en leucine et un motif intracellulaire ressemblant à l'IL-1 dont l'expression est ubiquitaire. Les TLRs (sauf TLR3) interagissent avec la protéine MyD88 (myeloid differentiation factor 88) pour induire le signal. MyD88 va permettre le recrutement de IRAK4 (interleukin-1 receptor associated kinase 4), IRAK1 et IRAK2 permettant alors la venue de TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6). IRAK1 et TRAF6 vont se lier entre autres à TAK1 (TGF activated kinase). TAK1 est ensuite activée et va permettre la phosphorylation de IKK α /IKK β /IKK γ (I κ B kinase). Ce complexe va permettre la phosphorylation d'I κ B entraînant sa dégradation. En l'absence de stimuli inflammatoires I κ B est lié à NF- κ B empêchant sa translocation dans le noyau. La dégradation d'I κ B va donc permettre l'activation de NF- κ B (**Figure 14**). TAK1 va également phosphoryler MKK6 (mitogen-activated protein kinase kinase 6) qui, elle-même, phosphoryle JNK et active AP1 (activator protein 1) (Mann, 2011).

L'ischémie-reperfusion va également permettre la libération d'acide arachidonique par l'intermédiaire de la phospholipase A₂. L'acide arachidonique est le précurseur de nombreuses molécules proinflammatoires telles que les leukotriènes, les prostaglandines (**Figure 14**) (Marchant et al., 2012).

Les PARs (protease-activated receptors) interviennent également au cours des processus d'ischémie-reperfusion cardiaque. Ils sont actuellement au nombre de quatre. PAR-1 induit une hypertrophie cardiaque, entraîne la prolifération des fibroblastes et l'activation du récepteur de l'EGF (epidermal growth factor). L'inhibition de PAR1 par un antagoniste va permettre une réduction de la taille de l'infarctus. PAR-2 est activé après un phénomène d'ischémie-reperfusion et induit une réponse inflammatoire en

activant les neutrophiles et la dégranulation des mastocytes. Des souris déficientes pour PAR-2 présentent une expression moindre de cytokines et chémokines proinflammatoires (**Figure 14**) (Antoniak et al., 2011).

Les NLRs (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors) sont des capteurs intracellulaires qui peuvent former des complexes multiprotéiques qui se nomment des inflammasomes. Ils sont capables d'activer la caspase 1 (Chen and Pedra, 2010). Il a été montré que les inflammasomes sont formés à la suite de l'ischémie-reperfusion dans les fibroblastes cardiaques mais pas dans les cardiomyocytes et qu'ils induisent la production d'IL-1 β , TNF- α , interféron γ , MCP-1, IL-6 et IL-10. Chez les souris déficientes pour ASC (apoptosis-associated speck-like adaptator protein and caspase 1), qui est un des composants de l'inflammasome, la réponse inflammatoire et la taille de l'infarctus et de la fibrose sont moins importantes après des lésions d'ischémie-reperfusion (**Figure 14**) (Kawaguchi et al., 2011).

Les phénomènes inflammatoires existent également dans les situations d'ischémie-reperfusion liée à la transplantation d'organe (Daemen et al., 2002; Marchant et al., 2012; Zhai et al., 2011) ou au cours des ischémies cérébrales (Macrez et al., 2011).

c. LA REPOSE ALLOIMMUNE

L'immunité adaptative (lymphocytes T et B) est impliquée dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion puisque la greffe cardiaque chez des souris dépourvues de lymphocytes entraîne une réaction inflammatoire moins importante à la phase tardive par rapport aux souris contrôles (Christopher et al., 2002). Des phénomènes identiques ont été montrés dans des modèles d'ischémie cérébrale chez les souris dépourvues de lymphocytes T : elles présentent des volumes infarcis moins importants que chez les souris contrôles. Les lymphocytes T helpers ou cytotoxiques semblent tous les deux impliqués dans le développement des lésions cérébrales (Brait et al., 2012).

L'ischémie-reperfusion par la libération de DAMPs va permettre aux macrophages et aux cellules dendritiques d'activer leur TLR4 et va permettre la maturation des cellules dendritiques qui vont alors pouvoir présenter l'antigène et migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (Thaunat, 2011). Le statut du greffon joue un rôle dans le type

de rejet puisque des greffons cardiaques nouvellement transplantés présentent un rejet aigu chez des souris ayant un système immunitaire effectif alors que les greffons chez des souris n'ayant pas de système immunitaire au moment de la greffe mais réintroduit plus tard présentent secondairement des lésions de rejet chronique et non de rejet aigu. L'une des explications pourrait être l'envahissement progressif du greffon par des cellules endothéliales de l'hôte diminuant ainsi la présentation des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Chalasanani et al., 2004). Dans une autre étude, la greffe rénale entraîne après 10 semaines l'invasion de cellules CD11b/c⁺ du receveur dont des cellules dendritiques CD103⁺ excréant du TNF α et permettant ainsi l'infiltration ultérieure par les lymphocytes CD4 (Ozaki et al., 2012).

Par ailleurs l'activation du complément peut également initier la destruction des allogreffes et l'inflammation. La mort cérébrale peut activer le facteur C3a du complément qui se dépose dans le cœur du donneur. Des cœurs de souris déficientes pour la protéine C3 du complément présentent en effet moins de lésions, d'infiltration par des cellules inflammatoires et d'expression de cytokines inflammatoires (Atkinson et al., 2009).

La présence de fragments activés du complément peut moduler les capacités des macrophages et des cellules dendritiques pour éliminer les cellules apoptotiques mais aussi faciliter les réponses des lymphocytes B et T. Le complément peut également moduler la production d'anticorps des lymphocytes B (Marchant et al., 2012).

d. LA FIBROSE

La fibrose est l'augmentation de composants de la matrice extracellulaire remplaçant le parenchyme fonctionnel d'un tissu, d'un organe. Elle conduit à une diminution de l'activité fonctionnelle de celui-ci. La fibrose fait souvent suite à des processus inflammatoires et immunitaires.

La plupart des cellules immunitaires qui jouent un rôle dans l'inflammation sont également actives pour induire la fibrose. De nombreuses études avec des techniques d'inactivation de gènes ont permis de mettre en évidence que les lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺, les macrophages et les cellules dendritiques participent à l'initiation de la fibrose

et que l'inhibition de la voie NF- κ B permet également une amélioration de la fibrose. L'une des actions de NF- κ B est de bloquer la dégradation du facteur transcriptionnel Snail1 qui est impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse, la migration des fibroblastes et la fibrose rénale (Liu, 2011).

Les cytokines et les chémokines jouent un rôle central dans la transmission du signal qui semble en grande partie médiée de façon paracrine puisque les foyers de fibrose dans le rein sont souvent en périphérie de vaisseaux sanguins où l'activation des cellules endothéliales peut créer un microenvironnement inflammatoire propice. Les chémokines vont permettre le recrutement de leucocytes libérant des facteurs profibrosants, de précurseurs circulants de fibroblastes et de fibroblastes déjà présents *in situ* et vont pouvoir moduler l'angiogenèse (Dobaczewski and Frangogiannis, 2009). La sécrétion de TGF- β , bFGF, PDGF, CTGF (connective tissue growth factor) et de tissue-type plasminogen activator va entraîner la prolifération et l'activation des fibroblastes.

Une fois activées, de nombreuses cellules vont produire de la matrice extracellulaire : on peut citer en premier lieu les fibroblastes, les cellules musculaires lisses mais aussi les cellules tubulaires rénales, certains macrophages. Le fibroblaste activé sécrète de grandes quantités de matrice extracellulaire et se nomme le myofibroblaste : il continue d'exprimer le marqueur FSP1, le récepteur β du PDGF ; des fibres d' α SMA, la vimentine et la nestine apparaissent. Il peut provenir d'origines multiples : fibroblastes interstitiels, différenciation des péricytes, conversion phénotypique de cellules épithéliales et endothéliales et fibrocytes circulants (**Figure 15**) (Liu, 2011).

Il a été découvert depuis peu que le péricyte, une cellule de soutien des vaisseaux (artériogénèse), joue un rôle dans la fibrogenèse et la raréfaction capillaire. Sous certaines conditions le péricyte qui peut sécréter du collagène 1 α 1 va se transformer en myofibroblaste, se détacher de la cellule endothéliale pour aller migrer dans l'espace interstitiel et induire la production de collagène. Un travail de Lin *et al.* a montré que les péricytes semblent être la source majeure des myofibroblastes dans un modèle de fibrose rénale (Lin et al., 2008). Les transitions épithélio- ou endothélio-mésenchymateuse (TendM) pourraient également apporter un contingent de myofibroblastes (Iwano et al., 2002; Zeisberg et al., 2008). HIF-1 jouerait un rôle dans la formation de la fibrose en induisant la TEM (Higgins et al., 2007). Néanmoins certains auteurs ne retrouvent pas de

myofibroblastes ayant une origine épithéliale *in vivo* (Humphreys et al., 2010; Koesters et al., 2010).

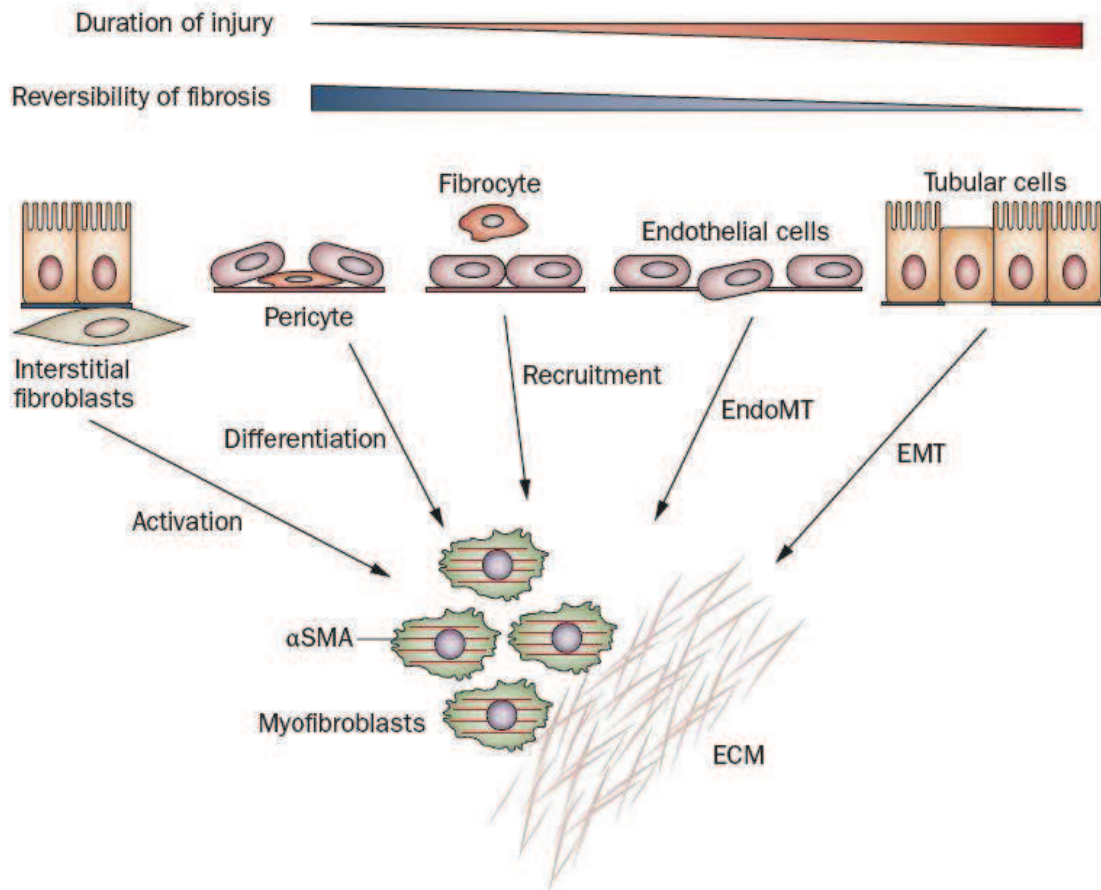


Figure 15 : L'origine multiple des myofibroblastes. D'après Liu, 2011.

Le fibroblaste activé va ensuite avoir de multiples contacts avec la matrice extracellulaire environnante par l'intermédiaire des intégrines. Celles-ci transmettent les signaux extérieurs en activant de multiples kinases dont ILK (integrin-linked kinase) qui va permettre la stabilisation de Snail1 et de la β -caténine stimulant la synthèse de fibronectine. Celle-ci va permettre la formation d'un maillage pour le futur dépôt des fibres de collagène et la synthèse de protéines de la matrice comme SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), le collagène IV, la thrombospondine, les protéoglycanes héparanes sulfates... (Liu, 2011)

Deux autres conséquences des processus conduisant à la fibrogenèse rénale sont l'atrophie tubulaire et la raréfaction des capillaires. NF- κ B est activé dans l'épithélium tubulaire lors d'un stress engendrant une réponse inflammatoire périrubulaire qui pourrait favoriser la TEM. Le stress du RE ou l'autophagie trop soutenues pourraient induire l'apoptose et diminuer également le contingent de cellules tubulaires (Liu, 2011; Pallet et al., 2008a). La raréfaction capillaire pourrait être due au phénomène de transition endothélio-mésenchymateuse (Zeisberg et al., 2008) mais le détachement du péricyte de la cellule endothéliale, détruisant la structure du capillaire pourrait également être une autre explication (Schrimpf and Duffield, 2011).

Actuellement limiter la progression ou réduire la fibrose font l'objet de nombreuses études. Plusieurs études montrent l'intérêt des inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone (inhibiteurs de l'enzyme de conversion et antagonistes du récepteur de l'angiotensine II de type 1) dans le ralentissement de la progression de la fibrose notamment au cours de la fibrose rénale (Naesens et al., 2009), hépatique (Yoshiji et al., 2007) ou cardiaque (Kawasaki et al., 2007).

L'administration de cellules stromales mésenchymateuses pourrait être intéressante car ces cellules peuvent migrer vers les tissus lésés et augmenter les processus de réparation par la sécrétion paracrine de nombreux facteurs augmentant l'angiogenèse, la mitogenèse et inhibant l'apoptose, l'inflammation et la fibrose plutôt que par un remplacement des cellules lésées (de Vries et al., 2012). Une étude récente chez le rat a montré que le conditionnement ischémique après 45 minutes d'ischémie suivies de reperfusion entraîne de moindres lésions de fibrose, une moindre augmentation de l'actine α de muscle lisse, de TGF β et de phospho-SMAD par rapport au groupe sans conditionnement (Weng et al., 2012). Plusieurs études ont montré l'intérêt d'un traitement par érythropoïétine afin de diminuer le remodelage et la fibrose cardiaque en diminuant les voies de l'inflammation et en augmentant l'angiogenèse (Lu et al., 2012; Nishiya et al., 2006). Enfin la correction de l'anémie par l'érythropoïétine diminue la néphropathie chronique d'allogreffe (Choukroun et al., 2012).

e. LA MORT CELLULAIRE

La mort cellulaire est un processus fréquent au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion d'une part lors d'une ischémie prolongée et d'autre part lors de la reperfusion. Les mécanismes de mort cellulaire sont la nécrose, l'apoptose et la mort cellulaire liée à l'autophagie. Nous n'aborderons ici que les mécanismes de nécrose et d'apoptose.

i. LA NECROSE

La nécrose se caractérise par un gonflement de la cellule et de ses organelles et des lésions de la membrane externe. Lors de l'ischémie, la glycolyse anaérobie va entraîner l'accumulation d'ions H^+ et une acidose. Les pompes ioniques échangent l'ion Na^+ pour éliminer l'ion H^+ . L'échangeur Na^+/Ca^{2+} en éliminant l'ion Na^+ va entraîner une accumulation de calcium cytoplasmique. Le calcium va être transporté dans la mitochondrie et va induire la formation d'espèces réactives de l'oxygène et diminuer le potentiel membranaire de la mitochondrie conduisant à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale. Ceci va entraîner des flux d'eau entraînant le gonflement de la mitochondrie. Lors de la reperfusion, l'oxygène et l'ATP à nouveau présents vont permettre le rétablissement du potentiel membranaire et augmenter le contenu en calcium qui va induire une ouverture prolongée du pore de transition de perméabilité mitochondriale (**Figure 16**). Le calcium peut également activer les calpaïnes qui sont des protéases différentes des caspases. Ceci va entraîner la perte d'intégrité de la mitochondrie et de la cellule.

Par ailleurs l'activation de récepteurs de mort tels que le récepteur du $TNF\alpha$ peut conduire à l'activation de RIP (receptor-interacting protein) et augmenter les espèces réactives de l'oxygène indépendamment de l'ischémie (Chiong et al., 2011).

La perte d'intégrité et la libération du contenu cellulaire suite à la nécrose vont déclencher une réponse inflammatoire (voir chapitre « L'inflammation »).

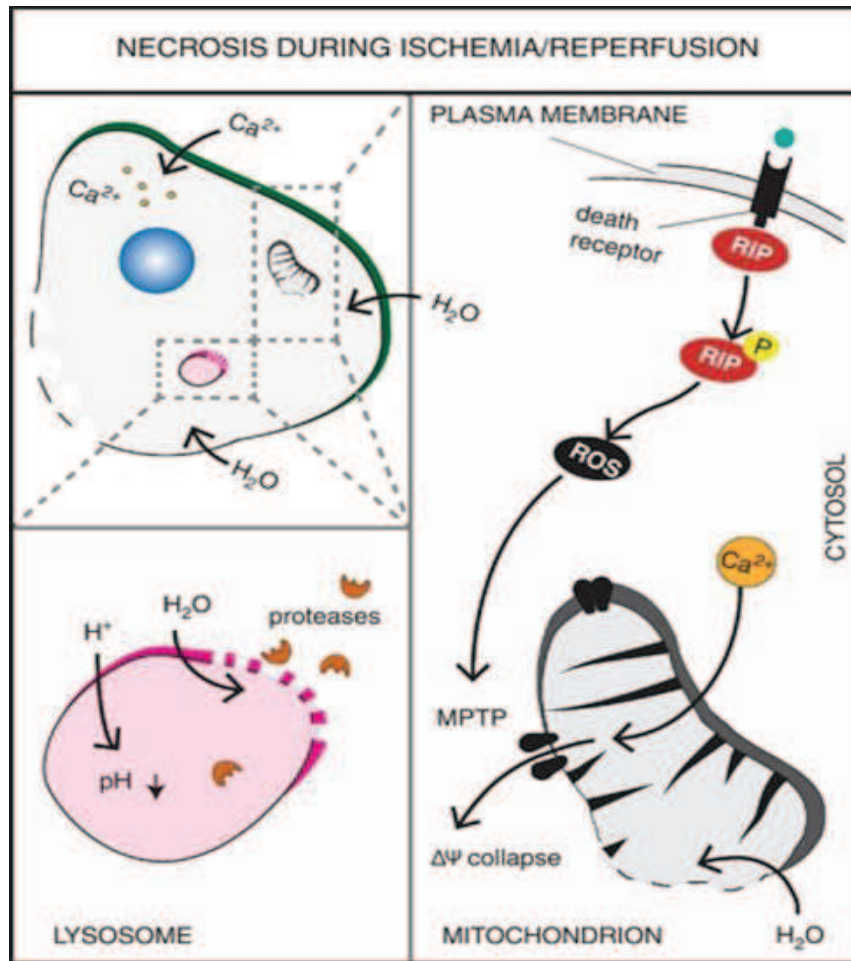


Figure 16 : Mécanismes de la nécrose. La baisse d'ATP et l'acidose vont entraîner une accumulation de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire puis dans la mitochondrie entraînant une ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP) et le gonflement de la mitochondrie. La nécrose peut également être induite par l'intermédiaire de RIP (receptor-interacting protein). D'après Chiong *et al.*, 2011.

ii. L'APOPTOSE

L'apoptose est médiée par deux voies, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. La voie extrinsèque peut être activée par le ligand de Fas, le TNF α ou TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) qui vont se lier à leurs récepteurs membranaires de mort. Par exemple, La liaison du ligand de Fas avec Fas va entraîner la formation du complexe DISC (death-inducing signaling complex). Ce complexe va activer les procaspases 8 et 10 et induire l'activation des caspases 3 et 7 qui vont cliver de nombreuses protéines et activer de nombreux médiateurs proapoptotiques. La voie extrinsèque va également

induire des signaux apoptotiques par l'intermédiaire de la mitochondrie en clivant Bid (BH3 interacting-domain death agonist) (Whelan et al., 2010).

La voie intrinsèque implique en premier lieu la mitochondrie. Les signaux de mort cellulaire comme l'hypoxie, la carence en nutriments, le stress oxydant sont médiés à la mitochondrie par Bax et des protéines « BH3-only ». Bax et Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) vont permettre la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. Cela va entraîner la libération de nombreux apoptogènes tels que le cytochrome *c*. Celui-ci va se lier à Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) et permettre le recrutement et l'activation de la procaspase 9 dans une structure appelée l'apoptosome. La caspase 9 va ensuite activer les caspases 3 et 7 (**Figure 17**) (Whelan et al., 2010).

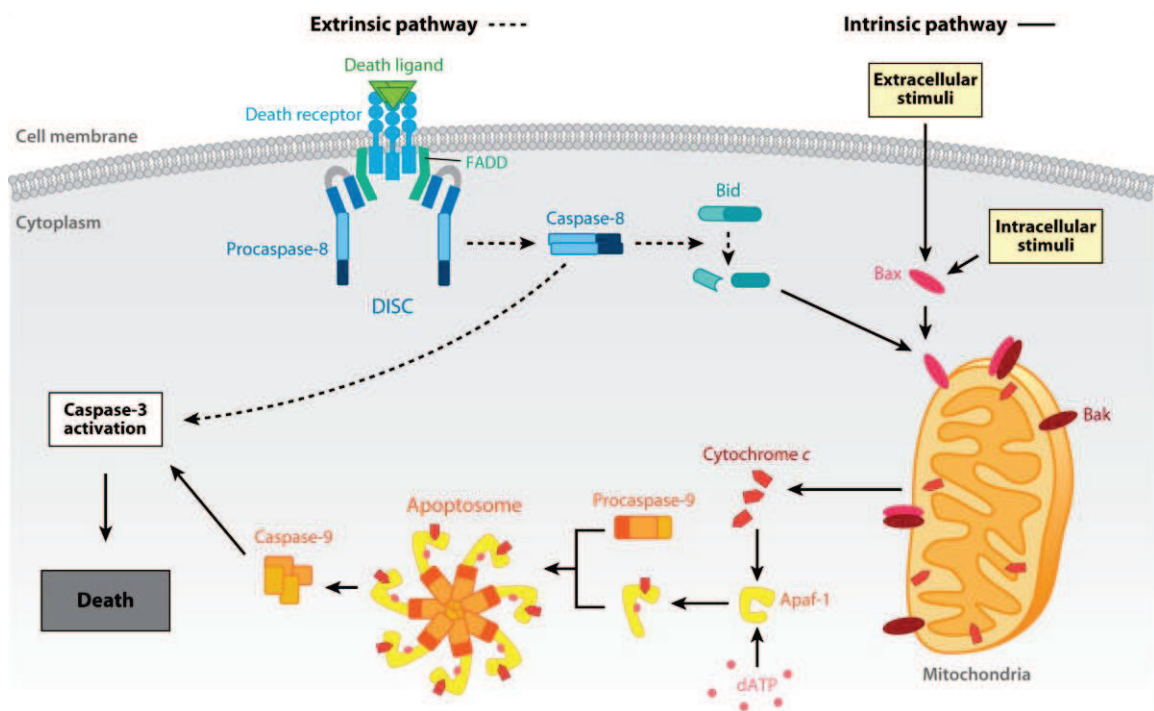


Figure 17 : Mécanismes de l'apoptose. Voie extrinsèque : un ligand de mort cellulaire va se lier à son récepteur permettant le recrutement de la procaspase 8. Son activation va entraîner l'activation des caspases 3 et 7. Voie intrinsèque : des signaux extracellulaires sont médiés par Bax qui va induire la perméabilisation de la mitochondrie libérant le cytochrome *c*. Celui-ci va se lier à Apaf-1 et permettre le recrutement de la procaspase 9 afin de former l'apoptosome. Ceci va permettre l'activation de la caspase 9 qui va activer les caspases 3 et 7. D'après Whelan *et al.*, 2010.

CHAPITRE II – LE STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE, LA REPONSE UPR ET SES IMPLICATIONS

1. PHYSIOLOGIE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE

Le RE est un organite intracellulaire se situant aux pourtours du noyau cellulaire et s'étendant jusqu'à la membrane cellulaire. Il est l'organe de synthèse des protéines de la cellule. Il joue également un rôle dans certaines modifications post-traductionnelles et l'adressage des protéines membranaires ou secrétées (Fewell et al., 2001). La concentration en protéines est très élevée et avoisine les 100 mg/ml. Le RE est également le site de synthèse du cholestérol, des stérols et d'autres lipides (Cox et al., 1997). Après avoir passé les différents contrôles de qualité, les protéines correctement repliées sont ensuite dirigées vers les organelles, la surface cellulaire ou l'espace extracellulaire.

Les principales protéines impliquées dans la maturation des protéines sont l'immunoglobulin binding protein, BiP [ou glucose-related protein 78, GRP78], la GRP94, les protein disulfide isomerases PDI et ERp57, la calnexine et la calréticuline (Hetz et al., 2011). La formation de ponts disulfures peut induire un stress oxydatif (formation d'espèces réactives de l'oxygène) car c'est un mécanisme d'oxydation qui consomme de l'énergie. PDI permet l'oxydation des cystéines et ERO1 (ER oxidoreductin 1) va permettre le transfert d'un électron de PDI vers FAD (flavin adenine dinucleotide). Le recyclage de FAD va alors pouvoir former des espèces réactives de l'oxygène (Zhang and Kaufman, 2008). La voie la mieux connue pour la maturation des protéines et le contrôle qualité est le cycle de la calnexine et de la calréticuline. Les protéines monoglycosylées vont être reconnues par les lectines, calnexine et calréticuline, qui vont augmenter l'efficacité de la conformation des protéines en empêchant leur agrégation et en évitant que les protéines mal conformées ne sortent du RE. ERp57, en s'associant à ces deux protéines, va réaliser les ponts disulfures permettant la conformation tridimensionnelle des glycoprotéines. La majorité des protéines passant par cette voie a une conformation satisfaisante (Chakrabarti et al., 2011). Un petit nombre de nouvelles glycoprotéines sont mal conformées et subissent un nouveau cycle. Enfin si

certaines protéines sont toujours mal conformées, elles sont dirigées vers le protéasome par une rétrotranslocation dans le cytosol qui s'appelle la voie ER-associated degradation (ERAD) afin d'être dégradées (Smith et al., 2011; Vembar and Brodsky, 2008).

2. LE STRESS DU RE

Le stress du RE apparaît la plupart du temps en conditions pathologiques et plus rarement en conditions physiologiques (dans les cellules sécrétrices comme les cellules β du pancréas ou les lymphocytes B) au cours desquelles des protéines mal conformées (bien conformées mais en quantité trop importantes dans les situations physiologiques) vont s'accumuler dans la lumière du RE. Le RE n'est alors plus apte à réaliser la maturation des nouvelles protéines et à les diriger vers l'appareil de Golgi.

Le stress du RE est impliqué dans de multiples pathologies humaines comme le diabète, le cancer, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, la transplantation d'organes (Chakrabarti et al., 2011; Pallet et al., 2010).

Les causes de ce stress sont multiples et variées. Il peut s'agir de la carence en glucose, de l'anoxie, des perturbations de l'équilibre redox cellulaire, des désordres calciques, de l'altération de la glycosylation des protéines, l'inhibition des enzymes de maturation, les infections virales ou de la surcharge en cholestérol...(Pallet et al., 2010) La réponse adaptative qui s'ensuit se nomme « Unfolded protein response » (UPR).

3. LA RÉPONSE UPR

Les trois fonctions principales de cette réponse au stress du RE vont être l'adaptation, l'alarme, et, si le processus perdure, l'induction de la mort cellulaire.

Brièvement, l'activation de cette réponse entraîne une augmentation du volume du RE et une synthèse de protéines chaperonnes afin d'accompagner l'augmentation des protéines dans la lumière du RE et de permettre leur maturation. De façon simultanée, la traduction est globalement diminuée pour réduire la charge protéique du RE tandis que la

dégradation des protéines mal conformées est augmentée. Si ces processus adaptatifs échouent, la réponse UPR déclenche des signaux d'alarme avec la génération d'une réaction inflammatoire médiée par les voies NF- κ B et JNK, la diminution d'expression de facteurs antiapoptotiques comme la protéine Bcl2. Après cette phase d'alarme, la cellule peut rentrer dans le cycle de l'apoptose (Chakrabarti et al., 2011).

Dans un premier temps, nous décrirons les médiateurs de cette réponse UPR puis les différents processus mis en route lors des phases d'adaptation, d'alarme et de mort cellulaire.

A. LES TRANSDUCTEURS

La réponse UPR comporte trois transducteurs principaux : la double-stranded RNA-activated protein kinase RNA-like ER kinase (Perk), l'inositol-requiring protein 1 (Ire1) (isoformes α et β) et l'activating transcription factor 6 (ATF6). Depuis peu, d'autres médiateurs ayant des homologies avec ATF6 ont été décrits comme Luman et des facteurs de transcription de la famille OASIS (old astrocyte specifically induced substance) (Asada et al., 2011).

Le premier médiateur qui a été décrit est Ire1 puisque c'est le seul médiateur de la réponse UPR présent chez la levure (Ire1p). Il s'agit d'une protéine transmembranaire de 110 kDa comportant deux domaines enzymatiques, une serine/threonine protein kinase et une endoribonucléase. L'activation de cette protéine se fait par autophosphorylation, dimérisation puis oligomérisation (Walter and Ron, 2011). Ire1 va ensuite réaliser un épissage non conventionnel du facteur transcriptionnel Xbp-1 (X-box binding protein 1) avec l'excision de 26 nucléotides dans un intron (Iwawaki and Akai, 2006). La protéine formée est un facteur transcriptionnel qui va aller dans le noyau se fixer sur des régions promotrices appelés ERSE (ER stress element) (**Figure 18**).

Perk est également une protéine transmembranaire du RE de 125 kDa. Au cours de son activation, Perk s'oligomérisse, s'autophosphoryle et va phosphoryler eIF2 α , inactivant de façon indirecte eIF2 et la traduction des ARNm (**Figure 18**) (Walter and Ron, 2011).

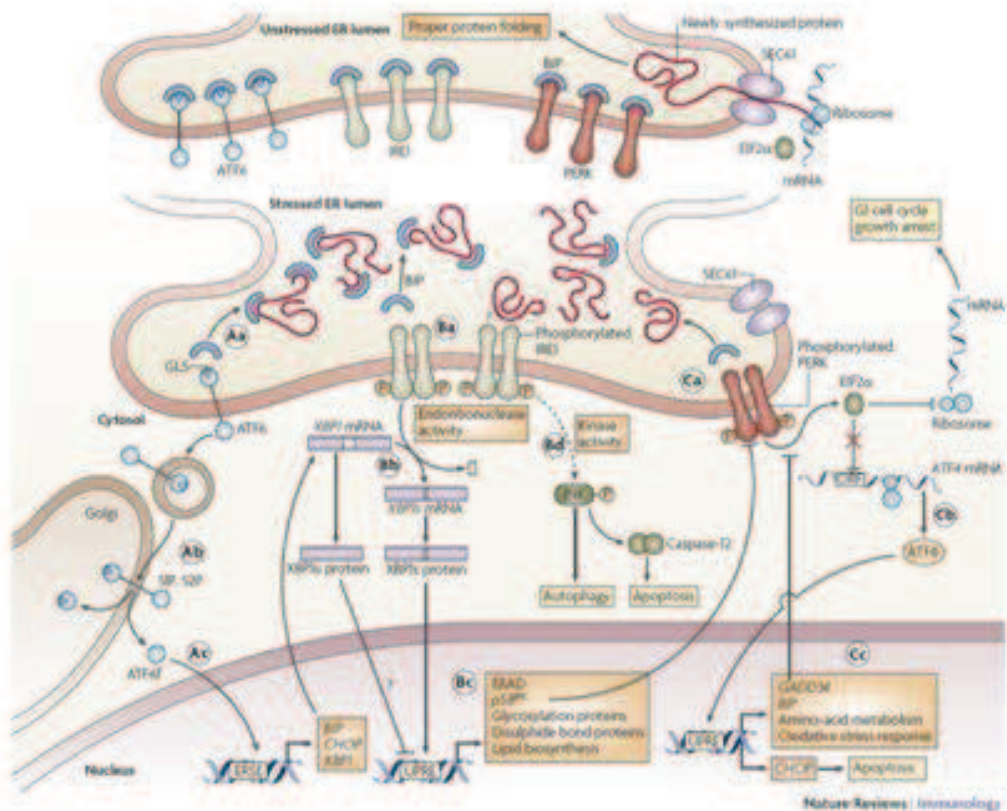


Figure 18 : La réponse UPR et ses différentes interactions. L'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE va entraîner la libération de BiP des 3 principaux transducteurs, Perk, Ire1 et ATF6. Perk va phosphoryler eIF2 α entraînant une inhibition de la traduction globale et la traduction spécifique de certaines protéines chaperonnes telles que ATF4 ; Ire1 va épisser de façon non conventionnelle le facteur XBP1 afin d'augmenter les protéines chaperonnes et activer la voie ERAD ; enfin ATF6 va être clivé au niveau de l'appareil de Golgi et va aller dans le noyau augmenter la transcription de protéines chaperonnes. D'après Todd *et al.*, 2008.

ATF6 est un facteur transcriptionnel transmembranaire du RE. Lors de l'accumulation de protéines mal conformées dans le RE, il est enveloppé dans des vésicules de transport et dirigé vers l'appareil de Golgi où deux protéases, S1P et S2P (site-1 et site-2 protease) vont respectivement cliver le domaine luminal et la partie transmembranaire. Le fragment N-terminal va migrer dans le noyau et activer les gènes de la réponse UPR en se fixant sur les ERSE-I et II (**Figure 18**) (Walter and Ron, 2011).

De nouveaux médiateurs ont été décrits récemment. Ceux-ci partagent des homologies avec ATF6 : ils possèdent un domaine transmembranaire, un domaine

d'activation-transcription et un domaine bZIP (basic leucine zipper) mais leur domaine endoluminal a peu d'homologies avec ATF6 rendant compte d'un mécanisme différent pour détecter les protéines mal conformées. Ces différents médiateurs se nomment Luman/CREB3 (cAMP response element binding protein 3), OASIS, BBF2H7 (BBF2 human homolog on chromosome 7), CREBH, CREB4. Ils appartiennent à la famille OASIS. Ils sont exprimés (à l'exception de Luman) de façon préférentielle dans les ostéoblastes et les astrocytes (Asada et al., 2011).

B. LA PHASE D'ADAPTATION

Ce mécanisme doit être finement régulé car l'ensemble des protéines arrivant dans la lumière du RE n'est pas encore conformées (structure ternaire). Dans les premiers travaux sur le stress du RE, l'activation de la voie UPR, et donc des différents médiateurs, était souvent reliée à la protéine chaperonne BiP qui fait partie de la famille Heat Shock protein 70. En l'absence de stress du RE cette protéine était fixée aux trois principaux médiateurs et empêchait leur dimérisation et leur activation. Lorsqu'une charge trop importante en protéines mal conformées apparaissait dans la lumière du RE, BiP allait se fixer aux protéines mal conformées et permettait ainsi l'activation des médiateurs de la réponse UPR (Schroder and Kaufman, 2005). Néanmoins de récentes études concernant Ire1 chez la levure montrent qu'un mutant d'Ire1 sur lequel BiP ne peut pas se fixer active efficacement la réponse UPR. Un modèle direct est donc évoqué notamment par la structure du domaine endoluminal qui présente des analogies avec l'architecture du complexe majeur d'histocompatibilité. BiP servirait alors à stabiliser Ire1 sous forme de monomères. Enfin Ire1 ne semble pas seulement activé par les protéines mal conformées mais également par des perturbations dans la composition des lipides. Il est également intéressant de noter que, dans les lymphocytes B, la réponse UPR semble précéder l'apparition des charges protéiques importantes et serait donc activée par d'autres médiateurs que les protéines mal conformées (Walter and Ron, 2011).

Deux phénomènes principaux vont avoir lieu au cours de la réponse UPR : une diminution de la production en protéines mal conformées et une augmentation de synthèse de protéines chaperonnes (**Figure 18**).

Le stress du RE induirait de façon indirecte la transcription de l'enzyme INO1 (inositol-1-phosphate synthase) qui est une enzyme clé dans la synthèse des phospholipides permettant une prolifération des membranes du RE (Schroder and Kaufman, 2005). Ceci va entraîner une augmentation du volume du RE et par conséquent une diminution de la concentration protéique dans celui-ci.

Suite à l'activation de la réponse UPR, une inhibition de la traduction va avoir lieu par l'intermédiaire de la voie Perk/eIF2 α . En effet Perk va phosphoryler la sous-unité α d'eIF2 sur la sérine 51. La phosphorylation d'eIF2 α inhibe le facteur eIF2B empêchant la formation du complexe ternaire eIF2-GTP-tRNA_i^{Met} nécessaire à l'initiation de la traduction en formant le complexe de préinitiation 43S par association avec la sous-unité ribosomale 40S.

Une des autres étapes d'adaptation au cours du stress du RE est la dégradation des protéines mal conformées par la voie ERAD (ER-associated degradation). Le mode de reconnaissance des protéines devant être dégradées n'est pas encore bien connu. De multiples protéines chaperonnes telles que BiP interagissent avec les protéines mal conformées (régions hydrophobiques sur la face extérieure de la protéine, défaut de la N-glycosylation, défaut de formation des ponts disulfures, défaut d'assemblage des complexes protéiques). Des protéines chaperonnes telles que HERP (homoCys-responsive ER-resident protein) ou EDEM (ER degradation-enhancing α -mannosidase-like lectin) permettent de délivrer les protéines mal conformées vers le retrotranslocon afin qu'elles soient ubiquitinylées et dégradées par le protéasome (Vembar and Brodsky, 2008).

Enfin la voie RIDD (regulated IRE1-dependent decay) permet de dégrader les ARNm liés au RE et permettrait de diminuer l'entrée de protéines et la charge des protéines mal conformées dans le RE. Ire1, grâce à son site endonucléasique, peut dégrader les ARNm empêchant ainsi leur traduction (Hollien et al., 2009).

De façon concomitante, il existe une augmentation de la transcription et de la traduction de protéines chaperonnes. La diminution de la quantité de eIF2 α active (c'est-

à-dire non phosphorylée) permet la traduction du facteur transcriptionnel ATF4 suite à la lecture du cadre de lecture ouvert (open reading frame) en aval de deux cadres de lecture ouverts non codants. La traduction d'ATF4 va ensuite activer la transcription de gènes du métabolisme des acides aminés, de la réponse anti-oxydante et de l'apoptose (Schroder and Kaufman, 2005).

La voie Ire1 α /XBP1 contrôle des gènes codant pour des protéines chaperonnes telles que BiP, ERdj4, p58^{IPK}, HEDJ, des protéines intervenant dans la voie ERAD comme EDEM, des protéines impliquées dans la glycosylation telles que RAMP4 (ribosome-associated membrane protein 4) ou des protéines permettant la conformation des protéines comme PDI (Lee et al., 2003).

Enfin ATF6 contrôle également l'expression de protéines chaperonnes telles que BiP, GRP94, calréticuline et des enzymes de maturation telles que PDI (Okada et al., 2002).

Une autre voie d'adaptation est l'autophagie. Ce processus permet le recyclage des macromolécules et des organelles. Sa finalité n'est pas encore bien définie puisque certaines études montrent un rôle dans la survie cellulaire tandis que d'autres retrouvent qu'elle induit la mort cellulaire (voir chapitre « L'autophagie »). Plusieurs acteurs contribuent à l'autophagie au cours du stress du RE : ATF4 et CHOP régulent respectivement la transcription de LC3 et Atg5 (Rouschop et al., 2010). JNK régulée par Ire1 α est importante pour la lipodation de LC3 tandis que la phosphorylation de eIF2 α est nécessaire pour la conversion de LC3. La libération de calcium dans le cytoplasme suite au stress du RE entraîne la phosphorylation de PKC θ (protein kinase C θ) qui induit également la lipodation de LC3 (He and Klionsky, 2009).

C. LES PHASES D'ALARME ET DE MORT CELLULAIRE

Si la situation normale ne peut pas être rétablie avec les différents processus cités ci-dessus, le stress du RE va engendrer des signaux d'alarmes et d'apoptose.

Les signaux vont principalement être médiés par Ire1 α qui peut interagir avec des protéines adaptatrices telles que TRAF2 pour entraîner l'activation de ASK1 (apoptosis

signal-regulating kinase 1) qui activera les voies JNK et p38/MAP kinases (Matsukawa et al., 2004; Urano et al., 2000). Ire1 α peut également moduler l'expression de kinases ERK (extracellular signal-regulated kinase) et de NF- κ B (Chakrabarti et al., 2011). Ces différentes voies vont entraîner une réponse inflammatoire et avoir des conséquences sur la survie, la différenciation et la prolifération cellulaire (Hayden and Ghosh, 2012).

Si le stress du RE perdure, et selon l'intensité, la nature du stimulus et le type cellulaire, d'autres acteurs vont intervenir et entraîner l'apoptose. La voie Ire1 α , en entraînant une dégradation des ARNm par la voie RIDD (décrite plus haut), permettant ainsi une moindre charge protéique dans le RE, peut entraîner l'apoptose si le stress du RE dure longtemps. Ire1 α pourrait également se lier à Bak et Bax qui sont impliquées dans l'apoptose (**Figure 19**) (Tabas and Ron, 2011). Un autre mécanisme passe par l'activation de la caspase 12 clivée par des calpaïnes activées elles-mêmes par Ire1 α mais son rôle exact fait débat car elle n'est pas présente chez l'homme (Nakagawa et al., 2000; Saleh et al., 2006).

Un autre mécanisme d'apoptose implique la protéine CHOP, qui est régulée par les trois voies principales de la réponse UPR. CHOP va induire l'apoptose par la diminution de l'expression de Bcl-2 alors que la concentration de Bax augmente. Bcl-2 permet la survie cellulaire en séquestrant les protéines « BH3-only » telles que Bad, Bim, Noxa et Puma qui sont nécessaires pour la perméabilisation mitochondriale médiée par Bax-Bak et pour l'apoptose. Un autre mécanisme d'apoptose médié par CHOP est l'augmentation du stress oxydant car Ero1 α dont la transcription dépend de CHOP induit un environnement hyperoxydé dans le RE qui entraînerait l'apoptose de la cellule. Ero1 α peut induire un stress oxydatif dans le cytoplasme avec l'induction de la NADPH oxydase et la génération d'espèces réactives de l'oxygène. Enfin CHOP active également d'autres molécules impliquées dans l'apoptose telles que DR5 (death receptor 5) et TRB3 (Tribbles-related protein 3) (**Figure 19**) (Tabas and Ron, 2011).

Enfin, dans certains modèles, l'autophagie joue un rôle délétère entraînant la mort cellulaire (voir chapitre « L'autophagie »).

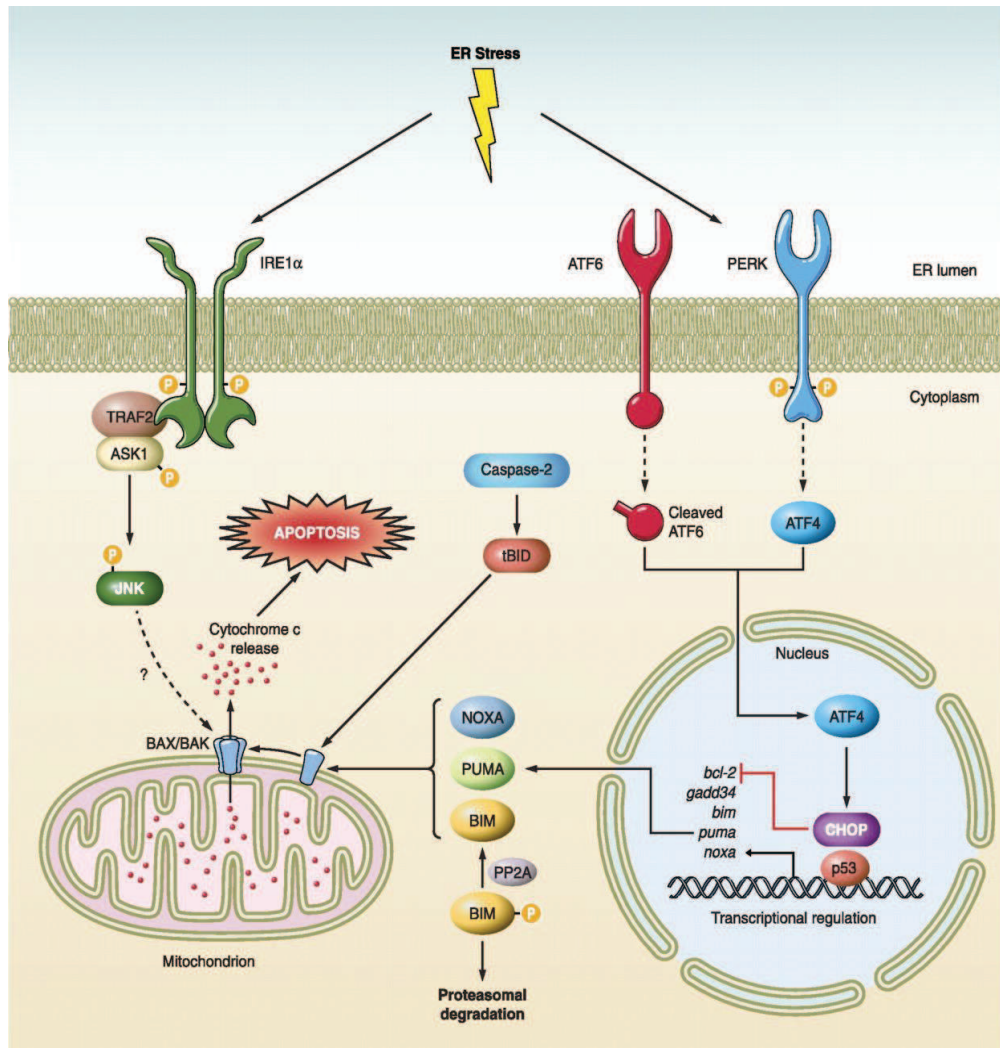


Figure 19 : L'apoptose médiée par le stress du RE. CHOP régule différentes protéines impliquées dans l'apoptose. Ire1 active la voie JNK qui va pouvoir induire l'apoptose. D'après Hetz, 2012.

D. LA REGULATION DE LA REPONSE UPR

La régulation de la réponse UPR doit être finement régulée pour que cessent les processus d'adaptation lorsque la charge protéique est redevenue satisfaisante ou lorsque le facteur causal a disparu. Il est intéressant de noter que la survenue d'un stress prolongé du RE entraîne l'activation séquentielle des voies Ire1 α , ATF6 puis PERK. Leur désactivation a lieu dans le même ordre chronologique. En effet l'épissage de XBP1 par Ire1 diminue après 8 heures de stress continu. Le fragment clivé d'ATF6 diminue au-delà

de 20 heures d'induction du stress tandis que la voie Perk semble persister plus longtemps. Ainsi la phase initiale de la réponse UPR entraîne des mécanismes plutôt en faveur de la survie cellulaire tandis que la diminution de l'activité des voies Ire1 α et ATF6 entraînerait un déséquilibre en faveur de facteurs proapoptiques (Lin et al., 2007).

La voie PERK/eIF2 α est régulée par un rétrocontrôle. En effet l'expression du facteur transcriptionnel ATF4 entraîne l'augmentation de CHOP qui va induire l'expression de la protéine GADD34 (growth arrest and DNA damage gene 34) qui, en association avec la protein phosphatase 1 (PP1), va déphosphoryler eIF2 α et ainsi permettre la reprise des fonctions normales du RE (Chakrabarti et al., 2011). Les voies Ire1 α /XBP1 et ATF6 semblent inactivées par l'expression d'une protéine du RE s'appelant Bax inhibitor-1 (BI-1). BI-1 interagit avec Ire1 α et diminue son activité endoribonucléasique (Hetz et al., 2011). La diminution du facteur XBP1 épissé pourrait jouer un rôle puisque la forme non épissée serait un régulateur négatif pour ATF6 (Chakrabarti et al., 2011).

4. LE STRESS DU RE EN PHYSIOPATHOLOGIE RENALE

Le stress du RE est impliqué dans certaines situations physiologiques comme dans les lymphocytes B (Cenci and Sitia, 2007) ou les cellules β du pancréas lors des pics de glycémies (Wagner and Moore, 2011). Néanmoins son rôle a été confirmé dans de multiples pathologies telles que le diabète de type II (Back and Kaufman, 2012), le cancer (Drogat et al., 2007; Ma and Hendershot, 2004), les maladies neurodégénératives (Doyle et al., 2011; Walker and Atkin, 2011), l'athérosclérose (Tabas, 2010), les maladies inflammatoires (Zhang and Kaufman, 2008), les maladies infectieuses (Torres et al., 2010; Zambrano et al., 2011), les maladies autoimmunes (Todd et al., 2008).

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux implications du stress du RE en physiopathologie rénale. Le 12 septembre 2012, une recherche Pubmed comportant l'équation « (UPR OR ER stress) AND (kidney OR renal disease) avec les limites « au cours des 10 dernières années » et « textes en anglais ou en français » retrouvait 306 articles dont la moitié depuis 2009 montrant l'intérêt croissant de cette voie de signalisation dans les pathologies rénales. Les principaux thèmes abordés

sont des modèles de néphrotoxicité induisant l'apoptose, l'implication du stress du RE au cours des lésions ischémiques, de l'inflammation, de la fibrose, de la transplantation rénale, de la néphropathie diabétique, de l'autophagie... Une revue récente résume l'ensemble des maladies rénales dans lesquelles le stress du RE jouerait un rôle (Dickhout and Krepinsky, 2009).

Congenital/hereditary
Congenital nephrotic syndrome
Congenital nephrosis of the Finnish type (CNF) (nephrin mutation, NPHS1)
Autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome (Podocin mutation, NPHS2)
Polycystic kidney disease (PCKD)
Proteinuria/albuminuria
Primary glomerular disease
Nonproliferative glomerulonephritis
Minimal-change disease (MCD) (puromycin nephrosis model)
Membranous nephropathy (PHN model)
Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS)
Proliferative glomerulonephritis
Membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN)
Rapidly progressive/crescentic proliferative glomerulonephritis (RPGN)
Tubular injury
Ischemia/reperfusion
Drugs
Nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) and prostaglandins
Acetaminophen
Antibiotics (aminoglycosides)
Chemotherapeutics (cisplatin)
Heavy metal-induced injury (cadmium, mercury, lead)
Calcineurin inhibitors (cyclosporin A, tacrolimus)
Kidney transplant
Crystal-induced injury (calcium oxalate)
Other
Diabetic nephropathy
Angiotensin II

Tableau 2 : Les différentes pathologies rénales impliquant le stress du RE. D'après Dickhout et Krepinsky, 2009.

Le rein est sensible à de multiples toxiques. Ceux-ci peuvent toucher les différentes unités du rein : les glomérules, les tubules, l'interstitium et les vaisseaux. Le rein est un organe vulnérable car le débit rénal représente environ 20 % du débit cardiaque, les besoins en oxygène sont importants à cause de systèmes enzymatiques et de transport cellulaires multiples et il y existe un pouvoir de concentration des toxiques. De nombreux toxiques peuvent induire le stress du RE mais les mécanismes menant à l'activation de cette voie de signalisation ne sont pas encore bien compris de manière générale.

A. LE STRESS DU RE ET LES LÉSIONS TUBULAIRES

Il a été décrit par exemple dans notre laboratoire que la ciclosporine induit la mort cellulaire par l'intermédiaire du stress du RE (Pallet et al., 2008a). En effet *in vitro*, la ciclosporine induit une augmentation des protéines spécifiques du stress du RE telles que BiP, CHOP, PDI ; un traitement par ciclosporine et salubrinal entraîne une moindre augmentation de BiP et de la calréticuline par rapport à un traitement par ciclosporine seule. Il existe une moindre mort cellulaire lorsque les cellules tubulaires sont incubées avec de la ciclosporine et du salubrinal par rapport à la ciclosporine seule et le salubrinal diminue également le clivage de PARP (poly (ADP-ribose) polymérase), un marqueur d'apoptose. *In vivo*, la ciclosporine induit des lésions tubulaires aiguës qui sont moins importantes quand les rats reçoivent conjointement du salubrinal. D'autres auteurs ont également montré des augmentations de BiP et CHOP (Han et al., 2008).

