



HAL
open science

La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) dans la biologie de la cellule mésangiale : rôles dans l'inflammation, la croissance et la survie

Mazène Hochane

► To cite this version:

Mazène Hochane. La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) dans la biologie de la cellule mésangiale : rôles dans l'inflammation, la croissance et la survie. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ093 . tel-00867932

HAL Id: tel-00867932

<https://theses.hal.science/tel-00867932>

Submitted on 30 Sep 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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
INSERM 682

THÈSE *présentée par :*
Mazène HOCHANE

soutenue le : **28 Septembre 2012**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspect Moléculaire et cellulaire de la biologie

***La protéine apparentée à l'hormone
parathyroïdienne (PTHrP) dans la
biologie de la cellule mésangiale : rôles
dans l'inflammation, la croissance et la
survie***

THÈSE dirigée par :

Mme BARTHELMEBS Mariette

DR CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr GIROLAMI Jean-Pierre

DR, INSERM,

Toulouse

Mme BOUBY-BOUZIDI Nadine

DR, INSERM,

Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr MEZIANI Ferhat

Pr, Université de Strasbourg

Je dédie cette thèse...

À ma mère, ses mains et son cœur chauds

*À mes trois adorables sœurs, Lama, Rana et Roba,
leurs sourires et leur courage*

*À mon père, qui n'est plus de ce monde et qui m'aurait
peut-être blâmé d'être parti, en me serrant chaudement
la main*

*À mon grand-père, avec qui j'aurais discuté « en
Français » de ce voyage, ses difficultés et ses plaisirs*

*À mon oncle Hossam et à sa famille, qui m'ont permis
de fouler le sol de France... et plus encore*

À toute ma famille Damasienne et française

*À l'idée que je me fais de l'avenir, du pays de la
mémoire, déchiré, au flanc de la méditerranée...*

Mazène HOCHANE

Abbreviations

(Les plus utilisées)

4-OH-TAM	4-hydroxy-tamoxifène
α-SMA	α-Smooth Muscle Actin
AC	Adénylate Cyclase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMPc	Adenosine Mono-Phosphate cyclique
AngII	Angiotensine II
Apaf-1	Aproptotic Peptidase activating Factor-1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARN(m)	Acide Ribonucléique (messenger)
AGE	Advanced Glycation End-product
AT1, AT2	Récepteur de type 1 et 2 de l'Angiotensine II
BSA	Bovine Serum Albumin
BrdU	Bromo-déoxyUridine
CARD	CAspase Recruitment Domain
CDK	Cyclin-Dependant Kinase
CM	Cellules Mésangiales
CM^{BL/6}	Cellules mésangiales issues des souris C57Bl/6j
CM^{CreLox}	Cellules mésangiales issues des souris CreLoxP
CKIα	Caséine Kinase-1α
CMLV	Cellule Musculaire Lisse Vasculaire
CMLAo	Cellule Musculaire Lisse Aortique
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CSF-1	Colony-Stimulating Factor-1
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAG	Diacylglycérol
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire
Dvl	Dishevelled
DMEM	Dulbecco-modified Eagle medium
EGF	Epithelium Growth Factor
ERK1/2	Extracellular Regulated Kinase 1 and 2
FADD	Fas-Associated Death Domain
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
GROα	GROWth-Related protein α

GSK-3β	<i>Glycogène Synthase Kinase-3β</i>
HB-EGF	<i>Heparin Binding-EGF</i>
HHM	<i>Hypercalcémie Humorale Maligne</i>
HSV	<i>Habu Snake Venom</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
ICAM-1	<i>Inter Cellular Adhesion Molecule-1</i>
IFN-γ	<i>Interferon-γ</i>
IgA	<i>Immunoglobuline A</i>
IGF-I	<i>Insulin-like Growth Factor-I</i>
IL-1β	<i>Interleukine-1β</i>
IL-2,3... IL-27	<i>Interleukine-2,3...jusqu' 'à 27</i>
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>
IP3	<i>Inositol 1,4,5-triphosphate</i>
IRC	<i>Insuffisance Rénale Chronique</i>
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal Kinase</i>
LPS	<i>Lipo-Poly-Saccharide</i>
MBG	<i>Membrane Basale Glomérulaire</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein kinase, ou MAP kinase</i>
MIP-2 (GROβ)	<i>Macrophage Inflammatory Protein-2 (Growth-Regulated Protein β)</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
MMP	<i>Matrix MetalloProtease</i>
NHERF	<i>Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor</i>
NLR	<i>NOD-Like Receptor</i>
NLS	<i>séquences de localisation nucléaire</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
PDZ	<i>Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, ZO-1</i>
PI3-K	<i>Phosphatidyl-inositol 3-kinase</i>
PKA	<i>Protéine Kinase A</i>
PKC	<i>Protéine Kinase C</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PTH	<i>hormone parathyroïdienne</i>
PTHrP	<i>protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne</i>
RAGE	<i>Récepteurs à AGE</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</i>
Rb	<i>Retino-Blastoma</i>
RCPG	<i>Récepteur Couplé aux Protéines G</i>
R-PTH1	<i>Récepteur commun à la PTHrP et à la PTH-1</i>

ROS	<i>Reactive Oxygene spieces</i>
Skp-2	<i>S-phase Kinase-associated Protein-2</i>
sICAM-1	<i>soluble Inter Cellular Adhesion Molecule-1</i>
SP	<i>Signal Peptide</i>
SRA	<i>Système Rénine-Angiotensine</i>
Smads	<i>Small mothers of decapentaplegic</i>
SVF	<i>Sérum de veau foetal</i>
Thy1.1, 1.2	<i>Thymus antigen 1.1, 1.2</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β),</i>
TIMP-1	<i>Tissue Inhibitor of MetalloProtéinase-1</i>
TIP39