Les protéinuries expérimentales entraînent également le stress du RE dans les cellules tubulaires. Une étude dans laquelle des souris knock-in étaient mutées pour la protéine BiP montre que les souris ayant une mutation de façon hétérozygote ont, en vieillissant, plus de lésions tubulointerstitielles que les souris non mutées. Une protéinurie accélère les lésions tubulointerstitielles chez la souris mutée avec une activation de la caspase 12 et une apoptose tubulaire (Kimura et al., 2008b).

Il a également été montré que d'autres toxiques induisent le stress du RE et l'apoptose des cellules tubulaires rénales : les produits de contraste iodés (Wu et al., 2010a), le cisplatine (Rovetta et al., 2012), les aminosides (Quiros et al., 2011), le cadmium (Kitamura and Hiramatsu, 2010), le plomb (Stacchiotti et al., 2009), l'acide

aristolochique (Zhu et al., 2012b), le paracétamol (Lorz et al., 2004), l'aldostérone (Ding et al., 2012) et l'antraquinone (Zhu et al., 2012a).

La formation d'espèces réactives de l'oxygène pourrait être l'un des phénomènes déclenchant le stress du RE dans les cellules tubulaires rénales (Ding et al., 2012).

B. LE STRESS DU RE ET LES LÉSIONS GLOMERULAIRES

Les différents contingents cellulaires du glomérule peuvent également être touchés. La réponse UPR peut être déclenchée dans les podocytes par divers moyens comme la tunicamycine, le ionophore calcique A23187, le donneur de NO S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (Inagi et al., 2005). Une charge importante en albumine sur des podocytes, induisant une protéinurie pathologique, entraîne le stress du RE et l'apoptose en permettant l'augmentation intracytosolique du calcium par l'intermédiaire du canal TRPC6 (transient receptor potential C6) (Chen et al., 2011).

L'incubation de cellules mésangiales avec un milieu riche en glucose (30 mmol/l) entraîne l'expression de BiP (Ramachandra Rao et al., 2007). L'induction d'un diabète expérimental chez des souris entraîne à la fois une protéinurie importante mais aussi une augmentation des marqueurs du stress du RE, BiP, CHOP, phospho-Perk et phospho-eIF2 α ; les souris diabétiques qui n'expriment pas la protéine CHOP ont une moindre protéinurie (Wu et al., 2010b). Chez l'homme, dans des biopsies rénales de patients diabétiques, l'expression de BiP, ORP150 (150 kDa oxygen-regulated protein), de la calnexine et de XBP1 est plus importante que dans des biopsies contrôles (Lindenmeyer et al., 2008).

D'autres glomérulopathies expérimentales telles que la néphrite d'Heymann (Jefferson et al., 2010) mimant une glomérulonéphrite extramembraneuse peuvent induire un stress du RE. En effet l'activation du complément sur des podocytes entraîne l'expression de BiP, GRP94 et l'activation de la voie Perk. De l'ARN interférence dirigée contre BiP dans les podocytes aggrave les lésions indiquant son rôle protecteur dans cette pathologie (Cybulsky et al., 2002). La néphrite à la puromycine qui mime une hyalinose segmentaire et focale induit une augmentation de BiP dans les podocytes de manière contemporaine au développement de la protéinurie (Cybulsky, 2010).

C. LE STRESS DU RE ET LES LESIONS ENDOTHELIALES

Il semble exister un seul travail étudiant (de façon composite) le stress du RE dans l'endothélium de l'artère rénale (Civelek et al., 2009) : Civelek *et al.* a comparé des zones susceptibles d'être athérogènes à des zones protégées de l'athérome et compare, entre autres, (comparaison de 4 régions athérogènes à 3 régions protégées de l'athérome) l'endothélium de l'artère rénale proximale (susceptible d'être athérogène) à celui plus distal. Il montre qu'il existe une augmentation d'expression de BiP, ATF6, Ire1 α , XBP1 et ATF4 dans les zones athérogènes par rapport aux zones non athérogènes sans augmentation de Perk et phospho-eIF2 α . Ainsi le flux sanguin non laminaire serait à l'origine d'un stress du RE dans les cellules endothéliales.

Il existe également d'autres rares travaux étudiant le stress du RE sur des cellules endothéliales. L'hyperglycémie (dextrose à 5g/l) et le fructose entraînent un stress du RE (mis en évidence par une corrélation inverse de l'activité de la phosphatase alcaline sécrétée) dans les cellules endothéliales veineuses (Sheikh-Ali et al., 2010). Le plomb induit aussi le stress du RE dans les cellules endothéliales aortiques. Il a été observé une augmentation d'expression de BiP, GRP94, Ire1 α et JNK lors d'un traitement par le plomb. L'ARN interférence dirigée contre BiP aggrave la cytotoxicité liée au plomb (Shinkai et al., 2010). Dans une autre étude il a été montré que l'expression de l'allèle HLA-B35 (associé à l'hypertension artérielle pulmonaire chez les patients atteints de sclérodémie) dans des cellules endothéliales entraîne une augmentation de BiP sans augmentation d'autres marqueurs tels que CHOP et PDI (Lenna et al., 2010).

D. LE STRESS DU RE ET L'INFLAMMATION RENALE

Il est maintenant établi qu'il existe une relation entre le stress du RE et l'inflammation, notamment dans le diabète, l'obésité, l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives (Zhang and Kaufman, 2008). Néanmoins il existe peu de travaux

étudiant cette relation dans le rein. Or l'on sait que certaines réponses dépendent du tissu ou du type cellulaire.

Nous avons vu précédemment que la formation de ponts disulfures peut induire des espèces réactives de l'oxygène par l'intermédiaire de PDI et Ero1. Or celles-ci peuvent induire une réaction inflammatoire (Raha and Robinson, 2000). Néanmoins l'activation de la voie Perk au cours du stress du RE limite cette réaction inflammatoire puisque la traduction sélective de ATF4 et NRF2 (nuclear factor-erythroid-derived (2NF-E2)-related factor 2) va induire la transcription de gènes maintenant le taux de glutathion dans la cellule (Zhang and Kaufman, 2008).

NF- κ B, qui est un facteur transcriptionnel impliqué dans l'initiation de l'inflammation, est activé au cours du stress du RE. La présence d'un stress oxydatif ou la sortie de calcium du RE dues au stress du RE activeraient NF- κ B. Par ailleurs la voie UPR activerait également NF- κ B car l'activation de la voie Perk, qui diminue la traduction globale, entraîne une diminution d'I κ B qui a une demi-vie plus courte que NF- κ B (Deng et al., 2004). L'inflammation est également médiée par Ire1 car il peut se lier à TRAF2 et former un complexe qui va pouvoir recruter IKK et JNK. IKK va dégrader I κ B permettant l'activation de NF- κ B et JNK va activer AP1 (Hu et al., 2006). Enfin ATF6 pourrait également moduler la réponse inflammatoire puisque dans des cellules tubulaires rénales traitées par la cytotoxine AB₅ subtilase, il existe une activation transitoire de NF- κ B associée à une phosphorylation d'Akt (Kitamura, 2009).

Hung *et al.* a montré *in vivo* que COX-2 (cyclooxygénase 2) est augmentée dans des reins et des foies de souris transgéniques qui avaient des protéines du virus de l'hépatite B tandis qu'il a montré l'implication de la réponse UPR et de NF- κ B dans l'induction de COX-2 *in vitro* dans des hépatocytes (Hung et al., 2004). D'autres auteurs ont trouvé que le stress du RE inhibe NF- κ B dans des cellules mésangiales par l'intermédiaire du facteur transcriptionnel C/EBP β qui est régulé par la voie Perk-eIF2 α et la voie Ire1-TRAF2 (Hayakawa et al., 2010).

E. LE STRESS DU RE ET LA FIBROSE RENALE

La fibrose rénale est considérée comme la conséquence ultime des maladies rénales chroniques entraînant une glomérulosclérose et/ou une fibrose interstitielle. Plusieurs études dans des modèles cardiaques et hépatiques tendent à montrer que le stress du RE peut être le médiateur d'un tel phénomène (Dickhout et al., 2011; Mu et al., 2010; Tamaki et al., 2008). D'autres équipes tendent à montrer la même chose dans des modèles rénaux. En effet, Dihazi *et al.* a réalisé une étude protéomique de fibroblastes rénaux après les avoir soumis à un stress osmotique : une lignée était issue d'un rein normal et l'autre d'un rein présentant de la fibrose interstitielle. Plus de 30 protéines sont régulées de façon différente entre les deux lignées dont 6 sont impliquées dans le stress du RE. Ces résultats incitent à penser qu'il existe une corrélation directe entre stress du RE et fibrogenèse sans que le mécanisme ne soit élucidé (Dihazi et al., 2011). Dans un modèle *in vivo*, Chiang *et al.* a montré que l'obstruction urétérale unilatérale chez le rat engendre un stress du RE avec l'augmentation de BiP et l'apparition de façon concomitante d'une fibrose rénale (Chiang et al., 2011).

F. LE STRESS DU RE ET LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE OU LES MODIFICATIONS PHENOTYPIQUES EPITHELIALES RENALES

La TEM est un processus biologique qui permet à une cellule épithéliale polarisée, qui interagit normalement avec la membrane basale, de subir de multiples modifications biochimiques qui vont lui permettre d'acquérir un phénotype mésenchymateux qui comprend une capacité migratrice augmentée, la possibilité d'invasion d'autres tissus et à traverser la membrane basale, une résistance élevée à l'apoptose et une augmentation de la production d'éléments de la matrice extracellulaire (Kalluri and Weinberg, 2009).

L'origine des myofibroblastes qui sont des fibroblastes activés et pourvoyeurs de la fibrose dans le parenchyme rénal est multiple : ils proviennent des fibroblastes résidant dans le rein, des fibroblastes périvasculaires et des péricytes, des fibroblastes circulants, des cellules endothéliales et des cellules épithéliales (Fragiadaki and Mason, 2011). Ces dernières pourraient représenter un tiers du contingent des myofibroblastes dans le rein (Iwano et al., 2002).

Néanmoins la provenance de myofibroblastes des cellules épithéliales rénales a été remise en question récemment car Humphreys *et al.* n'a pas retrouvé en 2010 de myofibroblastes en provenance des cellules épithéliales (par des techniques Cre/Lox) au cours de l'obstruction urétérale unilatérale (Humphreys et al., 2010) remettant ainsi en question les résultats d'Iwano.

Si l'on considère, malgré ce travail récent, que la TEM existe dans le rein, plusieurs travaux ont montré l'implication du stress du RE. Notre équipe a montré que le stress du RE induit par la ciclosporine peut entraîner des modifications phénotypiques épithéliales avec la disparition de la E-cadhérine, le réarrangement des fibres de stress, de la vinculine et la redistribution de la protéine β -caténine. Dans le même travail, il est montré que la thapsigargine, un inducteur spécifique du stress du RE induit les mêmes modifications phénotypiques (Pallet et al., 2008a). Plus récemment Lee *et al.* a montré que la protéinurie entraîne à la fois une TEM et le stress du RE dans des cellules HK2 via une voie commune, la voie ROS (reactive oxygen species)-c-Src kinase-mTOR (Lee et al., 2011). D'autres travaux ont également montré qu'une protéinurie induit soit le stress du RE, soit la TEM sans qu'un lien de cause à effet ne soit mis en évidence (Lindenmeyer et al., 2008; Strutz, 2009).

G. LE STRESS DU RE ET LA TRANSPLANTATION RENALE

Plusieurs phénomènes pathologiques impliquant le stress du RE peuvent se produire au cours de la transplantation d'organes solides dont, entre autres, l'ischémie-reperfusion rénale, les phénomènes liés à la préservation d'organes, la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine, le diabète post-transplantation. Les implications du stress du RE au cours de la transplantation rénale ont fait l'objet d'une revue par notre équipe en 2010 (Pallet et al., 2010).

L'ischémie-reperfusion rénale a comme conséquence une diminution de la synthèse protéique. Des études récentes suggèrent que la réponse UPR est responsable de l'inhibition de la synthèse des protéines qui a lieu dans les reins de rats reperfusés après une ischémie. L'ischémie secondaire à un arrêt cardiaque et la reperfusion qui survient au décours sont associés à l'activation de Perk et à la phosphorylation de eIF2 α , aboutissant

à l'inhibition du processus de traduction et de la synthèse des protéines (Montie et al., 2005). Ce résultat suggère que l'ischémie-reperfusion rénale induit un stress du RE et active la réponse UPR qui participe à l'apparition des lésions tubulaires rénales. Les processus d'assemblage et de maturation des protéines dans le RE sont perturbés au cours de l'ischémie, ce qui peut contribuer à l'apparition d'un phénotype ischémique des cellules épithéliales (altérations des protéines des jonctions transmembranaires, des transporteurs polarisés et des intégrines) (Kuznetsov et al., 1996). En considérant que la récupération après un épisode ischémique requiert une synthèse *de novo*, un assemblage et une maturation des protéines, les protéines chaperonnes du RE pourraient jouer un rôle majeur dans les processus de récupération.

Comme la réponse UPR peut engendrer de façon alternée une réponse pro- ou anti-apoptotique, le stress du RE joue un rôle complexe dans la survie des cellules rénales. Le préconditionnement des cellules épithéliales rénales avec des inducteurs du stress du RE les protège contre les agressions oxydantes (reperfusion) et la cytotoxicité, suggérant un rôle protecteur du stress du RE. Une étude récente a montré dans un modèle d'ischémie rénale chez le rat que le préconditionnement ischémique avant les lésions d'ischémie-reperfusion entraîne une meilleure clairance de la créatinine et une meilleure réabsorption du sodium, augmente la protéine BiP mais réduit l'activation de la voie Perk (Mahfoudh-Boussaid et al., 2012). Par ailleurs, le préconditionnement par le stress du RE atténue les lésions induites par H₂O₂ dans les cellules LLC-PK1 en empêchant l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, en potentialisant l'activation de PERK et en diminuant l'activation de la voie JNK alors que la réduction par ARN interférence de BiP, le régulateur clé du stress du RE, aggrave les lésions cellulaires (Hung et al., 2003).

L'ischémie-reperfusion peut également activer la mort cellulaire médiée par le stress du RE et il a été montré que cette réponse peut être diminuée par la protéine anti-apoptotique BI-1. BI-1 est une protéine liée au RE dont la synthèse est stimulée pendant l'ischémie-reperfusion rénale. Les souris déficientes pour le gène BI-1 soumises à l'ischémie-reperfusion sont très sensibles à l'insuffisance rénale et à l'apoptose des cellules tubulaires. De façon intéressante, BI-1 contrôle les voies du stress du RE à de multiples niveaux car ATF6, phospho-JNK et XBP-1 sont surexprimés pendant l'ischémie-reperfusion chez les souris déficientes pour le gène BI-1 (Bailly-Maitre et al., 2006).

L'ischémie-reperfusion induit dans le rein des changements dans l'expression de protéines spécifiques du RE telles que HSP70 et HO-1. Une autre protéine spécifique du RE, ORP150, est surexprimée dans les cellules tubulaires pendant l'ischémie-reperfusion rénale et il a été montré qu'elle joue un rôle cytoprotecteur pendant les agressions liées à l'ischémie-reperfusion. Les souris surexprimant ORP150 sont moins susceptibles à l'insuffisance rénale aiguë pendant l'ischémie-reperfusion que les souris hétérozygotes, exprimant moins de ORP150, confirmant ainsi le rôle essentiel du stress du RE dans les lésions rénales d'origine ischémique. Le rôle protecteur de ORP150 pendant le stress du RE semble être lié à ses propriétés de protéine chaperonne, entraînant un transport des protéines plus efficace pendant le stress du RE (Bando et al., 2004).

CHAPITRE III – OBJECTIFS ET PRESENTATION DES TRAVAUX

1. OBJECTIFS DE LA THESE

Une meilleure compréhension des mécanismes induisant la destruction du parenchyme rénal et la formation de fibrose au cours des stress toxique et ischémique est nécessaire afin de limiter la dégradation de la fonction rénale chez les patients ayant une insuffisance rénale ou porteurs d'un greffon rénal.

Le stress du RE et la réponse UPR sont une des réponses à ces deux stress et leurs implications sont actuellement encore peu connues dans le domaine de la pathologie rénale.

L'objectif principal de cette thèse est de mettre en évidence de nouveaux processus pertinents pour le patient, dépendant de la réponse UPR dans la pathologie rénale afin de caractériser leur régulation.

Nous montrons que la ciclosporine induit un stress du RE dans des cellules endothéliales artérielles et que celles-ci présentent des modifications phénotypiques endothéliales évocatrices de transition endothélio-mésenchymateuse (**article n°1**). La carence en glucose induit dans les cellules tubulaires rénales une réponse inflammatoire (**article n°2**) et angiogénique (**article n°3**) médiée par la réponse UPR.

2. PRESENTATION DES TRAVAUX

A. LA CICLOSPORINE DECLENCHE LE STRESS DU RE DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES POUVANT JOUER UN ROLE POUR DES MODIFICATIONS PHENOTYPIQUES ENDOTHELIALES ET LA MORT CELLULAIRE

Les inhibiteurs de la calcineurine, la ciclosporine et le tacrolimus, sont des immunosuppresseurs efficaces mais présentent une néphrotoxicité limitant ainsi la survie

à long terme du greffon rénal. La physiopathologie de la néphrotoxicité chronique liée aux inhibiteurs de la calcineurine n'est pas encore bien comprise et plusieurs mécanismes sont probablement impliqués (voir chapitre « La toxicité des inhibiteurs de la calcineurine »).

Il a été démontré par plusieurs équipes dont la nôtre que le stress du RE peut jouer un rôle dans la toxicité tubulaire liée à la ciclosporine et que celui-ci peut entraîner des modifications phénotypiques épithéliales (Han et al., 2008; Pallet et al., 2008a). Récemment certains auteurs ont montré que des fibroblastes peuvent provenir de cellules endothéliales caractérisant la TEndM (Arciniegas et al., 2007; Zeisberg et al., 2007a; Zeisberg et al., 2007b).

Les cellules endothéliales artérielles sont la première interface entre ces immunosuppresseurs et le greffon rénal; la réponse endothéliale à ces immunosuppresseurs est peu connue (Nickel et al., 2006).

L'objectif de ce travail est de déterminer si la ciclosporine et le tacrolimus peuvent induisent des modifications phénotypiques endothéliales évocatrices de TEndM par l'intermédiaire du stress du RE.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article n°1 intitulé « Cyclosporine triggers endoplasmic reticulum stress in endothelial cells: a role for endothelial phenotypic changes and death » publié dans l'American journal of physiology: renal physiology en janvier 2009.

Nous montrons dans ce travail que la ciclosporine seule induit une diminution de la viabilité cellulaire et des modifications morphologiques avec un aspect myofibroblastique des cellules. La ciclosporine induit une diminution d'expression de PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) et du facteur von Willebrand (marqueurs endothéliaux) et l'augmentation d' α SMA (marqueur myofibroblastique). On a ensuite cherché à savoir si le stress du RE pouvait être impliqué dans ce processus. Les marqueurs de stress du RE sont augmentés après un traitement par ciclosporine. Le stress du RE est impliqué dans la TEndM car la thapsigargine, un inducteur du stress du RE, entraîne des modifications phénotypiques identiques à la ciclosporine et le salubrinal, un inhibiteur de la déphosphorylation de eIF2 α , diminue les modifications dues à la ciclosporine. *In vivo*, l'analyse du cortex rénal de rats traités par ciclosporine montre la

présence sur la même cellule de PECAM-1 et l' α SMA. Enfin ni le tacrolimus ni ses métabolites n'entraînent les différentes modifications observées avec la ciclosporine.

En conclusion, la ciclosporine, contrairement au tacrolimus et à ses métabolites, induit des modifications phénotypiques évocatrices de TEndM *in vitro* et *in vivo*. Le stress du RE pourrait être l'un des mécanismes impliqués dans ce processus.

Article n°1 en annexe

Bouvier N, Flinois JP, Gilleron J, Sauvage JL, Legendre C, Beaune P, Thervet E, Anglicheau D, Pallet N. Cyclosporine triggers endoplasmic reticulum stress in endothelial cells: a role for endothelial phenotypic changes and death. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296(1): F160-9.

B. LE STRESS METABOLIQUE INDUIT UNE INFLAMMATION RENALE TUBULAIRE PAR L'INTERMEDIAIRE DE LA REPONSE UPR

L'ischémie rénale est une des causes importantes d'insuffisance rénale aiguë et d'IRCT (Bonventre and Yang, 2011) ; en transplantation rénale, elle peut compromettre la viabilité cellulaire et activer l'alloimmunité conduisant à des lésions d'atrophie tubulaire et de fibrose interstitielle, la dysfonction de greffon et sa perte (Nankivell and Chapman, 2006) tandis qu'elle peut activer l'autoimmunité dans des reins natifs (Anders and Schlondorff, 2010).

L'ischémie déclenche une cascade de cytokines proinflammatoires et profibrosantes pouvant aggraver les lésions ischémiques initiales. Les mécanismes de génération de cette réponse inflammatoire ne sont pas tous bien compris. Des réponses adaptatives telles que la voie HIF-1 α , l'inhibition de la voie mTOR, la réponse UPR ou l'autophagie qui ont comme actions « positives » la diminution de la consommation d'énergie, le recyclage d'énergie et de nutriments pour permettre à la cellule de survivre peuvent générer des signaux proinflammatoires (Sumpter and Levine, 2010; Zhang and Kaufman, 2008).

On ne sait pas actuellement si ces réponses, et notamment la réponse UPR, peuvent déclencher une réponse proinflammatoire au cours de l'ischémie rénale aiguë.

L'objectif de ce travail est de déterminer si des cellules tubulaires rénales soumises à un stress ischémique peuvent induire une réponse inflammatoire.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article n°2 intitulé « Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response » publié dans Cell Death and disease en avril 2011.

Nous montrons dans ce travail que la carence en glucose induit un stress du RE dans les cellules tubulaires rénales en activant les voies Perk et Ire1 α alors que l'hypoxie et la carence en acides aminés n'induisent pas cette réponse. La carence en glucose induit l'expression de certaines cytokines telles que IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 et RANTES avec un profil d'expression sensiblement similaire à celui induit par la tunicamycine, un inducteur du stress du RE. Il existe un profil biphasique avec une augmentation précoce de l'expression des transcrits (pics d'expression entre 2 et 8 heures) suivie d'une diminution débutant au-delà de 12 heures sauf pour RANTES dont l'expression continue au-delà de 12 heures. La carence en glucose active la voie NF- κ B. En réalisant de l'ARN interférence, on a pu montrer que la voie Perk n'est pas indispensable dans la genèse de la réponse inflammatoire mais que l'activation de la voie Perk entraîne néanmoins une augmentation de nombreuses cytokines. La voie Ire1 α est impliquée puisque l'inhibition de cette voie entraîne une diminution d'expression des cytokines proinflammatoires. On a montré dans le parenchyme rénal de rat que l'ischémie froide entraîne un stress du RE et une réponse inflammatoire. Enfin sur des biopsies rénales humaines préimplantatoires, on a montré qu'il existe une expression de BiP et de NF- κ B plus importante que sur des biopsies de greffon à 3 mois dont les patients ont une fonction rénale normale.

L'ischémie induit de nombreuses réponses adaptatives dont la réponse UPR dans des cellules tubulaires et le parenchyme rénal. Bien que cette voie de signalisation diminue la charge protéique dans le RE afin que la cellule survive, elle induit une réponse proinflammatoire pouvant favoriser la réponse immunitaire adaptative (Thaumat, 2011). Le mécanisme d'activation de la voie NF- κ B au cours du stress du RE n'est pas bien connu ; Perk et Ire1 α pourraient activer cette voie de différentes manières et induire des profils d'expression différents en intensité et dans la chronologie.

En conclusion, nous avons montré que l'ischémie induit le stress du RE dans les cellules tubulaires, active la voie UPR *in vitro* et *in vivo* induisant une réponse inflammatoire qui pourrait favoriser la réponse adaptative immunitaire adaptative.

Article n°2 en annexe

Fougeray, S, **Bouvier N**, Beaune P, Legendre C, Anglicheau D, Thervet E, Pallet N. Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response. *Cell Death Dis*, 2: e143, 2011.

C. LA REPONSE UPR REGULE LA REPONSE ANGIOGENIQUE DE L'EPITHELIUM RENAL PENDANT UN STRESS ISCHEMIQUE

Les agressions ischémiques dirigées contre le rein diminuent progressivement la viabilité cellulaire, induisent l'inflammation et la fibrose conduisant inexorablement à une destruction du parenchyme rénal. L'ischémie apparaît lorsque le débit sanguin ne satisfait plus aux besoins conduisant à un stress cellulaire. C'est un mécanisme commun pour de nombreuses maladies rénales chroniques (Mimura and Nangaku, 2010). La réponse cellulaire à l'ischémie va être de diminuer la consommation d'énergie et augmenter les apports : induction de la réponse UPR, de l'autophagie, de l'angiogenèse, inhibition de la voie mTOR. Malheureusement cette vision finaliste n'est pas parfaite et ces voies d'adaptation entraînent également une inflammation, une fibrose, une atrophie tubulaire, une raréfaction capillaire aggravant alors les lésions (Fine and Norman, 2008).

L'une des voies adaptatives à l'ischémie les plus connues et étudiées est la voie HIF-1 α (voir chapitre « La voie HIF-1 α ») (Majmundar et al., 2010) mais d'autres voies existent telles que la voie mTOR ou la réponse UPR (Bi et al., 2005; Drogat et al., 2007; Wouters and Koritzinsky, 2008).

On ne sait pas actuellement si la réponse UPR peut induire une réponse angiogénique pendant l'ischémie rénale.

L'objectif de cette étude est de déterminer si la réponse UPR peut induire une sécrétion de facteurs angiogéniques par l'épithélium tubulaire rénal au cours de l'ischémie.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article n°3 intitulé « The unfolded protein response regulates an angiogenic response by the kidney epithelium during ischemic stress » publié dans le Journal of Biological Chemistry en avril 2012.

Dans un premier temps, nous avons montré que la carence en glucose et l'hypoxie induisent l'expression des facteurs angiogéniques suivants : VEGF, bFGF et angiogénine ; tandis que le PDGF-B n'augmente que pendant l'hypoxie. Dans notre modèle la carence en glucose n'entraîne ni l'augmentation de la protéine HIF-1 α ni des gènes régulés par la voie HIF-1 α tels que PFKFB3 et Glut1. En revanche, la carence en glucose active la réponse UPR contrairement à l'hypoxie.

Dans un second temps, nous avons réalisé de l'ARN interférence dirigée vers les 3 principaux médiateurs de la réponse UPR afin de mieux déterminer la régulation des facteurs angiogéniques. Le VEGF et le bFGF sont régulés par la voie Perk tandis que l'angiogénine est régulée par les voies Perk et Ire1 α de façon opposée.

Enfin nous avons montré qu'il existe une expression des marqueurs angiogéniques et de la réponse UPR dans le cortex de reins de rat ayant été conservés dans l'IGL1[®], un liquide de conservation, afin de mimer l'ischémie froide au cours de la transplantation rénale.

Ainsi nous avons montré que la carence en glucose peut induire l'expression de facteurs angiogéniques par l'intermédiaire de la réponse UPR. Par ailleurs ce travail suggère que la réponse UPR pourrait induire la sécrétion non conventionnelle du bFGF qui ne possède pas de séquence signal (Nickel, 2011) et l'angiogénine, au-delà de ses propriétés angiogéniques (Li and Hu, 2012), pourrait permettre à la voie UPR d'inhiber la traduction indépendamment de la voie Perk.

Article n°3 en annexe

Bouvier N, Fougeray S, Beaune P, Thervet E, Pallet N. The unfolded protein response regulates an angiogenic response by the kidney epithelium during ischemic stress. *J Biol Chem* 2012; 287(18):14557-68.

D. IMPLICATION DU STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE EN TRANSPLANTATION RENALE (REVUE)

La transplantation rénale élargit grandement le champ de compétences du néphrologue qui prend en charge des patients greffés puisque des problématiques non néphrologiques apparaissent. Le futur organe doit être prélevé impliquant d'inévitables lésions d'ischémie-reperfusion, conservé et transporté dans des solutions spécifiques vers le futur receveur, implanté chez le receveur en minimisant les complications chirurgicales. Un traitement immunosuppresseur doit être instauré afin de limiter le risque de rejets mais suivi de façon précise afin de limiter sa toxicité sur le greffon (néphropathie d'allogreffe) et les complications chez le receveur (diabète, infections).

Dans une revue (article n°4) publiée dans *Médecine/Sciences* (Paris) en avril 2010, sont résumées les implications du stress du RE au cours de la vie du greffon et de son receveur. Après avoir décrit la réponse UPR, nous présentons quelques étapes de la greffe où le stress du RE est impliqué. L'arrêt cardiaque et l'ischémie-reperfusion provoquent un stress du RE avec une diminution de la synthèse protéique qui diffère selon les organes (Montie et al., 2005). Une meilleure préservation des organes est indispensable afin de limiter les lésions d'ischémie-reperfusion. De nouvelles approches sont à l'étude telles que les nouvelles solutions de préservation, les machines de perfusion et des additifs (Bon et al., 2012). Le stress du RE joue probablement un rôle dans cette étape critique. Les machines de perfusion semblent induire plus le stress du RE et l'apoptose que les solutions statiques ou les méthodes utilisant les deux techniques sans que la physiopathologie ne soit bien comprise (Manekeller et al., 2008; Minor et al., 2006). Par ailleurs dans un modèle animal de préservation du foie, la solution de préservation IGL-1[®] diminue le stress du RE par rapport à la solution UW[®] (Mosbah et al., 2012).

Le diabète est une complication fréquente de la transplantation (10 à 40% des patients) liée aux traitements immunosuppresseurs (dont le tacrolimus). Le stress du RE est impliqué dans sa pathogénie car il contribue au développement d'une insulino-résistance et à la mort des cellules β .

La ciclosporine induit le stress du RE dans les cellules tubulaires rénales (Pallet et al., 2008c) et induit des changements phénotypiques épithéliaux évocateurs de TEM participant à la formation de la fibrose (Pallet et al., 2008a).

Enfin la réponse UPR pourrait être une cible thérapeutique au cours de la transplantation d'organes. En effet le préconditionnement par des inducteurs du stress diminue le stress du RE. L'activation de certaines voies de la réponse UPR diminue également les implications néfastes du stress du RE. Certaines molécules telles que le 4-phénylbutyrate ou le TM2002 réduisent les actions délétères du stress du RE. De même l'inhibition de certaines voies d'aval du stress pourrait avoir un rôle bénéfique.

Article n°4 en annexe

Pallet N, **Bouvier N**, Beaune P, Legendre C, Anglicheau D, Thervet E. Implication du stress du réticulum endoplasmique en transplantation d'organe solide. *Med Sci (Paris)* 2010; 26: 397-403.

DISCUSSION

Ce travail de thèse s'est donc intéressé à mieux connaître les conséquences rénales de la réponse UPR au cours des stress toxique et ischémique. En effet la réponse UPR est impliquée dans de nombreux processus dans différents modèles cellulaires et pathologies humaines (Wang and Kaufman, 2012).

Ainsi sont présentés de nouveaux aspects de la réponse UPR en pathologie rénale : les cellules tubulaires rénales lors d'une carence en glucose induisent des réponses angiogénique (Bouvier et al., 2012) et inflammatoire (Fougeray et al., 2011) médiées par la réponse UPR et les cellules endothéliales artérielles traitées par la ciclosporine présentent des modifications phénotypiques endothéliales également médiées par la réponse UPR (Bouvier et al., 2009).

1. CHOIX DES MODELES

La ciclosporine a été choisie initialement car elle faisait l'objet d'études importantes au laboratoire car c'est une molécule néphrotoxique bien connue en transplantation rénale. Il a été montré qu'elle induit des modifications phénotypiques épithéliales et endothéliales, l'autophagie et la mort cellulaire en impliquant le stress du RE. Néanmoins comme nous l'avons décrit dans l'introduction la toxicité de la ciclosporine peut impliquer de nombreux médiateurs et nous n'avons pas pu déterminer si les conséquences de la ciclosporine sont dues à son rôle propre ou si cela implique d'autres intermédiaires. Ce qui est intéressant de noter, c'est qu'il est souvent considéré que la ciclosporine et le tacrolimus possèdent le même potentiel fibrogénique (Roos-van Groningen et al., 2006) en pratique clinique mais dans notre étude nous n'avons pas mis en évidence de rôle toxique du tacrolimus même en étudiant ses principaux métabolites. Peu de travaux ont étudié la toxicité du tacrolimus *in vitro* et nous n'avons donc pas d'éléments satisfaisants pour expliquer une telle différence entre les deux inhibiteurs de la calcineurine *in vitro* et leur toxicité sensiblement comparable *in vivo* : la différence de

toxicité entre la ciclosporine et le tacrolimus pourrait être liée à des différences dans l'inhibition plus ou moins spécifiques des différentes sous-unités de la calcineurine.

Il est connu que la ciclosporine induit, entre autres, une vasoconstriction aiguë et chronique contribuant à l'ischémie rénale. Ce phénomène est présent dans de nombreuses autres situations et englobe différents constituants : l'ischémie est composée d'une anoxie, d'une carence en glucose, en acides aminés, en cytokines... et qu'elle induit de nombreuses voies adaptatives dont la plus connue est la voie HIF-1 α . Nous avons choisi la carence en glucose afin d'éviter les mécanismes de régulation croisés entre la réponse UPR et la voie HIF-1 α et nous n'avons donc pas choisi un modèle d'hypoxie. De plus, dans notre modèle, l'hypoxie n'entraîne pas de réponse UPR probablement parce qu'il n'existe pas une anoxie totale mais seulement une hypoxie (0.1% d'oxygène). En effet si l'on avait choisi un modèle d'hypoxie il aurait été difficile de faire la part entre les différentes réponses.

2. LES MODIFICATIONS PHENOTYPIQUES ENDOTHELIALES

Les modifications phénotypiques endothéliales observées au cours de notre étude sont évocatrices de TEndM mais ce phénomène ne peut pas être affirmé complètement car même si certaines cellules expriment de façon concomitante *in vivo* PECAM-I et α SMA, on ne peut pas affirmer de façon certaine l'origine endothéliale de la cellule ayant le double marquage. Un travail de Zeisberg *et al.* est paru en même temps que le nôtre et décrit la TEndM de façon plus démonstrative puisqu'ils ont utilisé, d'une part, trois modèles différents de maladie rénale chronique et retrouvent, d'autre part, des fibroblastes activés ayant un marquage d'origine endothéliale (PECAM-1) confirmant la TEndM. Environ 30 à 50 % du contingent de fibroblastes exprime à la fois un marqueur endothélial et un marqueur fibroblastique (Zeisberg *et al.*, 2008). Dans notre modèle de toxicité cette prévalence de TEndM n'est pas aussi importante et représente probablement moins de 10% des fibroblastes activés. Néanmoins dans le travail de Zeisberg *et al.* il s'agit d'une étude descriptive et il n'y a pas d'explication mécanistique. Dans notre travail nous avons montré pour la première fois que la ciclosporine induit un stress du RE dans les cellules endothéliales et que celui-ci est potentiellement impliqué

dans les modifications phénotypiques endothéliales. En effet la diminution des lésions, la moindre diminution de l'expression de PECAM-1 et la moindre augmentation de l'expression de α SMA lors d'un traitement par salubrinal montrent que la voie Perk/eIF2 α pourrait être impliquée dans l'apparition de la TEndM.

3. LA REPONSE INFLAMMATOIRE

L'inflammation est un processus pléomorphe fréquent et joue un rôle obligatoire dans les processus de réparation, de cicatrisation (fibrose) et d'angiogenèse.

Nous avons montré un lien entre la carence en glucose, la réponse UPR et la réponse inflammatoire. Il est intéressant de constater que l'activation de NF- κ B est transitoire avec une relation inverse avec I κ B. En effet I κ B séquestre NF- κ B et empêche sa translocation dans le noyau, inhibant ainsi l'initiation de la réponse inflammatoire. On constate par ailleurs que l'augmentation de NF- κ B est très précoce et que son expression rediminue assez rapidement. L'activation de la voie Perk/eIF2 α entraîne une augmentation de cytokines inflammatoires tandis que son inhibition ne modifie pas le profil transcriptionnel. En revanche l'inhibition d'Ire1 diminue la réponse inflammatoire.

Il est déjà connu que Ire1 peut contrôler NF- κ B en se liant à TRAF2. Ce complexe Ire1-TRAF2 va induire le recrutement de IKK et va inhiber l'action de I κ B (Hu et al., 2006). La voie Perk/eIF2 α peut également moduler la réponse inflammatoire sans modifier l'état de phosphorylation de I κ B mais en diminuant sa traduction suite à la diminution globale de la traduction puisque sa demi-vie est plus courte que celle de NF- κ B (Deng et al., 2004) et ceci pourrait également expliquer l'apparition seulement transitoire de NF- κ B dans notre travail. Il n'y a pas eu d'étude concernant ATF6 et l'on a vu précédemment que cette voie de la réponse UPR peut aussi moduler la réponse de NF- κ B (Kitamura, 2009).

Le profil biphasique (une augmentation puis une décroissance de l'expression) des cytokines inflammatoires pourrait également être en partie médié par la réponse UPR. En effet, certains travaux montrent que l'induction chimique de la réponse UPR peut diminuer la réponse inflammatoire après une phase d'activation précoce (Hayakawa et

al., 2008). Un traitement par des inducteurs du stress du RE peut aussi induire une augmentation de la dégradation de TRAF2 qui induit une diminution de la phosphorylation de I κ B et donc l'absence de libération de NF- κ B (Kitamura, 2009). Certains auteurs ont également évoqué l'implication du facteur transcriptionnel C/EBP β dans l'inhibition de NF- κ B en interagissant avec la sous-unité p65 de NF- κ B (Hayakawa et al., 2010; Kitamura, 2009). Nous avons observé dans notre travail une augmentation transitoire de la transcription du facteur C/EBP β à 2 et 4 heures de traitement sans glucose et pourrait également expliquer la diminution de la réponse inflammatoire à la phase tardive.

Cette régulation biphasique pourrait également être la conséquence d'une diminution de la phosphorylation de eIF2 α liée à des mécanismes de rétrocontrôle tels que GADD34 montrant qu'il s'agit d'un processus dynamique dépendant de l'intensité et de la durée du stress induit.

4. LA REPOSE ANGIOGENIQUE

Dans ce travail, nous avons montré que la carence en glucose induit l'expression de facteurs angiogéniques par l'intermédiaire de la réponse UPR comme cela a été découvert dans le domaine de la cancérologie (Drogat et al., 2007). Ce travail ouvre de nouvelles perspectives sur d'éventuelles thérapeutiques afin d'augmenter l'angiogenèse notamment après des lésions d'ischémie-reperfusion post-transplantation. Néanmoins l'une des principales limites est que nous n'avons mis en évidence que l'augmentation de facteurs angiogéniques et que nous n'avons pas montré l'augmentation d'un réseau vasculaire dans un modèle *in vitro* complexe ou *in vivo*. Par ailleurs le VEGF et le bFGF ont un potentiel pro-inflammatoire qui n'a pas été évalué dans ce travail. Rappelons néanmoins qu'un microenvironnement inflammatoire est nécessaire à l'angiogenèse.

L'intérêt de ce travail a permis de montrer que la régulation du VEGF est différente d'autres travaux (Drogat et al., 2007; Ghosh et al., 2010; Pereira et al., 2010) puisque nous retrouvons seulement une régulation du VEGF par la voie Perk/eIF2 α .

Par ailleurs deux autres points nous semblent importants : il s'agit de la différence de régulation entre les transcrits et la sécrétion du bFGF et l'activité non-angiogénique de l'angiogénine qui est l'inhibition de la traduction protéique par l'intermédiaire des tRNAs.

La plupart des protéines possède une séquence signal leur permettant dans le RE d'être enveloppées dans des vésicules de transport, d'aller dans l'appareil de Golgi puis d'être libérées dans l'espace extracellulaire suite à la fusion de la vésicule avec la membrane plasmique. Certaines protéines comme bFGF (Florkiewicz et al., 1995) ou IL-1 β ne possèdent pas cette séquence signal et ne sont pas transportées vers l'extérieur par l'intermédiaire du RE. Ce système de sécrétion indépendant du RE et de l'appareil de Golgi s'intègre dans les processus de sécrétion non conventionnelle. La sécrétion du bFGF est peu connue même si un processus semble émerger (voir chapitre « La famille des FGFs ») (Nickel, 2011). Plusieurs voies de sécrétion non conventionnelle sont évoquées : sécrétion par l'intermédiaire des lysosomes ou des exosomes, translocation directe des facteurs par l'intermédiaire de canaux spécifiques ou par la formation d'exovésicules à partir de la membrane plasmique (« membrane blebbing ») (Nickel, 2005). Il a été montré que la sécrétion du bFGF est dépendante de la caspase 1 à l'intérieur des inflammasomes puis qu'il est libéré dans l'espace extracellulaire (Keller et al., 2008). Récemment Gee *et al.* a mis en évidence que le stress du RE peut être impliqué dans la sécrétion non conventionnelle de $\Delta F508$ -CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) qui est le récepteur muté de CFTR dans la mucoviscidose par l'intermédiaire de GRASPs (Golgi reassembly stacking proteins) (Gee et al., 2011). La sécrétion d'IL-1 β dépend à la fois de deux GRASPs mais aussi de la protéine Atg5 et de l'inflammasome (Dupont et al., 2011). La formation des amphisomes qui résulte de la fusion entre les autophagosomes et les corps multivésiculaires implique la présence de certaines protéines comme Atg1, Atg6 et Atg8 qui sont nécessaires à la formation des autophagosomes (Manjithaya and Subramani, 2011). Or la voie UPR peut réguler l'autophagie, ainsi la régulation de la sécrétion de bFGF par la voie Perk pourrait être médiée par les processus d'autophagie et de sécrétion non conventionnelle.

L'autre point novateur du travail est la régulation de l'angiogénine par Ire1 et Perk. En effet au-delà des propriétés angiogéniques de cette molécule (Tello-Montoliu et al., 2006), l'angiogénine possède également une activité ribonucléasique lui permettant de

cliver les ARNt en tiRNAs. Ces derniers peuvent alors inhiber la traduction protéique globale (Li and Hu, 2012). Nous avons montré que l'inhibition de la voie Perk et l'activation de la voie Ire1 engendrent une augmentation de l'angiogénine tandis que l'activation de la voie Perk et l'inhibition de la voie Ire1 diminuent l'expression d'angiogénine.

Ainsi on émet l'hypothèse que Ire1 pourrait inhiber la traduction protéique par l'intermédiaire de l'angiogénine notamment quand la voie Perk/eIF2 α est défaillante.

5. BIOMARQUEURS ET THERAPEUTIQUES FUTURS

L'une des implications de ces travaux serait la validation de biomarqueurs. L'autre finalité du travail est d'envisager la mise au point de nouvelles thérapeutiques. Plusieurs processus pathologiques y semblent accessibles. Nous nous intéresserons plus particulièrement au traitement des lésions d'ischémie-reperfusion et du stress du RE.

A. LES BIOMARQUEURS

BiP pourrait être un bon biomarqueur. En effet on a montré chez l'homme qu'il existe une association entre la protéine BiP et NF- κ B dans des biopsies de greffons rénaux à 3 mois de greffe (Fougeray et al., 2011). Un travail au laboratoire a montré que la présence de BiP dans des biopsies de greffons à 3 mois est associée à la fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire (Pallet, données personnelles). Une étude préliminaire sur l'analyse des protéines salivaires au cours de la polyarthrite rhumatoïde a permis de trouver une association entre BiP et la maladie (Giusti et al., 2010). Des études sont également réalisées en cancérologie : en effet il existe une relation entre la présence de BiP, le récepteur aux androgènes et un plus mauvais pronostic dans les cancers de la prostate (Tan et al., 2011).

B. LE TRAITEMENT DES LÉSIONS D'ISCHEMIE-REPERFUSION

Plusieurs traitements sont actuellement en cours de développement dans le domaine de l'ischémie-reperfusion qui touche, au-delà de la transplantation d'organes, la cardiologie (revascularisation de l'infarctus), la neurologie (accident vasculaire cérébral), la pathologie artérielle...

Le conditionnement ischémique est l'exposition d'un organe, d'un tissu à de courts épisodes non létaux d'ischémie conduisant à une diminution des lésions d'ischémie-reperfusion. Il existe différentes sortes de conditionnement : le préconditionnement, le post-conditionnement et le conditionnement à distance. Mahfoudh-Boussaid *et al.* a montré que le préconditionnement ischémique dans un modèle d'ischémie rénale de rats diminue le stress du RE et augmente l'expression de HIF-1 α (Mahfoudh-Boussaid *et al.*, 2012). Une technique prometteuse est peut-être le conditionnement à distance puisque celui-ci peut être aisément réalisé sur un membre. En effet, dans une étude randomisée chez des patients ayant un infarctus du myocarde, le conditionnement à distance diminue la zone infarctée (Botker *et al.*, 2010).

L'utilisation de gaz tels que le NO, le dihydrogène, l'hydroxyde de soufre ou le monoxyde de carbone pourrait également diminuer les lésions d'ischémie-reperfusion (Eltzschig and Eckle, 2011). Le NO, par exemple, a amélioré la fonction hépatique et a diminué l'apoptose des hépatocytes chez 10 receveurs de greffe hépatique (Lang *et al.*, 2007).

Des molécules activant la voie HIF-1 α comme les inhibiteurs de PHDs amélioreraient les lésions d'ischémie-reperfusion. Dans un modèle de transplantation rénale chez le rat, le prétraitement par l'inhibiteur de PHD améliore la fonction rénale, diminue la mortalité et améliore la survie (Bernhardt *et al.*, 2009).

Des traitements par l'érythropoïétine recombinante humaine (rhEPO) ont été évoqués en transplantation d'organes ou dans l'infarctus du myocarde : leurs résultats sont un peu décevants puisque la rhEPO ne réduit pas la prévalence de reprise retardée de fonction (Martinez *et al.*, 2010) mais diminue néanmoins la progression de la néphropathie d'allogreffe (Choukroun *et al.*, 2012) ou après un infarctus (Nishiya *et al.*, 2006).

Enfin on peut également évoquer les traitements par les modulateurs de micro-ARNs puisqu'ils sont impliqués dans la réponse à l'ischémie (Eltzschig and Eckle, 2011).

C. LE TRAITEMENT DU STRESS DU RE

Le stress du RE est également accessible à des traitements et ils font l'objet d'études dans différents domaines comme dans les maladies neurodégénératives, le diabète, les maladies rénales.

En premier lieu, on peut évoquer le préconditionnement par les inducteurs du stress à doses infratoxiques. Par exemple, dans un modèle de glomérulonéphrite mésangioproliférative chez le rat, un prétraitement par des inducteurs du stress du RE diminue les lésions histologiques et la protéinurie induite (Inagi et al., 2008). Dans un modèle de néphrite de Heymann chez le rat, le préconditionnement avec la tunicamycine à faible dose diminue la protéinurie (Cybulsky, 2010).

Un traitement par des molécules chimiques chaperonnes telles que le 4-phénylbutyrate ou l'acide tauroursodéoxycholique permet d'améliorer la capacité de conformation des protéines et facilite le trafic des protéines mal conformées (Inagi, 2009), peut diminuer les effets négatifs du stress du RE comme dans la maladie d'Alzheimer (Cuadrado-Tejedor et al., 2011) ou la néphropathie diabétique (Luo et al., 2010).

Le salubrinal est une petite molécule chimique qui a été découverte en 2005 (Boyce et al., 2005). Il inhibe la déphosphorylation de eIF2 α en se fixant à GADD34 empêchant ainsi la fixation de PP1 sur cette protéine (Fullwood et al., 2012). Notre équipe a montré dans plusieurs travaux que cette molécule peut avoir un rôle bénéfique (Bouvier et al., 2009; Bouvier et al., 2012; Fougeray et al., 2011; Pallet et al., 2008a) mais il existe également un rôle bénéfique dans les maladies neurodégénératives ou le myélome résistant au bortézomib (Fullwood et al., 2012). En revanche il peut induire un diabète et est toxique pour les cellules β du pancréas (Cnop et al., 2007).

La modification ou la modulation de Ire1 pourrait induire une activation plus importante de la voie Ire1/XBP1 entraînant une diminution de la mort cellulaire lorsque

les cellules sont soumises à un stress du RE (Bouhecareilh et al., 2011). Un traitement par des inhibiteurs de kinase pourrait induire une voie alternative à l'épissage de XBP1 entraînant une diminution de la dégradation de protéines chaperonnes (Han et al., 2009).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis de mettre en avant d'autres rôles de la réponse UPR dans le domaine de la pathologie rénale et de montrer que de nombreuses conséquences aux stress sont induites par l'intermédiaire de processus redondants comme l'angiogenèse ou l'inflammation qui peuvent être médiés par la voie HIF-1 α ou la voie UPR.

Cela montre ainsi la complexité et la redondance des voies de signalisation et il paraît donc illusoire de vouloir activer ou inhiber un processus final par la modulation d'une seule voie de signalisation. Ainsi il est donc important d'étudier d'autres voies de signalisation différentes de HIF-1 α pour mieux appréhender les problèmes liés à l'ischémie.

Nous envisageons de poursuivre ce travail dans plusieurs directions. Une première voie de recherche est la régulation de l'angiogénine par la voie UPR qui pourrait déboucher sur la découverte d'un autre mécanisme d'inhibition traductionnelle dépendant de la voie UPR. Il serait également intéressant de mieux comprendre la régulation de la sécrétion du bFGF dépendant de la voie Perk/eIF2 α pour savoir si ce processus est médié par l'autophagie ou non. Enfin évaluer la pertinence de biomarqueurs comme BiP dans les biopsies de greffons rénaux afin de détecter une fibrose interstitielle à venir permettrait de modifier les thérapeutiques en cours et améliorer la survie du greffon à plus long terme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agence de la Biomédecine (2011). Rapport annuel 2011.
- Anders, H.J., and Schlondorff, D.O. (2010). Innate immune receptors and autophagy: implications for autoimmune kidney injury. *Kidney Int* 78, 29-37.
- Andrae, J., Gallini, R., and Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & development* 22, 1276-1312.
- Anglicheau, D., Pallet, N., Rabant, M., Marquet, P., Cassinat, B., Meria, P., Beaune, P., Legendre, C., and Thervet, E. (2006). Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine-sirolimus interaction. *Kidney Int* 70, 1019-1025.
- Anglicheau, D., Thervet, E., Etienne, I., Hurault De Ligny, B., Le Meur, Y., Touchard, G., Buchler, M., Laurent-Puig, P., Tregouet, D., Beaune, P., *et al.* (2004). CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clinical pharmacology and therapeutics* 75, 422-433.
- Antoniak, S., Pawlinski, R., and Mackman, N. (2011). Protease-activated receptors and myocardial infarction. *IUBMB life* 63, 383-389.
- Arciniegas, E., Frid, M.G., Douglas, I.S., and Stenmark, K.R. (2007). Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 293, L1-8.
- Asada, R., Kanemoto, S., Kondo, S., Saito, A., and Imaizumi, K. (2011). The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology. *Journal of biochemistry* 149, 507-518.
- Atkinson, C., Varela, J.C., and Tomlinson, S. (2009). Complement-dependent inflammation and injury in a murine model of brain dead donor hearts. *Circulation research* 105, 1094-1101.
- Back, S.H., and Kaufman, R.J. (2012). Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annual review of biochemistry* 81, 767-793.
- Bae, S.H., Jeong, J.W., Park, J.A., Kim, S.H., Bae, M.K., Choi, S.J., and Kim, K.W. (2004). Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications* 324, 394-400.
- Bailly-Maitre, B., Fondevila, C., Kaldas, F., Droin, N., Luciano, F., Ricci, J.E., Croxton, R., Krajewska, M., Zapata, J.M., Kupiec-Weglinski, J.W., *et al.* (2006). Cytoprotective gene bi-1 is required for intrinsic protection from endoplasmic reticulum stress and ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2809-2814.
- Bando, Y., Tsukamoto, Y., Katayama, T., Ozawa, K., Kitao, Y., Hori, O., Stern, D.M., Yamauchi, A., and Ogawa, S. (2004). ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium

from ischemia-induced cell death. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 1401-1403.

Bang, C., Fiedler, J., and Thum, T. (2012). Cardiovascular importance of the microRNA-23/27/24 family. *Microcirculation* 19, 208-214.

Beenken, A., and Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature reviews Drug discovery* 8, 235-253.

Bernhardt, W.M., Gottmann, U., Doyon, F., Buchholz, B., Campean, V., Schodel, J., Reisenbuechler, A., Klaus, S., Arend, M., Flippin, L., *et al.* (2009). Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogenic kidney transplant model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21276-21281.

Berta, M.A., Mazure, N., Hattab, M., Pouyssegur, J., and Brahimi-Horn, M.C. (2007). SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1 α reduces its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications* 360, 646-652.

Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., Harding, H., Novoa, I., Varia, M., Raleigh, J., *et al.* (2005). ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J* 24, 3470-3481.

Biswas, S., Gupta, M.K., Chattopadhyay, D., and Mukhopadhyay, C.K. (2007). Insulin-induced activation of hypoxia-inducible factor-1 requires generation of reactive oxygen species by NADPH oxidase. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 292, H758-766.

Blotiere, P.O., Tuppin, P., Weill, A., Ricordeau, P., and Allemand, H. (2010). [The cost of dialysis and kidney transplantation in France in 2007, impact of an increase of peritoneal dialysis and transplantation]. *Nephrologie & therapeutique* 6, 240-247.

Bobadilla, N.A., and Gamba, G. (2007). New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F2-9.

Bon, D., Chatauret, N., Giraud, S., Thuillier, R., Favreau, F., and Hauet, T. (2012). New strategies to optimize kidney recovery and preservation in transplantation. *Nature reviews Nephrology* 8, 339-347.

Bonauer, A., Carmona, G., Iwasaki, M., Mione, M., Koyanagi, M., Fischer, A., Burchfield, J., Fox, H., Doebele, C., Ohtani, K., *et al.* (2009). MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science* 324, 1710-1713.

Bonventre, J.V., and Yang, L. (2011). Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 121, 4210-4221.

Border, W.A., and Noble, N.A. (1994). Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *The New England journal of medicine* 331, 1286-1292.

Botker, H.E., Kharbanda, R., Schmidt, M.R., Bottcher, M., Kalltoft, A.K., Terkelsen, C.J., Munk, K., Andersen, N.H., Hansen, T.M., Trautner, S., *et al.* (2010). Remote ischaemic

conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet* 375, 727-734.

Bouhccareilh, M., Higa, A., Fribourg, S., Moenner, M., and Chevet, E. (2011). Peptides derived from the bifunctional kinase/RNase enzyme IRE1alpha modulate IRE1alpha activity and protect cells from endoplasmic reticulum stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, 3115-3129.

Bouvier, N., Flinois, J.P., Gilleron, J., Sauvage, F.L., Legendre, C., Beaune, P., Thervet, E., Anglicheau, D., and Pallet, N. (2009). Cyclosporine triggers endoplasmic reticulum stress in endothelial cells: a role for endothelial phenotypic changes and death. *Am J Physiol Renal Physiol* 296, F160-169.

Bouvier, N., Fougeray, S., Beaune, P., Thervet, E., and Pallet, N. (2012). The unfolded protein response regulates an angiogenic response by the kidney epithelium during ischemic stress. *J Biol Chem* 287, 14557-14568.

Boyce, M., Bryant, K.F., Jousse, C., Long, K., Harding, H.P., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ma, D., Coen, D.M., Ron, D., *et al.* (2005). A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307, 935-939.

Brait, V.H., Arumugam, T.V., Drummond, G.R., and Sobey, C.G. (2012). Importance of T lymphocytes in brain injury, immunodeficiency, and recovery after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 598-611.

Branco-Price, C., Zhang, N., Schnelle, M., Evans, C., Katschinski, D.M., Liao, D., Ellies, L., and Johnson, R.S. (2012). Endothelial cell HIF-1alpha and HIF-2alpha differentially regulate metastatic success. *Cancer cell* 21, 52-65.

Brugarolas, J., and Kaelin, W.G., Jr. (2004). Dysregulation of HIF and VEGF is a unifying feature of the familial hamartoma syndromes. *Cancer cell* 6, 7-10.

Buetler, T.M., Cottet-Maire, F., Krauskopf, A., and Ruegg, U.T. (2000). Does cyclosporin A generate free radicals? *Trends in pharmacological sciences* 21, 288-290.

Carbia-Nagashima, A., Gerez, J., Perez-Castro, C., Paez-Pereda, M., Silberstein, S., Stalla, G.K., Holsboer, F., and Arzt, E. (2007). RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell* 131, 309-323.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298-307.

Carroll, V.A., and Ashcroft, M. (2006). Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res* 66, 6264-6270.

- Cauduro, R.L., Costa, C., Lhulier, F., Garcia, R.G., Cabral, R.D., Goncalves, L.F., and Manfro, R.C. (2005). Endothelin-1 plasma levels and hypertension in cyclosporine-treated renal transplant patients. *Clinical transplantation* *19*, 470-474.
- Cenci, S., and Sitia, R. (2007). Managing and exploiting stress in the antibody factory. *FEBS letters* *581*, 3652-3657.
- Chakrabarti, A., Chen, A.W., and Varner, J.D. (2011). A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnology and bioengineering* *108*, 2777-2793.
- Chalasan, G., Li, Q., Konieczny, B.T., Smith-Diggs, L., Wrobel, B., Dai, Z., Perkins, D.L., Baddoura, F.K., and Lakkis, F.G. (2004). The allograft defines the type of rejection (acute versus chronic) in the face of an established effector immune response. *Journal of immunology* *172*, 7813-7820.
- Chang, C.T., Hung, C.C., Yang, C.W., Vandewalle, A., and Wu, M.S. (2005). Cyclosporine decreases prostaglandin E2 production in mouse medullary thick ascending limb cultured cells. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* *18*, 871-878.
- Chen, G., and Pedra, J.H. (2010). The inflammasome in host defense. *Sensors* *10*, 97-111.
- Chen, L., Endler, A., and Shibasaki, F. (2009). Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Experimental & molecular medicine* *41*, 849-857.
- Chen, S., He, F.F., Wang, H., Fang, Z., Shao, N., Tian, X.J., Liu, J.S., Zhu, Z.H., Wang, Y.M., Wang, S., *et al.* (2011). Calcium entry via TRPC6 mediates albumin overload-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in podocytes. *Cell calcium* *50*, 523-529.
- Chen, Y., and Gorski, D.H. (2008). Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood* *111*, 1217-1226.
- Chiang, C.K., Hsu, S.P., Wu, C.T., Huang, J.W., Cheng, H.T., Chang, Y.W., Hung, K.Y., Wu, K.D., and Liu, S.H. (2011). Endoplasmic reticulum stress implicated in the development of renal fibrosis. *Mol Med* *17*, 1295-1305.
- Chiong, M., Wang, Z.V., Pedrozo, Z., Cao, D.J., Troncoso, R., Ibacache, M., Criollo, A., Nemchenko, A., Hill, J.A., and Lavandero, S. (2011). Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis* *2*, e244.
- Choukroun, G., Kamar, N., Dussol, B., Etienne, I., Cassuto-Viguiet, E., Toupance, O., Glowacki, F., Moulin, B., Lebranchu, Y., Touchard, G., *et al.* (2012). Correction of postkidney transplant anemia reduces progression of allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* *23*, 360-368.
- Christopher, K., Mueller, T.F., Ma, C., Liang, Y., and Perkins, D.L. (2002). Analysis of the innate and adaptive phases of allograft rejection by cluster analysis of transcriptional profiles. *Journal of immunology* *169*, 522-530.

- Civelek, M., Manduchi, E., Riley, R.J., Stoeckert, C.J., Jr., and Davies, P.F. (2009). Chronic endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response in arterial endothelium in regions of susceptibility to atherosclerosis. *Circulation research* 105, 453-461.
- Cnop, M., Ladriere, L., Hekerman, P., Ortis, F., Cardozo, A.K., Dogusan, Z., Flamez, D., Boyce, M., Yuan, J., and Eizirik, D.L. (2007). Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis. *J Biol Chem* 282, 3989-3997.
- Coggins, M., and Rosenzweig, A. (2012). The fire within: cardiac inflammatory signaling in health and disease. *Circulation research* 110, 116-125.
- Compernelle, V., Brusselmans, K., Acker, T., Hoet, P., Tjwa, M., Beck, H., Plaisance, S., Dor, Y., Keshet, E., Lupu, F., *et al.* (2002). Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nature medicine* 8, 702-710.
- Coresh, J., Selvin, E., Stevens, L.A., Manzi, J., Kusek, J.W., Eggers, P., Van Lente, F., and Levey, A.S. (2007). Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 298, 2038-2047.
- Covello, K.L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J.D., Arsham, A.M., Hu, C.J., Labosky, P.A., Simon, M.C., and Keith, B. (2006). HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & development* 20, 557-570.
- Cox, J.S., Chapman, R.E., and Walter, P. (1997). The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Molecular biology of the cell* 8, 1805-1814.
- Cuadrado-Tejedor, M., Garcia-Osta, A., Ricobaraza, A., Oyarzabal, J., and Franco, R. (2011). Defining the mechanism of action of 4-phenylbutyrate to develop a small-molecule-based therapy for Alzheimer's disease. *Current medicinal chemistry* 18, 5545-5553.
- Cybulsky, A.V. (2010). Endoplasmic reticulum stress in proteinuric kidney disease. *Kidney Int* 77, 187-193.
- Cybulsky, A.V., Takano, T., Papillon, J., Khadir, A., Liu, J., and Peng, H. (2002). Complement C5b-9 membrane attack complex increases expression of endoplasmic reticulum stress proteins in glomerular epithelial cells. *J Biol Chem* 277, 41342-41351.
- Daemen, M.A., de Vries, B., and Buurman, W.A. (2002). Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation* 73, 1693-1700.
- de Vries, D.K., Schaapherder, A.F., and Reinders, M.E. (2012). Mesenchymal stromal cells in renal ischemia/reperfusion injury. *Frontiers in immunology* 3, 162.
- Deng, J., Lu, P.D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Sonenberg, N., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). Translational repression mediates activation of nuclear factor

kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Molecular and cellular biology* 24, 10161-10168.

Dery, M.A., Michaud, M.D., and Richard, D.E. (2005). Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 535-540.

Dickhout, J.G., Carlisle, R.E., and Austin, R.C. (2011). Interrelationship between cardiac hypertrophy, heart failure, and chronic kidney disease: endoplasmic reticulum stress as a mediator of pathogenesis. *Circulation research* 108, 629-642.

Dickhout, J.G., and Krepinsky, J.C. (2009). Endoplasmic reticulum stress and renal disease. *Antioxidants & redox signaling* 11, 2341-2352.

Dihazi, H., Dihazi, G.H., Mueller, C., Lahrichi, L., Asif, A.R., Bibi, A., Eltoweissy, M., Vasko, R., and Mueller, G.A. (2011). Proteomics characterization of cell model with renal fibrosis phenotype: osmotic stress as fibrosis triggering factor. *Journal of proteomics* 74, 304-318.

Ding, W., Yang, L., Zhang, M., and Gu, Y. (2012). Reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress contributes to aldosterone-induced apoptosis in tubular epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 418, 451-456.

Ding, W.X., Ni, H.M., Gao, W., Hou, Y.F., Melan, M.A., Chen, X., Stolz, D.B., Shao, Z.M., and Yin, X.M. (2007). Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem* 282, 4702-4710.

Djamali, A., Reese, S., Hafez, O., Vidyasagar, A., Jacobson, L., Swain, W., Kolehmainen, C., Huang, L., Wilson, N.A., and Torrealba, J.R. (2012). Nox2 is a Mediator of Chronic CsA Nephrotoxicity. *Am J Transplant* 12, 1997-2007.

Dobaczewski, M., and Frangogiannis, N.G. (2009). Chemokines and cardiac fibrosis. *Frontiers in bioscience* 1, 391-405.

Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J., and Hinnebusch, A.G. (2000). Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol Cell* 6, 269-279.

Doyle, K.M., Kennedy, D., Gorman, A.M., Gupta, S., Healy, S.J., and Samali, A. (2011). Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *Journal of cellular and molecular medicine* 15, 2025-2039.

Drogat, B., Auguste, P., Nguyen, D.T., Bouche-careilh, M., Pineau, R., Nalbantoglu, J., Kaufman, R.J., Chevet, E., Bikfalvi, A., and Moenner, M. (2007). IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Res* 67, 6700-6707.

Dumont, F.J., Staruch, M.J., Koprak, S.L., Siekierka, J.J., Lin, C.S., Harrison, R., Sewell, T., Kindt, V.M., Beattie, T.R., Wyvratt, M., *et al.* (1992). The immunosuppressive and toxic effects of FK-506 are mechanistically related: pharmacology of a novel antagonist of FK-506 and rapamycin. *The Journal of experimental medicine* 176, 751-760.

- Dupont, N., Jiang, S., Pilli, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D., and Deretic, V. (2011). Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1beta. *EMBO J* 30, 4701-4711.
- Eltzschig, H.K., and Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nature medicine* 17, 1391-1401.
- Fagiani, E., and Christofori, G. (2012). Angiopoietins in Angiogenesis. *Cancer letters*.
- Feria, I., Pichardo, I., Juarez, P., Ramirez, V., Gonzalez, M.A., Uribe, N., Garcia-Torres, R., Lopez-Casillas, F., Gamba, G., and Bobadilla, N.A. (2003). Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 63, 43-52.
- Ferrara, N., and Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 161, 851-858.
- Fewell, S.W., Travers, K.J., Weissman, J.S., and Brodsky, J.L. (2001). The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet* 35, 149-191.
- Fine, L.G., and Norman, J.T. (2008). Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney Int* 74, 867-872.
- Floege, J., Eitner, F., and Alpers, C.E. (2008). A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 19, 12-23.
- Florkiewicz, R.Z., Majack, R.A., Buechler, R.D., and Florkiewicz, E. (1995). Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *Journal of cellular physiology* 162, 388-399.
- Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., and Williams, G. (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *The Journal of experimental medicine* 133, 275-288.
- Foster, K.G., andingar, D.C. (2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem* 285, 14071-14077.
- Fougeray, S., Bouvier, N., Beaune, P., Legendre, C., Anglicheau, D., Thervet, E., and Pallet, N. (2011). Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response. *Cell Death Dis* 2, e143.
- Fragiadaki, M., and Mason, R.M. (2011). Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis - evidence for and against. *International journal of experimental pathology* 92, 143-150.
- Frank, J., Engler-Blum, G., Rodemann, H.P., and Muller, G.A. (1993). Human renal tubular cells as a cytokine source: PDGF-B, GM-CSF and IL-6 mRNA expression in vitro. *Experimental nephrology* 1, 26-35.
- Fullwood, M.J., Zhou, W., and Shenolikar, S. (2012). Targeting phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha to treat human disease. *Progress in molecular biology and translational science* 106, 75-106.

- Gee, H.Y., Noh, S.H., Tang, B.L., Kim, K.H., and Lee, M.G. (2011). Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell* 146, 746-760.
- Ghosh, R., Lipson, K.L., Sargent, K.E., Mercurio, A.M., Hunt, J.S., Ron, D., and Urano, F. (2010). Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS One* 5, e9575.
- Giusti, L., Baldini, C., Ciregia, F., Giannaccini, G., Giacomelli, C., De Feo, F., Delle Sedie, A., Riente, L., Lucacchini, A., Bazzichi, L., *et al.* (2010). Is GRP78/BiP a potential salivary biomarker in patients with rheumatoid arthritis? *Proteomics Clinical applications* 4, 315-324.
- Godlewski, J., Nowicki, M.O., Bronisz, A., Nuovo, G., Palatini, J., De Lay, M., Van Brocklyn, J., Ostrowski, M.C., Chiocca, E.A., and Lawler, S.E. (2010). MicroRNA-451 regulates LKB1/AMPK signaling and allows adaptation to metabolic stress in glioma cells. *Mol Cell* 37, 620-632.
- Gooch, J.L. (2006). An emerging role for calcineurin Aalpha in the development and function of the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F769-776.
- Gooch, J.L., Roberts, B.R., Cobbs, S.L., and Tumlin, J.A. (2007). Loss of the alpha-isoform of calcineurin is sufficient to induce nephrotoxicity and altered expression of transforming growth factor-beta. *Transplantation* 83, 439-447.
- Gooch, J.L., Toro, J.J., Guler, R.L., and Barnes, J.L. (2004). Calcineurin A-alpha but not A-beta is required for normal kidney development and function. *The American journal of pathology* 165, 1755-1765.
- Gueutin, V., Deray, G., and Isnard-Bagnis, C. (2012). [Renal physiology]. *Bulletin du cancer* 99, 237-249.
- Gunaratnam, L., and Bonventre, J.V. (2009). HIF in kidney disease and development. *J Am Soc Nephrol* 20, 1877-1887.
- Halloran, P.F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England journal of medicine* 351, 2715-2729.
- Han, D., Lerner, A.G., Vande Walle, L., Upton, J.P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B.J., Oakes, S.A., and Papa, F.R. (2009). IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* 138, 562-575.
- Han, S.W., Li, C., Ahn, K.O., Lim, S.W., Song, H.G., Jang, Y.S., Cho, Y.M., Jang, Y.M., Ghee, J.Y., Kim, J.Y., *et al.* (2008). Prolonged endoplasmic reticulum stress induces apoptotic cell death in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *American journal of nephrology* 28, 707-714.
- Hardie, D.G. (2011). Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *The American journal of clinical nutrition* 93, 891S-896.

- Hariharan, S., Johnson, C.P., Bresnahan, B.A., Taranto, S.E., McIntosh, M.J., and Stablein, D. (2000). Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *The New England journal of medicine* 342, 605-612.
- Hausberg, M., Lang, D., Levers, A., Suwelack, B., Kisters, K., Tokmak, F., Barenbrock, M., and Kosch, M. (2006). Sympathetic nerve activity in renal transplant patients before and after withdrawal of cyclosporine. *Journal of hypertension* 24, 957-964.
- Hayakawa, K., Hiramatsu, N., Okamura, M., Yao, J., Paton, A.W., Paton, J.C., and Kitamura, M. (2008). Blunted activation of NF-kappaB and NF-kappaB-dependent gene expression by geranylgeranylacetone: involvement of unfolded protein response. *Biochemical and biophysical research communications* 365, 47-53.
- Hayakawa, K., Nakajima, S., Hiramatsu, N., Okamura, M., Huang, T., Saito, Y., Tagawa, Y., Tamai, M., Takahashi, S., Yao, J., *et al.* (2010). ER stress depresses NF-kappaB activation in mesangial cells through preferential induction of C/EBP beta. *J Am Soc Nephrol* 21, 73-81.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2012). NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development* 26, 203-234.
- Hazzan, M., Hertig, A., Buob, D., Copin, M.C., Noel, C., Rondeau, E., and Dubois-Xu, Y.C. (2011). Epithelial-to-mesenchymal transition predicts cyclosporine nephrotoxicity in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 22, 1375-1381.
- He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43, 67-93.
- Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D., and Glimcher, L.H. (2011). The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha. *Physiological reviews* 91, 1219-1243.
- Higgins, D.F., Kimura, K., Bernhardt, W.M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., Saito, Y., Johnson, R.S., Kretzler, M., Cohen, C.D., *et al.* (2007). Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117, 3810-3820.
- Hinnebusch, A.G. (2000). Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding ribosomes. In *Translational control of gene expression*, N. Sonenberg, J.W.B. Hershey, and M.B. Mathews, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 185-243.
- Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.L., and Gabbiani, G. (2007). The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American journal of pathology* 170, 1807-1816.
- Hirota, K., and Semenza, G.L. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Critical reviews in oncology/hematology* 59, 15-26.
- Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., and Weissman, J.S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 186, 323-331.

- Hong, F., Lee, J., Piao, Y.J., Jae, Y.K., Kim, Y.J., Oh, C., Seo, J.S., Yun, Y.S., Yang, C.W., Ha, J., *et al.* (2004). Transgenic mice overexpressing cyclophilin A are resistant to cyclosporin A-induced nephrotoxicity via peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *Biochemical and biophysical research communications* 316, 1073-1080.
- Hortelano, S., Castilla, M., Torres, A.M., Tejedor, A., and Bosca, L. (2000). Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 11, 2315-2323.
- Howard, K., Salkeld, G., White, S., McDonald, S., Chadban, S., Craig, J.C., and Cass, A. (2009). The cost-effectiveness of increasing kidney transplantation and home-based dialysis. *Nephrology (Carlton)* 14, 123-132.
- Hu, C.J., Wang, L.Y., Chodosh, L.A., Keith, B., and Simon, M.C. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Molecular and cellular biology* 23, 9361-9374.
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A.D., Kaufman, R.J., and Exton, J.H. (2006). Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Molecular and cellular biology* 26, 3071-3084.
- Huang, C., Han, Y., Wang, Y., Sun, X., Yan, S., Yeh, E.T., Chen, Y., Cang, H., Li, H., Shi, G., *et al.* (2009). SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 de-SUMOylation. *EMBO J* 28, 2748-2762.
- Huang, Y., Kempen, M.B., Munck, A.B., Swagemakers, S., Driegen, S., Mahavadi, P., Meijer, D., van Ijcken, W., van der Spek, P., Grosveld, F., *et al.* (2012). Hypoxia-inducible factor 2alpha plays a critical role in the formation of alveoli and surfactant. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 46, 224-232.
- Humphreys, B.D., Lin, S.L., Kobayashi, A., Hudson, T.E., Nowlin, B.T., Bonventre, J.V., Valerius, M.T., McMahon, A.P., and Duffield, J.S. (2010). Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *The American journal of pathology* 176, 85-97.
- Hung, C.C., Ichimura, T., Stevens, J.L., and Bonventre, J.V. (2003). Protection of renal epithelial cells against oxidative injury by endoplasmic reticulum stress preconditioning is mediated by ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 278, 29317-29326.
- Hung, J.H., Su, I.J., Lei, H.Y., Wang, H.C., Lin, W.C., Chang, W.T., Huang, W., Chang, W.C., Chang, Y.S., Chen, C.C., *et al.* (2004). Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF-kappaB and pp38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 279, 46384-46392.
- Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzone, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R., and Witters, L.A. (2005). The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* 280, 29060-29066.
- Iijima, K., Hamahira, K., Kobayashi, A., Nakamura, H., and Yoshikawa, N. (2000). Immunohistochemical analysis of renin activity in chronic cyclosporine nephropathy in childhood nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 11, 2265-2271.

- Inagi, R. (2009). Endoplasmic reticulum stress in the kidney as a novel mediator of kidney injury. *Nephron Experimental nephrology* *112*, e1-9.
- Inagi, R., Kumagai, T., Nishi, H., Kawakami, T., Miyata, T., Fujita, T., and Nangaku, M. (2008). Preconditioning with endoplasmic reticulum stress ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* *19*, 915-922.
- Inagi, R., Nangaku, M., Onogi, H., Ueyama, H., Kitao, Y., Nakazato, K., Ogawa, S., Kurokawa, K., Couser, W.G., and Miyata, T. (2005). Involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in podocyte injury induced by excessive protein accumulation. *Kidney Int* *68*, 2639-2650.
- Ivanov, P., Emara, M.M., Villen, J., Gygi, S.P., and Anderson, P. (2011). Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol Cell* *43*, 613-623.
- Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., and Neilson, E.G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* *110*, 341-350.
- Iwawaki, T., and Akai, R. (2006). Analysis of the XBP1 splicing mechanism using endoplasmic reticulum stress-indicators. *Biochemical and biophysical research communications* *350*, 709-715.
- Jefferson, J.A., Pippin, J.W., and Shankland, S.J. (2010). Experimental Models of Membranous Nephropathy. *Drug discovery today Disease models* *7*, 27-33.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J., and Kim, K.W. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* *111*, 709-720.
- Jiang, J., Tang, Y.L., and Liang, X.H. (2011). EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer biology & therapy* *11*, 714-723.
- Jousse, C., Averous, J., Bruhat, A., Carraro, V., Mordier, S., and Fafournoux, P. (2004). Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. *Biochemical and biophysical research communications* *313*, 447-452.
- Juhasz, G., Hill, J.H., Yan, Y., Sass, M., Baehrecke, E.H., Backer, J.M., and Neufeld, T.P. (2008). The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in *Drosophila*. *The Journal of cell biology* *181*, 655-666.
- Jung, Y.J., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J., and Neckers, L. (2003). IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *17*, 2115-2117.
- Kaelin, W.G., Jr., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* *30*, 393-402.
- Kaidi, A., Williams, A.C., and Paraskeva, C. (2007). Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nature cell biology* *9*, 210-217.

- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-1428.
- Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., and Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell death and differentiation* 18, 571-580.
- Kaptureczak, M.H., Meier-Kriesche, H.U., and Kaplan, B. (2004). Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant Proc* 36, 25S-32S.
- Karamysheva, A.F. (2008). Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry Biokhimiia* 73, 751-762.
- Kawaguchi, M., Takahashi, M., Hata, T., Kashima, Y., Usui, F., Morimoto, H., Izawa, A., Takahashi, Y., Masumoto, J., Koyama, J., *et al.* (2011). Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 123, 594-604.
- Kawasaki, D., Kosugi, K., Waki, H., Yamamoto, K., Tsujino, T., and Masuyama, T. (2007). Role of activated renin-angiotensin system in myocardial fibrosis and left ventricular diastolic dysfunction in diabetic patients--reversal by chronic angiotensin II type 1A receptor blockade. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 71, 524-529.
- Kayler, L.K., Magliocca, J., Zendejas, I., Srinivas, T.R., and Schold, J.D. (2011a). Impact of cold ischemia time on graft survival among ECD transplant recipients: a paired kidney analysis. *Am J Transplant* 11, 2647-2656.
- Kayler, L.K., Srinivas, T.R., and Schold, J.D. (2011b). Influence of CIT-induced DGF on kidney transplant outcomes. *Am J Transplant* 11, 2657-2664.
- Ke, Q., and Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular pharmacology* 70, 1469-1480.
- Keith, B., and Simon, M.C. (2007). Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* 129, 465-472.
- Keller, M., Ruegg, A., Werner, S., and Beer, H.D. (2008). Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132, 818-831.
- Kessler, M., Ayav, C., Erpelding, M., and Couchoud, C. (2012). Évolution des caractéristiques des patients en insuffisance rénale chronique terminale lors de l'initiation du traitement par dialyse. Données de REIN 2004–2009. *Néphrologie & thérapeutique*.
- Khanna, A., Plummer, M., Bromberek, C., Bresnahan, B., and Hariharan, S. (2002). Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 62, 2257-2263.
- Khanna, A.K., Plummer, M.S., Hilton, G., Pieper, G.M., and Ledbetter, S. (2004). Anti-transforming growth factor antibody at low but not high doses limits cyclosporine-mediated nephrotoxicity without altering rat cardiac allograft survival: potential of therapeutic applications. *Circulation* 110, 3822-3829.

- Kim, S., and Iwao, H. (2000). Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological reviews* 52, 11-34.
- Kimura, K., Iwano, M., Higgins, D.F., Yamaguchi, Y., Nakatani, K., Harada, K., Kubo, A., Akai, Y., Rankin, E.B., Neilson, E.G., *et al.* (2008a). Stable expression of HIF-1alpha in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F1023-1029.
- Kimura, K., Jin, H., Ogawa, M., and Aoe, T. (2008b). Dysfunction of the ER chaperone BiP accelerates the renal tubular injury. *Biochemical and biophysical research communications* 366, 1048-1053.
- Kitamura, M. (2009). Biphasic, bidirectional regulation of NF-kappaB by endoplasmic reticulum stress. *Antioxidants & redox signaling* 11, 2353-2364.
- Kitamura, M., and Hiramatsu, N. (2010). The oxidative stress: endoplasmic reticulum stress axis in cadmium toxicity. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 23, 941-950.
- Klein, I.H., Abrahams, A.C., van Ede, T., Oey, P.L., Ligtenberg, G., and Blankestijn, P.J. (2010). Differential effects of acute and sustained cyclosporine and tacrolimus on sympathetic nerve activity. *Journal of hypertension* 28, 1928-1934.
- Koesters, R., Kaissling, B., Lehir, M., Picard, N., Theilig, F., Gebhardt, R., Glick, A.B., Hahnel, B., Hossler, H., Grone, H.J., *et al.* (2010). Tubular overexpression of transforming growth factor-beta1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells. *The American journal of pathology* 177, 632-643.
- Koh, M.Y., Darnay, B.G., and Powis, G. (2008). Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1alpha, leading to its oxygen-independent degradation. *Molecular and cellular biology* 28, 7081-7095.
- Kohler, N., and Lipton, A. (1974). Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Experimental cell research* 87, 297-301.
- Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E.A., Horikawa, I., Barrett, J.C., and Huang, L.E. (2004). HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J* 23, 1949-1956.
- Kudo, N., Barr, A.J., Barr, R.L., Desai, S., and Lopaschuk, G.D. (1995). High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 270, 17513-17520.
- Kuznetsov, G., Bush, K.T., Zhang, P.L., and Nigam, S.K. (1996). Perturbations in maturation of secretory proteins and their association with endoplasmic reticulum chaperones in a cell culture model for epithelial ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8584-8589.
- Lanese, D.M., and Conger, J.D. (1993). Effects of endothelin receptor antagonist on cyclosporine-induced vasoconstriction in isolated rat renal arterioles. *J Clin Invest* 91, 2144-2149.

- Lang, J.D., Jr., Teng, X., Chumley, P., Crawford, J.H., Isbell, T.S., Chacko, B.K., Liu, Y., Jhala, N., Crowe, D.R., Smith, A.B., *et al.* (2007). Inhaled NO accelerates restoration of liver function in adults following orthotopic liver transplantation. *J Clin Invest* *117*, 2583-2591.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012a). mTOR Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *4*.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012b). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* *149*, 274-293.
- Lassila, M. (2002). Interaction of cyclosporine A and the renin-angiotensin system; new perspectives. *Current drug metabolism* *3*, 61-71.
- Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., and Glimcher, L.H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and cellular biology* *23*, 7448-7459.
- Lee, J.Y., Chang, J.W., Yang, W.S., Kim, S.B., Park, S.K., Park, J.S., and Lee, S.K. (2011). Albumin-induced epithelial-mesenchymal transition and ER stress are regulated through a common ROS-c-Src kinase-mTOR pathway: effect of imatinib mesylate. *Am J Physiol Renal Physiol* *300*, F1214-1222.
- Lee, S.B., Kim, S., Lee, J., Park, J., Lee, G., Kim, Y., Kim, J.M., and Chung, J. (2007). ATG1, an autophagy regulator, inhibits cell growth by negatively regulating S6 kinase. *EMBO reports* *8*, 360-365.
- Lenna, S., Townsend, D.M., Tan, F.K., Kapanadze, B., Markiewicz, M., Trojanowska, M., and Scorza, R. (2010). HLA-B35 upregulates endothelin-1 and downregulates endothelial nitric oxide synthase via endoplasmic reticulum stress response in endothelial cells. *Journal of immunology* *184*, 4654-4661.
- Li, C., and Yang, C.W. (2009). The pathogenesis and treatment of chronic allograft nephropathy. *Nature reviews Nephrology* *5*, 513-519.
- Li, J., Ni, M., Lee, B., Barron, E., Hinton, D.R., and Lee, A.S. (2008). The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell death and differentiation* *15*, 1460-1471.
- Li, S., and Hu, G.F. (2012). Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. *Journal of cellular physiology* *227*, 2822-2826.
- Li, Y., Wang, Y., Kim, E., Beemiller, P., Wang, C.Y., Swanson, J., You, M., and Guan, K.L. (2007). Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *J Biol Chem* *282*, 35803-35813.
- Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., Lavail, M.M., and Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* *318*, 944-949.

- Lin, S.L., Kisseleva, T., Brenner, D.A., and Duffield, J.S. (2008). Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *The American journal of pathology* *173*, 1617-1627.
- Lindenmeyer, M.T., Rastaldi, M.P., Ikehata, M., Neusser, M.A., Kretzler, M., Cohen, C.D., and Schlondorff, D. (2008). Proteinuria and hyperglycemia induce endoplasmic reticulum stress. *J Am Soc Nephrol* *19*, 2225-2236.
- Liu, W., and Phang, J.M. (2012). Proline dehydrogenase (oxidase), a mitochondrial tumor suppressor, and autophagy under the hypoxia microenvironment. *Autophagy* *8*.
- Liu, Y. (2004). Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* *15*, 1-12.
- Liu, Y. (2011). Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nature reviews Nephrology* *7*, 684-696.
- Lorz, C., Justo, P., Sanz, A., Subira, D., Egido, J., and Ortiz, A. (2004). Paracetamol-induced renal tubular injury: a role for ER stress. *J Am Soc Nephrol* *15*, 380-389.
- Lu, J., Yao, Y.Y., Dai, M.Q., Ma, S.G., Zhang, F.S., Cao, L., Ren, Q.L., and Liu, F.N. (2012). Erythropoietin attenuates cardiac dysfunction by increasing myocardial angiogenesis and inhibiting interstitial fibrosis in diabetic rats. *Cardiovascular diabetology* *11*, 105.
- Lubbers, D.W., and Baumgartl, H. (1997). Heterogeneities and profiles of oxygen pressure in brain and kidney as examples of the pO₂ distribution in the living tissue. *Kidney Int* *51*, 372-380.
- Lum, J.J., DeBerardinis, R.J., and Thompson, C.B. (2005). Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature reviews Molecular cell biology* *6*, 439-448.
- Luo, Z.F., Feng, B., Mu, J., Qi, W., Zeng, W., Guo, Y.H., Pang, Q., Ye, Z.L., Liu, L., and Yuan, F.H. (2010). Effects of 4-phenylbutyric acid on the process and development of diabetic nephropathy induced in rats by streptozotocin: regulation of endoplasmic reticulum stress-oxidative activation. *Toxicol Appl Pharmacol* *246*, 49-57.
- Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2004). The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer* *4*, 966-977.
- Macrez, R., Ali, C., Toutirais, O., Le Mauff, B., Defer, G., Dirnagl, U., and Vivien, D. (2011). Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet neurology* *10*, 471-480.
- Mahfoudh-Boussaid, A., Zaouali, M.A., Hadj-Ayed, K., Miled, A.H., Saidane-Mosbahi, D., Rosello-Catafau, J., and Ben Abdennebi, H. (2012). Ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and upregulates hypoxia inducible factor-1alpha in ischemic kidney: the role of nitric oxide. *Journal of biomedical science* *19*, 7.

- Mahmoud, M., Upton, P.D., and Arthur, H.M. (2011). Angiogenesis regulation by TGFbeta signalling: clues from an inherited vascular disease. *Biochemical Society transactions* *39*, 1659-1666.
- Majmundar, A.J., Wong, W.J., and Simon, M.C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* *40*, 294-309.
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., and Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* *414*, 550-554.
- Manekeller, S., Schuppius, A., Stegemann, J., Hirner, A., and Minor, T. (2008). Role of perfusion medium, oxygen and rheology for endoplasmic reticulum stress-induced cell death after hypothermic machine preservation of the liver. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* *21*, 169-177.
- Manjithaya, R., and Subramani, S. (2011). Autophagy: a broad role in unconventional protein secretion? *Trends in cell biology* *21*, 67-73.
- Mann, D.L. (2011). The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circulation research* *108*, 1133-1145.
- Marchant, D.J., Boyd, J.H., Lin, D.C., Granville, D.J., Garmaroudi, F.S., and McManus, B.M. (2012). Inflammation in myocardial diseases. *Circulation research* *110*, 126-144.
- Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., and Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current biology : CB* *10*, 1247-1255.
- Martinez, F., Kamar, N., Pallet, N., Lang, P., Durrbach, A., Lebranchu, Y., Adem, A., Barbier, S., Cassuto-Viguier, E., Glowaki, F., *et al.* (2010). High dose epoetin beta in the first weeks following renal transplantation and delayed graft function: Results of the Neo-PDGF Study. *Am J Transplant* *10*, 1695-1700.
- Matsukawa, J., Matsuzawa, A., Takeda, K., and Ichijo, H. (2004). The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. *Journal of biochemistry* *136*, 261-265.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* *12*, 991-1045.
- Mayer, G. (2011). Capillary rarefaction, hypoxia, VEGF and angiogenesis in chronic renal disease. *Nephrol Dial Transplant* *26*, 1132-1137.
- McBride, A., and Hardie, D.G. (2009). AMP-activated protein kinase--a sensor of glycogen as well as AMP and ATP? *Acta physiologica* *196*, 99-113.
- Mekhail, K., Gunaratnam, L., Bonicalzi, M.E., and Lee, S. (2004). HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL. *Nature cell biology* *6*, 642-647.
- Melillo, G. (2004). HIF-1: a target for cancer, ischemia and inflammation--too good to be true? *Cell cycle* *3*, 154-155.

- Mercer, C.A., Kaliappan, A., and Dennis, P.B. (2009). A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* 5, 649-662.
- Mimura, I., and Nangaku, M. (2010). The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nature reviews Nephrology* 6, 667-678.
- Minor, T., Manekeller, S., Sioutis, M., and Dombrowski, F. (2006). Endoplasmic and vascular surface activation during organ preservation: refining upon the benefits of machine perfusion. *Am J Transplant* 6, 1355-1366.
- Montie, H.L., Haezebrouck, A.J., Gutwald, J.C., and DeGracia, D.J. (2005). PERK is activated differentially in peripheral organs following cardiac arrest and resuscitation. *Resuscitation* 66, 379-389.
- Mosbah, I.B., Zaouali, M.A., Martel, C., Bjaoui, M., Abdennebi, H.B., Hotter, G., Brenner, C., and Rosello-Catafau, J. (2012). IGL-1 solution reduces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rat liver transplantation. *Cell Death Dis* 3, e279.
- Moss, N.G., Powell, S.L., and Falk, R.J. (1985). Intravenous cyclosporine activates afferent and efferent renal nerves and causes sodium retention in innervated kidneys in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8222-8226.
- Mourad, G., Garrigue, V., Bismuth, J., Szwarc, I., Delmas, S., and Iborra, F. (2005). Suivi et complications non immunologiques de la transplantation rénale. *Encycl Méd Chir, Néphrologie 18-065-D10*.
- Mu, Y.P., Ogawa, T., and Kawada, N. (2010). Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 90, 245-256.
- Myers, B.D., Ross, J., Newton, L., Luetscher, J., and Perlroth, M. (1984). Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *The New England journal of medicine* 311, 699-705.
- Naesens, M., Kuypers, D.R., and Sarwal, M. (2009). Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 4, 481-508.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.
- Nakamura, M., Yamabe, H., Osawa, H., Nakamura, N., Shimada, M., Kumasaka, R., Murakami, R., Fujita, T., Osanai, T., and Okumura, K. (2006). Hypoxic conditions stimulate the production of angiogenin and vascular endothelial growth factor by human renal proximal tubular epithelial cells in culture. *Nephrol Dial Transplant* 21, 1489-1495.
- Nankivell, B.J., Borrows, R.J., Fung, C.L., O'Connell, P.J., Allen, R.D., and Chapman, J.R. (2003). The natural history of chronic allograft nephropathy. *The New England journal of medicine* 349, 2326-2333.

- Nankivell, B.J., and Chapman, J.R. (2006). Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 81, 643-654.
- Narita, M., and Inoki, K. (2012). Rags connect mTOR and autophagy. *Small GTPases* 3, 111-114.
- Navarro-Antolin, J., Lopez-Munoz, M.J., Klatt, P., Soria, J., Michel, T., and Lamas, S. (2001). Formation of peroxynitrite in vascular endothelial cells exposed to cyclosporine A. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 1291-1293.
- Neufeld, G., and Kessler, O. (2008). The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8, 632-645.
- Nickel, T., Schlichting, C.L., and Weis, M. (2006). Drugs modulating endothelial function after transplantation. *Transplantation* 82, S41-46.
- Nickel, W. (2005). Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic* 6, 607-614.
- Nickel, W. (2011). The unconventional secretory machinery of fibroblast growth factor 2. *Traffic* 12, 799-805.
- Nielsen, F.T., Jensen, B.L., Marcussen, N., Skott, O., and Bie, P. (2008). Inhibition of mineralocorticoid receptors with eplerenone alleviates short-term cyclosporin A nephrotoxicity in conscious rats. *Nephrol Dial Transplant* 23, 2777-2783.
- Nishiya, D., Omura, T., Shimada, K., Matsumoto, R., Kusuyama, T., Enomoto, S., Iwao, H., Takeuchi, K., Yoshikawa, J., and Yoshiyama, M. (2006). Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Pharmacol Sci* 101, 31-39.
- Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M., and Mori, K. (2002). Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *The Biochemical journal* 366, 585-594.
- Ozaki, K.S., Kimura, S., Nalesnik, M.A., Sico, R.M., Zhang, M., Ueki, S., Ross, M.A., Stolz, D.B., and Murase, N. (2012). The loss of renal dendritic cells and activation of host adaptive immunity are long-term effects of ischemia/reperfusion injury following syngeneic kidney transplantation. *Kidney Int* 81, 1015-1025.
- Pallet, N., and Anglicheau, D. (2008). Physiopathologie de la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine. *Le courrier de la transplantation* 7, 9-13.
- Pallet, N., Bouvier, N., Beaune, P., Legendre, C., Anglicheau, D., and Thervet, E. (2010). [Involvement of endoplasmic reticulum stress in solid organ transplantation]. *Med Sci (Paris)* 26, 397-403.
- Pallet, N., Bouvier, N., Bendjallabah, A., Rabant, M., Flinois, J.P., Hertig, A., Legendre, C., Beaune, P., Thervet, E., and Anglicheau, D. (2008a). Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am J Transplant* 8, 2283-2296.

- Pallet, N., Bouvier, N., Legendre, C., Gilleron, J., Codogno, P., Beaune, P., Thervet, E., and Anglicheau, D. (2008b). Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity. *Autophagy* 4, 783-791.
- Pallet, N., Rabant, M., Xu-Dubois, Y.C., Lecorre, D., Mucchielli, M.H., Imbeaud, S., Agier, N., Hertig, A., Thervet, E., Legendre, C., *et al.* (2008c). Response of human renal tubular cells to cyclosporine and sirolimus: a toxicogenomic study. *Toxicol Appl Pharmacol* 229, 184-196.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282, 24131-24145.
- Papetti, M., and Herman, I.M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American journal of physiology Cell physiology* 282, C947-970.
- Parra Cid, T., Conejo Garcia, J.R., Carballo Alvarez, F., and de Arriba, G. (2003). Antioxidant nutrients protect against cyclosporine A nephrotoxicity. *Toxicology* 189, 99-111.
- Pascual, M., Theruvath, T., Kawai, T., Tolckoff-Rubin, N., and Cosimi, A.B. (2002). Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *The New England journal of medicine* 346, 580-590.
- Pattingre, S., Bauvy, C., and Codogno, P. (2003). Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *J Biol Chem* 278, 16667-16674.
- Pavlov, N., and Badet, J. (2001). [Angiogenin: involvement in angiogenesis and tumour growth]. *Bulletin du cancer* 88, 725-732.
- Pereira, E.R., Liao, N., Neale, G.A., and Hendershot, L.M. (2010). Transcriptional and post-transcriptional regulation of proangiogenic factors by the unfolded protein response. *PLoS One* 5.
- Perez-Rojas, J., Blanco, J.A., Cruz, C., Trujillo, J., Vaidya, V.S., Uribe, N., Bonventre, J.V., Gamba, G., and Bobadilla, N.A. (2007). Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F131-139.
- Perico, N., Dadan, J., and Remuzzi, G. (1990). Endothelin mediates the renal vasoconstriction induced by cyclosporine in the rat. *J Am Soc Nephrol* 1, 76-83.
- Pichler, R.H., Franceschini, N., Young, B.A., Hugo, C., Andoh, T.F., Burdmann, E.A., Shankland, S.J., Alpers, C.E., Bennett, W.M., Couser, W.G., *et al.* (1995). Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: roles of angiotensin II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 6, 1186-1196.
- Plouet, J., Schilling, J., and Gospodarowicz, D. (1989). Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* 8, 3801-3806.

Quiros, Y., Vicente-Vicente, L., Morales, A.I., Lopez-Novoa, J.M., and Lopez-Hernandez, F.J. (2011). An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 119, 245-256.

Raha, S., and Robinson, B.H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in biochemical sciences* 25, 502-508.

Raines, E.W. (2000). PDGF. In *Cytokine reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* J.J. Oppenheim, M. Feldmann, S.K. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, and N.A. Nicola, eds. (London, UK, San Diego, Ca, USA: Academic Press), pp. 755-790.

Ramachandra Rao, S.P., Wassell, R., Shaw, M.A., and Sharma, K. (2007). Profiling of human mesangial cell subproteomes reveals a role for calmodulin in glucose uptake. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F1182-1189.

Ramirez, C., Olmo, A., O'Valle, F., Masseroli, M., Aguilar, M., Gomez-Morales, M., Revelles, F., Garcia-Chicano, M.J., Arrebola, F., Reguero, M.E., *et al.* (2000). Role of intrarenal endothelin 1, endothelin 3, and angiotensin II expression in chronic cyclosporin A nephrotoxicity in rats. *Experimental nephrology* 8, 161-172.

Ramzy, D., Rao, V., Tumati, L.C., Xu, N., Miriuka, S., Delgado, D., and Ross, H.J. (2006). Role of endothelin-1 and nitric oxide bioavailability in transplant-related vascular injury: comparative effects of rapamycin and cyclosporine. *Circulation* 114, I214-219.

Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie (2010). Rapport annuel 2010.

Riano-Galan, I., Malaga, S., Rajmil, L., Ariceta, G., Navarro, M., Loris, C., and Vallo, A. (2009). Quality of life of adolescents with end-stage renal disease and kidney transplant. *Pediatric nephrology* 24, 1561-1568.

Roos-van Groningen, M.C., Scholten, E.M., Lelieveld, P.M., Rowshani, A.T., Baelde, H.J., Bajema, I.M., Florquin, S., Bemelman, F.J., de Heer, E., de Fijter, J.W., *et al.* (2006). Molecular comparison of calcineurin inhibitor-induced fibrogenic responses in protocol renal transplant biopsies. *J Am Soc Nephrol* 17, 881-888.

Ropolo, A., Grasso, D., Pardo, R., Sacchetti, M.L., Archange, C., Lo Re, A., Seux, M., Nowak, J., Gonzalez, C.D., Iovanna, J.L., *et al.* (2007). The pancreatitis-induced vacuole membrane protein 1 triggers autophagy in mammalian cells. *J Biol Chem* 282, 37124-37133.

Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., and Harker, L. (1974). A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 1207-1210.

Rouschop, K.M., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., *et al.* (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* 120, 127-141.

- Rovetta, F., Stacchiotti, A., Consiglio, A., Cadei, M., Grigolato, P.G., Lavazza, A., Rezzani, R., and Aleo, M.F. (2012). ER signaling regulation drives the switch between autophagy and apoptosis in NRK-52E cells exposed to cisplatin. *Experimental cell research* 318, 238-250.
- Ruster, C., and Wolf, G. (2006). Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 17, 2985-2991.
- Ryan, H.E., Lo, J., and Johnson, R.S. (1998). HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 17, 3005-3015.
- Saikumar, J., Hoffmann, D., Kim, T.M., Ramirez, V., Zhang, Q., Goering, P.L., Brown, R., Bijol, V., Park, P., Waikar, S., *et al.* (2012). Expression, circulation and excretion profile of microRNA-21, -155, and -18a following acute kidney injury. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*.
- Saleh, M., Mathison, J.C., Wolinski, M.K., Bensinger, S.J., Fitzgerald, P., Droin, N., Ulevitch, R.J., Green, D.R., and Nicholson, D.W. (2006). Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature* 440, 1064-1068.
- Salt, I.P., Johnson, G., Ashcroft, S.J., and Hardie, D.G. (1998). AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release. *The Biochemical journal* 335 (Pt 3), 533-539.
- Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S.K., Schumacher, A., Prchal, J.T., Chen, M., and Wang, J. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 454, 232-235.
- Scherrer, U., Vissing, S.F., Morgan, B.J., Rollins, J.A., Tindall, R.S., Ring, S., Hanson, P., Mohanty, P.K., and Victor, R.G. (1990). Cyclosporine-induced sympathetic activation and hypertension after heart transplantation. *The New England journal of medicine* 323, 693-699.
- Schirmer, S.H., van Nooijen, F.C., Piek, J.J., and van Royen, N. (2009). Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. *Heart* 95, 191-197.
- Schrimpf, C., and Duffield, J.S. (2011). Mechanisms of fibrosis: the role of the pericyte. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 20, 297-305.
- Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annual review of biochemistry* 74, 739-789.
- Semenza, G.L., Neufelt, M.K., Chi, S.M., and Antonarakis, S.E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5680-5684.
- Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., and Dvorak, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985.

- Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 3329-3335.
- Sheikh-Ali, M., Sultan, S., Alamir, A.R., Haas, M.J., and Mooradian, A.D. (2010). Hyperglycemia-induced endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. *Nutrition* *26*, 1146-1150.
- Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., and Klagsbrun, M. (1984). Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* *223*, 1296-1299.
- Shinkai, Y., Yamamoto, C., and Kaji, T. (2010). Lead induces the expression of endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and GRP94 in vascular endothelial cells via the JNK-AP-1 pathway. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* *114*, 378-386.
- Siedlecki, A., Irish, W., and Brennan, D.C. (2011). Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant* *11*, 2279-2296.
- Simon, M.C., Liu, L., Barnhart, B.C., and Young, R.M. (2008). Hypoxia-induced signaling in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* *70*, 51-71.
- Skuli, N., Majmundar, A.J., Krock, B.L., Mesquita, R.C., Mathew, L.K., Quinn, Z.L., Runge, A., Liu, L., Kim, M.N., Liang, J., *et al.* (2012). Endothelial HIF-2alpha regulates murine pathological angiogenesis and revascularization processes. *J Clin Invest* *122*, 1427-1443.
- Slattery, C., Campbell, E., McMorro, T., and Ryan, M.P. (2005). Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *The American journal of pathology* *167*, 395-407.
- Smith, M.H., Ploegh, H.L., and Weissman, J.S. (2011). Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* *334*, 1086-1090.
- Snanoudj, R., Royal, V., Elie, C., Rabant, M., Girardin, C., Morelon, E., Kreis, H., Fournet, J.C., Noel, L.H., and Legendre, C. (2011). Specificity of histological markers of long-term CNI nephrotoxicity in kidney-transplant recipients under low-dose cyclosporine therapy. *Am J Transplant* *11*, 2635-2646.
- Srisawat, N., and Kellum, J.A. (2011). Acute kidney injury: definition, epidemiology, and outcome. *Current opinion in critical care* *17*, 548-555.
- Stacchiotti, A., Morandini, F., Bettoni, F., Schena, I., Lavazza, A., Grigolato, P.G., Apostoli, P., Rezzani, R., and Aleo, M.F. (2009). Stress proteins and oxidative damage in a renal derived cell line exposed to inorganic mercury and lead. *Toxicology* *264*, 215-224.
- Stel, V.S., van de Luijtgaarden, M.W., Wanner, C., Jager, K.J., and on behalf of the European Renal Registry, I. (2011). The 2008 ERA-EDTA Registry Annual Report-a precis. *NDT plus* *4*, 1-13.

- Stengel, B., Metzger, M., Froissart, M., Rainfray, M., Berr, C., Tzourio, C., and Helmer, C. (2011). Epidemiology and prognostic significance of chronic kidney disease in the elderly--the Three-City prospective cohort study. *Nephrol Dial Transplant* 26, 3286-3295.
- Stepkowski, S.M. (2000). Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Rev Mol Med* 2, 1-23.
- Strutz, F.M. (2009). EMT and proteinuria as progression factors. *Kidney Int* 75, 475-481.
- Sumpter, R., Jr., and Levine, B. (2010). Autophagy and innate immunity: triggering, targeting and tuning. *Seminars in cell & developmental biology* 21, 699-711.
- Tabas, I. (2010). The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circulation research* 107, 839-850.
- Tabas, I., and Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature cell biology* 13, 184-190.
- Tamaki, N., Hatano, E., Taura, K., Tada, M., Kodama, Y., Nitta, T., Iwaisako, K., Seo, S., Nakajima, A., Ikai, I., *et al.* (2008). CHOP deficiency attenuates cholestasis-induced liver fibrosis by reduction of hepatocyte injury. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 294, G498-505.
- Tan, S.S., Ahmad, I., Bennett, H.L., Singh, L., Nixon, C., Seywright, M., Barnetson, R.J., Edwards, J., and Leung, H.Y. (2011). GRP78 up-regulation is associated with androgen receptor status, Hsp70-Hsp90 client proteins and castrate-resistant prostate cancer. *The Journal of pathology* 223, 81-87.
- Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., and Kominami, E. (2005). Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 1, 84-91.
- Tello-Montoliu, A., Patel, J.V., and Lip, G.Y. (2006). Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 4, 1864-1874.
- Terasaki, P.I. (2011). Cold ischemia time--time to rethink the risk for kidneys? *Am J Transplant* 11, 2551-2552.
- Thaumat, O. (2011). [Sterile inflammatory response to ischemia-reperfusion injury: immediate and long term consequences on graft function]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* 195, 847-859; discussion 859.
- Todd, D.J., Lee, A.H., and Glimcher, L.H. (2008). The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nature reviews Immunology* 8, 663-674.
- Tojo, M., Matsuzaki, K., Minami, T., Honda, Y., Yasuda, H., Chiba, T., Saya, H., Fujii-Kuriyama, Y., and Nakao, M. (2002). The aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugation system. *J Biol Chem* 277, 46576-46585.

- Torres, M., Castillo, K., Armisen, R., Stutzin, A., Soto, C., and Hetz, C. (2010). Prion protein misfolding affects calcium homeostasis and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. *PLoS One* 5, e15658.
- Treins, C., Murdaca, J., Van Obberghen, E., and Giorgetti-Peraldi, S. (2006). AMPK activation inhibits the expression of HIF-1 α induced by insulin and IGF-1. *Biochemical and biophysical research communications* 342, 1197-1202.
- U S Renal Data System (2011). *USRDS 2011 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664-666.
- van der Vos, K.E., Eliasson, P., Proikas-Cezanne, T., Vervoort, S.J., van Boxtel, R., Putker, M., van Zutphen, I.J., Mauthe, M., Zellmer, S., Pals, C., *et al.* (2012). Modulation of glutamine metabolism by the PI(3)K-PKB-FOXO network regulates autophagy. *Nature cell biology* 14, 829-837.
- Vembar, S.S., and Brodsky, J.L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 944-957.
- Wagner, M., and Moore, D.D. (2011). Endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 14, 367-373.
- Walker, A.K., and Atkin, J.D. (2011). Stress signaling from the endoplasmic reticulum: A central player in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *IUBMB life* 63, 754-763.
- Walter, P., and Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081-1086.
- Wang, S., and Kaufman, R.J. (2012). The impact of the unfolded protein response on human disease. *The Journal of cell biology* 197, 857-867.
- Webster, A.C., Woodroffe, R.C., Taylor, R.S., Chapman, J.R., and Craig, J.C. (2005). Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *Bmj* 331, 810.
- Weng, X., Shen, H., Kuang, Y., Liu, X., Chen, Z., Zhu, H., Jiang, B., Zhu, G., and Chen, H. (2012). Ischemic Postconditioning Inhibits the Renal Fibrosis Induced by Ischemia-reperfusion Injury in Rats. *Urology* 80, 484 e481-487.
- Whelan, R.S., Kaplinskiy, V., and Kitsis, R.N. (2010). Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 72, 19-44.
- White, M., Montezano, A.C., and Touyz, R.M. (2012). Angiotensin II signalling and calcineurin in cardiac fibroblasts: differential effects of calcineurin inhibitors FK506 and cyclosporine A. *Therapeutic advances in cardiovascular disease* 6, 5-14.

- Wise, L.M., Inder, M.K., Real, N.C., Stuart, G.S., Fleming, S.B., and Mercer, A.A. (2012). The vascular endothelial growth factor (VEGF)-E encoded by orf virus regulates keratinocyte proliferation and migration and promotes epidermal regeneration. *Cellular microbiology* *14*, 1376-1390.
- Wolfe, R.A., Ashby, V.B., Milford, E.L., Ojo, A.O., Ettenger, R.E., Agodoa, L.Y., Held, P.J., and Port, F.K. (1999). Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *The New England journal of medicine* *341*, 1725-1730.
- Wouters, B.G., and Koritzinsky, M. (2008). Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer* *8*, 851-864.
- Wu, C.T., Sheu, M.L., Tsai, K.S., Weng, T.I., Chiang, C.K., and Liu, S.H. (2010a). The role of endoplasmic reticulum stress-related unfolded protein response in the radiocontrast medium-induced renal tubular cell injury. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* *114*, 295-301.
- Wu, J., Zhang, R., Torreggiani, M., Ting, A., Xiong, H., Striker, G.E., Vlassara, H., and Zheng, F. (2010b). Induction of diabetes in aged C57B6 mice results in severe nephropathy: an association with oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and inflammation. *The American journal of pathology* *176*, 2163-2176.
- Xia, C., Meng, Q., Liu, L.Z., Rojanasakul, Y., Wang, X.R., and Jiang, B.H. (2007). Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* *67*, 10823-10830.
- Yamasaki, S., and Anderson, P. (2008). Reprogramming mRNA translation during stress. *Curr Opin Cell Biol* *20*, 222-226.
- Yamazaki, Y., Matsunaga, Y., Tokunaga, Y., Obayashi, S., Saito, M., and Morita, T. (2009). Snake venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. *J Biol Chem* *284*, 9885-9891.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2007). Permeases recycle amino acids resulting from autophagy. *Autophagy* *3*, 149-150.
- Yarlagadda, S.G., Coca, S.G., Garg, A.X., Doshi, M., Poggio, E., Marcus, R.J., and Parikh, C.R. (2008). Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant* *23*, 2995-3003.
- Yee Koh, M., Spivak-Kroizman, T.R., and Powis, G. (2008). HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends in biochemical sciences* *33*, 526-534.
- Yellon, D.M., and Hausenloy, D.J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine* *357*, 1121-1135.
- Yin, K.J., Olsen, K., Hamblin, M., Zhang, J., Schwendeman, S.P., and Chen, Y.E. (2012). Vascular Endothelial Cell-specific MicroRNA-15a Inhibits Angiogenesis in Hindlimb Ischemia. *J Biol Chem* *287*, 27055-27064.

- Yorimitsu, T., He, C., Wang, K., and Klionsky, D.J. (2009). Tap42-associated protein phosphatase type 2A negatively regulates induction of autophagy. *Autophagy* 5, 616-624.
- Yoshiji, H., Kuriyama, S., and Fukui, H. (2007). Blockade of renin-angiotensin system in antifibrotic therapy. *Journal of gastroenterology and hepatology* 22 *Suppl 1*, S93-95.
- Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., and Millhorn, D.E. (2003). Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem* 278, 15911-15916.
- Zambrano, J.L., Ettayebi, K., Maaty, W.S., Faunce, N.R., Bothner, B., and Hardy, M.E. (2011). Rotavirus infection activates the UPR but modulates its activity. *Virology journal* 8, 359.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2007a). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 67, 10123-10128.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S.E., Sugimoto, H., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2008). Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 19, 2282-2287.
- Zeisberg, E.M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A.L., McMullen, J.R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W.T., Roberts, A.B., *et al.* (2007b). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature medicine* 13, 952-961.
- Zhai, Y., Busuttil, R.W., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2011). Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *Am J Transplant* 11, 1563-1569.
- Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Tan, Y.S., Baek, J.H., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., and Semenza, G.L. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 283, 10892-10903.
- Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455-462.
- Zhang, L., Dong, L.Y., Li, Y.J., Hong, Z., and Wei, W.S. (2012). miR-21 represses FasL in microglia and protects against microglia-mediated neuronal cell death following hypoxia/ischemia. *Glia*.
- Zhong, Y., Wang, Q.J., Li, X., Yan, Y., Backer, J.M., Chait, B.T., Heintz, N., and Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature cell biology* 11, 468-476.
- Zhong, Z., Arteel, G.E., Connor, H.D., Yin, M., Frankenberg, M.V., Stachlewitz, R.F., Raleigh, J.A., Mason, R.P., and Thurman, R.G. (1998). Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine. *The American journal of physiology* 275, F595-604.

Zhu, S., Jin, J., Wang, Y., Ouyang, Z., Xi, C., Li, J., Qiu, Y., Wan, J., Huang, M., and Huang, Z. (2012a). The endoplasmic reticulum stress response is involved in apoptosis induced by aloe-emodin in HK-2 cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 50, 1149-1158.

Zhu, S., Wang, Y., Jin, J., Guan, C., Li, M., Xi, C., Ouyang, Z., Chen, M., Qiu, Y., Huang, M., *et al.* (2012b). Endoplasmic reticulum stress mediates aristolochic acid I-induced apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA.*

Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., and Sabatini, D.M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase. *Science* 334, 678-683.

ANNEXES

Article n°1

Bouvier N, Flinois JP, Gilleron J, Sauvage JL, Legendre C, Beaune P, Thervet E, Anglicheau D, Pallet N. Cyclosporine triggers endoplasmic reticulum stress in endothelial cells: a role for endothelial phenotypic changes and death. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296(1): F160-9.

Cyclosporine triggers endoplasmic reticulum stress in endothelial cells: a role for endothelial phenotypic changes and death

Nicolas Bouvier,¹ Jean Pierre Flinois,¹ Jerome Gilleron,² François-Ludovic Sauvage,⁴ Christophe Legendre,³ Philippe Beaune,¹ Eric Thervet,^{1,3} Dany Anglicheau,^{1,3} and Nicolas Pallet¹

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 775 and ²INSERM Unité 895, Université Paris Descartes; ³Service de Transplantation Rénale, Hôpital Necker, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris; ⁴Service de Pharmacologie et Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, Limoges, France

Submitted 22 September 2008; accepted in final form 28 October 2008

Bouvier N, Flinois JP, Gilleron J, Sauvage F, Legendre C, Beaune P, Thervet E, Anglicheau D, Pallet N. Cyclosporine triggers endoplasmic reticulum stress in endothelial cells: a role for endothelial phenotypic changes and death. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F160–F169, 2009. First published November 5, 2008; doi:10.1152/ajprenal.90567.2008.—Calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus are effective immunosuppressants, but both substances have the same intrinsic nephrotoxic potential that adversely affects allograft survival in renal transplant patients and causes end-stage renal disease in other solid organ or bone marrow transplant recipients. Endothelial cells are the first biological interface between drugs and the kidney, and calcineurin inhibitors may influence endothelial function and viability in a number of ways. Notably, endothelial cells have recently been shown to contribute to the accumulation of interstitial fibroblasts in nonrenal models, through endothelial-to-mesenchymal transition. Here we demonstrate that cyclosporine, but not tacrolimus or its metabolites, induces morphological and phenotypic endothelial changes suggestive of a partial endothelial-to-mesenchymal transition in human umbilical arterial endothelial cells. We identify for the first time a contingent of interstitial myofibroblasts that coexpress endothelial markers in rat kidneys treated with cyclosporine, suggesting that endothelial-to-mesenchymal transition could occur *in vivo*. Finally, our findings suggest that endoplasmic reticulum stress triggered by cyclosporine induces endothelial cells to undergo endothelial phenotypic changes suggestive of a partial endothelial-to-mesenchymal transition, whereas salubrinal partially preserves the endothelial phenotype. Inversely, tacrolimus does not induce endothelial-to-mesenchymal transition or endoplasmic reticulum stress. In conclusion, this study demonstrates for the first time that cyclosporine, and not tacrolimus, induces endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. Our findings also suggest that endoplasmic reticulum stress contributes to endothelial cell death and phenotypic changes similar to a partial endothelial-to-mesenchymal transition.

tacrolimus; endothelial-to-mesenchymal transition; epithelial-to-mesenchymal transition

THE INTRODUCTION OF THE calcineurin inhibitors (CNI) cyclosporine (CsA) and tacrolimus (TRL) in solid organ transplantation has led to a significant reduction in the incidence of acute allograft rejection and an improvement in short-term transplant survival (12). However, these early benefits have had little impact on long-term survival, and CNI use remains the chief cause of kidney failure (26–28). In renal transplantation, interstitial fibrosis (IF) and tubular atrophy (TA) are associated with a number of contributing factors such as immunological insults (acute rejection), hemodynamic changes (ischemia-reperfusion in-

jury, hypertension), and toxicity (CNI nephrotoxicity). CNIs chronically destroy kidney parenchyma with the organization of suggestive lesions including TA, IF, and nodular arteriolar hyaline sclerosis (5, 26). Although a number of therapeutic strategies have been proposed to avoid or reduce the use of CNI to halt or reverse IF/TA, CNI use remains the mainstay in solid organ transplantation (9, 17, 19, 20, 31).

With nephrotoxicity remaining a major contributing factor to late kidney damage, it is of the utmost importance to increase our understanding of the mechanisms involved in drug-induced nephrotoxicity to define new therapeutic strategies and identify early biomarkers. The pathogenesis of chronic nephrotoxicity in patients receiving CNI is still not well understood, and many potential mechanisms have been proposed, including vasoconstriction and ischemia, transforming growth factor- β (TGF- β) secretion, renin-angiotensin system activation, endothelin-1 release, nitric oxide dysregulation, tubular cell apoptosis, stimulation of inflammatory mediators, enhanced immunogenicity, and epithelial-to-mesenchymal transition in tubular epithelial cells (5, 6, 24, 36). Recently, we and others demonstrated that endoplasmic reticulum (ER) stress was an important contributor of CsA nephrotoxicity in mediating renal epithelial cell death and phenotypic changes suggestive of a mesenchymal transition (13, 32). Whether CNIs induce such effects in endothelial cells is unknown.

Although the response of the tubular epithelium has been widely studied during exposure to CNI (5, 6, 21, 24, 33, 34, 36), comprehensive and comparative analysis of the arteriolar endothelium response to CsA and TRL is lacking (23, 29, 39, 41). Endothelial cells are one of the most important targets of CNI because they are in continuous contact with these drugs, and the arteriolar endothelium is both a target (e.g., through endothelial cell death during thrombotic microangiopathy) and a mediator (e.g., through secretion of vasoactive compounds, such as endothelin 1, leading to tissue ischemia) of CNI nephrotoxicity (29). A puzzling issue is the relation between the respective roles of CsA and TRL in endothelial injury and the resulting nephrotoxicity. Although it is usually accepted that CsA and TRL are responsible for similar chronic structural lesions in treated patients, experimental data support different and sometimes conflicting toxicity profiles, depending on the biological process being analyzed (23).

Endothelial cells have been recently demonstrated to contribute to fibrosis through a process called the endothelial-to-

Address for reprint requests and other correspondence: N. Pallet, Unité INSERM U775, Centre Universitaire des Saints Pères, 45, rue des saints Pères, 75006 Paris, France (e-mail: nicolas.pallet@univ-paris5.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

mesenchymal transition (EndMT), by which endothelial cells lose their endothelial phenotype and gain myofibroblastic properties (3, 10, 43, 44). The occurrence of EndMT in kidney has not been demonstrated to date, and, because IF is a hallmark of CNI nephrotoxicity, one may wonder whether CNI could induce such a process.

The aim of the present study is to comparatively analyze CsA- and TRL-induced endothelial phenotypic changes (EPCs) and death in the same range of concentrations. We report that CsA induced EPCs suggestive of a partial EndMT in human umbilical artery endothelial cells (HUAECs), whereas TRL and its demethylated metabolites did not. Our results also support that such EPCs suggestive of a partial EndMT occur in vivo in rats treated with CsA. As an explanatory mechanism, our data suggest that ER stress contributes to CsA-induced EPCs and death. Finally, our results suggest that salubrinal (SAL), a molecule alleviating cells from the deleterious effects of ER stress, partially protects endothelial cells against CsA-induced EPCs and death.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. All chemicals, including CsA and TRL, were obtained from Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France). Cell culture medium and other cell culture products were supplied by Promocell (Heidelberg, Germany).

Cell culture. HUAECs were purchased from Promocell. Cells were not trypsinized more than three times and were tested for their endothelial origin through CD31 and von Willebrand factor (vWF) expression and the lack of α -smooth muscle actin (SMA) expression. Cells were cultured in endothelial cell medium (Promocell) with penicillin-streptomycin, hydrocortisone, bovine pituitary extracts, epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, and 10% fetal calf serum and maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Working concentrations of CsA and TRL were 10 μ M.

Viability study. HUAECs (25,000 cells per well) were plated in a 96-well plate. The next day, they were incubated with different concentrations of CsA and TRL for 72 h. The relative number of live cells per well was determined on the basis of mitochondrial integrity by assay with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) (Promega, Charbonnières, France), according to the manufacturer's protocol.

RNA extraction and RT-PCR. Total RNA was extracted using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's protocol. The yield and purity of RNA were measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Rockland, ME). Transcript levels were quantified by SYBR Green (ABgene, Courtaboeuf, France) and real-time PCR using an ABI PRISM 7900 sequence detector system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Vehicle-treated samples were used as controls, and fold changes for each tested gene were normalized against housekeeping genes (ribosomal protein L13A for in vitro analyses). The relative expression levels between samples were calculated using the comparative ΔC_t (threshold cycle number) method, with vehicle-treated samples as the reference point (22). All mRNA levels were quantified in triplicate (primer sequences are indicated in Supplemental Table 1; the online version of this article contains supplemental material).

Protein extraction and Western blot analysis. Total protein lysates were separated by sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions and transferred to PVDF membranes (GE Healthcare, Aulnay-sous-Bois, France). CD31 and α -SMA were detected using mouse antibody (1:500; sc59938 and sc53142, Santa Cruz Biotechnology, Leperray en Yvelines, France), and actin was detected using rabbit antibody (1:2,000; n° A2668, Sigma-Aldrich). Primary antibodies were visualized using horseradish

peroxidase-conjugated polyclonal secondary antibody (Dako, Trappes, France) and detected with ECL Western blotting (GE Healthcare Europe, Orsay, France).

In vivo study. Adult male Sprague-Dawley rats (Charles River laboratories, L'Arbresle, France) weighing 170–180 g were allowed free access to tap water. Two groups of five rats were treated intraperitoneally for 28 days with 15 mg/kg per day of CsA or placebo. Rats were then euthanized under thiopental anesthesia, and blood was collected; the kidneys were then rapidly retrieved, washed with heparinized saline, and either fixed in neutral-buffered formalin or snap frozen. The experimental protocol was approved by the animal care committee of the University Paris Descartes.

Immunofluorescence microscopy. For cellular immunofluorescence analysis, HUAECs were cultured on glass coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde, rinsed with PBS, and blocked with 2% BSA/PBS. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 and incubated with a 1:200 dilution of mouse anti-vinculin antibody (Sigma-Aldrich Chimie) for 30 min in the dark at room temperature. Samples were then incubated with a 1:500 dilution of chicken anti-mouse Alexa Fluor 488 antibody (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France). Actin stress fibers were stained in red with 1:1,000 tetramethylrhodamine isothiocyanate-labeled phalloidin (n° 77418, Sigma-Aldrich Chimie). Nuclei were counterstained and slides mounted in Vectashield Mounting Medium with 4,6-diamidino-2-diphenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Slides were mounted and viewed using a Zeiss Axioscop2 imaging fluorescence microscope.

For immunofluorescence analysis of kidney cryosections, frozen tissues were cut into 5- μ m-thick sections, which were fixed in 100% acetone at -20° C for 1 h. Sections were incubated with primary antibodies at room temperature for 2 h. The primary antibodies were mouse anti-CD31 (1:200, n° 550300, BD Pharmingen, Le Pont-de-Claix, France), rabbit anti-fibroblast-specific peptide 1 (FSP-1) (1:200, n° ab27957, Abcam) and rabbit anti- α -SMA (Abcam n° ab27957). The sections were next washed with PBS Tween 20 0.1% and were subsequently stained with fluorescent secondary antibodies, rabbit anti-mouse Alexa Fluor 488 antibody and goat anti-mouse Alexa Fluor 546 antibody. The nuclei were counterstained with DAPI. Cell images for deconvolution were taken using a Nikon epifluorescence TE-2000E imaging microscope at $\times 10$ and $\times 40$ magnifications, and Z-stacks of ≈ 20 incremental slices (0.4 μ m step size) were captured. AutoQuant software was used for image deconvolution.

Yeast microsomes extraction and TRL metabolites production. *Saccharomyces cerevisiae* yeast (both expressing the P450 3A5 cytochrome and empty) were cultured in SGI medium (Bacto casaminoacids, yeast nitrogen base and glucose) at 28°C for 24–30 h. Yeast were next incubated with tryptophan at 28°C for 24 h. Two hundred milliliters of 2 \times yeast extract (2%, and 2% bacto-peptone) together with ethanol was used for conversion under anaerobic conditions. Yeast microsomes were extracted with ultracentrifugation and solubilized in NaPO₄H₂ 100 mM, MgCl₂ 10 mM, glycerol 20%, and pH 7.4 buffer.

TRL metabolites were produced as previously reported (16). Briefly, 10 μ M of TRL dissolved in ethanol were incubated with 6 mg/ml yeast microsomes, 0.5 mM NADP⁺, 5 mM of glucose 6 phosphate, 1 U/ml of glucose 6-phosphate dehydrogenase, 5 mM MgCl₂, 50 μ M of EDTA, and 0.1 M of potassium phosphate buffer pH 7.4, in a total volume of 1 ml. The reaction was conducted at 28°C for 2 h. The solution was centrifuged at 35,000 revolution/min for 1 h at 4°C and filtered with a 0.2- μ m sterile filter. Demethylated metabolites were detected in supernatants using high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Supernatants were then incubated for up to 72 h with HUAECs in culture medium.

Statistical analysis. All data were expressed as means \pm SE of three different experiments, unless otherwise specified. Biological and histological data were compared using nonparametric tests. We used

the Mann-Whitney *U*-test for comparison between two groups. Statistical analyses were performed using Prism software. *P* values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

CsA, but not TRL, induces HUAEC morphological changes and death. As a first step, we analyzed the morphological and viability changes in HUAECs cultured with CsA and TRL in the same range of concentrations. Ten micromolar CsA decreased HUAEC viability up to 40% in a concentration-dependent manner compared with the vehicle, whereas TRL did not induce mortality in a wide range of concentrations (10 nM to 10 μM) (Fig. 1A). CsA induces striking morphological alterations resulting in a fibroblastic shape. Indeed, phase contrast analysis shows that untreated HUAECs are small, round, and adhere to each other. When exposed to 10 μM CsA, HUAEC size increases (Fig. 6C), and they progressively exhibit an elongated shape with cytoplasmic extensions suggestive of filopodiae and a high degree of cell detachment. These morphological changes are not observed in TRL-exposed cells (Fig. 1B). HUAECs exposed to CsA also develop actin stress fibers across the cytoplasm, whereas, in untreated cells, actin filaments are smooth and distributed in the periphery of the cytoplasm. Vinculin redistribution beneath filopodia, a feature suggestive of myofibroblasts (14, 38), is observed during CsA

exposure (Fig. 1B), whereas this redistribution is not visualized in vehicle- or TRL-exposed cells.

Altogether, these data suggest that CsA, but not TRL, induces endothelial morphological changes suggestive of a myofibroblastic shape.

CsA, not TRL, induces EPCs. We next analyzed whether CsA and TRL could alter endothelial marker expression. Endothelial cells exposed to CsA are subjected to endothelial phenotypic alterations with downregulation of the endothelial marker CD31 (PECAM-I) and vWF transcripts that become significant after 48 h of treatment (Fig. 2A). We confirmed CD31 downregulation during CsA exposure at the protein level (Fig. 2B). Unlike CsA, TRL does not modify CD31 and vWF expression (Fig. 2, C and D).

Myofibroblasts are fibroblasts that express α-SMA and thereby gain contractile and migratory properties. CsA, unlike TRL, induced a significant upregulation of α-SMA at both the mRNA and protein levels (Fig. 2, A, B, C, and D), suggesting that CsA induces α-SMA expression in endothelial cells.

Since CsA induces downregulation of CD31 expression and de novo expression of the myofibroblastic marker α-SMA, we conclude that CsA, and not TRL, induces in vitro EPCs, suggestive of a partial EndMT. These changes seem to be independent of TGF-β because we did not find any TGF-β

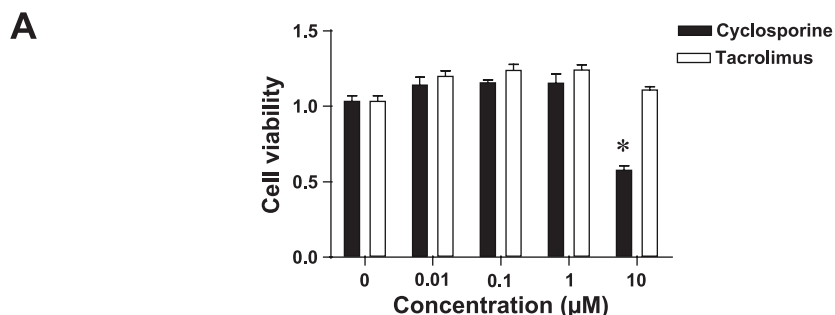
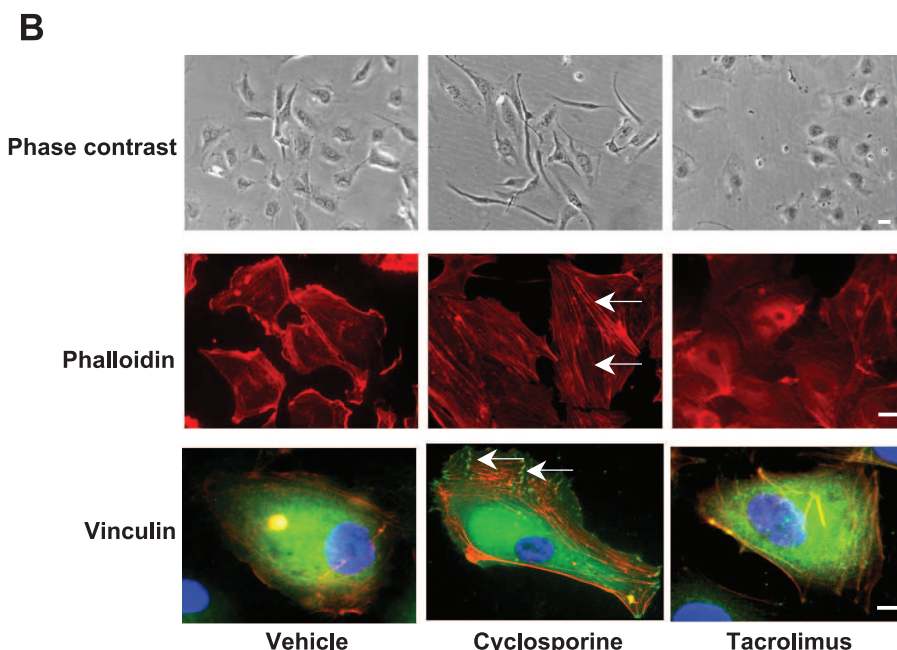


Fig. 1. Cyclosporine (CsA), not tacrolimus (TRL), induces endothelial morphological changes and death. *A*: cell viability determined using the MTS assay after 72 h of exposure to various CsA and TRL concentrations, **P* < 0.05, *n* = 3. *B*: cellular morphology after 48 h of exposure to 10 μM CsA, 10 μM TRL, or vehicle (1/1,000 ethanol) determined with phase contrast microscopy (*top*), bar = 75 μm; immunofluorescence after phalloidin staining to analyze actin cytoskeleton (*middle*), bar = 25 μm. White arrows demonstrate stress fibers. *Bottom*: vinculin redistribution was detected using mouse antibody (green) together with phalloidin to detect actin cytoskeleton (red), bar = 25 μm, and diaminophenylindone (DAPI) to demonstrate the nuclei, bar = 25 μm. White arrows demonstrate vinculin redistribution beneath filopodiae.



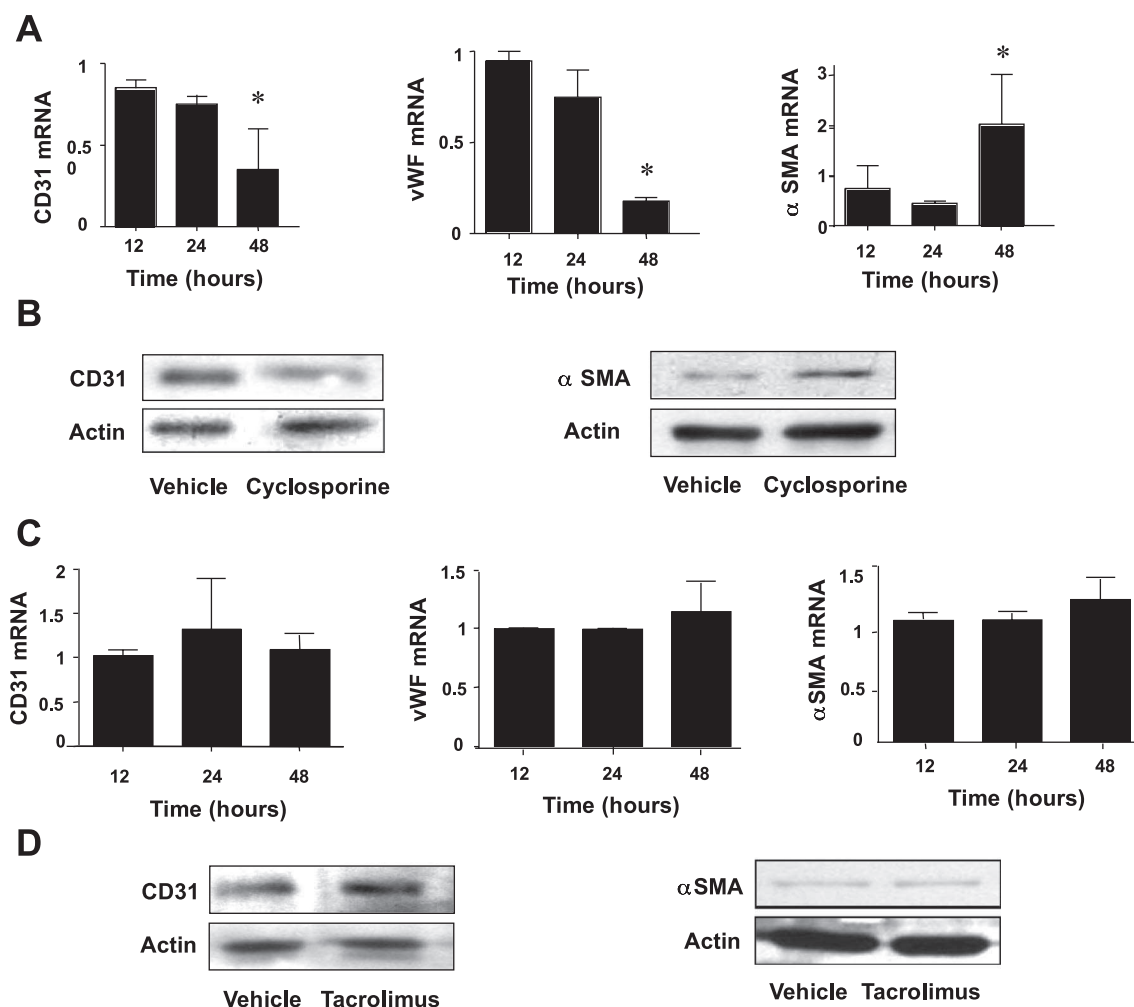


Fig. 2. CsA, not TRL, induces endothelial phenotypic changes. *A*: real-time RT-PCR analysis of CD31, von Willebrand factor (vWF), and α -smooth muscle actin (α -SMA) transcripts expression after 12-, 24-, and 48-h exposure to 10 μ M CsA using RPL13A as housekeeping gene. *B*: representative Western blot of CD31 and α -SMA expression after 48 h of treatment with 10 μ M CsA or vehicle. *C*: real-time RT-PCR analysis of CD31, vWF, and α -SMA transcripts expression after 12-, 24-, and 48-h exposure to 10 μ M TRL using RPL13A as housekeeping gene. *D*: representative Western blot of CD31 and α -SMA expression after 48 h of treatment with 10 μ M TRL or vehicle.

expression at either the mRNA or the protein levels during CsA treatment (Supplemental Fig. S1).

Interestingly, we found that Snail (snail homologue 1, SNAI1) mRNA, a transcription factor known to upregulate mesenchymal markers and to repress the epithelial phenotype during the epithelial to mesenchymal transition (37), was transiently and significantly upregulated during CsA treatment (Supplemental Fig. S2). This finding raises the possibility that Snail could be involved in CsA-induced EPCs.

CYP3A5-mediated TRL metabolites induce neither HUAEC death nor phenotypic alterations. Since TRL itself has no effect on HUAECs in vitro, whereas it is known to be nephrotoxic in vivo, we hypothesized that TRL toxicity could be mediated by its demethylated metabolites produced by P450 3A5 cytochromes (CYP3A5). Since HUAECs do not express CYP3A5 (data not shown), the absence of TRL metabolites in culture medium could explain the absence of TRL cytotoxicity. Therefore, we incubated 10 μ M TRL with CYP3A5-expressing yeast microsomes and an NADPH-generating system to obtain demethylated TRL metabolites (Fig. 3A). The quantity

of demethylated TRL metabolites represented roughly 40% of the total TRL at the end of incubation with CYP3A5-expressing yeast. The incubation of these metabolites with HUAECs for 48 and 72 h did not alter either cell morphology or cell viability (Fig. 3, B and C). These results suggest that demethylated metabolites of TRL produced by CYP3A5-expressing yeasts are not responsible for the nephrotoxic effects of TRL in vivo.

CsA induces EPCs in vivo. To test whether partial EndMT might occur in vivo, we analyzed whether myofibroblasts (α -SMA-positive cells) coexpress the endothelial marker CD31 (α -SMA+/CD31+ double-labeled cells). Rat kidneys treated with 15 mg/kg CsA for 28 days express many interstitial fibroblasts in the vicinity of tubular sections (Fig. 4A, white arrows; Fig. 4B, white arrow heads), whereas untreated rat kidneys did not. Among these fibroblasts, ~20% coexpressed α -SMA and CD31 (Fig. 4B.1, white arrows and see Fig. 4B.2, white arrows for higher magnification). To further prove the occurrence of endothelial cells coexpressing fibroblast markers in kidney interstitium, we analyzed

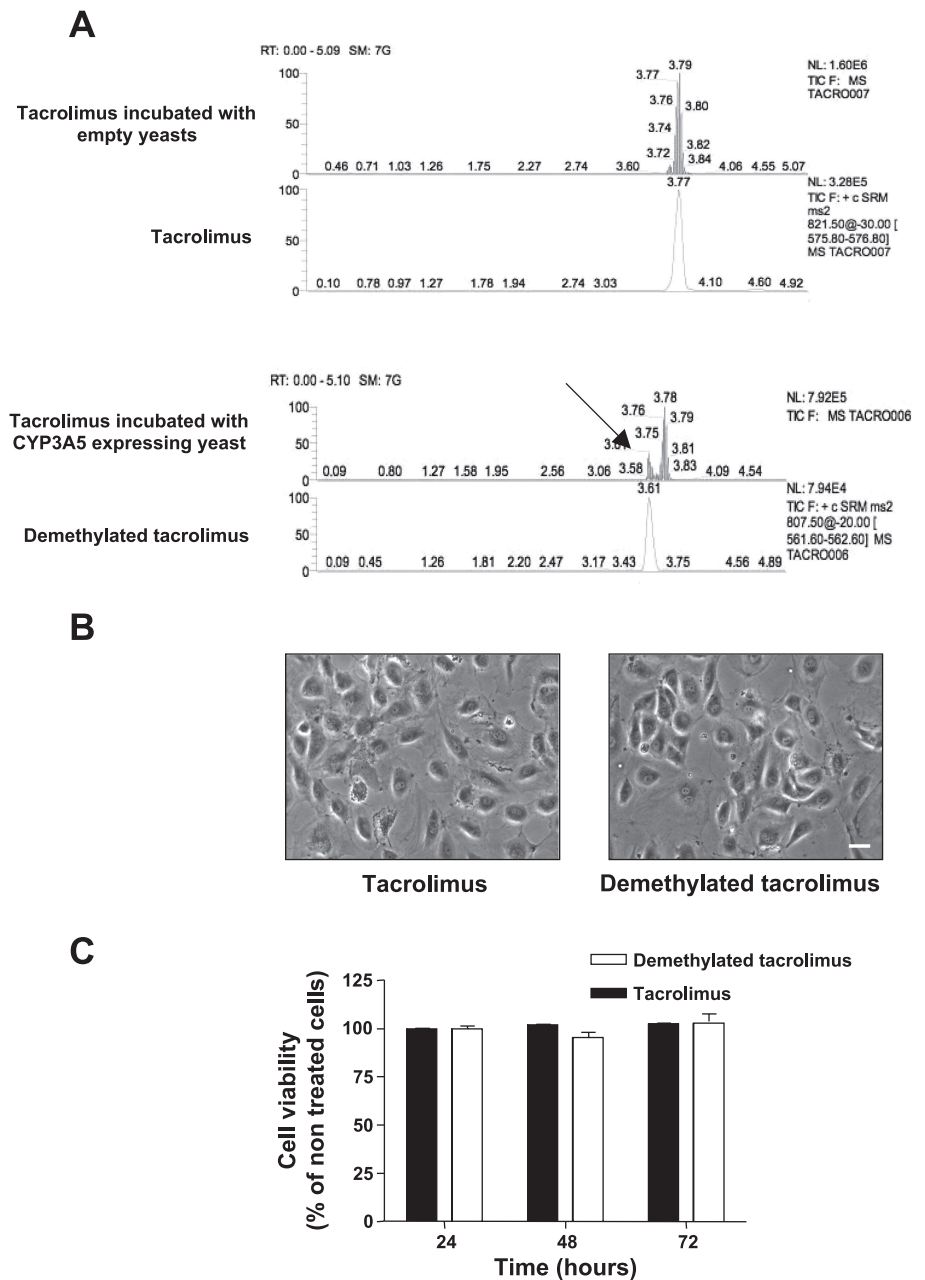


Fig. 3. TRL metabolites do not induce either cell death or morphological alterations. *A*: TRL metabolite production followed by detection with HPLC-MS. On the first line, the grey spectrum represents the detection of nonmetabolized TRL (after incubation with empty yeasts). On the second line, the white spectrum at 3.77 ppm represents the theoretical profile of nonmetabolized TRL. On the third line, the grey spectrum at 3.61 ppm (arrow) represents demethylated metabolites of TRL (after incubation with CYP3A5-expressing yeasts). On the fourth line, the white spectrum at 3.61 ppm represents the theoretical profile of demethylated TRL. *B*: cellular morphology after 48 h of exposure after incubation with 10 μ M TRL or TRL plus demethylated metabolites, determined with phase contrast microscopy; bar = 25 μ m. *C*: cell viability determined using the MTS assay 72 h after incubation with 10 μ M TRL or TRL plus demethylated metabolites.

the expression of the fibroblastic marker FSP-1 in endothelial cells. During CsA treatment, a significant number of FSP-1-positive cells appeared in rat kidney interstitium (Supplemental Fig. S3A), whereas these cells were not observed during treatment with the vehicle. Interestingly, \sim 10% of the FSP-1-positive cells coexpressed CD-31 (FSP-1+/CD31+ double-labeled cells) (Supplemental Fig. S3B). Taken together, the observation that a significant proportion of endothelial cells express myofibroblastic markers in the kidney interstitium strongly suggests that partial EndMT might occur in vivo in rat kidneys during CsA treatment.

ER stress is involved in morphological and EPCs induced by CsA. To further decipher the toxicological mechanisms leading to in vitro EPCs and death during CsA exposure, we tested whether ER stress and the following unfolded protein

response (UPR) were activated in HUAECs during CsA treatment. Indeed, ER stress is involved in CsA-induced nephrotoxicity and tubular incomplete epithelial-to-mesenchymal transition (32), a process that shares similarities with the EndMT we describe here. Moreover, ER stress is involved in various endothelial insults and contributes to vascular pathological process, including atherosclerosis (42, 45). In ER stress conditions, the aim of the UPR is to adapt to the changing environment and reestablish normal ER function by reducing mRNA translation and, therefore, the amount of new synthesized proteins in the ER, by increasing the proteasomal degradation of ER localized proteins, and by increasing the protein folding capacity of the ER. When adaptation fails and ER stress prolongs, cell triggers death programs, usually in the form of apoptosis. To analyze

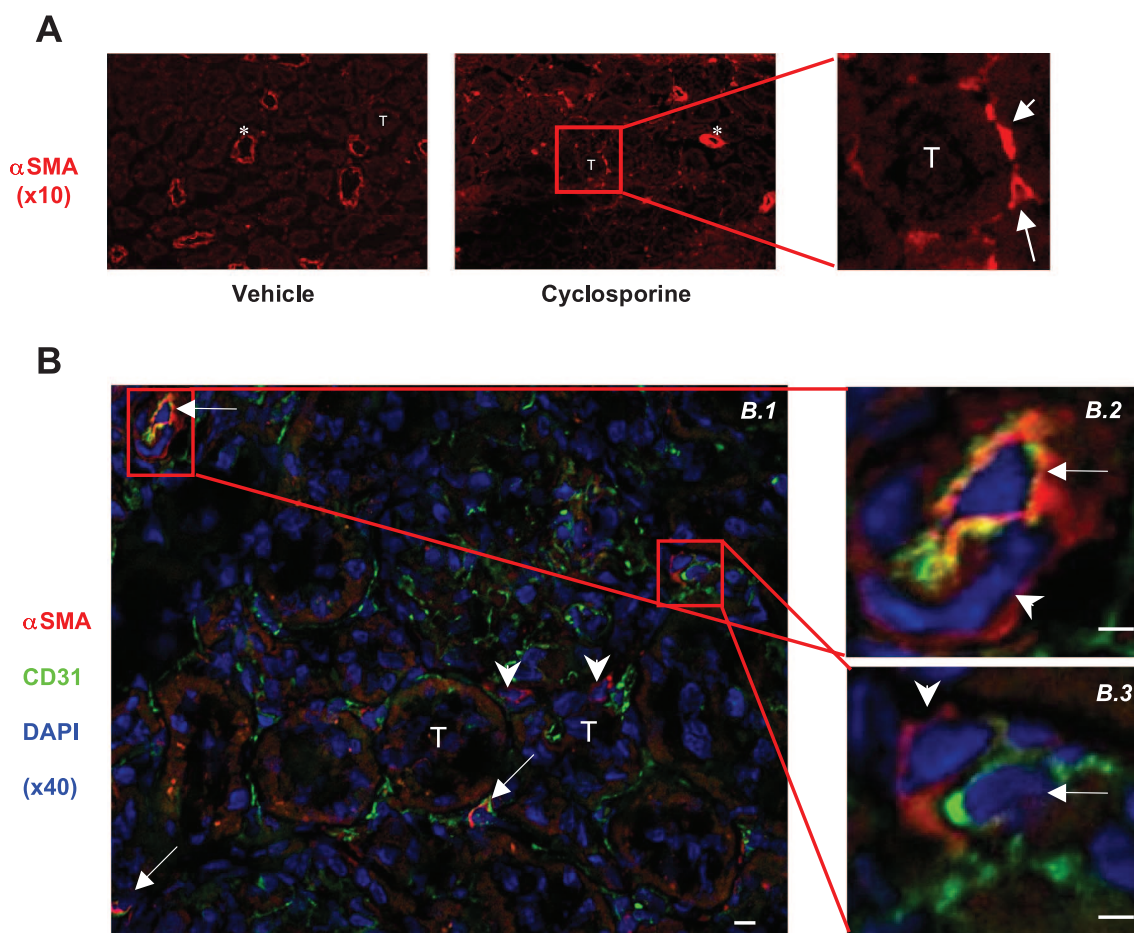


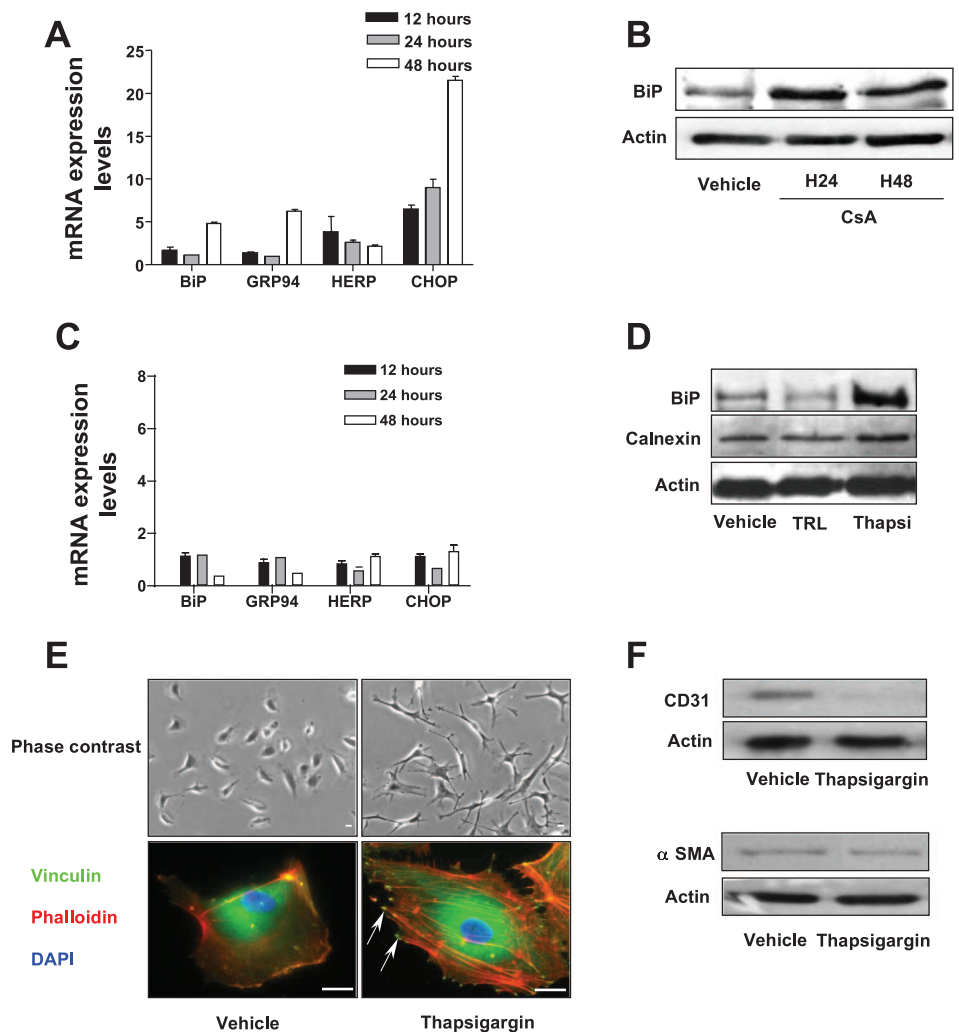
Fig. 4. Endothelial phenotypic changes occur in rat kidneys treated with CsA. *A*: representative immunofluorescence analysis of α -SMA-expressing cells in rat cortex kidneys after 28 days of treatment with 15 mg/kg per day of CsA or vehicle, magnification $\times 10$. Asterisks denote arteriolar sections; T denotes a tubular section, and white arrows denote peritubular (interstitial) α -SMA+ fibroblasts. *B*: immunofluorescence analysis with deconvolution of CD31 (green) and α -SMA (red) coexpression in frozen cortical sections of rat kidneys after 28 days of treatment with 15 mg/kg per day of CsA or vehicle. Tissue counterstained with DAPI (blue) to demonstrate nuclei; bar = 25 μ m. *1*: T denotes tubular sections; white arrows denote α -SMA+/CD31+ cells, and white arrowheads denote α -SMA+/CD31- cells. *2*: α -SMA+/CD31+ (white arrow) and α -SMA+/CD31- (white arrowhead) cells at high magnification. *3*: α -SMA+/CD31- (white arrowhead) and α -SMA-/CD31+ (white arrow) cells at high magnification.

whether the UPR is activated in endothelial cells during CsA and TRL treatments, we focused on four transcriptionally regulated markers. BiP/GRP78 and GRP94 are chaperones found to be upregulated during ER stress to increase the ER folding capacity. HERP is a component of the ER-associated degradation pathway, implicated in the degradation of accumulated proteins, thus lowering the protein charge in the ER lumen. Finally CCAAT/enhancer binding protein-homologous protein (CHOP) is a mediator of cell death program activated during ER stress. HUAECs exposed to CsA for various durations initiate the UPR with the upregulation of BiP/GRP78, GRP94, HERP, and CHOP (Fig. 5, *A* and *B*). Conversely, TRL, even at 10 μ M, does not induce the UPR, suggesting that TRL does not induce ER stress (Fig. 5, *C* and *D*). Moreover, thapsigargin, a prototypical ER stress inducer, triggers EPCs including an elongated shape, a high degree of cell detachment, the development of actin stress fibers, and focal adhesions with vinculin redistribution at the level of filopodiae (Fig. 5*E*). CD31 expression was also strongly downregulated (Fig. 5*F*). However, thapsigargin did not induce α -SMA synthesis. Similar morphological and

phenotypic changes are also observed with tunicamycin, another ER stress inducer (Supplemental Fig. S4). Together, these results suggest that ER stress could contribute, at least partially, to the EPCs induced by CsA.

To clarify the role of ER stress in HUAEC phenotypic changes and death, we coincubated these cells with SAL, a molecule recently described to alleviate the cells from the deleterious effects of ER stress (4, 32). SAL reduces BiP expression in HUAECs during CsA treatment (Fig. 6*A*), suggesting that SAL reduces ER stress. CsA does not decrease cell viability when coincubated with SAL, suggesting that SAL protects against CsA-induced cytotoxicity (Fig. 6*B*). Finally, alleviating ER stress with SAL partially prevents CsA-induced EPCs. Indeed, SAL limits CsA-induced cell size increase, whereas it does not protect against the formation of filopodiae and actin stress fibers (Fig. 6*C*); SAL limits the downregulation of CD31 induced by CsA, at both the mRNA and protein levels (Fig. 6, *D* and *E*), whereas it did not do so for later α -SMA expression (Fig. 6*F*). Taken together, these data suggest that ER stress contributes to the partial EndMT induced by CsA and that

Fig. 5. Endoplasmic reticulum stress is involved in morphological and phenotypic endothelial changes induced by CsA. **A**: real-time PCR analysis of BiP, GRP94, HERP, and CCAAT/enhancer binding protein-homologous protein (CHOP) mRNA expression reported to vehicle-treated cells after various times of exposure to 10 μ M CsA, $n = 3$. **B**: representative analysis of BiP expression by Western blot after 24 and 48 h of incubation with 10 μ M CsA. **C**: real-time PCR analysis of BiP, GRP94, HERP, and CHOP mRNA expression reported to vehicle-treated cells after various times of exposure to 10 μ M TRL. **D**: representative Western blot of BiP and calnexin expression after 24 h of incubation with 10 μ M TRL or 0.25 μ M thapsigargin (Thapsi). **E**: cellular morphology after 24 h of exposure to 0.25 μ M thapsigargin, determined with phase contrast microscopy; bar = 50 μ m (*Top*). *Bottom*: vinculin redistribution beneath filopodiae was detected after 24 h of exposure to 0.25 μ M thapsigargin or vehicle; cells were counterstained with phalloidin to demonstrate the actin cytoskeleton and DAPI to demonstrate nuclei; bar = 25 μ m. **F**: representative Western blot of CD31 (*top*) and α -SMA (*bottom*) after 24 h of exposure to 0.25 μ M thapsigargin.



SAL could partially reduce endothelial cell death and phenotypic changes.

DISCUSSION

The aim of our study was to decipher the toxicological response of arterial endothelial cells to CsA and TRL exposure. Our results bring important new insights to the mechanisms of CsA and TRL endothelial toxicity.

This work demonstrates that the endothelial responses to CsA and TRL are totally different, with CsA at near-therapeutic concentrations inducing cell death, ER stress, and EPCs suggestive of a partial EndMT and with TRL at concentrations 1,000 times higher than therapeutic concentrations altering neither cell viability nor endothelial phenotype.

The ER stress response and the induction of EPCs are observed at the same concentration of CsA (10 μ M). At 1 mo posttransplant, target CsA (Neoral) concentrations of 1.5 to 2 μ g/ml 2 h after drug intake have been recommended, corresponding to 1.2 to 1.7 μ M in renal transplant patients (7). Our working CsA concentration is therefore close to the whole blood concentrations observed in transplant patients. However, achieving a correspondence between CsA concentrations in patients' blood or kidney tissue and CsA concentrations in

culture medium is virtually impossible. CsA is a highly lipophilic drug that accumulates in cell membranes, thus producing higher concentrations within phospholipid membranes (18). Moreover, the concentration of CsA in the medium does not correspond to the concentration at the intracellular target site, because tubular cells express transporters such as P-glycoprotein that actively reject CsA from inside the cell (2).

The differential endothelial responses to CsA and TRL in vitro suggest that, rather than calcineurin (CN) inhibition, immunophilin [cyclophilin A (CyPA) and FK-BP12] enzymatic activity inhibition is probably involved in the cytotoxic effects we observed, at least in vitro. This hypothesis is supported by experimental data demonstrating the role of immunophilins in CNI nephrotoxicity. Mice overexpressing CyPA are protected against CsA nephrotoxicity, whereas mice expressing mutated CyPA spontaneously develop renal lesions similar to those observed in CsA nephrotoxicity and are more sensitive to CsA-induced nephrotoxicity (15). We also recently demonstrated that CyPA knockout with RNA interference induced ER stress and tubular cell death (32). FK-binding proteins share similar enzymatic activities with cyclophilins, but with a reduced array of substrate array. To explain the differential effects of CsA and TRL in endothe-

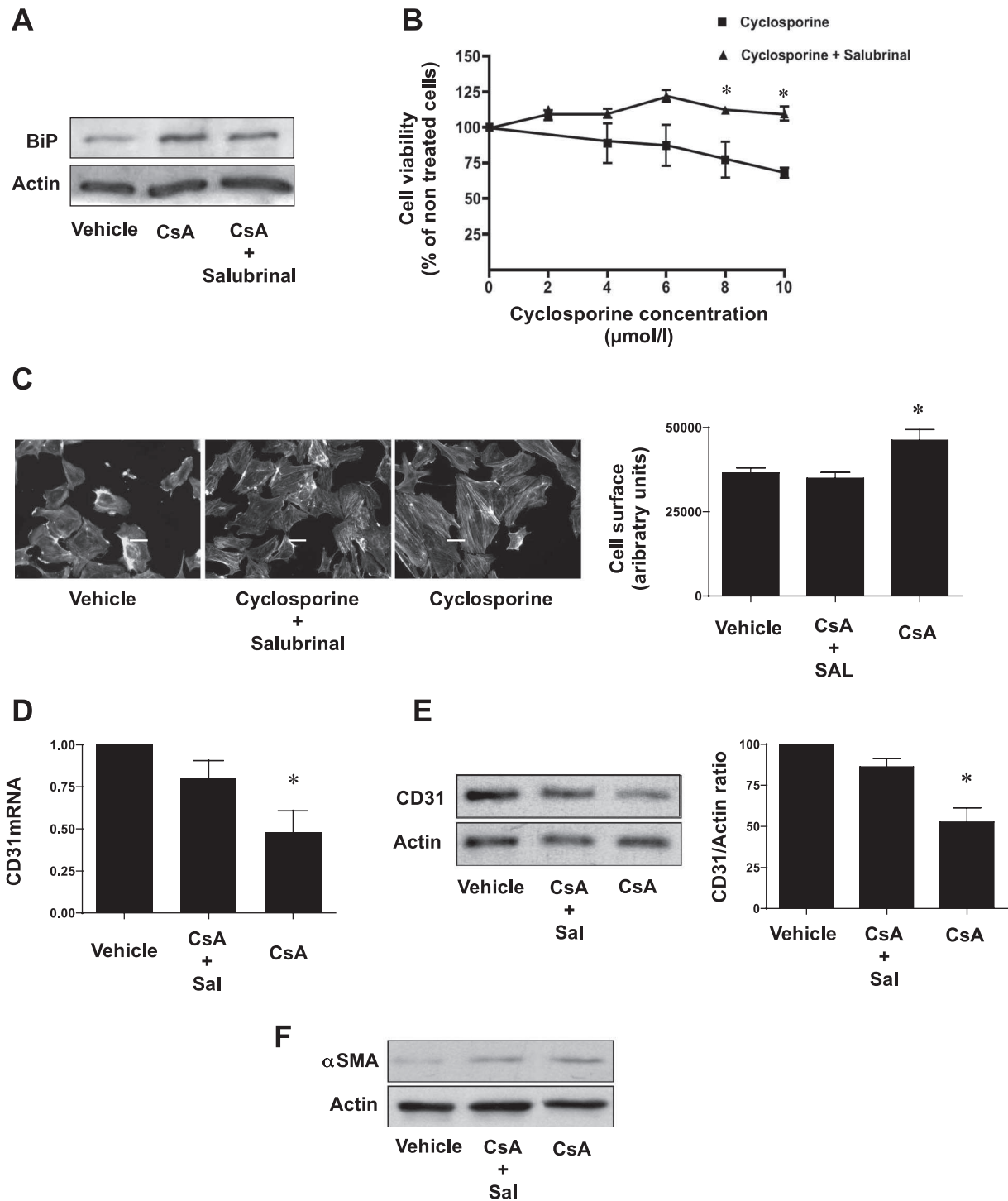


Fig. 6. Salubriinal (SAL) partially protects against endothelial cell death and phenotypic changes induced by CsA. *A*: representative Western blot of BiP expression 24 h after incubation with vehicle, 10 µM CsA, or 10 µM CsA plus 25 µM SAL. *B*: cell viability determined using the MTS assay 72 h after incubation with increasing concentrations of CsA with or without 25 µM SAL. * $P < 0.05$. *C*: tubular cell surface measurement 72 h after incubation with 10 µM CsA with or without 25 µM SAL. * $P < 0.05$ compared with CsA + SAL. *D*: real-time PCR analysis of CD31 mRNA expression reported to vehicle-treated cells after 48 h of exposure to 10 µM CsA with or without 25 µM SAL. * $P < 0.05$ compared with CsA + SAL. *E*: *Left*: representative Western blot analysis of CD31 expression in whole cell lysates 48 h after incubation with 10 µM CsA with or without 25 µM SAL. *Right*: densitometric analysis of the CD31/actin ratio. * $P < 0.05$ compared with CsA + SAL. *F*: representative Western blot analysis of α-SMA expression in whole cell lysates 48 h after incubation with 10 µM CsA with or without 25 µM SAL.

lial cells in vitro, one can hypothesize that FK-BP12 isomerase activity inhibition by TRL is supplanted by CyPA enzymatic activity in a redundant manner. Indeed, FK-BP12 inhibition does not induce nephrotoxicity, and a TRL analog, L-615,818, which inhibits FK-BP12 isomerase activity without inhibiting CN activity, does not induce in vivo nephrotoxicity (8). However, in vivo studies suggest that CN inhibition, rather than immunophilin enzymatic inhibition, mediates CNI nephrotoxicity. Kidneys from mice knocked out for the calcineurin A α -subunit develop structural lesions resembling those induced by CsA, whereas deletion of the β -subunit does not induce any lesion (11). Together, these data lead us to propose that CsA nephrotoxicity could be mediated by both CyPA isomerase activity inhibition and CN inhibition, whereas TRL nephrotoxicity could be mediated by CN inhibition alone.

The fact that TRL is not cytotoxic in vitro, even at very high concentrations, although it induces chronic nephrotoxicity lesions similar to CsA in vivo, is very intriguing. One cannot exclude the possibility that our in vitro model is limited to correctly studying chronic toxic drug effects. Indeed, the treatment durations we used (days) are very short when compared those used for in vivo experiments (months) and for treating patients (years). When cells are cultured for long times, they lose their phenotypic characteristics, and it is virtually impossible to attest their origin after 1 wk of culture. However, this criticism applies to all in vitro models. CNI nephrotoxicity encompasses a single toxic affect on one kind of cell and results from the combination of multiple tissue insults such as ischemia, TGF- β and endothelin-1 secretion, oxidative stress, and so on. Despite the limitations inherent to the nature of the model, in vitro studies are necessary to better understand the biological pathways involved in CNI nephrotoxicity at a molecular level that cannot be achieved with laboratory animals.

Another important finding of our study is the fact that CsA induces partial EPCs, suggestive of EndMT both in vitro and in vivo. Growing data support the existence of EndMT in various fibrogenic processes. Although the understanding of the implications of epithelial-to-mesenchymal transition in kidney fibrosis and allograft nephropathy has been increasing for many years, EndMT is a very recent concept that has never been described in kidneys. EndMT has been described during heart fibrosis, in the stroma surrounding tumoral cells, and during pulmonary hypertension (3, 10, 43, 44). Similar to the epithelial-to-mesenchymal transition, EndMT is characterized by the loss of the endothelial phenotype together with the gain of myofibroblastic markers such as FSP-1 and α -SMA. Very recently, two studies focusing on EndMT in nonembryological models, namely heart fibrosis (44) and carcinoma-associated fibroblasts (43), strongly supported that EndMT could be involved in myofibroblast formation in vivo and plays a pathogenic role during adult tissue injury. In their landmark study focusing on carcinoma-associated fibroblasts, ongoing EndMT was defined by the simultaneous expression of CD31 with α -SMA or FSP-1 (43). A complete phenotype switch would be characterized by a CD31-/ α -SMA+ or CD31-/FSP-1+ labeling, rendering these cells indistinguishable from resident myofibroblasts or epithelial-to-mesenchymal transition-derived myofibroblasts. Demonstrating a complete phenotypic switch requires a CreLox system model in which a LacZ protein coding gene is controlled by the Tie2 promoter. In this model, the detection of the LacZ protein in a CD31-/ α -

SMA+ or CD31-/FSP-1+ cell attests the endothelial origin of EndMT-derived myofibroblasts. Demonstrating the existence of partial EndMT in the kidney is an important step toward a better comprehension of CNI nephrotoxicity, but the precise role of EndMT in IF remains to be elucidated.

Our study also demonstrates for the first time that CsA, and not TRL, induces endothelial ER stress and that ER stress could, at least in part, mediate CsA-induced endothelial cell death and phenotypic changes. Cellular redox disturbances, aberrant Ca²⁺ regulation, glucose deprivation, viral infections, altered glycosylation, inhibition of folding enzymes, and overloading of cholesterol can interfere with the ER protein folding machinery and subsequently lead to the accumulation of unfolded or misfolded proteins in the ER lumen, a situation called ER stress (25, 42, 45). Importantly, many injuries that mediate chronic allograft nephropathy, such as chronic ischemia, ischemia-reperfusion, viral infections, and CsA nephrotoxicity are known inducers of ER stress. Thus the importance of the phenomenon in chronic structural damage and its contribution to the damage is probably underestimated. ER stress triggers an evolutionarily conserved response termed the UPR. The aim of this response is to adapt to the changing environment and reestablish normal ER function, to reduce the amount of new proteins translocated to the ER by reducing mRNA translation, to increase the proteasomal degradation of ER-localized proteins, and to increase the protein folding capacity of the ER. When adaptation fails and ER stress is prolonged, the cell triggers suicide programs, usually in the form of apoptosis. However, ER stress does not only mediate cell death; growing evidence implicates ER stress as a contributor to cell phenotypic and functional changes (1, 35, 40). SAL does not protect against the formation of filopodia. This suggests that ER stress partially participates to EPCs and that, because SAL partially limits ER stress, the whole phenotypic changes induced by CsA may not be blocked by SAL. Since compounds that target ER stress exist, such as SAL or 4-phenyl butyrate (4, 30), as do potential biomarkers (such as BiP, detected in renal biopsies), it is important to better understand the role of ER stress during kidney injury and to clarify its precise role in chronic kidney diseases.

In conclusion, we demonstrate that CsA, and not TRL, induces endothelial cell death and phenotypic changes suggestive of partial EndMT and that these features may also occur in vivo. This process is partially mediated by ER stress and reversed with SAL, which relieves the cell from ER stress.

REFERENCES

1. Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, Lennon CJ, Kluger Y, Dynlacht BD. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* 27: 53–66, 2007.
2. Anglicheau D, Pallet N, Rabant M, Marquet P, Cassinat B, Meria P, Beaune P, Legendre C, Thervet E. Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine-sirolimus interaction. *Kidney Int* 70: 1019–1025, 2006.
3. Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L1–L8, 2007.
4. Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J. A selective inhibitor of

- eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307: 935–939, 2005.
5. **Burdmann EA, Andoh TF, Yu L, Bennett WM.** Cyclosporine nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 23: 465–476, 2003.
 6. **Campistol JM, Sacks SH.** Mechanisms of nephrotoxicity. *Transplantation* 69: S5–S10, 2000.
 7. **Cole E, Midtvedt K, Johnston A, Pattison J, O'Grady C.** Recommendations for the implementation of Neoral C(2) monitoring in clinical practice. *Transplantation* 73: S19–S22, 2002.
 8. **Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Siekierka JJ, Lin CS, Harrison R, Sewell T, Kindt VM, Beattie TR, Wyratt M.** The immunosuppressive and toxic effects of FK-506 are mechanistically related: pharmacology of a novel antagonist of FK-506 and rapamycin. *J Exp Med* 176: 751–760, 1992.
 9. **Flechner SM, Kurian SM, Solez K, Cook DJ, Burke JT, Rollin H, Hammond JA, Whisenant T, Lanigan CM, Head SR, Salomon DR.** De novo kidney transplantation without use of calcineurin inhibitors preserves renal structure and function at two years. *Am J Transplant* 4: 1776–1785, 2004.
 10. **Frid MG, Kale VA, Stenmark KR.** Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ Res* 90: 1189–1196, 2002.
 11. **Gooch JL, Toro JJ, Guler RL, Barnes JL.** Calcineurin A- α but not A- β is required for normal kidney development and function. *Am J Pathol* 165: 1755–1765, 2004.
 12. **Halloran PF.** Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 351: 2715–2729, 2004.
 13. **Han SW, Li C, Ahn KO, Lim SW, Song HG, Jang YS, Cho YM, Jang YM, Ghee JY, Kim JY, Kim SH, Kim J, Kwon OJ, Yang CW.** Prolonged endoplasmic reticulum stress induces apoptotic cell death in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Am J Nephrol* 28: 707–714, 2008.
 14. **Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G.** Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 159: 1009–1020, 2001.
 15. **Hong F, Lee J, Piao YJ, Jae YK, Kim YJ, Oh C, Seo JS, Yun YS, Yang CW, Ha J, Kim SS.** Transgenic mice overexpressing cyclophilin A are resistant to cyclosporin A-induced nephrotoxicity via peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 1073–1080, 2004.
 16. **Iwasaki K, Shiraga T, Nagase K, Tozuka Z, Noda K, Sakuma S, Fujitsu T, Shimatani K, Sato A, Fujioka M.** Isolation, identification, and biological activities of oxidative metabolites of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone. *Drug Metab Dispos* 21: 971–977, 1993.
 17. **Kahan BD.** Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* 356: 194–202, 2000.
 18. **Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B.** Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant Proc* 36: 25S–32S, 2004.
 19. **Kreis H, Cisterne JM, Land W, Wranner L, Squifflet JP, Abramowicz D, Campistol JM, Morales JM, Grinyo JM, Mourad G, Berthoux FC, Brattstrom C, Lebranchu Y, Vialtel P.** Sirolimus in association with mycophenolate mofetil induction for the prevention of acute graft rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 69: 1252–1260, 2000.
 20. **Kreis H, Oberbauer R, Campistol JM, Mathew T, Daloz P, Schena FP, Burke JT, Brault Y, Gioud-Paquet M, Scarola JA, Neylan JF.** Long-term benefits with sirolimus-based therapy after early cyclosporine withdrawal. *J Am Soc Nephrol* 15: 809–817, 2004.
 21. **Liu Y.** Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 15: 1–12, 2004.
 22. **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25: 402–408, 2001.
 23. **Maes BD, Vanrenterghem YF.** Cyclosporine: advantages versus disadvantages vis-a-vis tacrolimus. *Transplant Proc* 36: 40S–49S, 2004.
 24. **McMorrow T, Gaffney MM, Slattery C, Campbell E, Ryan MP.** Cyclosporine A induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 20: 2215–2225, 2005.
 25. **Mori K.** Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101: 451–454, 2000.
 26. **Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR.** The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 349: 2326–2333, 2003.
 27. **Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD.** Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 78: 557–565, 2004.
 28. **Nankivell BJ, Chapman JR.** Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 81: 643–654, 2006.
 29. **Nickel T, Schlichting CL, Weis M.** Drugs modulating endothelial function after transplantation. *Transplantation* 82: S41–S46, 2006.
 30. **Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgun CZ, Hotamisligil GS.** Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313: 1137–1140, 2006.
 31. **Ozdemir BH, Ozdemir FN, Demirhan B, Haberal M.** TGF- β 1 expression in renal allograft rejection and cyclosporine A toxicity. *Transplantation* 80: 1681–1685, 2005.
 32. **Pallet N, Bouvier N, Bendjallah A, Rabant M, Flinois JP, Hertig A, Legendre C, Beaune P, Thervet E, Anglicheau D.** Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am J Transplant* 8: 2283–2296, 2008.
 33. **Pallet N, Bouvier N, Legendre C, Gilleron J, Codogno P, Beaune P, Thervet E, Anglicheau D.** Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity. *Autophagy* 4: 783–791, 2008.
 34. **Pallet N, Rabant M, Xu-Dubois YC, Lecorre D, Mucchielli MH, Imbeaud S, Agier N, Hertig A, Thervet E, Legendre C, Beaune P, Anglicheau D.** Response of human renal tubular cells to cyclosporine and sirolimus: a toxicogenomic study. *Toxicol Appl Pharmacol* 229: 184–196, 2008.
 35. **Shimada T, Hiramatsu N, Okamura M, Hayakawa K, Kasai A, Yao J, Kitamura M.** Unexpected blockade of adipocyte differentiation by K-7174: implication for endoplasmic reticulum stress. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 355–360, 2007.
 36. **Slattery C, Campbell E, McMorrow T, Ryan MP.** Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *Am J Pathol* 167: 395–407, 2005.
 37. **Thiery JP, Sleeman JP.** Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 131–142, 2006.
 38. **Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA.** Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 349–363, 2002.
 39. **Trapp A, Weis M.** The impact of immunosuppression on endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol* 45: 81–87, 2005.
 40. **Ulianich L, Garbi C, Treglia AS, Punzi D, Miele C, Raciti GA, Beguinot F, Consiglio E, Di Jeso B.** ER stress is associated with dedifferentiation and an epithelial-to-mesenchymal transition-like phenotype in PC C13 thyroid cells. *J Cell Sci* 121: 477–486, 2008.
 41. **Wilasrusmee C, Da Silva M, Singh B, Siddiqui J, Bruch D, Kittur S, Wilasrusmee S, Kittur DS.** Morphological and biochemical effects of immunosuppressive drugs in a capillary tube assay for endothelial dysfunction. *Clin Transplant*, 17 Suppl 9: 6–12, 2003.
 42. **Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC.** Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115: 2656–2664, 2005.
 43. **Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R.** Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 67: 10123–10128, 2007.
 44. **Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R.** Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13: 952–961, 2007.
 45. **Zhang K, Kaufman RJ.** Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279: 25935–25938, 2004.

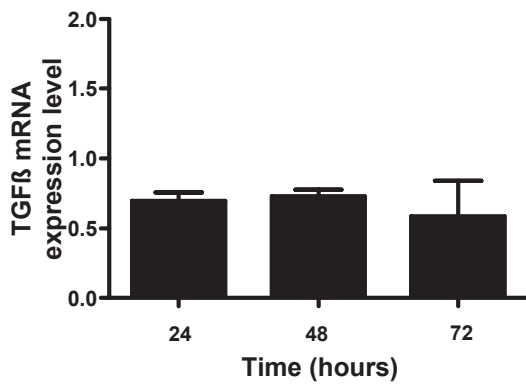
Supplemental table : primers list

Gene name, <i>access number</i> (<i>Homo Sapiens</i>)	PCR product size (Nucleotides)	Primer sequence
BIP/GRP78, <i>NM_005347</i>	224	F 5'-AACTGGCTGGCAAGATGAAG-3' R 5'-AGGAGTGAAGGCGACATAGG-3'
HERP, <i>NM_014083</i>	111	F 5'-CATCAGGGGCTTTTGTTC-3' R 5'-GATTGGCAGGCTGGTTTTTC-3'
CHOP/GADD 153, <i>NM_004083</i>	301	F 5'-GCGACAGAGCCAAAATCAGAG-3' R 5'-CCAGAGAAGAGGGTCAAGAG-3'
α -SMA, <i>NM_001613</i>	274	F 5'-CGAAGCACAGAGCAAAAAG-3' R 5'-CGTTCCAGAGGCATAGAGAG-3'
GRP94, <i>NM_003299</i>	121	F 5'-CTGGGTCAAGCAGAAAGGAG-3' R 5'-TTCTCTGTTGCTTCCCGACT-3'
vWF, <i>NM_000552</i>	113	F 5'-AGCTGGTCCCCTTGGGTACTT-3' R 5'-CCACAGGGTAGATGGTGCTT-3'
TGF- β 1, <i>NM_000660</i>	64	F 5'-GCCCACTGCTCCTGTGACA-3' R 5'-CGGTAGTGAACCCGTTGATGT-3'
SNAI1, <i>NM_005985</i>	102	F 5'-CACTATGCCGCGCTGTTTC-3' R 5'-GCTGGAAGGTAAACTCTGGATTAGA-3'
RPL13A, <i>NM_012423</i>	124	F 5'-CCTCGAGGAGAACAGGAAAGAGA-3' R 5'-GAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA-3'

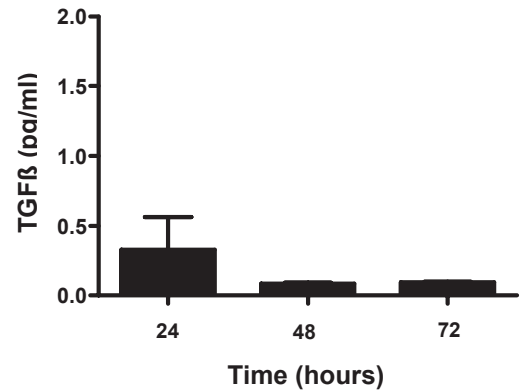
Supplemental figure 1 : Cyclosporine does not induce TGF- β synthesis

A. Left. Real time RT-PCR analysis of TGF- β mRNA expression after 24, 48 and 72 hours exposure to 10 μ M cyclosporine. **Right.** TGF- β immunoassay of cell culture supernatants 24, 48, 72 hours after exposure to 10 μ M cyclosporine, n=3

A.

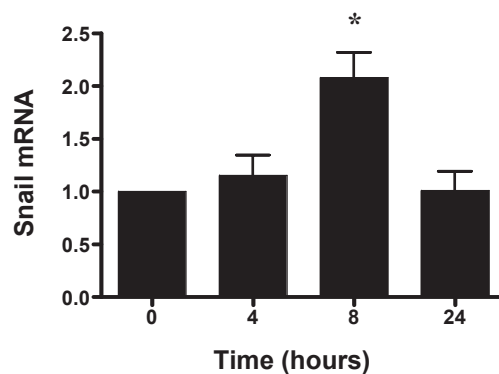


B.



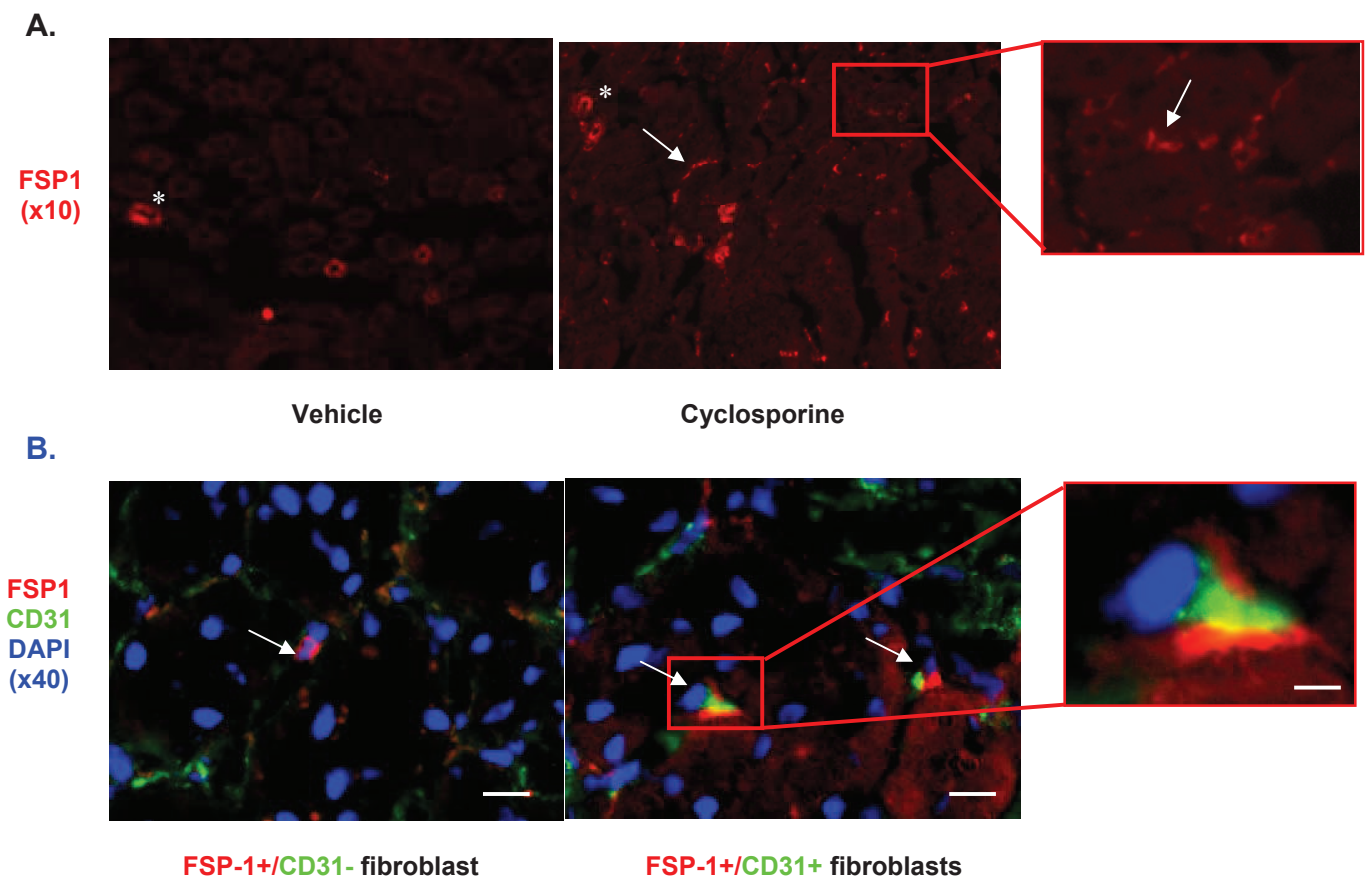
Supplemental figure 2 : Cyclosporine transiently increases Snail transcripts expression levels

Real time RT-PCR analysis of Snail mRNA expression after various times of exposure to 10 μ M cyclosporine, n=3.



Supplemental figure 3. FSP1-CD31 double labelled interstitial cells are observed in rat kidneys during cyclosporine treatment.

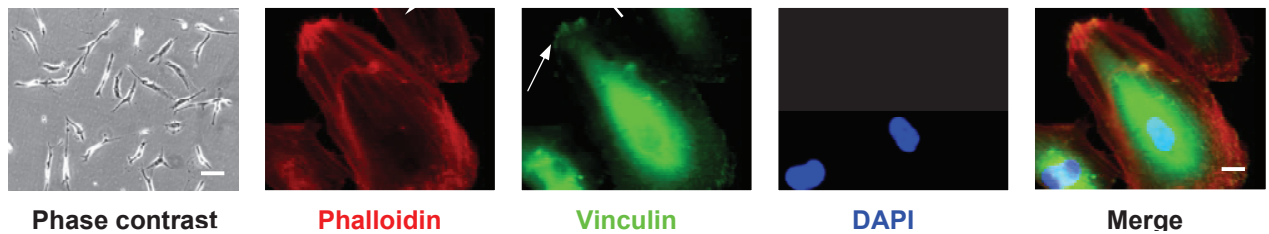
A. Representative immunofluorescence analysis of FSP-1 expression in rats cortex kidneys after 28 days of treatment with 15 mg/kg/day cyclosporine or vehicle, magnification x10. **White stars denote arteriole section** (smooth muscle cells express FSP1) and white arrow **heads** interstitial fibroblasts (FSP+ cells) **B.** Immunofluorescence analysis of CD31 (green) and FSP1 (red) co-expression in frozen cortical sections of rats kidneys after 28 days of treatment with 15 mg/kg/day cyclosporine. Tissues were counterstained with diaminophenylindone (DAPI, blue) to demonstrate nuclei; bar represents 40 μ m (left and middle) and 10 μ M (right). White arrows denote FSP+/CD31- cell (left) and FSP1+/CD31+ cells (middle). Right, high magnification of a FSP1+/CD31+ double labeled cell.



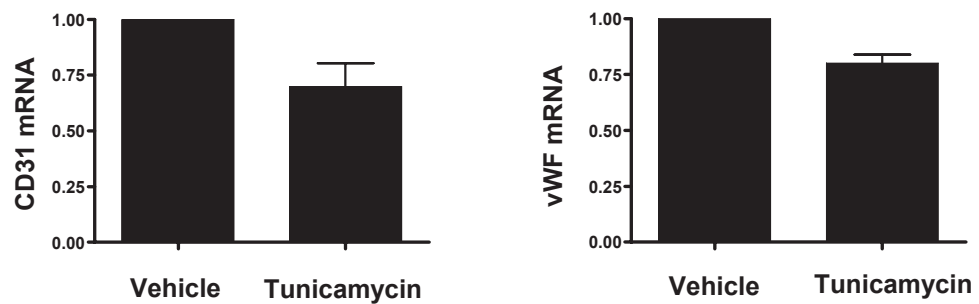
Supplemental figure 4. Tunicamycin induces morphological and phenotypic endothelial changes

A. Cellular morphology after 48 hours of exposure to 0.5 μ g/ml tunicamycin determined with phase contrast microscopy (up), bar, 75 μ m; Vinculin was detected using mouse antibody (green) together with phalloidin to detect actin cytoskeleton (red), bar, 25 μ m and diaminophenylindone (DAPI) to demonstrate the nuclei, bar, 25 μ m. **B.** Real time RT-PCR analysis of CD31 and vWF mRNA expression after 72 hours of exposure to 0.05 μ g/ml tyunicamycin.

A.



B.



Article n°2

Fougeray, S, **Bouvier N**, Beaune P, Legendre C, Anglicheau D, Thervet E, Pallet N. Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response. *Cell Death Dis*, 2: e143, 2011.

Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response

S Fougeray¹, N Bouvier¹, P Beaune^{1,3}, C Legendre², D Anglicheau^{1,2}, E Thervet^{1,2} and N Pallet^{*1,2}

The renal epithelium contributes to the development of inflammation during ischemic injury. Ischemia induces endoplasmic reticulum (ER) stress and activates the unfolded protein response (UPR). Ischemic tissues generate distress signals and inflammation that activates fibrogenesis and may promote adaptive immunity. Interestingly, the UPR may activate inflammation pathways. Our aim was to test whether the UPR is activated during metabolic stress and mediates a tubular inflammatory response. Glucose deprivation, not hypoxia and amino acids deprivation, activated the UPR in human renal cortical tubular cells in culture. This stress activated NF- κ B and promoted the transcription of proinflammatory cytokines and chemokines, including IL-6, IL-8, TNF- α , RANTES and MCP-1. The protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase signaling pathway was not required for the induction of inflammation but amplified cytokine. Inositol-requiring enzyme 1 activated NF- κ B signaling and was required for the transcription of proinflammatory cytokines and chemokines following metabolic stress. Moreover, acute ischemia activated ER stress and inflammation in rat kidneys. Finally, the ER stress marker GRP78 and NF- κ B p65/RelA were coexpressed in human kidney transplants biopsies performed before implantation, suggesting that ER stress activates tubular inflammation in human renal allografts. In conclusion, this study establishes a link between ischemic stress, the activation of the UPR and the generation of a tubular inflammatory response.

Cell Death and Disease (2011) 2, e143; doi:10.1038/cddis.2011.26; published online 14 April 2011

Subject Category: Immunity

Ischemia, the shortage of blood supply into an organ is a common complication of various clinical conditions including cancer, stroke or solid organ transplantation. Renal ischemia is a major cause of acute and end-stage renal failure, which causes serious morbidity and mortality.¹ In the renal transplant setting, ischemic injuries under toxic conditions (calcineurin inhibitors), surgical pressure or immunological injury compromise tissue viability and promote alloimmunity, leading to interstitial fibrosis/tubular atrophy, progressive graft dysfunction and loss.^{2,3} In addition, acute ischemia in native kidneys may trigger autoimmunity through the generation of alarm signals by stressed and/or dying cells and the generation of endogenous neoantigens and epitope spreading.^{4–6}

The renal tubular epithelium has a central role in the development of acute and chronic kidney structural deterioration after ischemic injury, especially by the generation of inflammatory and profibrogenic cytokines.^{7,8} Renal ischemia generates a cascade of proinflammatory mediators that can amplify injury. For example, renal-associated TLRs 2 and 4 recognize danger-associated molecular patterns (DAMPs) and promote local inflammation.^{9,10} Modulation of the graft microenvironment by this early innate response may be a prerequisite for fibrogenesis and for the full development of adaptive immunity and subsequent renal allograft rejection.

The primary mechanism through which the ischemic kidney initiates this inflammatory cascade has not yet been fully elucidated and alternative biological pathways should be tested. Although various extracellular stimuli, including DAMPs, promote tubular inflammation, the implication of intracellular distress processes on tubular inflammation remains to be determined.

Tubular cells that encounter nutrient and oxygen deprivation during ischemia use various adaptive responses to maintain homeostasis and survival, including the inhibition of degradation of hypoxia inducible factor-1 α , the inhibition of mammalian target of rapamycin-dependent signaling and the initiation of macroautophagy and the activation of the unfolded protein response (UPR). These adaptive responses decrease energy expenditure, increase nutrient availability and promote cell survival. However, these biological processes also lead to the generation of proinflammatory cytokines and chemokines, suggesting that stressed tissues generate alarm signals that produce an inflammatory microenvironment in addition to releasing DAMPs.^{11–14} Whether such responses trigger inflammation in the setting of acute renal ischemia is unknown.

Ischemia promotes endoplasmic reticulum (ER) stress, a situation that is caused by the accumulation of misfolded

¹INSERM U775, Université Paris Descartes, Paris, France; ²Service de Transplantation Rénale, Hôpital Necker, Paris, France and ³Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

*Corresponding author: N Pallet, INSERM U775, Centre Universitaire des Saints Pères. 45 rue des Saints-Pères, Paris 75006, France. Tel: +33 14 286 2251; Fax: +33 14 286 2072; E-mail: nicolas.pallet@nck.aphp.fr

Keywords: inflammation; epithelial cells kidney; ischemia; transplantation; endoplasmic reticulum stress

Abbreviations: ATF, activated transcription factor; CHOP, C/EBP homologous protein; eIF2 α , elongation initiation factor 2 α ; ER, endoplasmic reticulum; GADD34, growth arrest and DNA-damage-inducible protein 34; GRP, glucose-related protein; IR, ischemia–reperfusion; IRE1, inositol-requiring enzyme 1; PERK, protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase; TRAF2, tumor necrosis factor-associated receptor 2; UPR, unfolded protein response; HRCCs, human renal cortical cells; XBP1, X-box-binding protein 1

Received 21.12.10; revised 15.2.11; accepted 11.3.11; Edited by V De Laurenzi

proteins in the lumen of the ER. ATP shortage caused by hypoxia and glucose deprivation decreases the intra-reticular calcium concentration, impairs the activity of chaperone molecules, interferes with disulfide bridge formation and impairs the maturation of native proteins.^{15–17} The function of the UPR is to adjust cell functions in response to ER stress and to re-establish normal ER function both at the translational and transcriptional level. If the stress persists and adaptation fails, the cell activates the apoptotic program.¹¹ In ER stress conditions, the aim of the UPR is to adapt to the changing environment and reestablish normal ER function, by reducing messenger RNA (mRNA) translation and therefore the amount of new synthesized proteins in the ER, by increasing the proteasomal degradation of ER localized proteins, and by increasing the protein folding capacity of the ER. When adaptation fails and ER stress prolongs, cell triggers death programs, usually in the form of apoptosis.¹⁸ Three major mediators are involved in the UPR signaling: activated transcription factor 6 (ATF6), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) and protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK).

The aim of this study was to investigate whether renal tubular cells promote inflammation through the UPR in the context of ischemic injury. We have demonstrated that glucose deprivation, not hypoxia and amino acids shortage induces ER stress and activates the IRE1 and PERK pathways in human renal cortical cells (HRCCs) in culture. Although the IRE1 axis is necessary for NF- κ B activation and proinflammatory cytokines production, the PERK pathway is not required for NF- κ B activation but amplifies the tubular inflammatory response. Moreover, ER stress and NF- κ B are also activated in rat kidneys following acute cold ischemia. Finally, we have demonstrated that acute kidney ischemic injury promotes tubular ER stress and activates the NF- κ B pathway in human renal allografts.

Results

Glucose deprivation, not hypoxia and amino acids shortage promote ER stress. We first examined which metabolic constituent of ischemia, namely glucose or amino acids deprivation, or hypoxia, induced ER stress in tubular cells. HRCCs exposed for 24 h to glucose-deprived culture medium expressed the ER stress marker GRP78, also known as binding immunoglobulin protein, whereas cells cultured for 24 h without amino acids, or subjected to hypoxia (Figure 1a, bottom) did not develop ER stress (Figures 1a and c). GRP94, a chaperone involved in the adaptive response to ER stress, was also expressed during glucose deprivation (Figure 1b). These results suggest that glucose deprivation, but not amino acids deprivation or hypoxia, promotes ER stress in HRCCs in culture.

Metabolic stress activates the PERK pathway. As glucose deprivation, hereafter referred to as metabolic stress, promotes tubular ER stress, we next tested whether the UPR was activated. Metabolic stress activated the PERK pathway, as shown by the early phosphorylation of the translation initiator elongation initiation factor 2 α (eIF2 α ;

Figure 2a), followed by the selectively translated transcriptional factor ATF4 (Figure 2b) and the expression of transcripts for the apoptotic inducers C/EBP homologous protein (CHOP; also known as growth arrest and DNA-damage-inducible protein 153 (GADD153)) and GADD34 (Figure 2c). These results suggest that metabolic stress activates the PERK pathway in HRCCs.

Metabolic stress activates the IRE1 pathway. IRE1 homodimerizes during ER stress and acquires kinase and endonuclease activities. In HRCCs subjected to metabolic stress, the transcriptional factor X-box-binding protein 1 (XBP1) was actively spliced during glucose deprivation (Figure 2d), suggesting that IRE1 is activated during metabolic stress. Together, these results indicate that metabolic stress activates IRE1 signaling in HRCCs.

Metabolic stress generates a tubular inflammatory response. We next tested whether metabolic stress could promote tubular inflammation. We evaluated the expression of various proinflammatory cytokine and chemokine transcripts during metabolic stress. These transcripts are expressed during acute kidney injury.⁴ HRCCs exposed to metabolic stress showed biphasic expression patterns for IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 and RANTES, whereas CX3CL1 and IL-1 β expression did not increase (Figure 3a). IL-6, IL-8, MCP-1 and TNF- α expression levels peaked early, between 2 and 8 h after stimulation, followed by significant expression inhibition beginning after 12 h. RANTES expression profile was different from the other cytokines, as its expression was maintained even after 12 h, time at which the other cytokines were downregulated. Hierarchical clustering of the gene expression profiles suggested that metabolic stress and the ER stress inducer tunicamycin promote similar proinflammatory profiles which are different from that induced by TNF- α (Figure 3a). These results suggest that ER stress (chemically or metabolically induced) and the prototypical proinflammatory cytokine TNF- α generate distinct tubular inflammatory profiles. C/EBP β , a transcription factor that inhibits the proinflammatory properties of ER stress, was transiently induced by metabolic stress and could, at least in part, be responsible for the biphasic patterns (Figure 3b).

Metabolic stress activates NF- κ B signaling. Inflammatory responses to stress usually involve NF- κ B signaling. HRCCs challenged with metabolic stress activated NF- κ B signaling. Indeed, the expression of the NF- κ B repressor I κ B α was transiently reduced (Figure 3c, left) and NF- κ B p65/RelA expression was transiently increased during metabolic stress (Figure 3c, right). Moreover, the nuclear translocation of the transcriptional factor NF- κ B p65/RelA was observed by immunofluorescence imaging in the same conditions, 2 h after the initiation of the stress (Figure 3d). Taken together, these results suggest that metabolic stress activates the proinflammatory NF- κ B pathway. We next hypothesized that the UPR activated during metabolic stress could promote tubular inflammation.

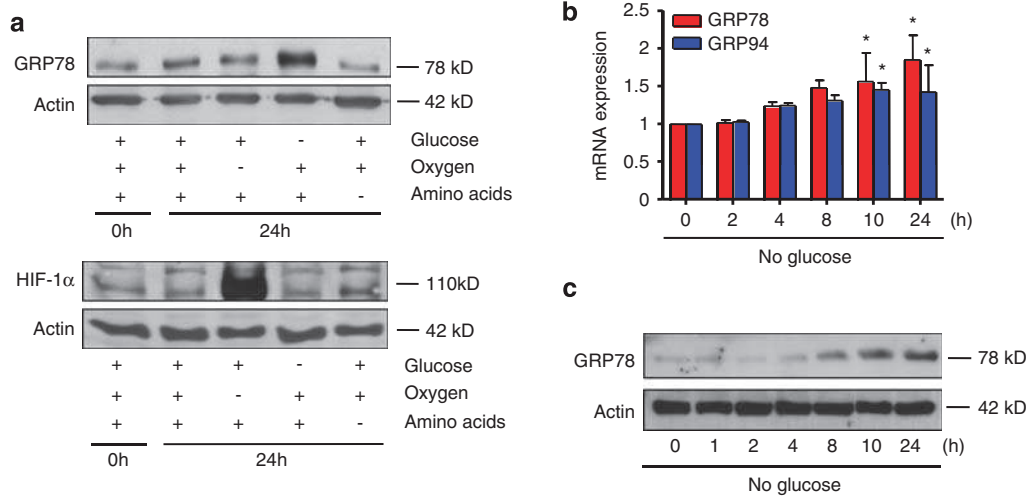


Figure 1 Glucose deprivation, not hypoxia and amino acids shortage promote ER stress. (a) GRP78 and HIF-1 α expression during various metabolic stresses. Levels of GRP78 (top) and HIF-1 α (bottom) expression are shown from HRCs incubated in glucose- or amino acids-deficient culture media or challenged with hypoxia for 24 h. A representative immunoblot of three independent experiments is shown. (b) Metabolic stress promotes chaperones genes transcription. HRCs were cultured in glucose-deprived culture medium for the indicated periods. *GRP78* and *GRP94* transcripts levels, measured by qRT-PCR, are presented as mean \pm S.E.M. relative to levels before metabolic stress over three independent experiments. * $P < 0.05$. (c) Metabolic stress promotes time-dependent GRP78 expression. HRCs were cultured in glucose-deficient medium for the indicated periods and GRP78 protein expression was determined by immunoblotting. A representative immunoblot of three independent experiments is shown

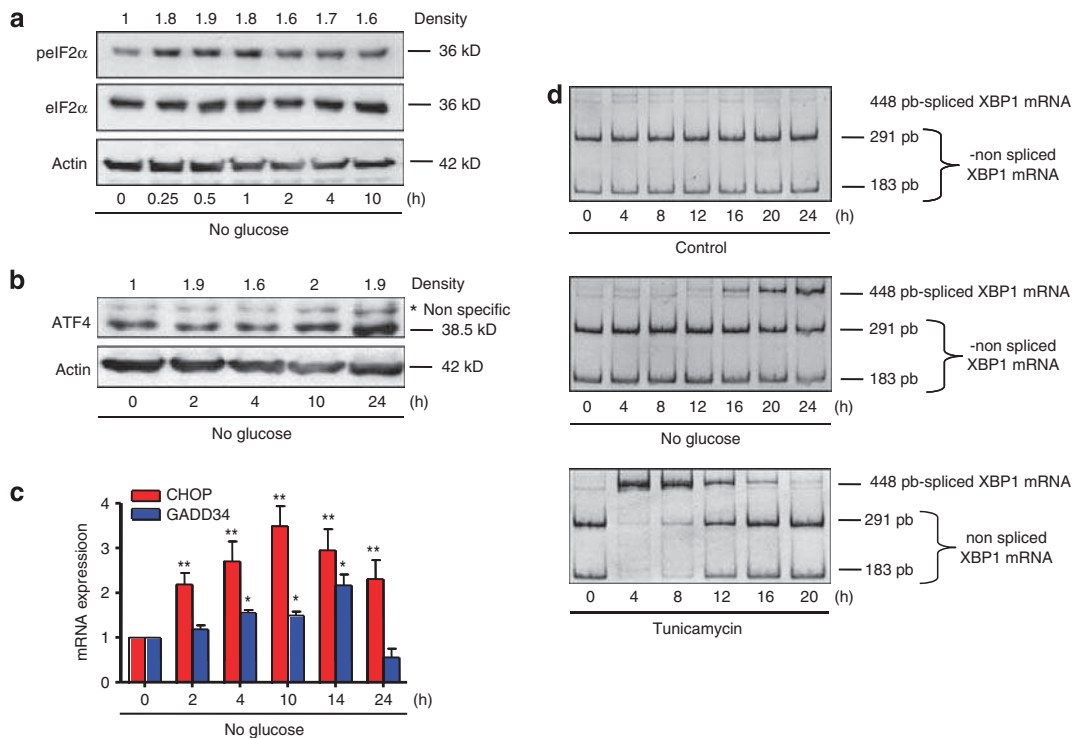


Figure 2 Metabolic stress activates the PERK and IRE1 pathways. (a) eIF2 α is phosphorylated during metabolic stress. Phospho-eIF2 α expression was evaluated by immunoblotting in HRCs cultured in glucose-deficient medium for the indicated periods. A representative immunoblot of three independent experiments is shown. Density refers to p-eIF2 α /total eIF2 α . (b) ATF4 expression is upregulated during metabolic stress. ATF4 protein expression was evaluated by immunoblotting in HRCs cultured in glucose-deficient medium for the indicated periods. A representative immunoblot of three independent experiments is shown. (c) *CHOP* and *GADD34* transcripts expression is upregulated under metabolic stress. HRCs were cultured in glucose-deficient medium for the indicated periods. Transcripts levels, measured by qRT-PCR, are presented as the mean \pm S.E.M. relative to the levels before metabolic stress for three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (d) Metabolic stress promotes XBP1 splicing. HRCs were subjected to a time course of tunicamycin (2 μ g/ml) exposure or cultured in glucose-deficient medium for the indicated periods. *XBP1* mRNA splicing was examined by PCR and followed by migration in polyacrylamide gels. See the Material and Methods section for more details

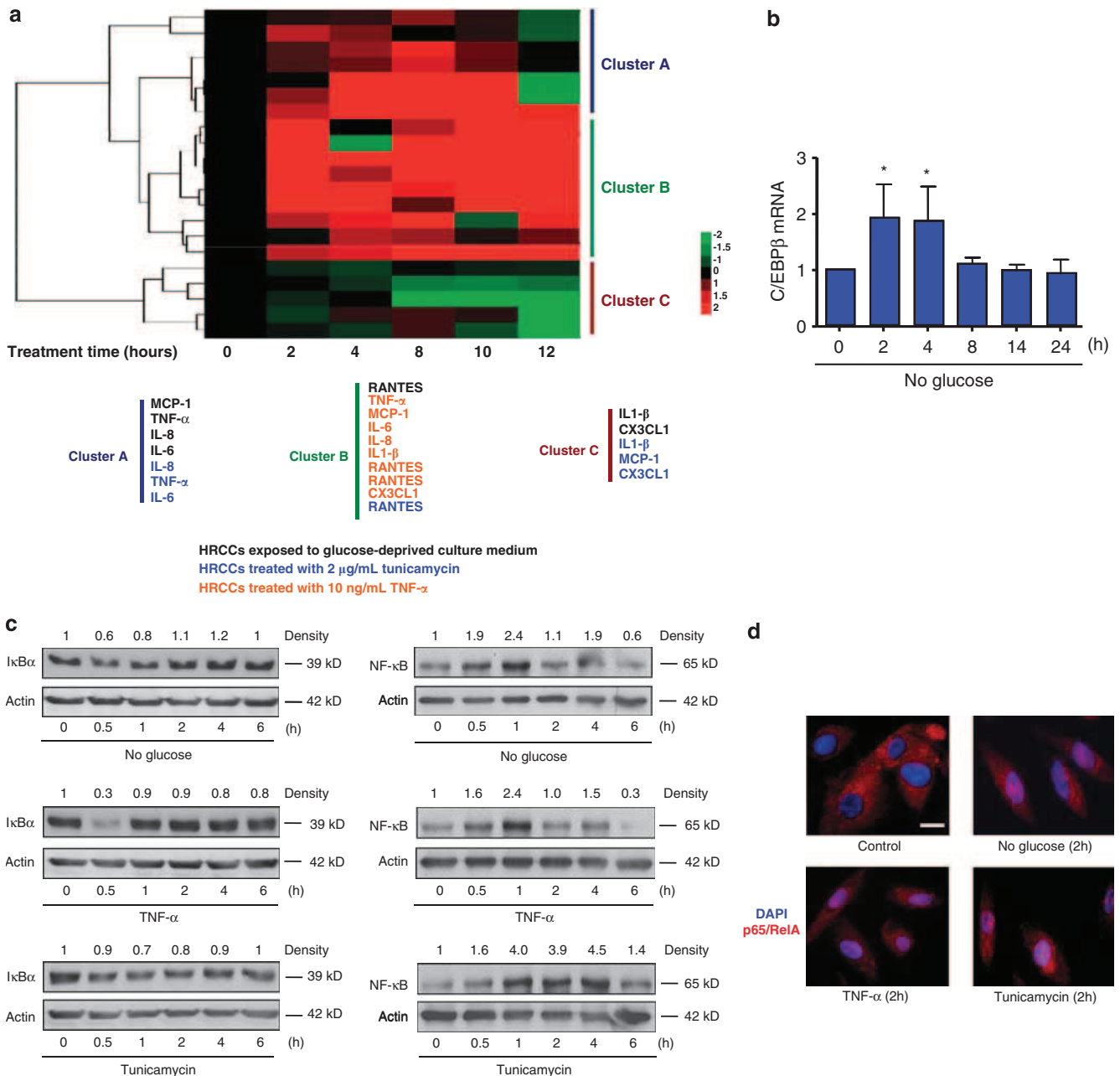


Figure 3 Metabolic stress generates a tubular inflammatory response and activates NF- κ B signaling. (a) Heat Map of cytokines expression profiles. HRCCs were cultured in glucose-deficient medium or incubated with tunicamycin (2 μ g/ml) or TNF- α (10 ng/ml). *IL-6*, *IL-8*, *TNF- α* , *MCP-1*, *RANTES*, *CX3CL1* and *IL-1 β* transcripts levels were measured by qRT-PCR. Expression levels shown are representative of the $2^{-\Delta\Delta C}$ obtained from eight independent replicates at each time point. Time resolved supervised hierarchical clustering of transcripts expression was performed. The brightness of the green and red represents the degree to which expression was lower or higher, respectively, in the HRCCs relative to cells before treatment. (b) *C/EBP β* is transiently upregulated during metabolic stress. HRCCs were cultured in glucose-deficient medium. *C/EBP β* transcripts levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm S.E.M. relative to levels in cells before treatment for three independent experiments. (c) $I\kappa B\alpha$ is degraded and NF- κ B p65/RelA expression is increased during metabolic stress. Protein expression of $I\kappa B\alpha$ (left) and NF- κ B p65/RelA (right) in HRCCs cultured in glucose-deficient medium or incubated with 10 ng/ml TNF- α or 2 μ g/ml tunicamycin for the indicated periods was evaluated. A representative immunoblot of three independent experiments is shown. (d) NF- κ B p65/RelA translocates in the nucleus during metabolic stress. NF- κ B p65/RelA nuclear translocation was evaluated by immunofluorescence analysis. HRCCs were cultured in glucose-deficient medium or incubated with 10 ng/ml TNF- α or 2 μ g/ml tunicamycin for 2 h. Cells were counterstained with DAPI to visualize the nuclei. White bar = 10 μ m. A representative picture of three independent experiments is shown

The PERK pathway is not required for triggering tubular inflammation during metabolic stress. We transiently inhibited PERK signaling during metabolic stress by RNA interference using synthetic small interfering RNA (siRNA) directed against the PERK mRNA (Figure 4a). PERK

inhibition did not seem to alter NF- κ B signaling because the $I\kappa B\alpha$ expression profiles were similar during metabolic stress with or without PERK knockdown (Figure 4b). PERK inhibition did not alter cytokines expression profiles (not shown). This result suggests that the PERK pathway is not

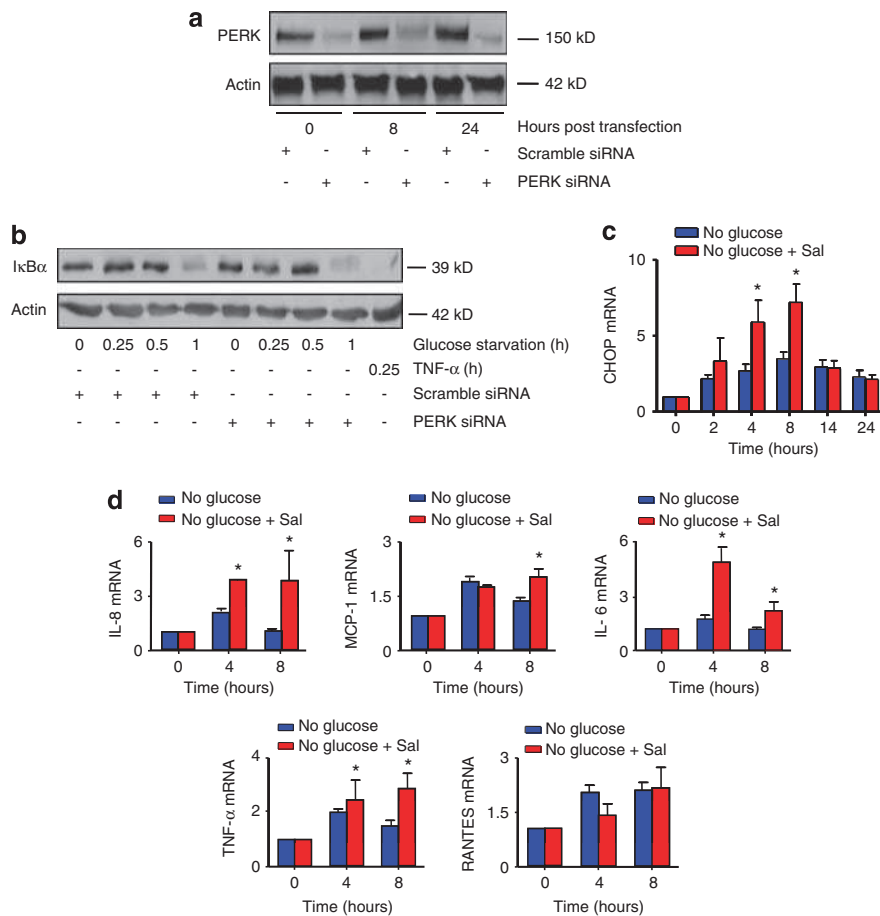


Figure 4 PERK is not required for triggering tubular inflammation during metabolic stress. (a) RNA interference directed against *PERK* transcripts. HRCCs were transfected with siRNA targeting *PERK* transcripts or control non-targeting (scramble) siRNAs. At 24 h post transfection, cells were incubated with glucose-free medium and the PERK protein level was measured at different periods of time. A representative analysis of PERK by immunoblotting is shown ($n = 3$). (b) PERK inhibition does not reduce $I\kappa B\alpha$ degradation during metabolic stress. $I\kappa B\alpha$ protein levels are shown in HRCCs transfected with either PERK or scramble siRNA or control cells. At 24 h post transfection, cells were incubated for 1 h with glucose-deficient medium or incubated with 10 ng/ml $TNF-\alpha$ for 15 min. An immunoblot representative of three independent experiments is shown. (c) Salubrinal amplifies PERK signaling during metabolic stress. HRCCs were incubated with glucose-deficient medium for various periods of time with or without 20 μM salubrinal. *CHOP* transcripts were measured by qRT-PCR after different periods of time. Transcripts expression levels are presented as the mean \pm S.E.M. relative to the levels in non-treated cells and are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$. (d) Salubrinal amplifies tubular inflammation during metabolic stress. HRCCs were incubated with glucose-free medium for various periods of time with 20 μM salubrinal. *IL-6*, *IL-8*, *TNF-\alpha*, *RANTES* and *MCP-1* transcripts were measured by qRT-PCR after different periods of time. Transcripts expression levels are presented as the mean \pm S.E.M. relative to levels in control cells and are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$

required for the initiation of tubular inflammation during metabolic stress. To activate the PERK pathway, we incubated HRCCs with salubrinal, a molecule that selectively blocks eIF2 α dephosphorylation via inhibiting the serine/threonine phosphatase PP1 and amplifies the activation of the PERK pathway, among other effects. Salubrinal promoted the activation of the PERK pathway, as exemplified by the overexpression of CHOP during metabolic stress (Figure 4c). Salubrinal also amplified the expression of proinflammatory cytokines and chemokines (but not RANTES) during metabolic stress (Figure 4d). Together, these results suggest that PERK signaling during metabolic stress does not seem to be required for mediating tubular inflammation but could constitute an accessory pathway that promotes tubular inflammation when selectively activated.

The IRE1 pathway mediates tubular inflammation during metabolic stress. We next focused on IRE1 signaling

during metabolic stress. IRE1 inhibition was effective after siRNA transfection (Figure 5a). Regarding NF- κB signaling, IRE1 inhibition reduced $I\kappa B\alpha$ degradation, NF- κB p65/RelA increase and NF- κB p65/RelA nuclear translocation during metabolic stress (Figure 5b). IRE1 inhibition was associated with reduced expression levels of proinflammatory cytokines during metabolic stress, including IL-8, RANTES, $TNF-\alpha$ and IL-6 to a lesser extent (Figure 5c). MCP-1 expression during metabolic stress did not seem to depend on IRE1 signaling (data not shown). These experiments suggest that metabolic stress generates tubular inflammation that is in part mediated by IRE1-dependent NF- κB signaling.

Cold ischemia in rat kidneys induces ER stress and promotes inflammation. To translate our *in vitro* findings to an *in vivo* setting, we reproduced cold ischemia conditions encountered during kidney transplantation and analyzed

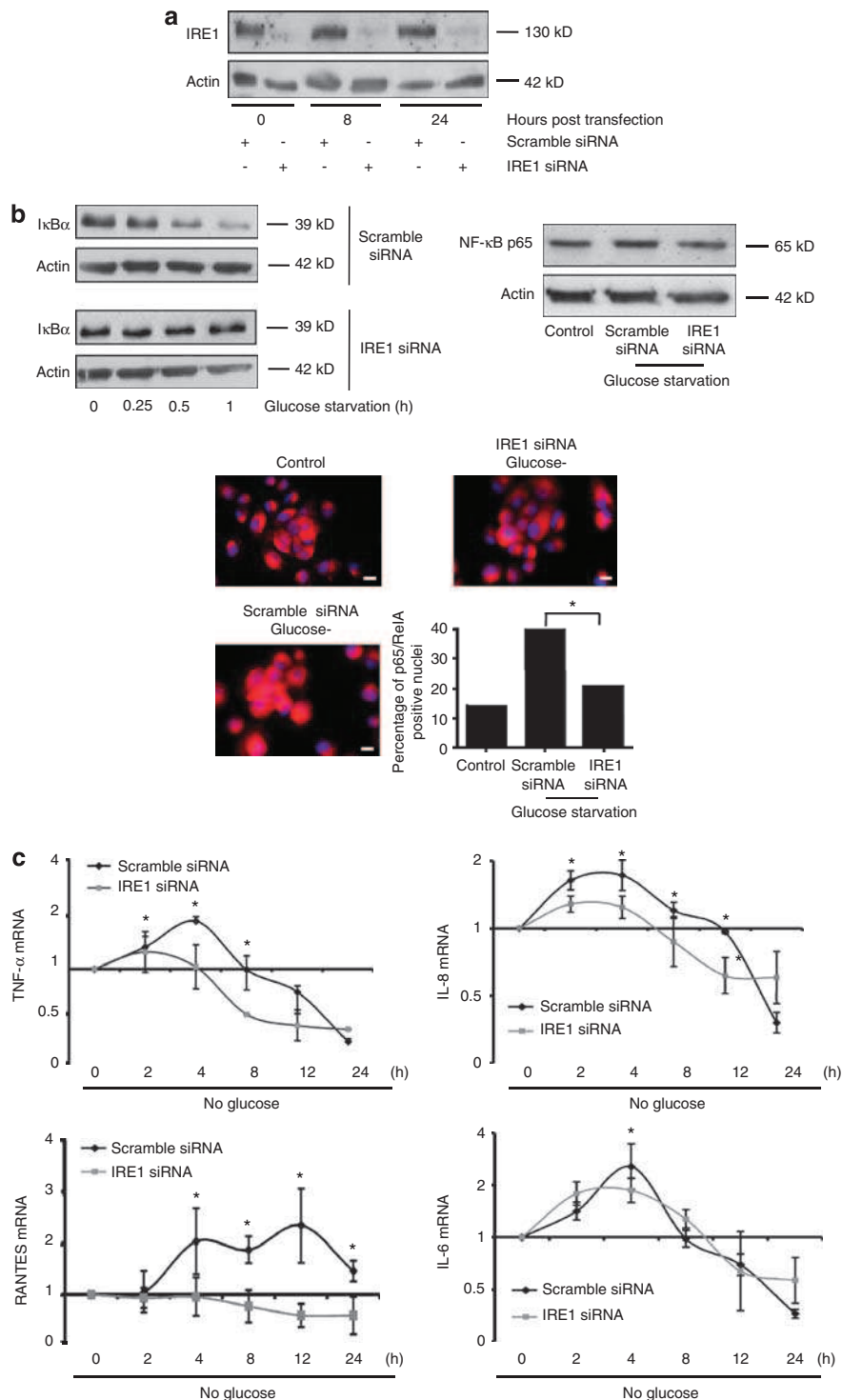


Figure 5 IRE1 mediates tubular inflammation during metabolic stress. (a) RNA interference directed against *IRE1* transcripts. HRCCs were transfected with siRNA targeting *IRE1* transcripts or control non-targeting (scramble) siRNAs. At 24 h post transfection, cells were incubated with glucose-free medium and the IRE1 protein level was measured at different periods of time. A representative analysis of IRE1 by immunoblotting is shown ($n = 3$). (b) IRE1 inhibition inhibits NF- κ B activation during metabolic stress. Left: I κ B α protein levels are shown in HRCCs transfected with either IRE1 or scramble siRNA. At 24 h after transfection, cells were incubated for 1 h with glucose-free medium. An immunoblot representative of three independent experiments is shown. Right: NF- κ B p65 protein levels are shown in HRCCs transfected with either IRE1 or scramble siRNA. At 24 h after transfection, cells were incubated for 1 h with glucose-free medium. An immunoblot representative of three independent experiments is shown. Bottom: NF- κ B p65/RelA nuclear translocation was evaluated by immunofluorescence analysis. HRCCs transfected with either IRE1 or scramble siRNA were cultured for 2 h in glucose-deficient medium. Cells were counterstained with DAPI (blue) to visualize the nuclei. White bar = 10 μ m. Nuclear NF- κ B p65/RelA (red) staining is quantified by dividing the number of positive cells by the total number of cells at magnification $\times 10$. (c) IRE1 inhibition reduces tubular inflammation during metabolic stress. HRCCs transfected with siRNA targeting *IRE1* transcripts or control non-targeting (scramble) siRNAs. At 24 h post transfection, cells were incubated with glucose-free medium and *IL-8*, *IL-6*, *TNF- α* and *RANTES* transcripts were measured by qRT-PCR at different periods of time. Transcripts expression levels are presented as a mean \pm S.E.M. relative to levels in cells transfected with control siRNA and are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$

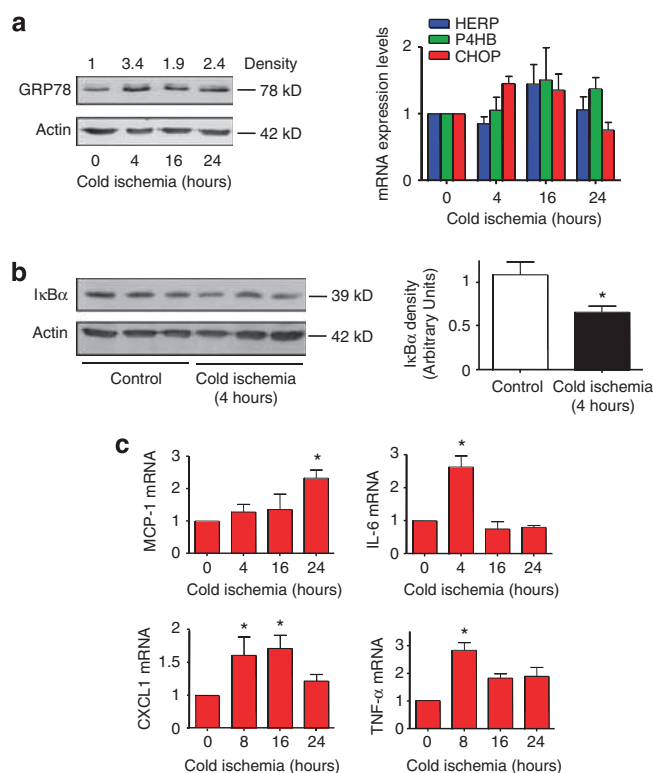


Figure 6 Cold ischemia in rat kidneys activates ER stress and generates an inflammatory response. (a) Cold ischemia promotes endoplasmic reticulum stress in rat kidneys. Rats were nephrectomized and kidneys were rinsed and incubated in an IGL1 solution for up to 24 h. Left: GRP78 protein levels in rat kidneys after various times of cold ischemia were measured. A representative immunoblot is shown. Right: expression levels of the *HERP*, *P4HB* and *CHOP* transcripts in rat kidneys after 0, 4, 16 or 24 h of cold ischemia were measured by qRT-PCR. Expression levels are presented as the mean \pm S.E.M. relative to the levels in rat kidneys before cold ischemia, $n = 4$ per group. (b) Cold ischemia promotes $I\kappa B\alpha$ degradation in rat kidneys. $I\kappa B\alpha$ protein levels in rat kidneys after 4 h of cold ischemia were measured. A representative immunoblot and densitometric analysis are shown. (c) Cold ischemia promotes inflammation in rat kidneys. *IL-6*, *TNF- α* , *MCP-1* and *CXCL1* transcripts expression levels in rat kidneys after various times of cold ischemia were measured by qRT-PCR. Expression levels are presented as the mean \pm S.E.M. relative to the levels in rat kidneys before cold ischemia, $n = 4$ per group. * $P < 0.05$

whether acute ischemia produces ER stress and inflammation in rat kidneys. Rats were nephrectomized and kidneys were conserved in IGL1 (Institute Geroges Lopez, Lyon, France) at 4 °C for various periods of time. The ER stress surrogate marker GRP78 was expressed as early as at 4 h after nephrectomy and was maintained after 24 h (Figure 6a, left). The expression levels of other ER stress markers including CHOP, protein disulfide isomerase and HERP were also increased during acute ischemia (Figure 6a, right). These results suggest that ER stress and the UPR are activated in rat kidneys during acute ischemia. We next characterized the inflammatory processes in ischemic rat kidneys. $I\kappa B\alpha$ expression was downregulated following cold ischemia, suggesting that NF- κ B signaling is activated in the cortex of ischemic kidneys (Figure 6b). Kidney ischemia promoted expression cytokines, including IL-6, TNF- α , MCP-1 and the neutrophil chemoattractant CXCL1, a murin homolog of human IL-8 (Figure 6c). Whether ER stress is directly responsible the kidney inflammation during 'cold' ischemia *in vivo* remains to be definitely demonstrated, but our results strongly suggest that these two processes are linked.

ER stress and NF- κ B activation are associated in renal allograft biopsies. Finally, we performed an immunohistological study in 18 preimplantation human renal

allograft biopsies to investigate whether ER stress and NF- κ B activation are present after acute ischemia. These biopsies were performed just before the kidney transplantation and constitute an interesting human model of acute ischemia. We compared the expression levels of GRP78 between these samples and 15 control biopsies performed at 3 months post transplant in stable patients with a normal renal function. Living donor kidneys were excluded. The mean \pm S.E.M. cold ischemia time was 18 ± 3 h. Control biopsies displayed a low, if not, tubular GRP78 staining; in preimplantation biopsies a strong perinuclear staining was observed (Figure 7a), suggesting that cold ischemia induces ER stress in renal allografts before transplantation. The semiquantitative evaluation showed that GRP78 expression is significantly higher in the preimplantation group than the control group (Figure 7a). In the same manner, NF- κ B p65/RelA nuclear staining was found in the preimplantation group, whereas the control group displayed weak staining (Figure 7b). NF- κ B p65/RelA nuclear staining was significantly higher in the preimplantation group than in the control group (Figure 7b). Finally, we found that GRP78 and NF- κ B p65/RelA colocalized in the same tubules, suggesting that these two processes are linked (please compare preimplantation biopsies on Figures 7a and b). GRP78 and NF- κ B p65/RelA colocalized cortical tubular cells, a finding

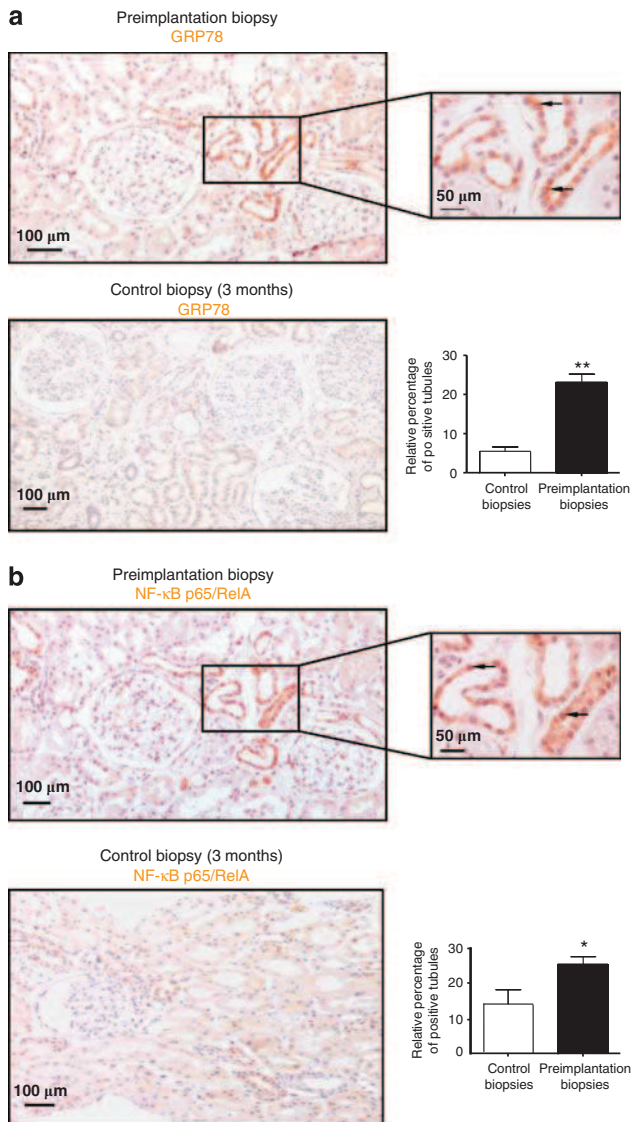


Figure 7 ER stress and NF- κ B activation are associated in renal allograft biopsies. (a) Tubular expression of GRP78 is upregulated following cold ischemia in human kidney allografts. Left: a representative image of GRP78 immunohistochemistry in a preimplantation biopsy with a perinuclear staining (arrows) and a control biopsy. Right: quantification of tubular GRP78 staining in preimplantation biopsies compared with controls (protocol biopsies performed 3 months after transplantation). $n = 18$ for preimplantation biopsies and $n = 15$ for the control group. $**P < 0.01$. (b) NF- κ B signaling is activated following cold ischemia in human kidney allografts. Left: a representative image of NF- κ B p65/RelA immunohistochemistry in preimplantation biopsy with nuclear staining (arrows) and control biopsy. Right: quantification of tubular NF- κ B p65/RelA staining in preimplantation biopsies compared with controls (protocol biopsies performed at 3 months after transplantation). $n = 18$ for preimplantation biopsies and $n = 15$ in the control group. $*P < 0.05$

that confirms our *in vitro* findings on HRCCs. In conclusion, acute kidney ischemic injury promotes tubular ER stress and activates the NF- κ B pathway in human renal allografts.

Discussion

Cellular responses to acute kidney ischemia promote profound biological alterations that lead to metabolic

adaptation and cell survival in the injured milieu. Complex biological pathways are activated to reduce cellular energy expenditure, activate anaerobic glycolysis, increase blood supply and nutrient transport and ultimately maintain cell viability. Ischemia induces metabolic stress that is secondary to oxygen, amino acids and glucose deprivation and activates complex evolutionarily conserved responses, including the UPR. Although this adaptive response promotes cell survival and adaptation to metabolic stress, it also generates distress signals that could locally promote inflammation. This concept is important because a proinflammatory microenvironment is known to favor the adaptive immune response.¹⁹ The precise mechanisms by which renal tubular cells initiate this proinflammatory response remain to be definitively elucidated.

In this study, we identified the UPR as a new factor in the induction of an inflammatory response during metabolic challenge. Tubular epithelial cells may generate a proinflammatory microenvironment during acute ischemic kidney injury as a consequence of extracellular stimuli including complement activation²⁰ or activation of TLRs by high-mobility group B1, heat shock proteins, hyaluronans and biglycans.^{9,10} Although these studies highlight the important role of epithelial cells in inflammation following acute kidney injury, they rely on the role of above mentioned extracellular mediators. Here we demonstrate that intracellular stress induced by glucose deprivation promotes tubular inflammation generating a proinflammatory microenvironment prone to the development of alloimmunity.

We observed a biphasic profile of NF- κ B and cytokines expression during metabolic stress, suggesting that although ER stress may induce proinflammatory molecules via transient activation of NF- κ B in the early phase and suppression in later phase. Previous work demonstrated that C/EBP β , a transcriptional factor whose expression has been shown to increase during ER stress through ill-defined mechanisms, interacts with and inhibits NF- κ B during ER stress.²¹ As we found that C/EBP β is expressed during metabolic stress, one can speculate that ER stress is possibly involved not only in the initiation of renal inflammation but also in its resolution. Whether this inhibitory process occurs *in vivo* and in a human setting remains to be determined. Intriguingly, RANTES expression profile during glucose starvation is different from the other cytokines. There is indeed a biphasic activation of RANTES that persists even after 12 h, time at which the other cytokines evaluated are already down-regulated. The functional significance of these findings for T-cell accumulation at the site of inflammation remains to be demonstrated. Given the chemotactic activity of RANTES that brings T cells, dendritic cells and NK cells to sites of inflammation, one can speculate that RANTES can have detrimental effects via the recruitment of immune cells that enhance inflammatory processes and promote alloimmunity during ischemia.

The detailed mechanisms by which NF- κ B is activated under ER stress are poorly understood. The UPR can directly promote NF- κ B activation through a PERK-eIF2 α -mediated translation attenuation.²² Because the half-life of I κ B α is much shorter than that of NF- κ B transcriptional factors, attenuating translation increases the ratio of NF- κ B to I κ B α and frees NF- κ B to translocate to the nucleus in response to ER stress.

In response to ER stress, the autophosphorylation of IRE1 induces a conformational change in its cytosolic domain, which can then bind to the adapter protein tumor necrosis factor-associated receptor 2 (TRAF2). The IRE1 α -TRAF2 complex recruit I κ B kinase, which phosphorylates I κ B α , leading to its degradation and the nuclear translocation of NF- κ B.²³ The IRE1 α -TRAF2 complex can also recruit the protein kinase JNK, leading to the activation of JNK and the phosphorylation of the transcription factor AP1.²⁴ Our data suggest that the IRE1 and PERK transducers are different drivers of NF- κ B signaling and promote non-redundant cytokine expression profiles. These results are of importance because IRE1 and PERK are differentially activated depending on the cell type, the nature, the intensity and duration of stimuli. Thus, deciphering their respective role in mediating tubular inflammation during ischemic injury could help to better understand the links between ischemic injuries and innate immunity activation.

The UPR is involved in renal tissue response following acute ischemic injury and has a complex role in regulating cell adaptation to stressful conditions and promoting cellular demise.^{16,25} Recent studies have suggested that the UPR is responsible for the inhibition of protein synthesis that occurs in rat kidneys after ischemia-reperfusion (IR) and participates in the onset of renal tubular injury.^{26,27} Conversely, preconditioning of renal epithelial cells in culture with ER stress inducers protects against oxidative assault (reperfusion) and cytotoxicity, suggesting that the cells were protected from injury if ER stress precedes the ischemic assault.²⁸ The ambivalent detrimental and cytoprotective properties of the UPR parallel our findings regarding proinflammatory and anti-inflammatory properties of the UPR during metabolic stress. Understanding this dynamic process is of great importance to develop nephroprotective strategies that target the UPR.

Our findings should be interpreted in the setting of 'pure' acute ischemia rather than as the consequences of IR because we did not analyze ER stress and inflammation after reperfusion injury. The classical model used to analyze tissue response after acute ischemia is the IR model characterized by the clamping of the renal artery for 30 minutes or more (i.e., warm ischemia) followed by reperfusion. Although widely accepted, this model does not reflect the kind of IR injury that occurs in renal transplantation because that ischemic changes occur in a kidney that has been profusely rinsed and is devoid of blood, and the duration of cold ischemia time can be a few hours to >30 h. The consequences of these two kinds of ischemia are clinically and biologically different. However, the model we used does not take into account the consequences of the reperfusion injury that are known to produce oxidative stress and is known to trigger ER stress.

In conclusion, we demonstrated that ischemia promotes tubular ER stress and activates the UPR, *in vitro*, *in vivo* and in human allograft biopsies collected before kidney implantation. The UPR is involved in mounting an inflammatory tubular response that could help to constitute the proinflammatory microenvironment known to encourage the adaptive immune response.

Materials and Methods

Cell culture. HRCCs were recovered from human nephrectomy specimens and cultured according to previously published methods.²⁹ Hypoxia experiments were

performed using the Anaerocult P kit (Merck, VWR, Fontenay sous Bois, France) following manufacturer instructions. To produce metabolic stress, HRCCs were incubated in a nutrient-deprived culture medium. Nutrient culture medium was DMEM supplemented with 1% fetal calf serum and penicillin-streptomycin.

RNA extraction and RT-PCR. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's protocol. The yield and purity of RNA were measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Labtech, Palaiseau, France). Transcript expression levels were quantified by SYBR green real-time PCR using an ABI PRISM 7900 sequence detector system (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Vehicle-treated samples were used as controls, and fold changes for each tested gene were normalized to housekeeping genes (ribosomal protein L13A for *in vitro* analyses and TATA-box-binding protein for *in vivo* analyses). The relative expression levels between samples were calculated using the comparative delta C_t (threshold cycle number) method.³⁰ Primers are listed in Supplemental Table 1.

Protein extraction and western blot analysis. Protein extraction and immunoblotting were performed as previously described.²⁹ Details on antibodies are listed on Supplemental Table 2.

Immunofluorescence microscopy. HRCCs were cultured on glass coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde, rinsed with phosphate-buffered saline and blocked with 2% bovine serum albumin. Cells were permeabilized with Triton X-100 and incubated with a rabbit anti NF- κ B p65/RelA antibody. Samples were then incubated with an anti-rabbit Cy5 antibody (Jackson ImmunoResearch, Marseille, France). Then, cells were washed and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories, Peterborough, UK). Slides were mounted and viewed using a Nikon Eclipse TE 2000E (Nikon, Champigny sur Marne, France) imaging fluorescence microscope. Details on antibodies are listed on Supplemental Table 2.

siRNA transfections. PERK, IRE1 and scramble (control) siRNAs were designed and obtained from Qiagen. Transfection was performed using HiPerfect (Qiagen) as the transfection reagent and following the manufacturer protocol.

Analysis of XBP1 processing. HRCCs were exposed to metabolic stress or tunicamycin, and the XBP1 cDNA encompassing the region of restriction site was amplified by PCR using the following primers forward 5'-aaacagatgacgctca-3' and reverse 5'-tcctctggtagacctctggag-3' and the PCR product was incubated with the Pst1 restriction enzyme for 1 h at 37 °C, and the restriction digests were separated on a 8% polyacrylamide gel with ethidium bromide. The gels were photographed under UV transillumination and quantified by densitometry. The XBP1 mRNA that was resistant to Pst1 and therefore already spliced and activated was detected as a 448-bp, Pst1⁻, amplification product, which is indicative of spliced XBP1 mRNA. XBP1 PCR products were digested with Pst1 (Pst1⁺), to produce 291-bp and 183-bp amplification products, which indicate a predominance of the native, unspliced form of the XBP1 mRNA.

In vivo study. To characterize acute kidney ischemia injury that occurs before kidney transplantation, we nephrectomized rats and we conserved rinsed kidneys in a conservation solution, namely IGL1, at 4 °C for various periods of time. This experiment in rats promotes cold ischemia similar to that observed in human renal kidneys before transplantation. Adult male Sprague-Dawley rats were assigned to one of five groups of four animals each. Rats were anesthetized with intraperitoneal ketamine. The abdomen was then opened through a midline incision and the kidneys were perfused with cold heparinized saline. Kidneys were next washed with IGL1 followed by incubation in IGL1 during 0 h, 4, 8, 16 and 24 h at 4 °C. All procedures were performed strictly under the Paris Descartes University Animal Care recommendations.

Renal allograft biopsies and immunohistochemistry. In all, 18 preimplantation biopsies were analyzed for GRP78 and NF- κ B p65/RelA staining. In all, 15 protocol biopsies performed at 3 months post transplant in stable patients with a normal renal function and who received treatment with tacrolimus, prednisone and mycophenolate mofetil were used as control. Patients wrote informed consent at the time of the transplantation. Pathological examination was strictly normal using Banff scoring. The sections were incubated with an anti-GRP78 rabbit polyclonal antibody or a rabbit anti-NF- κ B p65/RelA antibody. The sections were then

incubated with anti-rabbit antibody conjugated to a peroxidase-labeled polymer (Dako, Trappes, France). Details on antibodies are listed on Supplemental Table 2. Tubular GRP78 and NF- κ B p65/RelA staining were quantified by dividing the number of positive tubules by the total quantified at $\times 20$ magnification.

Statistical analysis. All data are expressed as means \pm S.E.M. of three different experiments, unless otherwise specified. Biological and histological data were compared using non-parametric tests. We used the Mann-Whitney *U*-test for non-parametric data comparisons between two groups, and the Student's test for parametric data. Statistical analyses were performed using Prism-GraphPad software (GraphPad Prism4, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A *P*-values of < 0.05 were considered significant.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We thank Monique Diry and Jean-Pierre Flinois for their technical assistance. This work has been supported by a grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Author's contributions

SF performed all of the experiments; NB performed *in vivo* studies; DA generated primary cultured cells; CL, ET and PB supervised the project; NP designed the study and wrote the paper.

- Bonventre J. Diagnosis of acute kidney injury: from classic parameters to new biomarkers. *Contrib Nephrol* 2007; **156**: 213–219.
- Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2006; **81**: 643–654.
- Perico N, Cattaneo D, Sayegh M, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004; **364**: 1814–1827.
- Bonventre J, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 2004; **66**: 480–485.
- Anders H. Toll-like receptors and danger signaling in kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 1270–1274.
- Anders H, Schlondorff D. Innate immune receptors and autophagy: implications for autoimmune kidney injury. *Kidney Int* 2010; **78**: 29–37.
- Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 2000; **15**: 290–301.
- Eddy AA, Neilson EG. Chronic kidney disease progression. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 2964–2966.
- Leemans J, Stokman G, Claessen N, Rouschop K, Teske G, Kirschning C *et al*. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest* 2005; **115**: 2894–2903.
- Wu H, Chen G, Wyburn K, Yin J, Bertolino P, Eris J *et al*. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2007; **117**: 2847–2859.
- Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008; **454**: 455–462.
- Lee D, Hung M. All roads lead to mTOR: integrating inflammation and tumor angiogenesis. *Cell Cycle* 2007; **15**: 3011–3014.
- Nizet V, Johnson R. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 609–617.
- Sumpter RJ, Levine B. Autophagy and innate immunity: triggering, targeting and tuning. *Semin Cell Dev Biol* 2010; **21**: 699–711.
- Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY *et al*. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 411–421.
- Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000; **101**: 451–454.
- Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2004; **279**: 25935–25938.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; **115**: 2656–2664.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; **296**: 301–305.
- Akcaay A, Nguyen Q, Edelstein C. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm* 2009; **2009**: 137072.
- Hayakawa K, Nakajima S, Hiramatsu N, Okamura M, Huang T, Saito Y *et al*. ER stress depresses NF- κ B activation in mesangial cells through preferential induction of C/EBP beta. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 73–81.
- Deng J, Lu P, Zhang Y, Scheuner D, Kaufman R, Sonenberg N *et al*. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 10161–10168.
- Kaneko M, Niinuma Y, Nomura Y. Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol Pharm Bull* 2003; **26**: 931–935.
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP *et al*. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000; **287**: 664–666.
- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 519–529.
- Kuznetsov G, Bush KT, Zhang PL, Nigam SK. Perturbations in maturation of secretory proteins and their association with endoplasmic reticulum chaperones in a cell culture model for epithelial ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8584–8589.
- Montie HL, Kayali F, Haezebrouck AJ, Rossi NF, Degracia DJ. Renal ischemia and reperfusion activates the eIF 2 alpha kinase PERK. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1741**: 314–324.
- Hung CC, Ichimura T, Stevens JL, Bonventre JV. Protection of renal epithelial cells against oxidative injury by endoplasmic reticulum stress preconditioning is mediated by ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 2003; **278**: 29317–29326.
- Pallet N, Thervet E, Le Corre D, Knebelmann B, Nusbaum P, Tomkiewicz C *et al*. Rapamycin inhibits human renal epithelial cell proliferation: effect on cyclin D3 mRNA expression and stability. *Kidney Int* 2005; **67**: 2422–2433.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 2001; **25**: 402–408.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)

Supplemental table 1. Primer sequences used for RT-PCR analysis (A, Homo sapiens, B, Rattus norvegicus)

A.

Gene name	Access number (Homo sapiens)	PCR product size (nucleotides)	Primer sequence
BiP	<i>NM_005347</i>	200	F 5'-ggtgaaagaccctgacaaa-3'
			R 5'-gtcaggcgattctggtcatt-3'
C/EBPβ	<i>NM_005194</i>	126	F 5'-ttcgaagttgatgcaatcg-3'
			R 5'-caacaagcccgtaggaacat-3'
CHOP	<i>NM_004083</i>	170	F 5'-tggaagcctggtatgaggac-3'
			R 5'-tgtgacctctgctggtctg-3'
CX3CL1	<i>NM_002996</i>	147	F 5'-tccttaccagcagagcacct-3'
			R 5'-gtctctgctctgccatttc-3'
GADD34	<i>NM_014330</i>	171	F 5'-aggaggctgaagacagtgga-3'
			R 5'-ggccatctgcaaattgactt-3'
GRP94	<i>NM_003299</i>	285	F 5'-agtacggatggcttggaac-3'
			R 5'-tgaggcgaagcattctttct-3'
IL-1β	<i>NM_000576</i>	268	F 5'-cagccaatcttcattgctca-3'
			R 5'-gcatcttctcagctgtcc-3'
IL-6	<i>NM_000600</i>	272	F 5'-aggagacttgcttggtgaaa-3'
			R 5'-aaagctgcgcagaatgagat-3'
IL-8	<i>NM_000584</i>	180	F 5'-caggaattgaatgggtttgc-3'
			R 5'-aaaccaaggcacagtggaaac-3'
IRE1α	<i>NM_001433</i>	261	F 5'-aggagaggagggaatcgta-3'
			R 5'-cagtcctaatagccacacct-3'
MCP-1	<i>NM_002982</i>	171	F 5'-ccccagtcacctgctgttat-3'
			R 5'-tggaatcctgaaccacttc-3'
PERK	<i>NM_004836</i>	175	F 5'-caggcaaaggaaggagtctg-3'
			R 5'-aacaactccaaagccaccac-3'
RANTES	<i>NM_002985</i>	285	F 5'-gctgcagtgagctgagattg-3'
			R 5'-gccagtaagctcctgtgagg-3'
RPL13A	<i>NM_012423</i>	124	F 5'-cctggaggagaagaggaaagaga-3'
			R 5'-gaggacctctgtgtattgtcaa-3'
TNF-α	<i>NM_000594</i>	208	F 5'-tccttcagacaccctcaacc-3'
			R 5'-caggatcaaagctgtaggc-3'

B.

Gene name	Access number (Rattus norvegicus)	PCR product size (nucleotides)	Primer sequence
CHOP	<i>NM_024134</i>	236	F 5'-cgacagagccaaaataacagc-3' R 5'-ggatgcagggtcaagagtgtg-3'
CXCL1	<i>NM_030845</i>	215	F 5'-gcggagagatgagagtctgg-3' R 5'-gagacgagaaggagcattgg-3'
CX3CL1	<i>NM_134455</i>	106	F 5'-ctcgtcccagagtgaggaag-3' R 5'-ctgctcctcaggcctacaac-3'
HERP	<i>NM_053523</i>	110	F 5'-agaacttgcggatgaatgc-3' R 5'-gaggaaaacggaaaatgtcg-3'
IL-1β	<i>NM_031512</i>	230	F 5'-aggttccttgtgcaagtgt-3' R 5'-tgagtgaactgccttctg-3'
IL-6	<i>NM_012589</i>	136	F 5'-taccccaactccaatgctc-3' R 5'-ggttgcgagtagacctca-3'
MCP-1	<i>NM_031530</i>	192	F 5'-ccagaaaccagccaactctc-3' R 5'-ccgactcattgggatcatct-3'
P4HB	<i>NM_012998</i>	206	F 5'-tgaactggctgaagaacg-3' R 5'-ggaaaacacatcgctattgg-3'
RANTES	<i>NM_031116</i>	122	F 5'-atatggctcggacaccactc-3' R 5'-tgacaaagacgactgcaagg-3'
TBP	<i>NM_001004198</i>	132	F 5'-tgcacagagccaagagtgaa-3' R 5'-cacatcacagctccccacca-3'
TNF-α	<i>NM_012675</i>	211	F 5'-actcccagaaaagcaagcaa-3' R 5'-cgagcaggaatgagaagagg-3'

Supplemental table 2. Primary antibodies used for (A) Western blot, (B) immunofluorescence and (C) immunohistochemistry analyses.

A.

Antibody	Dilution	Reference
Anti-phospho-eIF2 α	1:500	ab32157 ¹
Anti-I κ B α	1:1000	9242 ²
Anti-GRP78	1:1000	sc-1050 ³
Anti-ATF4	1:500	ab50546 ¹
Anti-IRE1 α	1:500	3294 ²
Anti-HIF-1 α	1:500	NB100-449 ⁴
Anti-NF- κ B p65	1:1000	4764 ²
Anti-Actin	1:1000	A2668 ⁵

B.

Antibody	Dilution	Reference
Anti-NF- κ B p65	1:20	4764 ²

C.

Antibody	Dilution	Reference
Anti-GRP78	1:1000	sc-1050 ³
Anti-NF- κ B p65	1:50	sc-8008 ³

¹ Abcam, Cambridge, UK

² Cell Signaling Technology, Saint-Quentin-en-Yvelines, France

³ Santa Cruz Biotechnology, Le Perray-en-Yvelines, France

⁴ Novus Biologicals, Cambridge, UK

⁵ Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France

Article n°3

Bouvier N, Fougeray S, Beaune P, Thervet E, Pallet N. The unfolded protein response regulates an angiogenic response by the kidney epithelium during ischemic stress. *J Biol Chem* 2012; 287(18):14557-68.

The Unfolded Protein Response Regulates an Angiogenic Response by the Kidney Epithelium during Ischemic Stress^{*S}

Received for publication, January 8, 2012, and in revised form, March 2, 2012. Published, JBC Papers in Press, March 8, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.340570

Nicolas Bouvier^{†S}, Sophie Fougeray^{†S}, Philippe Beaune^{†S¶}, Eric Thervet^{†S||}, and Nicolas Pallet^{†S1}

From [†]INSERM U775, Centre Universitaire des Saints Peres, Paris, France, the ^{||}Service de Nephrologie, and [¶]Pole de Biologie, Hopital Europeen Georges Pompidou, Paris 70115, France, and the ^SUniversite Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, Paris 75065, France

Background: It is unknown whether the unfolded protein response (UPR) mediates an angiogenic response during kidney ischemia.

Results: The UPR regulates the expression of VEGFA, bFGF, and angiogenin independently of HIF-1 α , during kidney ischemia.

Conclusion: PERK is a central regulator of the angiogenic response to nutrient deprivation.

Significance: Our study identifies the UPR as a potential regulator of angiogenesis, independent of HIF-1 α .

Ischemic injuries permanently affect kidney tissue and challenge cell viability, promoting inflammation and fibrogenesis. Ischemia results in nutrient deprivation, which triggers endoplasmic reticulum stress, ultimately resulting in the unfolded protein response (UPR). The aim of this study was to test whether the UPR could promote an angiogenic response independently of the HIF-1 α pathway during ischemic stress in the human kidney epithelium. Glucose deprivation induced the secretion of vascular endothelial growth factor A (VEGFA), basic fibroblast growth factor (bFGF) and angiogenin (ANG) in human kidney epithelial cells independently of HIF-1 α . Glucose deprivation, but not hypoxia, triggered endoplasmic reticulum stress and activated the UPR. RNA interference-mediated inhibition of the gene encoding the kinase PERK decreased VEGFA and bFGF expression, but neither gene was affected by the inhibition of IRE1 α or ATF6. Furthermore, we show that the expression of angiogenin, which inhibits protein synthesis, is regulated by both IRE1 α and PERK, which could constitute a complementary function of the UPR in the repression of translation. In a rat model of acute ischemic stress, we show that the UPR is activated in parallel with VEGFA, bFGF, and ANG expression and independently of HIF-1 α .

Chronic kidney structural deterioration progresses as a result of the dynamic combination of specific and nonspecific insults that engage cycles of cell death, inflammation, and healing, ultimately resulting in maladaptive tissue remodeling and loss of kidney function (1, 2). Ischemia occurs when the blood supply to the tissue is so restricted that it induces cellular stress and is a common factor in the progression of several, if not all, chronic kidney diseases, as it induces inflammation, epithelial-to-mesenchymal transition and fibrosis (3). A shortage of blood can produce ischemia, during which the tissues cannot fulfill their energetic demand. The cellular response to ischemia aims,

in a coordinated fashion, to improve the energy input (nutrients and oxygen) and reduce the energy expenditure. This improvement in the energy input relies on angiogenesis, the cellular expression of nutrient transporters, or catabolic processes including autophagy. Alternatively, the reduction of energy expenditure can be achieved by a reduction in protein translation, which is a highly energy-consuming process. During ischemia, the inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR)² signaling and the activation of the kinase PKR-like ER Kinase (PERK), mediate the general inhibition of translation. Of note, some of the proteins that are involved in the metabolic adaptation to ischemia, such as activated transcription factor 4 (ATF4), which can mediate angiogenesis (4), can be selectively translated and expressed despite the general inhibition of translation. At the cellular level, oxygen and nutrient deprivation activate adaptive mechanisms that maintain basal metabolism and vital functions. Although mainly protective, these signaling pathways also actively participate in tissue remodeling by promoting inflammation and fibrogenesis, which can result in interstitial fibrosis, tubular atrophy, capillary rarefaction, and loss of kidney function. These structural alterations cause a progressive deterioration of the vascular network and exchanging interfaces, changes that, in turn, aggravate ischemia (3, 5). Therefore, a better understanding of the biological processes activated within the cell in response to ischemia is critical both for the identification of potential therapeutic targets, and to slow structural kidney deterioration.

The best-known adaptive response to ischemia is the stabilization of the transcription factor Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α), which escapes from proteasomal degradation during hypoxia. HIF-1 α drives the transcription of genes involved in adaptive responses to hypoxia, which include angiogenesis,

* This work was supported by a grant from the Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM).

^S This article contains supplemental Figs. S1–S4 and Tables S1 and S2.

¹ To whom correspondence should be addressed: INSERM U775, Centre Universitaire des Saints Peres, 45 rue des Saints-Peres, 75006 Paris, France. Tel.: 33142862251; Fax: 33142862072; E-mail: npallet@yahoo.fr.

² The abbreviations used are: mTOR, mammalian target of rapamycin; ATF, activated transcription factor; CHOP, C/EBP homologous protein; eIF2 α , elongation initiation factor 2 α ; ER, endoplasmic reticulum; GRP, glucose-related protein; IRE1 α , inositol-requiring enzyme 1; PERK, protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase; UPR, unfolded protein response; PDI, protein-disulfide isomerase; HREC, human renal epithelial cells; XBP-1, X-box-binding protein 1; bFGF, basic fibroblast growth factor; ANG, angiogenin; VEGFA, vascular endothelial growth factor A; HERP, homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress protein; PDI, protein-disulfide isomerase.

The Unfolded Protein Response and Tubular Angiogenesis

nutrient transport, glycolysis, and inhibition of apoptosis (6). The secretion of angiogenic factors by epithelial and endothelial cells during ischemia contributes to the maintenance of an intact tubulo-interstitial compartment and slows the progression of kidney disease, although the situation is complex, as a dysregulated angiogenic response can result in deleterious effects and amplify an injury (7, 8).

Other adaptive processes implicated in the response to nutrient and oxygen deprivation involve the mTOR kinase (9, 10) and the unfolded protein response (UPR) (11, 12). Hypoxia and glucose starvation promote ATP shortage, decrease the intracellular calcium concentration, impair the activity of chaperone molecules, interfere with disulfide bridge formation and impair the maturation of native proteins, a process that promotes endoplasmic reticulum (ER) stress and activates the UPR (12, 13). The UPR involves three major mediators, PERK, the protein kinase/endoribonuclease Inositol-requiring Enzyme 1 α (IRE-1 α) and the transcription factor ATF6. The role of the UPR is to modify cellular functions in response to ER stress and to re-establish normal ER function both at the translational and transcriptional levels. The UPR is responsible for the attenuation of general mRNA translation by the phosphorylated form of elongation Initiation Factor 2 α (eIF2 α) and transcriptional regulation of the UPR genes encoding chaperones, folding, and proteasomal degradation enzymes, and activation of macroautophagy (13, 14).

It is currently unknown whether the UPR mediates an angiogenic response during kidney ischemia. The aim of this study was to investigate whether the UPR modulates the production of angiogenic factors by the human kidney epithelium during ischemia. Here, we demonstrate that human renal epithelial cells (HREC) subjected to glucose deprivation secrete vascular endothelial growth factor A (VEGFA), basic fibroblast growth factor (bFGF), and angiogenin (ANG) independently of HIF-1 α , and we identify the PERK pathway as a central regulator of this angiogenic response. Additionally, we show that the expression of the angiogenic mediator ANG, which is also a translational repressor, is regulated by both IRE1 α and PERK. This provides the basis for the characterization of other functions of the UPR in the inhibition of mRNA translation in addition to the PERK-eIF2 α pathway.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—HREC of proximal origin (HK-2) were purchased from ATCC/LGC Standards and cultured according to previously published methods (15). Hypoxia experiments were performed using the Anaerocult[®] P kit (Merck Chemicals). The Anaerocult[®] kit is a small chamber that produces an anaerobic atmosphere due to the presence of chemicals that absorb oxygen, including iron powder, citric acid, sodium carbonate, and silica (kieselguhr), which are activated by water. The Petri dishes are incubated within these chambers, in which the estimated oxygen percentage is less than 0.1% beyond 1 h. This chamber can be placed in a tissue culture incubator. HREC were incubated in glucose-free DMEM to induce ischemic stress.

siRNA Transfections—PERK, IRE1 α , ATF6, and scramble (control) small interfering synthetic RNAs (siRNAs) were

designed and obtained from Qiagen. Transfection was performed using HiPerFect[®] (Qiagen) following the manufacturer's protocol.

RNA Extraction and Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)—Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit[®] (Qiagen) following the manufacturer's protocol. The yield and purity of RNA were measured using a NanoDrop ND-1000[®] spectrophotometer (Nanodrop Technologies). Transcript expression levels were quantified by SYBR green real-time PCR using an ABI PRISM 7900 sequence detector system (Applied Biosystems). Vehicle-treated samples were used as the controls, and fold changes for each tested gene were normalized to housekeeping genes (Ribosomal Protein L13A for *in vitro* and Tata-binding protein for *in vivo* analyses). The relative expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (threshold cycle number) method (16). Primers are listed in supplemental Table S1.

Protein Extraction and Western Blot Analysis—Total protein lysate from HREC was separated by sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions and transferred to a PVDF membrane (GE Healthcare). Primary antibodies were visualized using horseradish peroxidase-conjugated polyclonal secondary antibodies (Sigma Aldrich) and detected by ECL reagent[®] (GE Healthcare). Antibody details are listed in the supplemental Table S2.

Cell Membrane Permeabilization Assessment—The level of cell necrosis was measured using the ToxiLight[®] BioAssay Kit (Cambrex), which is a bioluminescent assay designed to measure the release of adenylate kinase from damaged cells. Experiments were performed according to the manufacturer's protocol.

Enzyme-linked Immunosorbent Assays—Subconfluent cells were grown in 6-well plates for the indicated times under the indicated conditions. Secretion of VEGFA, bFGF, ANG, and PDGF-BB was quantified in the cell culture supernatant using the Quantikine[®] human VEGF immunoassay, the Quantikine[®] human bFGF immunoassay, the Quantikine[®] human ANG immunoassay and the Quantikine[®] human PDGF-BB immunoassay (RD Systems), respectively, according to the manufacturer's protocol. VEGFA, bFGF, ANG, and PDGF-BB concentrations in the culture medium were normalized to the number of cells in the plate.

In Vivo Experiments—Adult male Sprague-Dawley rats weighing 170–180 g were purchased from Charles River Laboratories. To characterize the acute kidney ischemia injury that occurs before kidney transplantation, we nephrectomized rats and rinsed the kidneys in IGL1[®] preservation solution at 4 °C for 24 h. The rats were anesthetized using intraperitoneal ketamine and xylazine. The abdomen was then opened by a midline incision, and the kidneys were perfused with cold heparinized saline. The kidneys were then washed with IGL1[®] and incubated with IGL1[®] for 24 h at 4 °C ($n = 4$ for each group). All procedures were strictly performed according to the Paris Descartes University Animal Care recommendations.

Statistical Analysis—All data are expressed as the mean \pm S.E. of three independent experiments, unless otherwise specified. Variables were compared with the Student's *t* test. Statis-

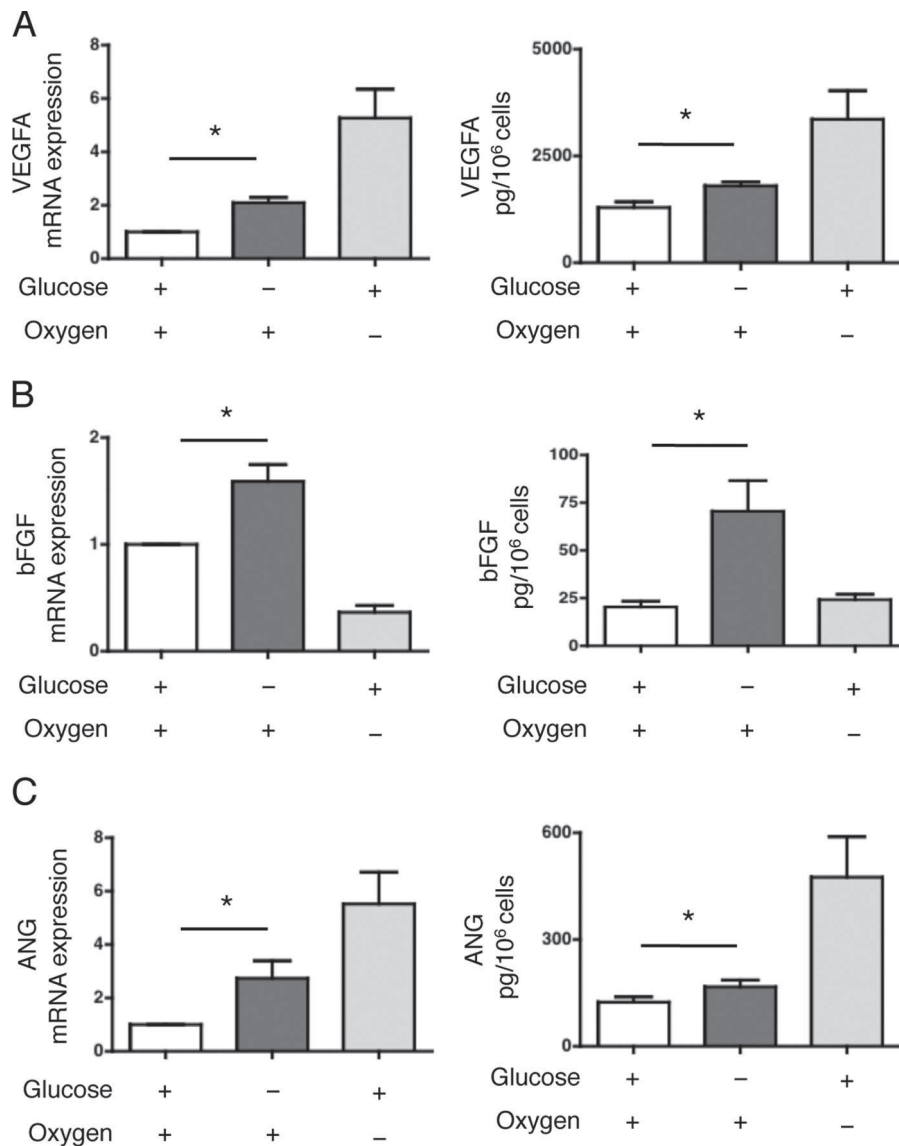


FIGURE 1. **Glucose deprivation induces the expression of angiogenic mediators.** A, HREC were cultured in glucose-deprived medium or in standard medium with or without hypoxia for 24 h. *Left:* VEGFA transcript levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm S.E. relative to levels after 24 h of culture with standard conditions in four independent experiments. *Right:* secretion of VEGFA in the medium was quantified by ELISA. The concentration is presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments. *, $p < 0.05$. B, HREC were cultured in glucose-deprived medium or in standard medium with or without hypoxia for 24 h. *Left:* bFGF transcript levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm S.E. relative to levels after 24 h of culture with standard conditions in four independent experiments. *Right:* secretion of bFGF in the medium was quantified by ELISA. The concentration is presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments. *, $p < 0.05$. C, HREC were cultured in glucose-deprived medium or in standard medium with or without hypoxia for 24 h. *Left:* ANG transcript levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm S.E. relative to levels after 24 h of culture with standard conditions in four independent experiments. *Right:* secretion of ANG in the medium was quantified by ELISA. The concentration is presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments. *, $p < 0.05$.

tical analyses were performed using Prism-GraphPad® software. p values of less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Glucose Deprivation Induces the Expression of Angiogenic Mediators—To test whether ischemia induces an angiogenic response within the human kidney epithelium, we monitored the expression of genes encoding mediators of angiogenesis in HREC exposed to glucose-deprived medium, hypoxia, or both. The combination of hypoxia and glucose starvation proved to be too cytotoxic within our cellular model to provide interpretable results (supplemental Fig. S1A). We analyzed the expres-

sion of VEGFA, bFGF, ANG, and platelet-derived growth factor β (PDGFB), as these mediators are important regulators of angiogenesis during kidney disease (7, 8, 17, 18).

After 24 h of culture in glucose-deprived culture medium under normoxic conditions, VEGFA expression was significantly increased compared with the controls (HREC cultured in standard conditions) at both the transcriptional and protein levels (Fig. 1A). As expected, hypoxia also promoted VEGFA expression in our model (Fig. 1A). Glucose starvation for 24 h significantly increased bFGF transcript levels relative to HREC cultured in standard conditions, whereas hypoxia did not alter bFGF gene expression (Fig. 1B). Glucose starvation, but not

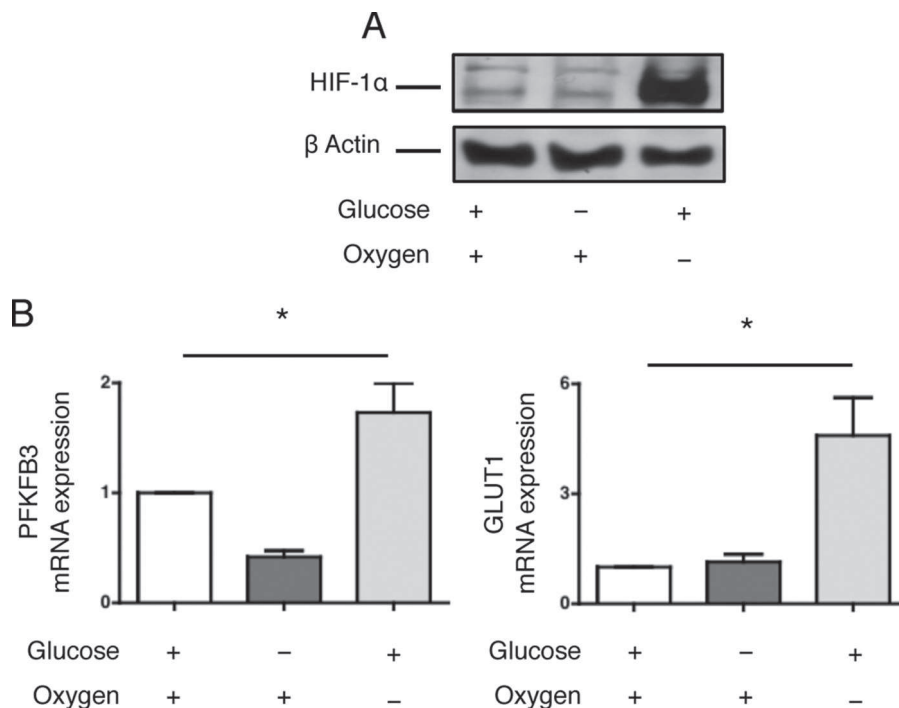


FIGURE 2. **Glucose deprivation does not activate HIF-1 α signaling.** A, HREC were cultured in glucose-depleted medium or in standard medium with or without hypoxia for 24 h. HIF-1 α protein expression was determined by immunoblotting. The immunoblot shown is representative of three independent experiments. B, HREC were cultured in glucose-depleted medium or in standard medium with or without hypoxia for 24 h. *PFKFB3* and *GLUT1* transcript levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm S.E. relative to levels after 24 h of culture with standard conditions in four independent experiments. *, $p < 0.05$.

hypoxia, also significantly increased the secretion of bFGF into the culture medium compared with basal culture conditions (Fig. 1B). Glucose starvation induced *ANG* expression at both the transcriptional and protein levels, as did hypoxia (Fig. 1C). *PDGFB* expression did not increase under glucose starvation, whereas hypoxia induced the expression of *PDGFB* transcripts (supplemental Fig. S1, B and C). Overall, our results suggest that the angiogenic factors VEGFA, bFGF, and ANG but not PDGFB, are expressed by HREC in response to glucose deprivation but independently of hypoxia.

Glucose Deprivation Does Not Activate HIF-1 α Signaling—HIF-1 α is a central regulator of the expression of various angiogenic molecules during ischemia (19, 20). We therefore evaluated whether glucose deprivation would activate the HIF-1 α pathway. HIF-1 α did not accumulate in HREC cultured in glucose-depleted medium under a normoxic atmosphere but was elevated under hypoxic conditions (Fig. 2A). Additionally, the expression of genes whose transcription is under control of HIF-1 α , such as 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (*PFKFB3*) and glucose transporter 1 (*GLUT1*), was induced during hypoxia but not under glucose-depleted conditions (Fig. 2B). These results suggest that glucose deprivation does not activate the HIF-1 α signaling pathway and that alternative pathways might be involved in the induction of the expression of angiogenic mediators.

Glucose Deprivation, but Not Hypoxia, Activates the UPR in HREC—The UPR has been identified as an important conveyor of tumoral tissue resistance in response to ischemia (11, 12) and may regulate the expression of *VEGFA* under chemically induced ER stress (21). Given these findings, we investigated

whether glucose deprivation activates the UPR in HREC. The expression of genes typically activated during the UPR, including glucose-related protein 78 (*GRP78*) and CCAAT/Enhancer-binding protein homologous protein (*CHOP*) was significantly increased during glucose deprivation, as was the spliced form of X-box-binding protein-1 (*XBPI1*) (Fig. 3A). These genes were not expressed when HREC were cultured under hypoxic conditions, suggesting that glucose deprivation, but not hypoxia, activates the UPR within renal tubular cells. Moreover, the ER stressor tunicamycin induced the expression of *VEGFA*, *bFGF* and *ANG*, but not *PDGFB* in HREC both at the transcripts and protein levels (Fig. 3, B and C), suggesting that the UPR might promote an angiogenic response in HREC.

RNA Interference Directed against Three Transducers of the UPR—To test whether the UPR modulates the angiogenic response of HREC following glucose deprivation, we inhibited *IRE1 α* , *PERK*, or *ATF6* expression in HREC by siRNA-based RNA interference. The efficacy of *IRE1 α* , *PERK*, or *ATF6* inhibition of expression is depicted in Fig. 4. Glucose deprivation elevates the preferential expression of *IRE1 α* and *ATF6*; however, the biological significance of this result, to our knowledge, is unknown. Given the known models for *IRE1 α* and *ATF6* activation during ER stress, it is unlikely that this positive regulation would interfere with the functions of the UPR.

VEGFA Expression Is Regulated by PERK—We first examined the role of *PERK* in modulating *VEGFA* expression in response to glucose deprivation. Inhibition of *PERK* expression by RNA interference significantly reduced the expression of *VEGFA* at both the transcriptional and protein levels (Fig. 5A). Interestingly, HREC exposed to salubrinal, a small molecule

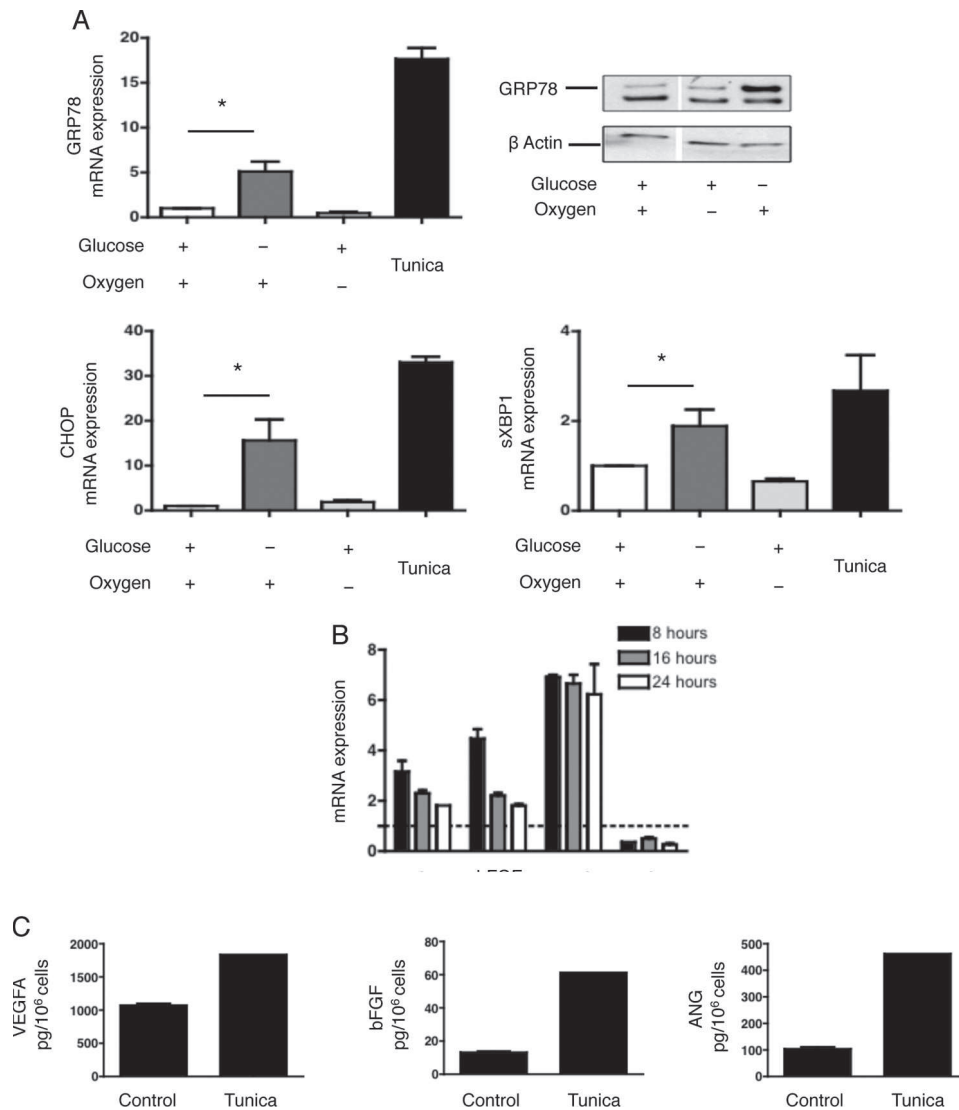


FIGURE 3. Glucose deprivation, not hypoxia, activates the UPR in HREC. *A*, HREC were cultured in glucose-deprived medium or in standard medium with or without hypoxia for 24 h, or with 2.5 μ M tunicamycin for 8 h. *GRP78*, *CHOP*, and *sXBP1* transcript levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm S.E. relative to levels after 24 h of culture with standard conditions in four independent experiments. *GRP78* protein expression was determined by immunoblotting. The immunoblot shown is representative of three independent experiments. *, $p < 0.05$. *B*, HREC were cultured with 2.5 μ M tunicamycin for 8, 16, and 24 h. *VEGFA*, *bFGF*, *ANG*, and *PDGFB* transcript levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm S.E. relative to levels in non-treated cells in four independent experiments. The dotted line figures the expression level (= 1) of each gene in basal condition. *C*, HREC were cultured with 2.5 μ M tunicamycin for 16 h, and the secretion of *VEGFA*, *bFGF*, and *ANG* in the medium was quantified by ELISA.

that inhibits eIF2 α dephosphorylation and maintains the PERK-eIF2 α pathway activated (22), increased *VEGFA* expression (Fig. 5*B*). Conversely, inhibition of *IRE1 α* or *ATF6* expression did not alter *VEGFA* expression (Fig. 5, *C* and *D* and supplemental Fig. S2, *A* and *B*). These results suggest that PERK, but not *IRE1 α* or *ATF6*, regulates the expression of *VEGFA*. However, one cannot exclude that PERK may regulate the intracellular trafficking or secretion of *VEGFA* in addition to its production.

bFGF Expression Is Regulated by PERK—We next examined the role of the UPR transducers in the production of *bFGF* in response to glucose deprivation. Inhibition of *PERK* expression significantly reduced the secretion of *bFGF* into the culture medium but did not affect transcript levels (Fig. 6*A*). Salubrinal treatment of HREC led to a significant increase in *bFGF* secretion without alteration of transcript levels (Fig. 6*B*). Conversely,

inhibition of *IRE1 α* or *ATF6* expression did not alter *bFGF* expression (Fig. 6, *C* and *D*, and supplemental Fig. S3, *A* and *B*). These results suggest that PERK, but not *IRE1 α* or *ATF6*, mediates *bFGF* expression in renal tubular cells during glucose deprivation and that regulation may occur at both the transcriptional and post-transcriptional levels.

ANG Expression Is Regulated by PERK and IRE1 α —We next focused on the regulation of *ANG* by the UPR. Inhibition of PERK expression significantly increased *ANG* expression at both the transcriptional and protein levels (Fig. 7*A*), whereas salubrinal strongly inhibited it (Fig. 7*B*), suggesting that PERK signaling inhibits *ANG* expression. Inhibition of *IRE1 α* expression significantly reduced *ANG* expression at the transcriptional and protein levels (Fig. 7*C*), suggesting that *IRE1 α* activates *ANG* expression. Inhibition of *ATF6* did not alter *ANG* expression (Fig. 7*D* and supplemental Fig. S4). Together, these

The Unfolded Protein Response and Tubular Angiogenesis

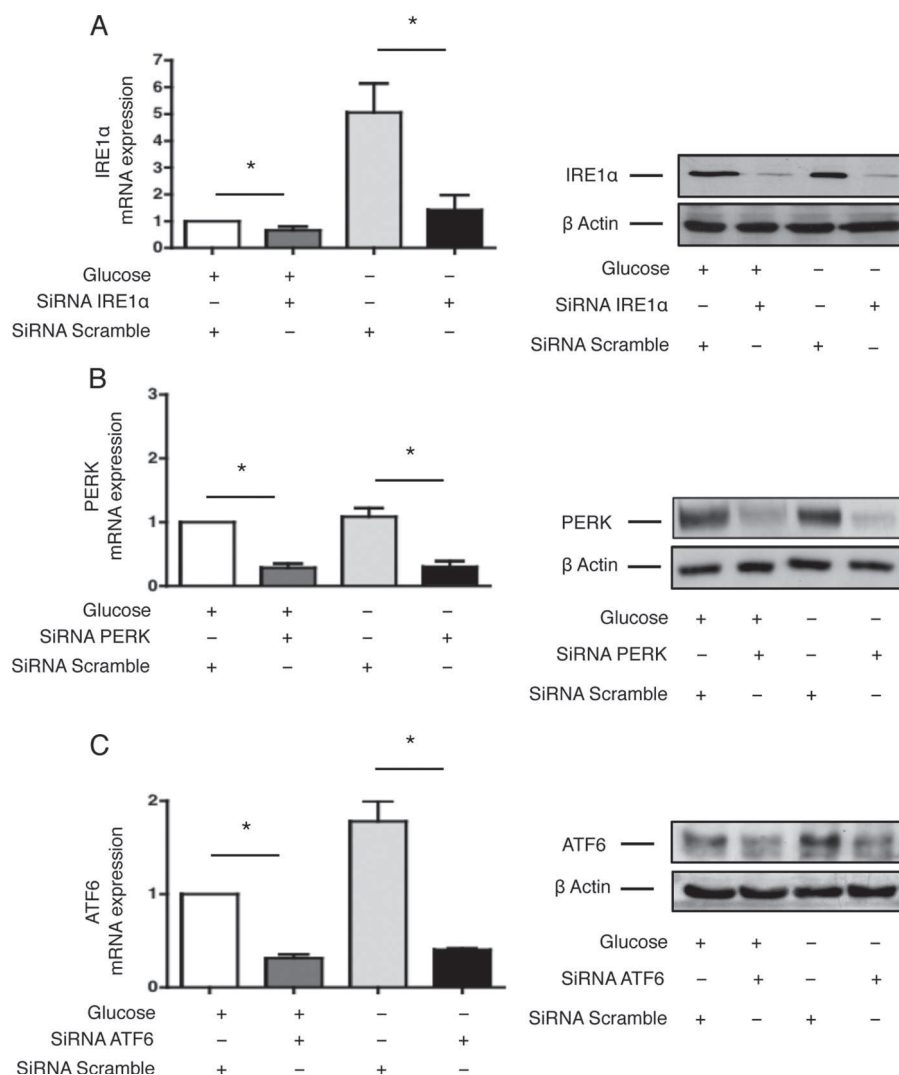


FIGURE 4. RNA interference directed against three transducers of the UPR. *A*, HREC were transfected with siRNAs targeting *IRE1α* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. Twenty-four hours post-transfection, the culture medium was replaced with glucose-free medium or with standard medium. *IRE1α* transcript (left) and protein (right) levels were measured after an additional 24 h and compared with levels after 24 h of culture with standard conditions. $*p < 0.05$. *B*, HREC were transfected with siRNAs targeting *PERK* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. Twenty-four hours post-transfection, the culture medium was replaced with glucose-free medium or with standard medium. *PERK* transcript (left) and protein (right) levels were measured after an additional 24 h and compared with levels after 24 h of culture with standard conditions. $*p < 0.05$. *C*, HREC were transfected with siRNAs targeting *ATF6* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. Twenty-four hours post-transfection, the culture medium was replaced with glucose-free medium or with standard medium. *ATF6* transcript (left) and protein (right) levels were measured after an additional 24 h and compared with levels after 24 h of culture with standard conditions. $*p < 0.05$.

results suggest that *ANG* expression is positively regulated by *IRE1α* and inhibited by *PERK* during glucose deprivation. Given the fact that *ANG* promotes stress-induced translational repression (23), our findings also unravel a new mechanism of inhibition of protein synthesis activated by the UPR. This mechanism seems to occur when the activity of the *PERK*-*eIF2α* pathway is reduced because *ANG* expression is induced when *PERK* expression is inhibited (Fig. 7A) and when the phosphorylation of *eIF2α* is abolished (Fig. 7E).

Cold Ischemia in Rat Kidneys Activates the UPR and Generates an Angiogenic Response—To translate our *in vitro* findings to an *in vivo* setting, we reproduced an ischemic kidney condition and analyzed the UPR and angiogenic responses in rat kidneys. To mimic cold ischemia, which occurs during kidney transplantation, the rats were nephrectomized, and the kidneys were stored in the IGL1® preservative solution at 4 °C for 24 h. The expression of the UPR target genes homocysteine-induc-

ible endoplasmic reticulum stress protein (*HERP*), protein disulfide isomerase, (*PDI*), *CHOP*, *ATF4*, and *sXBP1*, was significantly increased in ischemic rat kidneys (Fig. 8A), the UPR surrogate marker *GRP78* was expressed after 24 h and the *PERK* target *eIF2α* was phosphorylated (Fig. 8B), suggesting that the UPR is activated during acute ischemia of the kidney. We observed that *bFGF*, *VEGFA*, and *ANG* expression increased after 24 h and paralleled the expression of the UPR markers (Fig. 8C), whereas *HIF-1α* was not expressed in ischemic kidneys (Fig. 8D). Together, these results suggest that cold ischemia activates the UPR and that *VEGFA*, *bFGF*, and *ANG* expression also increases in parallel, independently of *HIF-1α* expression.

DISCUSSION

Survival in an ischemic microenvironment requires a cell to activate adaptive biological responses that regulate metabolic

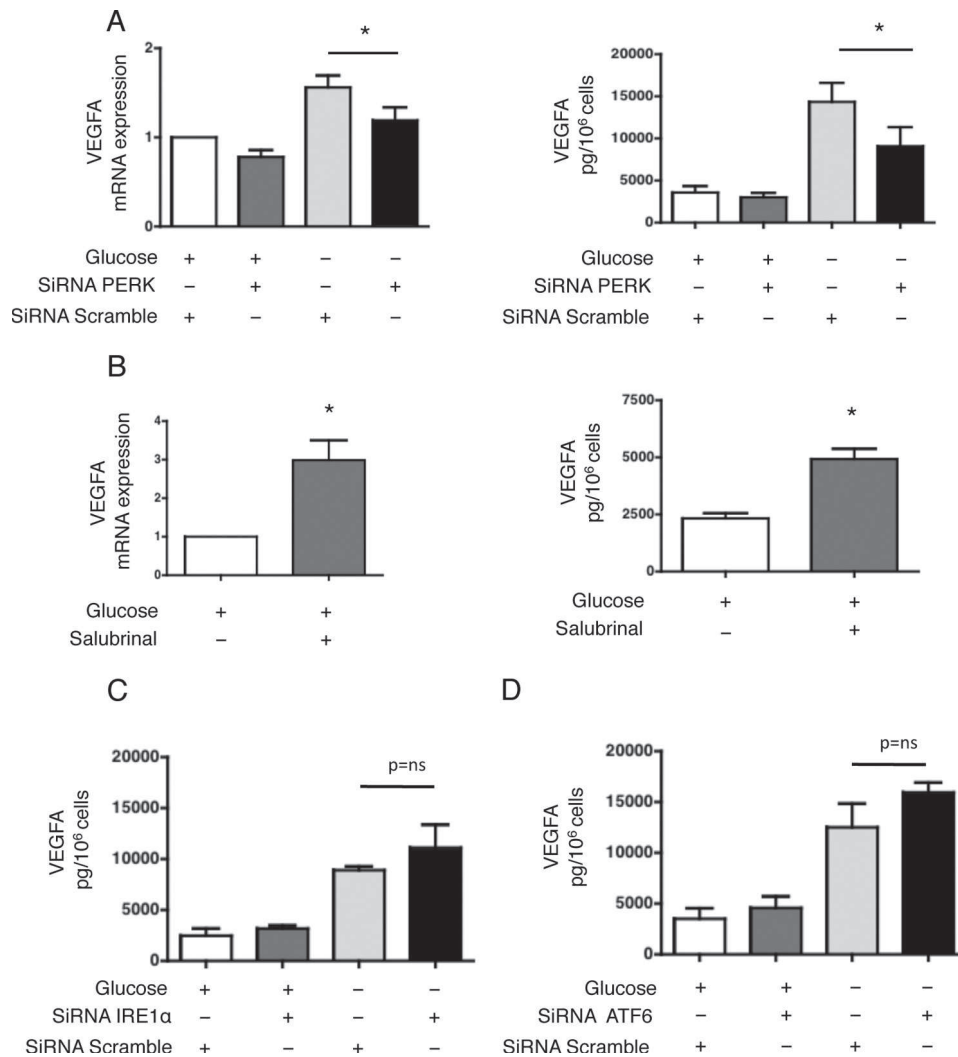


FIGURE 5. **VEGFA expression is regulated by PERK.** A, HREC were transfected with siRNAs targeting PERK or control, non-targeted (scramble) siRNAs. *Left*: VEGFA transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 24 h and compared with levels after 24 h of culture with standard conditions ($n = 4$). *Right*: secretion of VEGFA in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). $*$, $p < 0.05$. B, HREC were incubated in standard medium and treated with or without 25 μM salubrinal for 48 h. *Left*: VEGFA transcript levels were measured by qRT-PCR and compared with levels after 48 h of culture with standard conditions ($n = 3$). *Right*: secretion of VEGFA in the medium was quantified by ELISA ($n = 3$). $*$, $p < 0.05$. C, HREC were transfected with siRNAs targeting IRE1 α or control, non-targeted (scramble) siRNAs. The secretion of VEGFA in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). $*$, $p < 0.05$. D, HREC were transfected with siRNAs targeting ATF6 or control, non-targeted (scramble) siRNAs. The secretion of VEGFA in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). $*$, $p < 0.05$.

reprogramming, angiogenesis, translation inhibition, and macroautophagy. The angiogenic response generated by the ischemic kidney epithelium integrates components of these standard responses to ischemic stress to maintain the blood supply and fulfill cell's energetic demands. In addition to the HIF-1 α -mediated transcriptional program that responds to hypoxic stress, other undefined adaptive pathways are also thought to be involved, but their specific functions have not been experimentally confirmed. Here, we describe an adaptive angiogenic response of the human kidney epithelium to nutrient deprivation that functions independently of hypoxia and HIF-1 α . This response links ER stress and the UPR to the production of the angiogenic factors VEGFA, bFGF, and ANG. The fact that PDGFB expression is not altered by the UPR transducers implies that the UPR and HIF-1 α drive angiogenic responses with distinctive profiles. In addition to the regulation of angio-

genesis, our findings reveal a novel function of the UPR in the inhibition of translation. In fact, in our model, ANG, an RNase that inhibits translation in response to stressful conditions, is tightly regulated by the UPR transducers PERK and IRE1 α , and its expression occurs when the PERK-eIF2 α axis activity is abolished.

The observation that nutrient starvation in HREC activates the UPR, which in turn mediates the secretion of angiogenic factors, adds complexity to the consequences of ER stress in the progression of kidney disease. The secretion of angiogenesis mediators, such as VEGFA, in response to ischemia is essential for the maintenance of the tubulo-interstitial compartment, as it prevents endothelial cell death and peritubular capillary collapse, and helps to maintain adequate oxygen and nutrient supplies (24–26). Angiogenic mediators, however, also fuel inadequate tissue remodeling because they can facilitate leukocyte

The Unfolded Protein Response and Tubular Angiogenesis

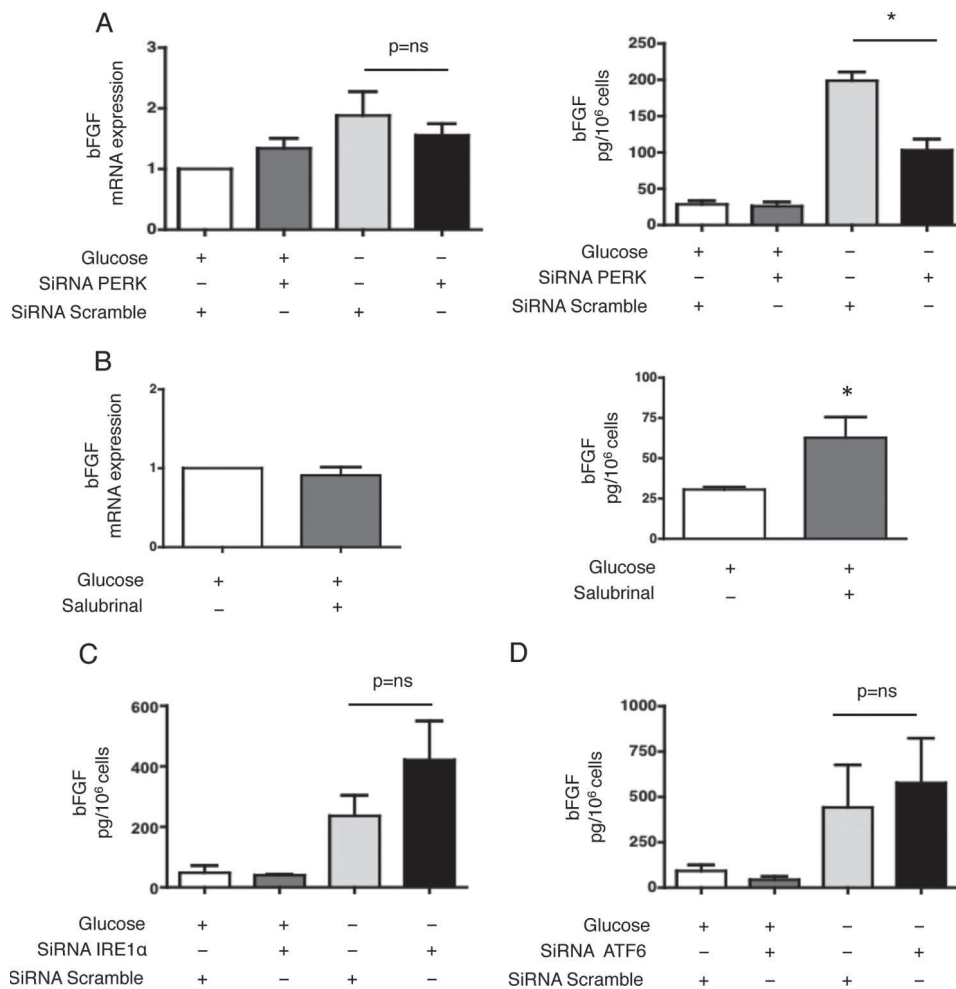


FIGURE 6. bFGF expression is regulated by PERK. *A*, HREC were transfected with siRNAs targeting PERK or control, non-targeted (scramble) siRNAs. *Left*: bFGF transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 48 h and compared with levels after 48 h of culture with standard conditions ($n = 4$). *Right*: secretion of bFGF in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). $^* p < 0.05$. *B*, HREC were incubated in glucose-free or standard medium and treated with or without 25 μM salubrinal for 48 h. *Left*: bFGF transcript levels were measured by qRT-PCR and compared with levels after 48 h of culture with standard conditions ($n = 3$). *Right*: secretion of bFGF in the medium was quantified by ELISA ($n = 3$). $^* p < 0.05$. *C*, HREC were transfected with siRNAs targeting *IRE1 α* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. The secretion of bFGF in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). *D*, HREC were transfected with siRNAs targeting *ATF6* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. The secretion of bFGF in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$).

recruitment and promote inflammation, the epithelial-to-mesenchymal transition and fibroblast activation (8, 27, 28). Therapeutic modulation of the UPR with 4-phenyl-butyrate or salubrinal can alleviate the deleterious effects of the UPR, reduce kidney injury and delay tissue remodeling (29, 30). Further studies are required to address important questions regarding the consequences of these angiogenic responses in the context of kidney disease progression as well as the duration of the response, the level of secretion of these mediators and the nature of the initial injury.

To mimic cellular energetic failures that occur in response to ischemia, we analyzed the consequences of glucose starvation on human epithelial cells. Glucose starvation induces intracellular ATP depletion and serves as a relevant model of ischemic stress (31). Tissue ischemia, which promotes profound nutrient deprivation, including glucose deprivation, results in an energetic failure that may induce ER stress. Ischemia in rat kidneys is a far more complex process than glucose deprivation in cultured cells, and this difference is a limitation of *in vitro* models

for the study of ischemia. As an example of this limitation, the combination of glucose starvation with hypoxia (which commonly occurs during tissue ischemia) was too toxic to be suitable for further studies *in vitro* (32). Our *in vitro* model used glucose starvation to induce the energetic failure that may occur during ischemia *in vivo*. Because our aim was to investigate the HIF-1 α -independent involvement of the UPR in the angiogenic response to ischemia, we did not include hypoxia in our model, as it would not have been possible to delineate the respective contributions of HIF-1 α signaling and the UPR. This model enabled us to characterize the role of the UPR transducers in generating an angiogenic response to energetic failure that is independent of HIF-1 α .

Our findings highlight the central and complex involvement of the PERK kinase in the modulation of the angiogenic response to glucose deprivation. PERK phosphorylates the translational regulator eIF2 α , resulting in a general inhibition of translation. One factor that escapes translational inhibition is the transcription factor ATF4, which regulates the expression

The Unfolded Protein Response and Tubular Angiogenesis

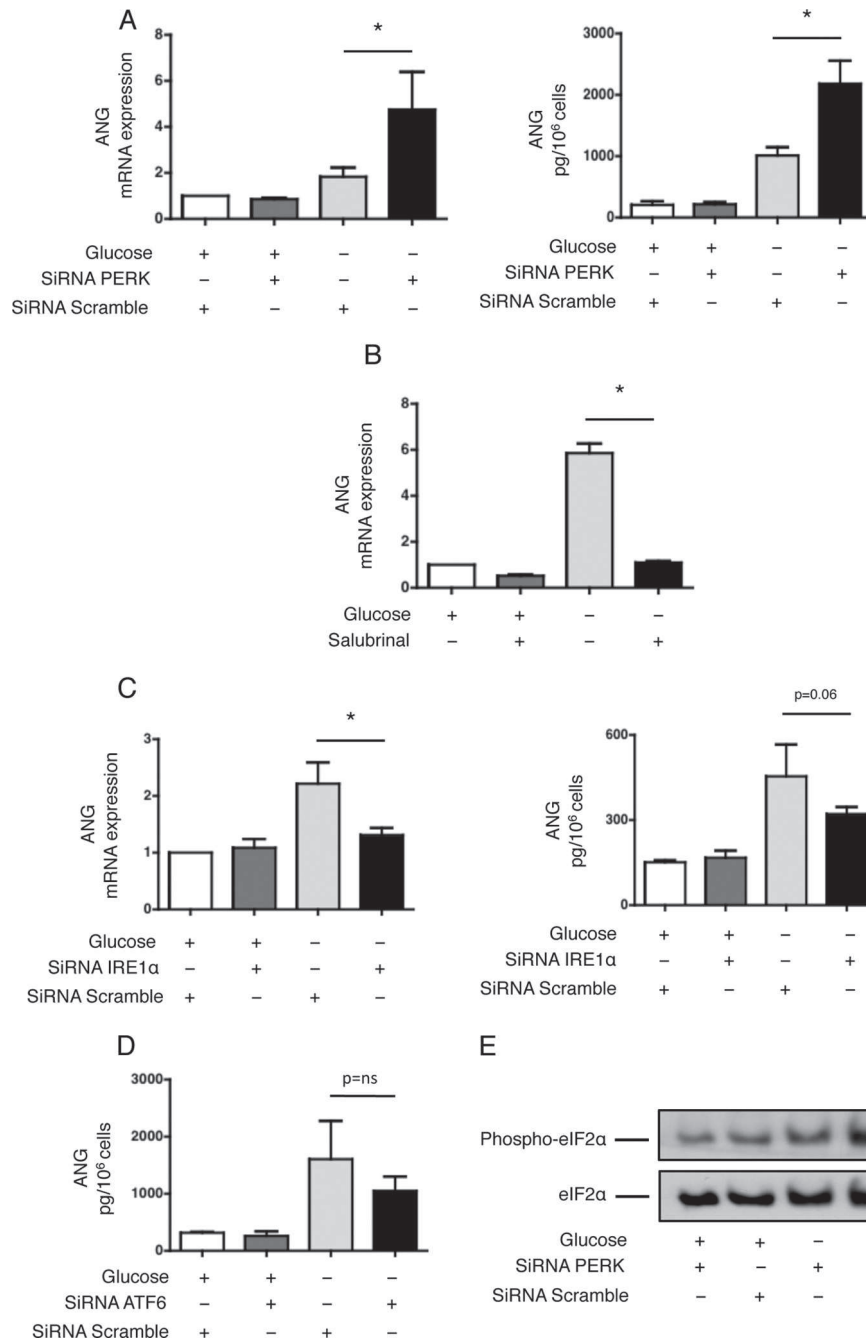


FIGURE 7. ANG expression is regulated by PERK and IRE1 α . HREC were transfected with siRNAs targeting *PERK* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. *Left:* ANG transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 24 h and compared with levels after 24 h of culture with standard conditions ($n = 4$). *Right:* secretion of ANG in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). *, $p < 0.05$. *B,* HREC were incubated in glucose-free or standard medium and treated with or without 25 μM salubrinal for 48 h. *Left:* ANG transcript levels were measured by qRT-PCR and compared with levels after 48 h of culture with standard conditions ($n = 3$). *C,* HREC were transfected with siRNAs targeting *IRE1 α* or with control, non-targeted (scramble) siRNAs. *Left:* ANG transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 24 h and compared with levels after 24 h of culture with standard conditions ($n = 4$). *Right:* secretion of ANG in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). *D,* HREC were transfected with siRNAs targeting *ATF6* or with control, non-targeted (scramble) siRNAs. The secretion of ANG in the medium was quantified by ELISA after the cells had incubated in glucose-free or standard medium for 48 h ($n = 3$). *E,* phosphorylation status of eIF2 α . HREC were transfected with siRNAs targeting *PERK* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. Phospho-eIF2 α and eIF2 α protein levels were measured after the cells had incubated in glucose-free or standard medium ($n = 4$). A representative immunoblot is shown.

of nutrient transporters and antioxidants, amino acid synthesis and the induction of autophagy (11, 31, 33). The mode of regulation of *VEGFA* expression by UPR mediators seems to depend on the cell type and the identity of ER stress factor. In mouse embryonic fibroblasts, *VEGFA* is transcriptionally regulated by

IRE1 α and *PERK* through their respective transcription factors, sXBP1 and ATF4, but in the HepG2 hepatoma cell line, *VEGFA* is regulated by ATF6 (21). A more complex regulation of *VEGFA* was observed in a medulloblastoma cell line, involving regulatory action at both the transcriptional and post-trans-

The Unfolded Protein Response and Tubular Angiogenesis

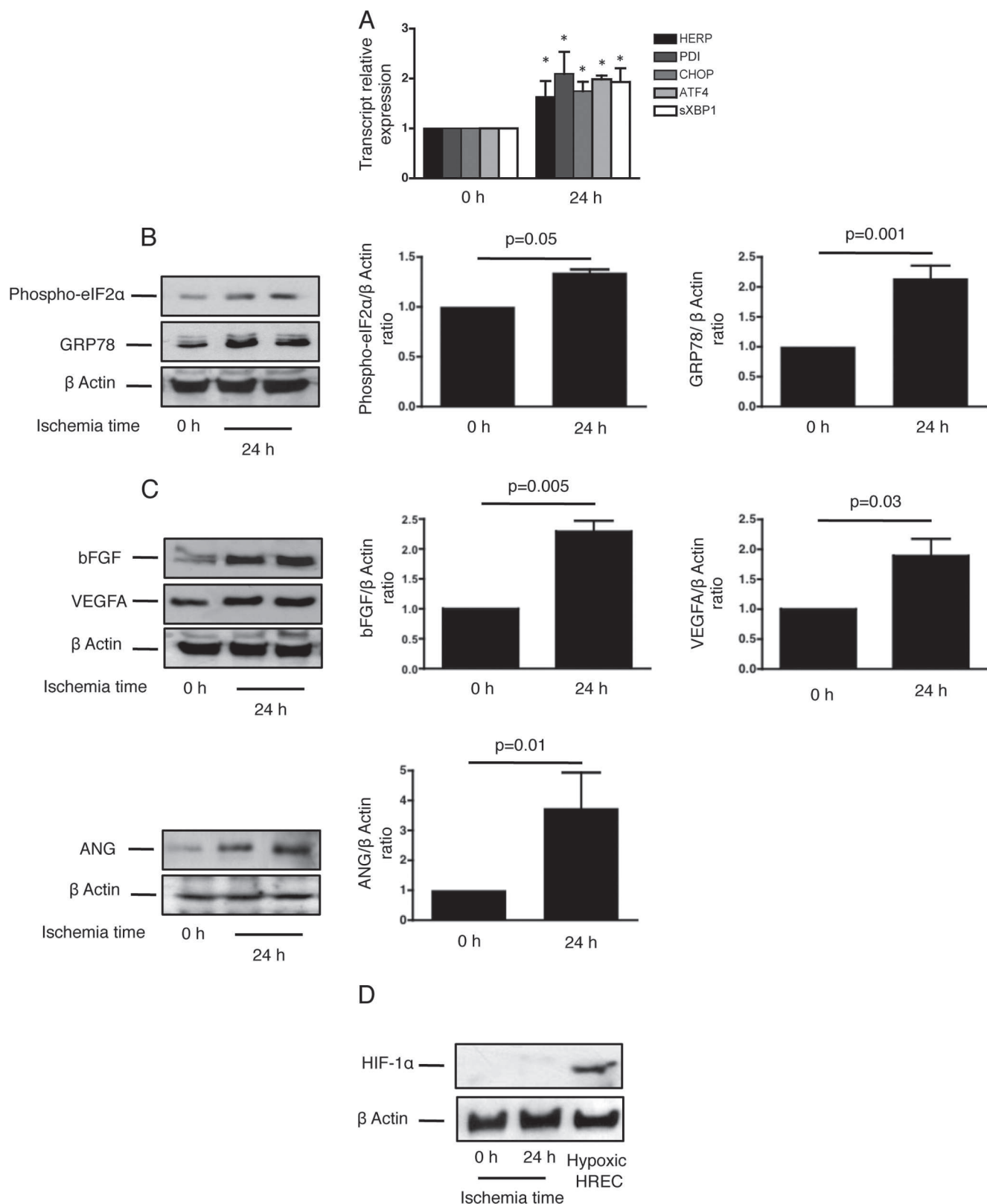


FIGURE 8. Cold ischemia in rat kidneys activates ER stress and generates an angiogenic response. The rats were nephrectomized, and the kidneys were rinsed and incubated in an IGL1® solution for 24 h. *A*, *HERP*, *PDI*, *CHOP*, *ATF4*, and *sXBP1* transcript levels were measured by qRT-PCR in the rat kidneys after 24 h of cold ischemia, and compared with levels in non ischemic kidneys ($n = 4$). *, $p < 0.05$. *B*, GRP78 and phospho-eIF2α protein levels were measured in the rat kidneys after 24 h of cold ischemia. *Left*: a representative immunoblot is shown. *Right*: a densitometric analysis of immunoblots. $n = 4$. *C*, VEGFA, bFGF, and ANG protein levels were measured in the rat kidneys after 24 h of cold ischemia. *Left*: a representative immunoblot is shown. *Right*: a densitometric analysis of immunoblots. $n = 4$. *D*, HIF-1α protein levels were measured in rat kidneys after 24 h of cold ischemia. A representative immunoblot is shown. Hypoxic HREC were used as control.

scriptional levels (34). In our model, *VEGFA* expression depends only on PERK. Moreover, a salubrinal-induced increase in the activity of this pathway resulted in increased expression of *VEGFA*. Therefore, PERK might represent a potential therapeutic target for increasing *VEGFA* production. PERK also regulates *bFGF* expression at both the transcriptional and translational levels. The fact that salubrinal increases *bFGF* secretion and the inhibition of the PERK pathway reduces *bFGF* secretion without modifying transcript expression suggest that the UPR might activate *bFGF* secretion independently of a transcriptional activity. *bFGF* lacks the signal peptide and is secreted through a non-conventional pathway that does not involve the trans-Golgi network (35). Instead, *bFGF* secretion requires activation by caspase 1 within inflammasomes, followed by direct release from the cell through the plasma membrane (36). Recently, ER stress was shown to activate a non-conventional secretion pathway mediated by Golgi reassembly stacking proteins (GRASPs) (37). Other modes of non-conventional secretion, including autophagy, may be involved in *bFGF* secretion when the UPR is activated. PERK is known to activate autophagy (38), and autophagy is implicated in the non-conventional secretion of various molecules, including interleukin 1 β (39), which is secreted in the same way as *bFGF* (36). Whether *bFGF* is secreted during the UPR through a similar non-conventional secretion pathway is an interesting hypothesis that remains to be tested.

Our results also show that the UPR regulates *ANG* expression, a finding of considerable biological significance. In addition to its functions in kidney vasculogenesis (17), *ANG* is a general inhibitor of translation in response to stress. *ANG* is a secreted ribonuclease that generates stress-induced tRNA-derived fragments (tiRNAs) that contribute to the displacement of eIF4G/A from capped and uncapped mRNA and eIF4E/G/A (eIF4F) from the m7G cap, thereby inhibiting translation and inducing stress granule assembly (23). Our results suggest that, in addition to the activation of PERK and the phosphorylation of eIF2 α , the UPR activates an *ANG*-mediated pathway that may lead to a global repression of translation. Validation of this hypothesis will require in-depth studies to precisely delineate the respective roles of *ANG*-induced stress-induced tiRNAs and eIF2 α phosphorylation in the inhibition of translational programs during the UPR.

In conclusion, nutrient deprivation in human epithelial cells promotes an angiogenic response that involves *VEGFA*, *bFGF*, and *ANG* secretion. This process occurs independently of HIF-1 α , with PERK acting as a central regulator, making it a promising therapeutic target. Additionally, the expression of *ANG*, a stress-induced translational repressor, is modulated by both IRE1 α and PERK, representing an alternate pathway by which the UPR might inhibit protein synthesis in response to stress.

REFERENCES

1. Racusen, L. C., and Regele, H. (2010) *Kidney Int. Suppl.*, S27–S32
2. Zeisberg, M., and Neilson, E. G. (2010) Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1819–1834
3. Mimura, I., and Nangaku, M. (2010) The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **6**, 667–678
4. Oskolkova, O. V., Afonyushkin, T., Leitner, A., von Schlieffen, E., Gargalovic, P. S., Lusic, A. J., Binder, B. R., and Bochkov, V. N. (2008) ATF4-de-

pendent transcription is a key mechanism in VEGF up-regulation by oxidized phospholipids: critical role of oxidized sn-2 residues in activation of unfolded protein response. *Blood* **112**, 330–339

5. Fine, L. G., and Norman, J. T. (2008) *Kidney Int.*
6. Majmundar, A. J., Wong, W. J., and Simon, M. C. (2010) Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell* **40**, 294–309
7. Chade, A. R. (2011) Renovascular disease, microcirculation, and the progression of renal injury: role of angiogenesis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300**, R783–R790
8. Mayer, G. (2011) Capillary rarefaction, hypoxia, VEGF and angiogenesis in chronic renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant* **26**, 1132–1137
9. Wouters, B. G., and Koritzinsky, M. (2008) Hypoxia signaling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 851–864
10. Sengupta, S., Peterson, T. R., and Sabatini, D. M. (2010) Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol. Cell* **40**, 310–322
11. Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., Harding, H., Novoa, I., Varia, M., Raleigh, J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Bell, J., Ron, D., Wouters, B. G., and Koumenis, C. (2005) ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J.* **24**, 3470–3481
12. Drogat, B., Auguste, P., Nguyen, D. T., Boucheceireilh, M., Pineau, R., Nalbantoglu, J., Kaufman, R. J., Chevet, E., Bikfalvi, A., and Moenner, M. (2007) IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *Cancer Res.* **67**, 6700–6707
13. Hetz, C. (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 89–102
14. Walter, P., and Ron, D. (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081–1086
15. Pallet, N., Thervet, E., Le Corre, D., Knebelmann, B., Nusbaum, P., Tomkiewicz, C., Meria, P., Flinois, J. P., Beaune, P., Legendre, C., and Anglicheau, D. (2005) Rapamycin inhibits human renal epithelial cell proliferation: effect on cyclin D3 mRNA expression and stability. *Kidney Int.* **67**, 2422–2433
16. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ C(T)} Method. *Methods* **25**, 402–408
17. Nakamura, M., Yamabe, H., Osawa, H., Nakamura, N., Shimada, M., Kumasaka, R., Murakami, R., Fujita, T., Osanai, T., and Okumura, K. (2006) Hypoxic conditions stimulate the production of angiogenin and vascular endothelial growth factor by human renal proximal tubular epithelial cells in culture. *Nephrol. Dial. Transplant* **21**, 1489–1495
18. Rajnoch, J., Lodererova, A., Szabo, A., Honsova, E., Vannay, A., Bloudickova, S., Matl, I., and Viklicky, O. (2005) Regulators of angiogenesis in renal ischemia/reperfusion injury in normotensive and hypertensive rats: effect of tacrolimus. *Transplant Proc.* **37**, 352–354
19. Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T., and Carmeliet, P. (2009) Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev. Cell* **16**, 167–179
20. Aragonés, J., Fraisl, P., Baes, M., and Carmeliet, P. (2009) Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell Metab.* **9**, 11–22
21. Ghosh, R., Lipson, K. L., Sargent, K. E., Mercurio, A. M., Hunt, J. S., Ron, D., and Urano, F. (2010) Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS One* **5**, e9575
22. Boyce, M., Bryant, K. F., Jousse, C., Long, K., Harding, H. P., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Ma, D., Coen, D. M., Ron, D., and Yuan, J. (2005) A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* **307**, 935–939
23. Ivanov, P., Emara, M. M., Villen, J., Gygi, S. P., and Anderson, P. (2011) Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol. Cell* **43**, 613–623
24. Leonard, E. C., Friedrich, J. L., and Basile, D. P. (2008) VEGF-121 preserves renal microvessel structure and ameliorates secondary renal disease following acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **295**, F1648–F1657
25. Choi, Y. J., Chakraborty, S., Nguyen, V., Nguyen, C., Kim, B. K., Shim, S. I., Suki, W. N., and Truong, L. D. (2000) Peritubular capillary loss is associ-

The Unfolded Protein Response and Tubular Angiogenesis

- ated with chronic tubulointerstitial injury in human kidney: altered expression of vascular endothelial growth factor. *Hum. Pathol.* **31**, 1491–1497
26. Rudnicki, M., Perco, P., Enrich, J., Eder, S., Heining, D., Bernthaler, A., Wiesinger, M., Sarközi, R., Noppert, S. J., Schramek, H., Mayer, B., Oberbauer, R., and Mayer, G. (2009) Hypoxia response and VEGF-A expression in human proximal tubular epithelial cells in stable and progressive renal disease. *Lab. Invest.* **89**, 337–346
27. Reinders, M. E., Rabelink, T. J., and Briscoe, D. M. (2006) Angiogenesis and endothelial cell repair in renal disease and allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 932–942
28. Strutz, F., Zeisberg, M., Ziyadeh, F. N., Yang, C. Q., Kalluri, R., Müller, G. A., and Neilson, E. G. (2002) Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int.* **61**, 1714–1728
29. Inoki, K., Mori, H., Wang, J., Suzuki, T., Hong, S., Yoshida, S., Blattner, S. M., Ikenoue, T., Rüegg, M. A., Hall, M. N., Kwiakowski, D. J., Rastaldi, M. P., Huber, T. B., Kretzler, M., Holzman, L. B., Wiggins, R. C., and Guan, K. L. (2011) mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 2181–2196
30. Pallet, N., Bouvier, N., Bendjallab, A., Rabant, M., Flinois, J. P., Hertig, A., Legendre, C., Beaune, P., Thervet, E., and Anglicheau, D. (2008) Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am. J. Transplant* **8**, 2283–2296
31. Ye, J., Kumanova, M., Hart, L. S., Sloane, K., Zhang, H., De Panis, D. N., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J. A., Ron, D., and Koumenis, C. (2010) The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* **29**, 2082–2096
32. Marjon, P. L., Bobrovnikova-Marjon, E. V., and Abcouwer, S. F. (2004) Expression of the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 by human breast carcinomas is responsive to nutrient deprivation and endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cancer* **3**, 4
33. Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* **40**, 280–293
34. Pereira, E. R., Liao, N., Neale, G. A., and Hendershot, L. M. (2010) *PLoS One* **5**,
35. Florkiewicz, R. Z., Majack, R. A., Buechler, R. D., and Florkiewicz, E. (1995) Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J. Cell Physiol.* **162**, 388–399
36. Keller, M., Rüegg, A., Werner, S., and Beer, H. D. (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* **132**, 818–831
37. Gee, H. Y., Noh, S. H., Tang, B. L., Kim, K. H., and Lee, M. G. (2011) Rescue of $\Delta F508$ -CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell* **146**, 746–760
38. Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* **40**, 280–293
39. Dupont, N., Jiang, S., Pilli, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D., and Deretic, V. (2011) Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO J.* **30**, 4701–4711

Supplemental table 1. Primer sequences used for RT-PCR analysis

Gene name	Access number	PCR product size (nucleotides)	Primer sequence
ANG	NM_001145 (<i>Homo sapiens</i>)	191	F 5'-tgtctgcccgtttctgcgg-3' R 5'-ccggcctgtggttgcat-3'
ATF6	NM_007348 (<i>Homo sapiens</i>)	232	F 5'-ccagcagcacccaagactcaaaca-3' R 5'-gtgtgactccccagcaacagc-3'
bFGF	NM_002006 (<i>Homo sapiens</i>)	221	F 5'-agcgacctcacatcaag-3' R 5'-cgttcagtgccacatacc-3'
CHOP	NM_004083 (<i>Homo sapiens</i>)	170	F 5'-tggaagcctggtatgaggac-3' R 5'-tgtgacctctgctggttctg-3'
GLUT1	NM_006516 (<i>Homo sapiens</i>)	291	F 5'-gctacaacactggagtcatc-3' R 5'-ggatcagcatctcaaaggac-3'
GRP78	NM_005347 (<i>Homo sapiens</i>)	200	F 5'-ggtgaaagacccctgacaaa-3' R 5'-gtcaggcgattctggtcatt-3'
IRE1 α	NM_001433 (<i>Homo sapiens</i>)	237	F 5'-agagaggcgggagagccgtg-3' R 5'-cgaggagggtgggggaagcga-3'
PDGF-B	NM_002608 (<i>Homo sapiens</i>)	116	F 5'-ccgccagcgcccattttca-3' R 5'-ctttgcagcgaggctggaggg-3'
PERK	NM_004836 (<i>Homo sapiens</i>)	175	F 5'-caggcaaggaaggagtctg-3' R 5'-aacaactcaaagccaccac-3'
PFKFB3	NM_004566 (<i>Homo sapiens</i>)	253	F 5'-ggtgtgcgacgaccctac-3' R 5'-gtacacgatcggcctctg-3'
RPL13A	NM_012423 (<i>Homo sapiens</i>)	124	F 5'-cctggaggagaagaggaaagaga-3' R 5'-gaggacctctgtgtattgtcaa-3'
VEGF-A	NM_001171623 (<i>Homo sapiens</i>)	144	F 5'-gaaggaggagggcagaatc-3' R 5'-cacacaggatggcttgaag-3'
sXBP1	NM_005080 (<i>Homo sapiens</i>)	117	F 5'-gcaggtgcaggcccagttgt-3' R 5'-tgggtccaagttgtccagaatgc-3'
ATF4	NM_024403 (<i>Rattus norvegicus</i>)	206	F 5'-acagcgaagtgttggcgggg-3' R 5'-ggcatcctcctgcccgtgt-3'
CHOP	NM_024134 (<i>Rattus norvegicus</i>)	236	F 5'-cgacagagccaaaataacagc-3' R 5'-ggatgcagggtcaagagtgtg-3'
HERP	NM_053523 (<i>Rattus norvegicus</i>)	110	F 5'-agaactgcggatgaatgc-3' R 5'-gaggaaaacggaaaatgtcg-3'
PDI	NM_012998 (<i>Rattus norvegicus</i>)	206	F 5'-tgaactggctgaagaaacg-3' R 5'-ggaaaacacatcgctattgg-3'
sXBP1	NM_001004210 (<i>Rattus norvegicus</i>)	158	F 5'-ctgagtccgcagcaggtgcag-3' R 5'-ctctgggaaggacatttga-3'

Supplemental table 2. Primary antibodies used for Western blot.

Antibody	Dilution	Reference
Anti-β Actin	1:1000	A2668 ¹
Anti-Angiogenin	1 :500	sc-9044 ²
Anti-ATF6	4 μ g/ml	IMG-273 ³
Anti-bFGF	1:500	05-118 ⁴
Anti-eIF2α	1 :1000	ab5369 ⁵
Anti-phospho-eIF2α	1:500	ab32157 ⁵
Anti-GRP78	1:1000	sc-1050 ²
Anti-HIF-1α	1:500	NB100-449 ⁶
Anti-IRE1α	1:500	3294 ⁷
Anti-PERK	1:500	3192 ⁷
Anti-VEGFA	1:500	sc-152 ²

¹ Sigma-Aldrich

² Santa Cruz Biotechnology

³ Imgenex

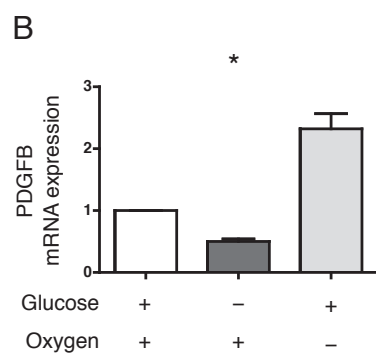
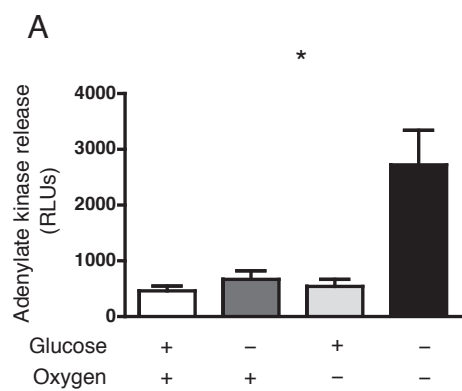
⁴ Millipore

⁵ Abcam

⁶ Novus Biologicals

⁷ Cell Signaling Technology

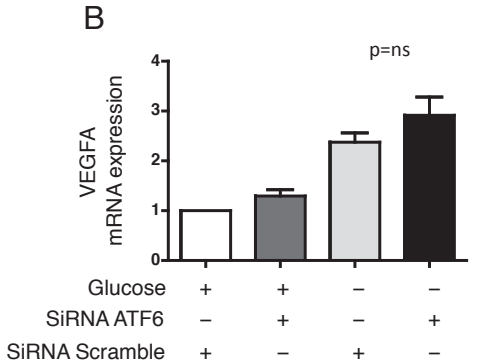
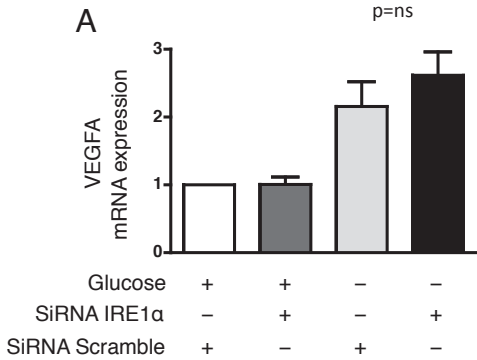
Supplemental Figure 1



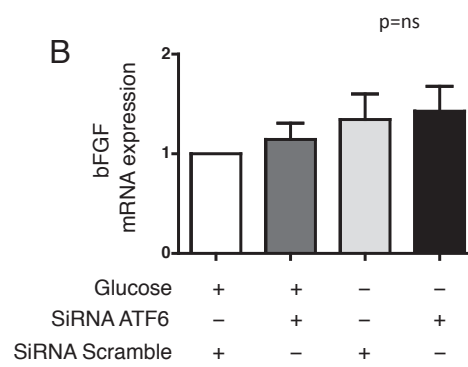
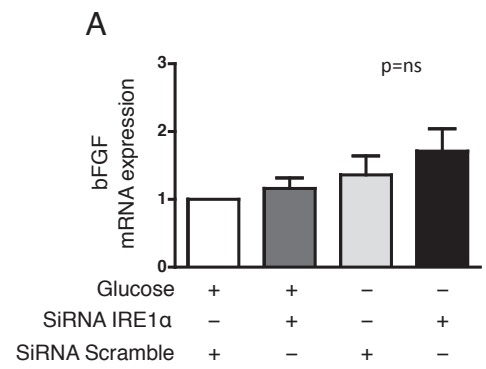
C

Standard PDGF-BB concentration (pg/ml)	Corresponding optical density	Conditions (n=4)	Optical density (mean±se)	Corresponding concentration
0	0.04	Glucose (+) Oxygen (+)	0.03±0.004	<Min
31.2	0.07	Glucose (-) Oxygen (+)	0.03±0.001	<Min
62.5	0.11	Glucose (+) Oxygen (-)	0.03±0.001	<Min
125	0.19	Glucose (-) Oxygen (-)	0.03±0.006	<Min
250	0.34			
500	0.63			
1000	1.33			
2000	2.45			

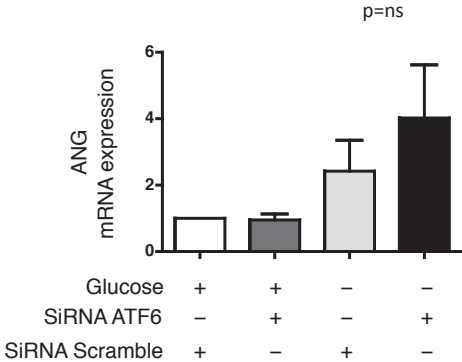
Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4



SUPPLEMENTAL FIGURES LEGENDS

SUPPLEMENTAL FIGURE 1. A. HREC were cultured in glucose-deprived or standard medium with or without hypoxia for 24 hours. The level of cell death was evaluated by measuring the release of adenylate kinase with the ToxiLight[®] BioAssay Kit. Adenylate kinase concentrations were estimated by the luminescence of the medium and are presented as the mean \pm sem of three independent experiments. B. HREC were cultured in glucose-deprived medium or in standard medium with or without hypoxia for 24 hours. *PDGFB* transcript levels were measured by qRT-PCR and are presented as the mean \pm sem relative to levels after 24 hours of culture with standard conditions in four independent experiments. *, $p < 0.05$. C. The secretion of PDGF-BB in the medium was quantified by ELISA. The concentration is presented as the mean \pm sem of four independent experiments. *, $p < 0.05$.

SUPPLEMENTAL FIGURE 2. A. HREC were transfected with siRNAs targeting *IRE1 α* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. A. *VEGFA* transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 24 hours and compared to levels after 24 hours of culture with standard conditions (n=4). B. HREC were transfected with siRNAs targeting *ATF6* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. *VEGFA* transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 48 hours and compared to levels after 48 hours of culture with standard conditions (n=4).

SUPPLEMENTAL FIGURE 3. A. HREC were transfected with siRNAs targeting *IRE1 α* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. *bFGF* transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 24 hours and compared to levels after 24 hours of culture with standard conditions (n=4). B. HREC were transfected with siRNAs targeting *ATF6* or control, non-targeted (scramble) siRNAs. *bFGF* transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 24 hours and compared to levels after 24 hours of culture with standard conditions (n=4).

SUPPLEMENTAL FIGURE 4. HREC were transfected with siRNAs targeting *ATF6* or with control, non-targeted (scramble) siRNAs. *ANG* transcript levels were measured by qRT-PCR after the cells had incubated in glucose-free medium for 24 hours and compared to levels after 24 hours of culture with standard conditions (n=4).

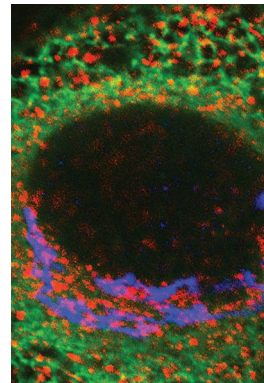
Article n°4

Pallet N, **Bouvier N**, Beaune P, Legendre C, Anglicheau D, Thervet E. Implication du stress du réticulum endoplasmique en transplantation d'organe solide. Med Sci (Paris) 2010; 26: 397-403.

Le stress du réticulum endoplasmique (RE) est produit par l'accumulation de protéines mal conformées dans le RE et conduit à l'activation d'une réponse adaptative, la réponse UPR (*unfolded protein response*). Le stress du RE est impliqué dans la pathogénie de nombreuses pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose, les diabètes de types 1 et 2 ou certaines maladies inflammatoires du tube digestif. Des données expérimentales récentes suggèrent son implication en transplantation d'organe solide. L'objet de cette revue est de synthétiser les données sur les mécanismes moléculaires du stress du RE et les conséquences de celui-ci en pathologie, et plus particulièrement à partir de plusieurs modèles de transplantation d'organes solides et de lésions tissulaires dans lesquels le stress du RE peut être impliqué. Nous discutons aussi les implications possibles du stress du RE, au-delà de la simple réponse adaptative et de la régulation de la mort cellulaire, sur les modifications des propriétés fonctionnelles et les changements phénotypiques. La modulation de la réponse UPR au cours du stress du RE en transplantation d'organe solide pourrait constituer une cible thérapeutique prometteuse. La mise en évidence de marqueurs du stress du RE tels que BiP/GRP78 ou CHOP dans les biopsies de greffon pourrait permettre la détection précoce d'un processus pathologique en cours avant que les lésions histologiques ne soient définitivement établies. L'autre enjeu serait de trouver une stratégie pour bloquer la mort cellulaire causée par le stress du RE, ce qui fournit un champ d'investigation passionnant pour de futurs traitements protecteurs. ◀

Implication du stress du réticulum endoplasmique en transplantation d'organe solide

Nicolas Pallet, Nicolas Bouvier, Philippe Beaune, Christophe Legendre, Dany Anglicheau, Éric Thervet



N. Bouvier, P. Beaune :
Inserm U775,
Centre universitaire
des Saints-Pères,
45, rue des Saints-Pères,
75006 Paris, France ;
Université Paris Descartes,
Paris, France.

C. Legendre : service
de transplantation rénale,
Hôpital Necker-
Enfants malades, AP-HP,
Paris, France.

N. Pallet, D. Anglicheau,
É. Thervet : Inserm U775
et Université Paris Descartes,
Paris, France ;
service de transplantation
rénale,
Hôpital Necker-Enfants malades,
AP-HP,
149, rue de Sèvres,
75015 Paris, France ;
Université Paris Descartes,
Paris, France.

eric.thervet@nck.aphp.fr
nicolas.pallet@univ-paris5.fr

L'accumulation de protéines mal conformées à l'intérieur du réticulum endoplasmique (RE) génère un stress cellulaire pouvant aboutir à la mort de la cellule si aucune adaptation n'est mise en jeu. Les cellules soumises à un stress du RE activent une réponse adaptative conservée au sein de différentes espèces appelée réponse UPR pour *unfolded protein response* [1-5, 46]. Trois phases se distinguent schématiquement au cours de cette réponse : une phase adaptative, une phase d'alarme et une phase d'activation de la mort cellulaire. La phase adaptative est caractérisée par la dégradation protéasomale des protéines, l'inhibition globale de la traduction, l'augmentation du pool de protéines chaperonnes et d'enzymes de maturation protéique. Cette phase permet de limiter le stress du RE en réduisant la charge en protéines mal conformées. La phase d'alarme est caractérisée par la génération d'une réaction inflammatoire médiée par les voies NF-κB et JNK (voir *Glossaire*). Cette phase permet l'activation de la réponse immune en réaction à un stress cellulaire



(infection virale par exemple). Enfin, si le stress se prolonge, ou si son intensité reste élevée, la réponse UPR peut induire la mort cellulaire par apoptose. Le stress du RE est impliqué dans de nombreuses pathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson juvénile, le déficit en $\alpha 1$ -antitrypsine, la mucoviscidose, le diabète, les accidents vasculaires cérébraux, les maladies cardiaques et rénales [6-8].

L'organe transplanté est le lieu de multiples processus pathologiques, immunologiques ou non, pouvant conduire à la perte de structure et de fonction du greffon [9, 10]. Un certain nombre de situations physiopathologiques survenant dans l'organe transplanté peuvent être responsables d'un stress du RE : ischémie¹ froide (lorsque le greffon est réfrigéré), ischémie-reperfusion (I/R) (réapprovisionnement en sang d'un organe suite à une période d'ischémie), néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine par exemple. Une meilleure compréhension des conséquences adaptatives et délétères de la réponse UPR dans le tissu greffé en réponse à ces facteurs d'agression est de première importance car elle pourrait être à l'origine de biomarqueurs de souffrance tissulaire précoce mais également générer de nouvelles cibles thérapeutiques modulant cette réponse.

L'objet de cette revue est de détailler les données expérimentales existantes portant sur l'implication du stress du RE et de la réponse UPR du tissu soumis à des situations pathologiques observées en transplantation d'organe solide. Dans un premier temps, les voies de la réponse UPR au cours du stress du RE seront détaillées, puis seront analysées les données montrant l'implication de la réponse UPR au cours de l'I/R, du diabète post-transplantation et de la néphrotoxicité de la ciclosporine (CsA). Enfin, les données portant sur les possibilités thérapeutiques ayant comme cible la réponse UPR seront résumées.

Le stress du RE et la réponse UPR

Le RE fournit un environnement optimisé pour la formation et la maturation des protéines. Les protéines doivent être correctement conformées et assemblées dans le RE avant le transit dans les organites intracellulaires puis à la surface cellulaire. Les perturbations de l'équilibre redox cellulaire, les désordres de l'homéostasie calcique, la carence en glucose, les infections virales, l'altération de la glycosylation des protéines, l'inhibition des enzymes de maturation et la surcharge en cholestérol peuvent interférer avec la machinerie de formation des protéines et ainsi entraîner une accumulation de protéines mal ou non conformées dans la lumière du RE, et donc un stress du RE [7, 8]. La réponse UPR permet de réduire la quantité de protéines natives dans le RE en inhibant la traduction des ARNm, d'augmenter la dégradation dans le protéasome des protéines localisées au RE, mais également la capacité de maturation des protéines dans le RE. Quand l'adaptation échoue et que le stress du RE se prolonge, la cellule déclenche un programme de mort cellulaire, habituellement sous la forme d'apoptose (Figure 1) [6, 9, 10].

¹ L'ischémie se caractérise par une altération du flux sanguin au niveau d'une région, d'un organe ou d'un organisme entier.

Trois principaux médiateurs sont impliqués dans la voie de signalisation de la réponse UPR : ATF6 (*activated transcription factor 6*), IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*) et PERK (*protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*) (Figure 1) [3, 11]. Lors d'un stress du RE, la réponse la plus précoce est une diminution transitoire de la traduction des ARNm due à la phosphorylation d'elf2 α (*eukaryotic initiation factor 2 α*). PERK, une kinase résidente du RE, est activée dans ces conditions et phosphoryle elf2 α . IRE1 possède une activité ribonucléase activée par oligodimérisation et autophosphorylation permettant l'épissage non conventionnel de l'ARNm codant le facteur transcriptionnel XBP1 (*X-box binding protein 1*). L'épissage de 26 nucléotides produit un décalage du cadre de lecture et permet la traduction de l'ARNm ainsi épissé (XBP1s) et la synthèse du facteur transcriptionnel XBP1 qui pourra se lier à un ERSE (*endoplasmic reticulum stress response element*) et conduire à la transcription de gènes codant pour des protéines chaperonnes telles que BiP, GRP94, calréticuline, mais aussi des enzymes de maturation et de dégradation. Des données récentes ont apporté des informations importantes et originales sur l'activité endonucléasique d'IRE1. L'accumulation de protéines mal conformées déclenche la dimérisation d'IRE1 qui est essentielle pour générer l'activité endoribonucléasique [12, 13]. Cette oligomérisation ouvre le domaine kinase d'IRE1 par modification conformationnelle, active la trans-autophosphorylation d'IRE1, ce qui a comme conséquence de stabiliser les dimères d'IRE1 et de faciliter l'addition de nouveaux monomères. La constitution d'un oligomère de plus grande taille est ainsi facilitée. La forme dimérisée d'IRE1 permet l'épissage de l'ARNm de XBP1 et ainsi l'activation de la réponse adaptative UPR. Si le stress du RE se poursuit, IRE1 va former des oligomères par l'intermédiaire de la trans-autophosphorylation et augmenter son activité RNase qui dégradera des ARNm localisés près du RE (*RNA decay*) [14]. Ces ARNm codant des protéines d'adaptation au stress comme des chaperonnes, leur destruction par *RNA decay* pourrait être délétère pour la cellule au cours du stress du RE. Ainsi, selon l'intensité et la durée du stress du RE, IRE1 peut avoir un rôle bénéfique en activant XBP1, mais si ce stress se poursuit, elle sera responsable de la dégradation d'ARN codant des protéines d'adaptation au stress.

IRE1 et elf2 α peuvent activer la voie NF- κ B et ainsi générer une réponse inflammatoire. L'activation d'IRE1 permet le recrutement de TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*) et la phosphorylation et la dégradation de I κ B, un inhibiteur de NF- κ B. Le rôle de elf2 α dans l'activation de NF- κ B passe par

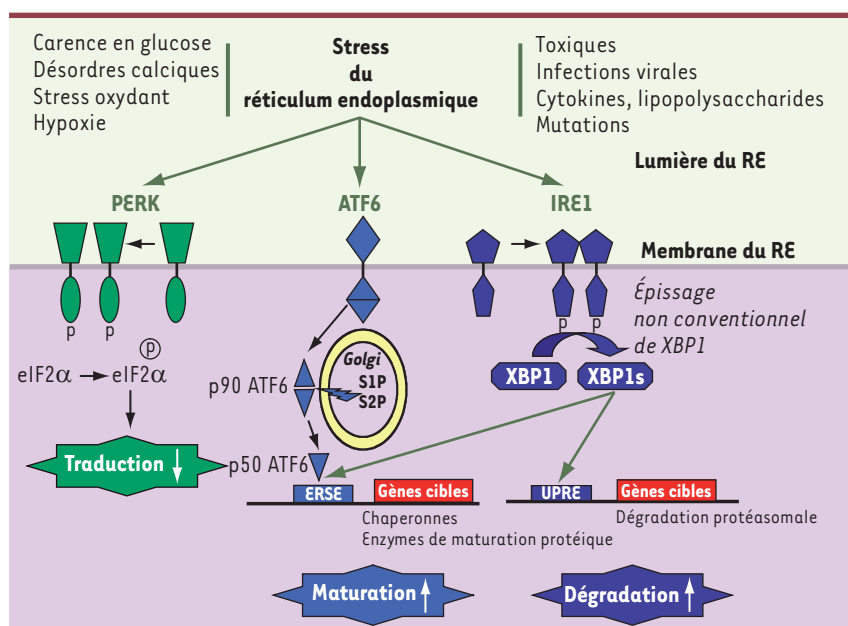


Figure 1. Mécanismes moléculaires de la réponse UPR (unfolded protein response).

En condition normale, BiP est liée aux domaines endoluminaux d'IRE1, PERK et ATF6 pour les maintenir à l'intérieur du réticulum endoplasmique (RE). Lorsqu'il y a une accumulation de protéines mal conformées, BiP se lie préférentiellement à celles-ci et libère IRE1, PERK et ATF6, permettant ainsi la dimérisation/oligomérisation spontanée d'IRE1 et PERK, leur trans-autophosphorylation et leur activation. IRE1 activée va alors épisser l'ARNm du facteur de transcription XBP1 (XBP1s) permettant sa traduction. La protéine XBP1 est transloquée dans le noyau, où elle se lie aux ERSE (endoplasmic reticulum stress elements). IRE1 active également JNK, via TRAF2. La phosphorylation d'eIF2 α par PERK phosphorylée entraîne la diminution globale de la traduction des ARNm. Enfin, la séparation de BiP et ATF6 permet à ATF6 d'exposer une séquence permettant sa localisation dans l'appareil de Golgi. Ceci induit le transport d'ATF6 (p90 ATF6) dans l'appareil de Golgi où il est clivé et dont l'un des fragments (p50 ATF6), un facteur de transcription, va être transloqué dans le noyau où il se lie à des ERSE et induit la transcription de gènes tels que *Bip*, *CHOP* et *XBP1*.

tion des ARNm. Enfin, la séparation de BiP et ATF6 permet à ATF6 d'exposer une séquence permettant sa localisation dans l'appareil de Golgi. Ceci induit le transport d'ATF6 (p90 ATF6) dans l'appareil de Golgi où il est clivé et dont l'un des fragments (p50 ATF6), un facteur de transcription, va être transloqué dans le noyau où il se lie à des ERSE et induit la transcription de gènes tels que *Bip*, *CHOP* et *XBP1*.

l'inhibition de la traduction d'I κ B [7]. Dans des conditions de stress, ATF6 est activé par clivage protéolytique dans le Golgi. La portion cytosolique d'ATF6 se lie à un ERSE et induit une transcription des gènes de la réponse UPR dont ceux codant les protéines chaperonnes résidant dans le RE et des gènes d'enzymes de maturation. La protéine chaperonne BiP sert de régulateur principal de la réponse UPR et joue un rôle essentiel dans l'activation d'IRE1, PERK et ATF6 suite à un stress du RE [3]. Si la surcharge en protéines non ou mal conformées persiste dans le RE, l'activation prolongée de la réponse UPR dirigera la cellule vers la mort cellulaire programmée.

Dans des conditions de stress du RE, de nombreuses voies de signalisation activent l'apoptose [6]. IRE1 joue un rôle important dans l'apoptose à travers l'activation des voies JNK et NF- κ B. Une seconde voie conduisant à l'apoptose implique le clivage de la caspase 12 résidant dans le RE. Finalement, CHOP (C/EBP² homologous protein), dont le mode d'action n'est pas bien établi, est impliquée dans l'apoptose durant le stress du RE [15]. Le stress du RE produit de nombreuses réponses cellulaires qui ne sont pas directement liées à l'adaptation secondaire à l'accumulation de protéines mal conformées et à la mort cellulaire, mais qui pourraient avoir des implications sur des fonctions cellulaires précises ou sur la différenciation cellulaire. Le stress du RE intervient dans la différenciation de nombreux types cellulaires tels que les chondrocytes, les adipocytes, les cellules souches neurales, les myocytes et les lymphocytes [15-20]. Ainsi, la réponse UPR générée au cours du stress du RE doit être considérée comme un mode d'adap-

tation à un nombre de situations physiopathologiques très variées visant à rétablir l'homéostasie de la cellule et son fonctionnement normal. La mort cellulaire sera effective lorsque ces capacités d'adaptation seront dépassées et que le programme de suicide cellulaire inhérent à la réponse UPR sera prédominant par rapport au programme d'adaptation. Cette balance est dépendante du type de stimulus, de son intensité, de sa durée, du type cellulaire et du microenvironnement cellulaire. Nous allons détailler ci-dessous l'implication de la réponse UPR au cours de situations pathologiques pouvant survenir lors de transplantations d'organes solides.

Le stress du RE en transplantation d'organes solides

Ischémie-reperfusion

L'ischémie-reperfusion (I/R) rénale

Elle a comme conséquence une diminution de la synthèse protéique. Des études récentes suggèrent que la réponse UPR est responsable de l'inhibition de la synthèse des protéines qui a lieu dans les reins de rats reperfusés après une ischémie. L'ischémie secondaire à un arrêt cardiaque et la reperfusion qui survient au décours de la réanimation sont associées à l'activation de PERK et à la phosphorylation d'eIF2 α , aboutissant à

² Les protéines C/EBP interagissent avec le motif CCAAT box (cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymidine) présent dans de nombreux promoteurs de gènes.

l'inhibition du processus de traduction et de la synthèse des protéines [16]. Ce résultat suggère que l'I/R rénale induit un stress du RE et active la réponse UPR qui participe à l'apparition des lésions tubulaires rénales. Les processus d'assemblage et de maturation des protéines dans le RE sont perturbés au cours de l'ischémie, ce qui peut contribuer à l'apparition d'un phénotype ischémique des cellules épithéliales (altérations des protéines des jonctions transmembranaires, des transporteurs polarisés et des intégrines) [17]. En considérant que la récupération après un épisode ischémique requiert une synthèse protéique *de novo*, un assemblage et une maturation des protéines, les protéines chaperonnes du RE pourraient jouer un rôle majeur dans les processus de récupération.

Comme la réponse UPR peut engendrer de façon alternée une réponse pro ou antiapoptotique, le stress du RE joue un rôle complexe dans la survie des cellules rénales. Le préconditionnement *in vitro* de cellules épithéliales rénales avec des inducteurs du stress du RE les protège contre les agressions oxydantes (reperfusion) et la cytotoxicité, suggérant un rôle protecteur du stress du RE. Le préconditionnement par le stress du RE atténue les lésions induites par H₂O₂ dans les cellules LLC-PK1 (lignée de cellules épithéliales dérivées d'un rein de porc) en empêchant l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, en potentialisant l'activation de PERK et en diminuant l'activation de la voie JNK. En revanche, la réduction par ARN interférence de BiP, le régulateur clé du stress du RE, aggrave les lésions cellulaires. L'I/R induit dans le rein des modifications d'expression de protéines spécifiques du RE telles que la HSP70 (*heat shock protein* de 70 kDa) et la HO-1 (*heme oxygenase-1*). Une autre protéine spécifique du RE, la HSP12A, également connue sous le nom d'ORP150, est surexprimée dans les cellules tubulaires pendant l'I/R rénale et il a été montré qu'elle jouait un rôle cytoprotecteur pendant les agressions liées à l'I/R. Les souris surexprimant HSP12A sont moins susceptibles à une insuffisance rénale aiguë pendant l'I/R que les souris hétérozygotes pour l'expression du gène codant cette protéine, exprimant moins de HSP12A, confirmant ainsi le rôle essentiel du stress du RE dans les lésions rénales d'origine ischémique. Le rôle protecteur de HSP12A pendant le stress du RE semble être lié à ses propriétés de protéine chaperonne, entraînant un repliement et un transport protéique plus efficaces pendant le stress du RE [18].

L'ischémie-reperfusion hépatique

Une cause importante de reprise retardée de fonction au décours d'une transplantation hépatique est l'I/R

[45]. Des données récentes suggèrent que le stress du RE est impliqué dans les phénomènes d'I/R. Dans un modèle murin d'I/R hépatique, la voie IRE1 est activée à la phase précoce de l'ischémie et, dans un second temps, à la phase précoce de la reperfusion. Cette réaction peut contribuer à l'activation de la voie SAPK/JNK (*stress activated protein kinase/JNK*) lors de la reperfusion [19]. Cette voie est activée pendant l'I/R hépatique et augmente les lésions hépatiques pendant la transplantation, principalement en induisant l'apoptose hépatocytaire [20]. La diminution de l'activité JNK protège de l'I/R et réduit l'apoptose hépatocytaire médiée par la voie mitochondriale [21, 22]. L'inhibition chimique de la voie JNK pourrait être utile afin de protéger la viabilité du greffon hépatique pendant l'I/R et serait une stratégie innovante chez l'homme. Au contraire, la voie PERK, qui induit l'inhibition de la traduction, est principalement activée pendant la reperfusion. On détecte l'activation de PERK dans les cellules endothéliales sinusoidales, ce qui pourrait contribuer à l'hypersensibilité de ce type de cellules hépatiques à l'I/R. Ces résultats sont bien corrélés au défaut observé dans la sécrétion protéique et suggèrent que la réponse biphasique du stress du RE peut influencer les fonctions sécrétrices du foie et, ainsi, le devenir de la transplantation [19].

La préservation d'organes

L'endothélium vasculaire est une cible privilégiée lors de la reperfusion qui suit la conservation hypothermique. La préservation de son intégrité est un facteur critique dans la préservation des organes destinés à la transplantation. Une analyse ultrastructurale détaillée des cellules endothéliales humaines conservées pendant 6 heures en hypothermie dans des solutions de préservation a montré des lésions cellulaires comme la disparition des contacts intercellulaires, l'organisation des fibres de stress, la condensation nucléaire et la perte de l'intégrité mitochondriale. Il faut noter que les citernes endoplasmiques sont distendues, signe très suggestif de stress du RE [23]. Des données expérimentales obtenues chez des souris chez lesquelles on a provoqué un arrêt cardiaque, puis qu'on a ressuscitées, suggèrent que le stress du RE et la diminution de la traduction protéique jouent un rôle, mais les réponses à l'I/R sont différentes selon les organes. Le stress du RE est activé de façon importante et transitoire dans le rein et le foie tandis qu'il est plus modéré dans le cœur [16]. Par conséquent, le stress du RE dans les organes peut contribuer à la physiopathologie de l'arrêt cardiaque et à l'I/R pendant l'intervention chirurgicale au cours de la greffe.

Le remplacement des liquides de conservation conventionnels par une perfusion hypothermique continue peut améliorer la viabilité des organes. Un essai récent chez l'homme a démontré un bénéfice certain de l'utilisation d'une machine de perfusion comparativement à la conservation en hypothermie classique sur la fonction et la survie du greffon à un an [24]. Dans ce cadre, la durée de perfusion semble importante par rapport à l'induction du stress du RE. Les foies de rats perfusés par une pompe avec une solution HTK (*histidine-tryptophan-ketoglutarate*) oxygénée démontrent une phosphorylation de PERK et l'activation de la caspase 12, suivies du clivage de la caspase 3, suggérant une apoptose liée au stress du RE. En revanche, quand les foies sont



d'abord perfusés pendant deux heures puis conservés au froid pendant 16 heures dans la solution HTK, la caspase 12 n'est plus clivée. De plus, cette stratégie de perfusion courte protège le foie contre la cytolysse et empêche les altérations ultrastructurales des hépatocytes [25]. Une autre étude a montré que la voie JNK est inhibée pendant l'oxygénation hypothermique [26]. Le mécanisme par lequel la préservation hypothermique par perfusion de manière prolongée active la réponse UPR est inconnu. Ainsi, les conditions de préservation de l'organe prélevé ainsi que les phénomènes d'ischémie et de reperfusion au moment de la transplantation d'organe génèrent un stress du RE suivi d'une réponse UPR et permettent une adaptation au stress pouvant être mise à profit par des techniques de préconditionnement chimique ou ischémique. Cependant, cette phase d'adaptation est limitée et transitoire et peut être dépassée lors d'un stress trop intense ou prolongé qui aboutira aux lésions tissulaire et structurelle de l'organe greffé.

Le diabète post-transplantation

Le stress du RE est impliqué dans la pathogénie du diabète car il contribue au développement d'une insulino-résistance et à la mort des cellules β [27, 28]. Les cellules sécrétant de grandes quantités d'insuline sont soumises à un stress inhérent à l'importance de la synthèse protéique et sont très sensibles à toute perturbation générant une accumulation de protéines mal conformées. Les mutations du gène codant PERK sont associées à une perte progressive des cellules β des îlots de Langerhans chez la souris et chez l'homme. Les souris porteuses de mutation de eIF2 α développent une perte des cellules β , alors que celles qui ont une délétion de CHOP, inducteur d'apoptose, sont protégées contre le développement du diabète [27, 29, 30]. Le diabète post-transplantation touche 10 à 40 % des patients greffés et augmente la morbi-mortalité cardiovasculaire [31, 32]. Le traitement par tacrolimus (un des deux inhibiteurs (IC) de la calcineurine, l'autre étant la CsA) fait partie des facteurs de risque les plus importants. La physiopathologie des lésions des cellules β du pancréas pendant le traitement par tacrolimus n'est pas bien comprise, mais des études suggèrent que la perturbation liée au stress du RE pourrait altérer la viabilité cellulaire. En effet, les anomalies morphologiques dont les inclusions nucléaires, la dilatation des citernes du RE granuleux, associées à la dégranulation cytoplasmique importante et à la dégénérescence des îlots β pancréatiques, ont été décrites dans des modèles de cellules β de rongeurs avec l'utilisation des deux IC [32, 33]. Ces données suggèrent que le stress du RE est impliqué dans le diabète induit par les IC. Les mécanismes précis par lesquels les IC induisent un diabète post-transplantation ne sont pas connus, mais la caractérisation du rôle de la réponse UPR dans la diabétogénèse est importante car elle pourrait offrir des perspectives thérapeutiques intéressantes, comme par exemple le ciblage de la voie JNK par des inhibiteurs spécifiques [28, 34].

La néphrotoxicité de la ciclosporine

La CsA induit le stress du RE. L'apoptose des cellules tubulaires induite par la CsA est associée à l'induction de CHOP [35]. En évaluant la réponse transcriptomique des cellules tubulaires à la CsA, nous avons

montré l'implication du stress du RE [36]. L'administration de CsA *in vivo* induit une augmentation de l'ARNm de BiP, un marqueur de stress du RE, dans des biopsies de greffon [36]. La CsA (pendant 7 jours) active la réponse UPR, confirmée par l'induction de BiP, et une réponse pro-apoptotique caractérisée par l'augmentation de la caspase 12 et CHOP. Cependant, un traitement long par CsA (pendant 28 jours) diminue l'expression de BiP [37]. Nous avons récemment montré que la néphrotoxicité liée à la CsA était en partie liée au stress du RE. En effet, la CsA et d'autres inducteurs du stress du RE sont responsables de changements phénotypiques épithéliaux conduisant à la formation de protomyofibroblastes, indépendamment de la voie de signalisation du TGF- β (*Transforming growth factor beta*). L'inhibition de la cyclophiline A par ARN interférence joue un rôle en déclenchant à la fois le stress du RE et des changements phénotypiques épithéliaux comme ceux induits par la CsA. Enfin, le salubrinal, un inhibiteur sélectif de la déphosphorylation de p-eIF2 α , réduit de façon significative les changements phénotypiques épithéliaux et la cytotoxicité induits par la CsA *in vitro* et *in vivo*. Ces données mettent l'accent sur le rôle du stress du RE pendant la néphrotoxicité liée à la CsA par induction de la mort cellulaire, mais aussi en tant que médiateur de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans les cellules tubulaires [36]. Ainsi, le stress du RE est impliqué dans la médiation de la néphrotoxicité de la CsA *in vitro* et *in vivo* et peut constituer une cible thérapeutique puisque le salubrinal, une molécule limitant les effets du stress du RE, protège les reins de rats de la néphrotoxicité induite par la CsA.

La réponse UPR comme cible thérapeutique

Compte tenu de l'importance du stress du RE et de la réponse UPR dans la détermination de la vie ou de la mort cellulaire au cours d'un grand nombre de pathologies humaines, la caractérisation de cibles thérapeutiques présente un grand intérêt. La modulation de la réponse UPR est néanmoins complexe car des voies d'adaptation et de survie cellulaire sont activées parallèlement aux voies de mort cellulaire [28]. Ainsi, la modulation des voies de la réponse UPR vers l'adaptation pourrait être bénéfique pour la cellule. Par exemple, l'utilisation du salubrinal, qui inhibe la traduction des ARNm en inhibant la déphosphorylation de p-eIF2 α , a un effet cytoprotecteur dans des modèles cellulaires de maladie de Parkinson et d'excitotoxicité [28, 38]. Nous avons rapporté que le salubrinal atténue significativement la néphrotoxicité de la CsA *in vivo* [36]. Le préconditionnement ischémique améliore les

résultats des greffes hépatiques et rénales [39] et pourrait activer la réponse UPR, et plus spécialement la « composante adaptative » de la réponse. Enfin, des souris qui reçoivent de la tunicamycine ou de la thapsigargine, deux inducteurs importants du stress du RE, sont protégées des lésions d'I/R rénales [40]. L'utilisation de molécules chaperonnes pourrait être bénéfique pour la cellule au cours du stress du RE. Le 4-phénylbutyrate réduit *in vivo* l'action délétère du stress du RE [41]. Il a également été montré qu'un inhibiteur des produits de dégradation du glucose, le TM2002, réduit la mort cellulaire due au stress du RE *in vitro* et diminue les lésions d'I/R *in vivo* dans le rein [42]. L'induction sélective de BiP/GRP78 par du 1-(3-4-dihydrophényl)-2-thiocyanate-éthanone (BIX) avant l'occlusion d'une artère cérébrale réduit la taille de l'infarctus et la mort neuronale [43]. Plus récemment, il a été montré qu'un inhibiteur de kinase, le 1 NM-PP1 permettait la dimérisation d'IRE1 et l'épissage de XBP1 sans activer la dégradation des ARNm que l'on observe au cours du stress du RE soutenu [14]. La modulation de la voie adaptative IRE1-XBP1 par cette classe de molécules appelée KIRA (*kinase-inhibiting RNase attenuators*) pourrait trouver des applications au cours du diabète ou de certains cancers.

L'inhibition des voies activant la mort cellulaire au cours de la réponse UPR pourrait être bénéfique pour le maintien de la viabilité cellulaire. Ainsi, l'inhibition de la voie des MAP-kinases ASK/JNK, qui est activée au cours du stress du RE par IRE1, pourrait être bénéfique au cours du diabète de type 2, de maladies neurodégénératives ou de certaines cardiopathies [34]. De même, l'inhibition de p38 MAPK, qui est activée au cours du stress du RE et qui augmente l'activité de CHOP, a des propriétés cytoprotectrices [44]. Ainsi, les potentialités thérapeutiques qu'offre la réponse UPR sont grandes, mais la complexité des voies de signalisation et la dualité mort/survie cellulaire de cette réponse rend la modulation particulièrement délicate, en particulier dans un contexte de pathologies chroniques telles que le diabète de type 2 ou les maladies neurodégénératives.

Conclusion et perspectives

L'implication du stress du RE en transplantation d'organe solide est probablement sous-estimée, une littérature émergente suggère couramment son rôle dans divers types de situations pathologiques. Une meilleure compréhension de son implication est nécessaire afin de développer de nouveaux biomarqueurs de souffrance tissulaire et de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. La détection du stress du RE dans des

biopsies rénales pourrait servir de biomarqueur de souffrance parenchymateuse et aboutir à des modifications thérapeutiques adéquates. La modulation du stress du RE en tant que médiateur d'adaptation au stress, de mort cellulaire ou de différenciation cellulaire pourrait également être la cible d'interventions thérapeutiques à visée protectrice. ♦

SUMMARY

Involvement of endoplasmic reticulum stress in solid organ transplantation

Endoplasmic reticulum (ER) stress is a situation caused by the accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum, triggering an evolutionary conserved adaptive response termed the unfolded protein response. When adaptation fails, excessive and prolonged ER stress triggers cell suicide. Important roles for ER-initiated cell death pathways have been recognized for several diseases, including diabetes, hypoxia, ischemia/reperfusion injury, neurodegenerative and heart diseases. The implication of the ER stress is not well recognized in solid organ transplantation, but increasing evidence suggests its implication in mediating allograft injury. The purpose of this review is to summarize the mechanisms of ER stress and to discuss its implication during tissue injury in solid organ transplantation. The possible implications of the ER stress in the modifications of cell functional properties and phenotypic changes are also discussed beyond the scope of adaptation and cell death. Increasing the understanding of the cellular and molecular mechanisms of acute and chronic allograft damages could lead to the development of new biomarkers and to the discovery of new therapeutic strategies to prevent the initiation of graft dysfunction or to promote the tissue regeneration after injury. ♦

GLOSSAIRE

- CsA** : ciclosporine
- ATF** : *activated transcription factor*
- CHOP** : *C/EBP homologous protein*
- eIF2 α** : *elongation initiation factor 2 α*
- ER** : *endoplasmic reticulum*
- ERSE** : *endoplasmic reticulum stress response element*
- GADD34** : *growth arrest and DNA damage inducible protein 34*
- GRP** : *glucose related protein*
- IR** : *ischemia-reperfusion*
- IRE1** : *inositol requiring enzyme 1*
- JNK** : *c-jun N-terminal kinase*
- NF- κ B** : *nuclear factor κ B*
- PERK** : *protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*
- TRAF2** : *tumor necrosis factor associated receptor 2*
- UPR** : *unfolded protein response*
- HTK** : *histidine-tryptophan-ketoglutarate*
- MAPK-SAPK** : *mitogen associated protein kinase-stress activated protein kinase*
- IC** : *inhibiteur de la calcineurine*
- BiP** : *immunoglobulin-binding protein*
- ASK** : *apoptosis signal-regulating kinase*

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 181-91.
2. Kaufman R, Scheuner D, Schroder M, et al. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 411-21.
3. Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000; 101: 451-4.
4. Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 2002; 110: 1383-8.
5. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 519-29.
6. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed J. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; 115: 2656-64.
7. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008; 454: 455-62.
8. Boucheccareilh M, Chevet E. Stress du réticulum endoplasmique : une réponse pour éviter le pIRE. *Med Sci (Paris)* 2009; 25: 281-7.
9. Nankivell B, Borrows R, Fung C, et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326-33.
10. Nankivell B, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2006; 81: 643-54.
11. Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2004; 279: 25935-8.
12. Aragón T, van Anken E, Pincus D, et al. Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. *Nature* 2009; 457: 687-93.
13. Korennykh A, Egea P, Korostelev A, et al. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature* 2009; 457: 687-93.
14. Han D, Lerner A, Vande Walle L, et al. IRE1 α kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* 2009; 138: 562-75.
15. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004; 11: 381-9.
16. Montie H, Haezebrouck A, Gutwald J, DeGracia D. PERK is activated differentially in peripheral organs following cardiac arrest and resuscitation. *Resuscitation* 2005; 66: 379-89.
17. Kuznetsov G, Bush K, Zhang P, Nigam S. Perturbations in maturation of secretory proteins and their association with endoplasmic reticulum chaperones in a cell culture model for epithelial ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8584-9.
18. Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, et al. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *Faseb J* 2004; 18: 1401-3.
19. Emadali A, Nguyen D, Rochon C, et al. Distinct endoplasmic reticulum stress responses are triggered during human liver transplantation. *J Pathol* 2005; 207: 111-8.
20. Theruvath T, Czerny C, Ramsheh V. C-Jun N-terminal kinase 2 promotes injury via the mitochondrial permeability transition after mouse liver transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 1819-28.
21. Boutros T, Nantel A, Emadali A, Tzimas G. The MAP Kinase phosphatase 1MKP-1/DUSP1 is a regulator of human liver response to transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 2558-68.
22. Theruvath T, Snoddy M, Zhong Z. Mitochondrial permeability transition in liver ischemia and reperfusion: role of the c-jun N-terminal kinase 2. *Transplantation* 2008; 85: 1500-4.
23. Eberl T, Salvenmoser W, Rieger G, et al. Ultrastructural analysis of human endothelial cells after hypothermic storage in organ preservation solutions. *J Surg Res* 1999; 82: 253-60.
24. Moers C, Smits J, Maathuis M. Machine reperfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med* 2009; 360: 7-19.
25. Minor T, Manekeller S, Sioutis M, Dombrowski F. Endoplasmic and vascular surface activation during organ preservation: refining upon the benefits of machine perfusion. *Am J Transplant* 2006; 6: 1355-66.
26. Dutkowski P, Krug A, Kryiak M, Dunschede F. Detection of mitochondrial electron chain carrier redox status by transhepatic light intensity during rat liver reperfusion. *Cryobiology* 2003; 47: 125-42.
27. Harding H, Zeng H, Zhang Y, et al. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in per $^{+/-}$ mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* 2001; 7: 1153-63.
28. Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 1013-30.
29. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, et al. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* 2002; 109: 525-32.
30. Scheuner D, Kaufman R. The unfolded protein response: A pathway that links insulin demand with beta-cell failure and death. *Endocr Rev* 2008; 29: 317.
31. Balla A, Chobanian M. New-onset diabetes after transplantation: a review of recent literature. *Curr Opin Organ Transplant* 2009; 14: 375-9.
32. Penforis A, Kury-Paulin S. Immunosuppressive drug-induced diabetes. *Diabetes Metab* 2006; 32: 539-46.
33. Drachenberg C, Klassen D, Weir M. Islet damage associated with tacrolimus and cyclosporine: morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation. *Transplantation* 1999; 68: 396-402.
34. Sahl B. c-Jun N-terminal kinases as potential therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 1339-53.
35. Justo P, Lorz C, Sanz A, Egido J, Ortiz A. Intracellular mechanisms of cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 3072-80.
36. Pallet N, Bouvier N, Bendjallab A, et al. Endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death induced by cyclosporine. *Am J Transplant* 2008; 11: 2283-96.
37. Han SW, Li C, Ahn K, et al. Prolonged endoplasmic reticulum stress induces apoptotic cell death in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Am J Nephrol* 2008; 28: 707-14.
38. Smith W, Pei Z, Tanaka Y, et al. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 3801-11.
39. Desai K, Dikdan G, Shareef A, Koneru B. Ischemic preconditioning of the liver: a few perspective from the bench to the bedside translation. *Liver Transpl* 2008; 14: 1569-77.
40. Prachasilchai W, Sonoda H, Yokota-Ikeda N. A protective role of unfolded protein response in mouse ischemic acute kidney injury. *Eur J Pharmacol* 2008; 592: 138-45.
41. Qi X, Hosoi T, Okuma Y, Kaneko M, Nomura Y. Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury. *Mol Pharmacol* 2004; 66: 899-908.
42. Izuhara Y, Nangaku M, Takizawa S, et al. A novel class of advanced glycation inhibitors ameliorates renal and cardiovascular damage in experimental rat models. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 497-509.
43. Kudo T, Kanamoto S, Hara H, et al. A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Cell Death Differ* 2008; 15: 364-75.
44. Hynes Jr, Leftheri K. Small molecule p38 inhibitors: novel structural features and advances from 2002-2005. *Curr Top Med Chem* 2005; 5: 967-85.
45. Durand F, Belghiti J. Transplantation hépatique chez l'adulte. *Med Sci (Paris)* 2005; 21: 89-94.
46. Foulfelle F, Ferré P. La réponse UPR : son rôle physiologique et physiopathologique. *Med Sci (Paris)* 2007; 23: 291-6.

TIRÉS À PART

N. Pallet

Résumé :

Le rein natif et le greffon rénal peuvent être soumis à de multiples agressions conduisant à la détérioration progressive du parenchyme. Ces agressions peuvent être spécifiques (stress toxique, immunologique) et/ou non spécifiques (stress ischémique) et vont engendrer des réponses pouvant entraîner à la fois une diminution de la consommation d'énergie, une augmentation des apports afin de maintenir l'homéostasie tissulaire et la survie mais aussi une réaction inflammatoire et l'apoptose pouvant conduire à la fibrose. Parmi celles-ci, on peut nommer les voies HIF1 α , mTOR, le stress du réticulum endoplasmique (RE), l'autophagie, l'activation de l'immunité innée et acquise. La réponse adaptative qui suit le stress du RE, la réponse UPR (Unfolded protein response), est une voie adaptative dont les implications sont actuellement encore peu connues dans le domaine de la pathologie rénale. Celle-ci se compose de trois effecteurs principaux : Perk, Ire1 et ATF6.

A l'aide de deux modèles de stress toxique (cyclosporine) et ischémique (carence en glucose) sur deux modèles cellulaires distincts (cellulaires endothéliales artérielles et cellules tubulaires rénales), et dans des modèles *in vivo*, nous avons montré que le stress du RE était impliqué à la fois dans l'apparition de modifications phénotypiques endothéliales évocatrices de transition endothélio-mésenchymateuse induites par la cyclosporine et à la fois dans l'induction de réponses inflammatoire (régulation de NF- κ B par Ire1) et angiogénique (régulation distincte de VEGF, bFGF et angiogénine par Perk et Ire1) induites par la carence en glucose. La réponse UPR semble modulée de façon subtile au cours de ces stress car les trois effecteurs n'engendrent pas des réponses identiques.

Ces travaux apportent ainsi une meilleure compréhension des mécanismes d'adaptation au cours de stress variés, montrent que le stress du RE est impliqué dans ces réponses adaptatives et que la réponse peut être différente selon les effecteurs de la réponse UPR. Cette meilleure compréhension pourra permettre de valider des biomarqueurs précoces et des modulateurs de la réponse UPR afin de prévenir la dégradation du parenchyme rénal.

Abstract:

Native and grafted kidneys are stressed by multiple specific or non-specific insults leading to progressive structural deterioration. Responses to these insults are adaptive and preserve cell survival but may also promote inflammation, fibrosis and apoptosis. The most important of these adaptive pathways are HIF1 α pathway, mTOR pathway, autophagy, unfolded protein response (UPR). The consequences of the UPR in kidney injuries are not well known.

The objective of this study is to delineate the mechanisms and consequences of the activation of the UPR in response to toxic (cyclosporine) and ischemic (glucose starvation) stresses in two distinct cellular models (arterial endothelial cells and renal tubular cells). Here, we showed that UPR was engaged in cyclosporine-induced endothelial phenotypic changes, glucose starvation-induced inflammatory and angiogenic responses: NF- κ B regulation by Ire1; distinct VEGF, bFGF and angiogenin regulation by Perk and Ire1. UPR is subtly modulated since its transducers do not induce identical processes.

In conclusion these comprehensive works, we demonstrate the UPR is implicated in stress-induced adaptive pathways with different downstream responses according to the effector. Renal tissue degradation could be prevented by discovering and validating early biomarker and UPR modulators.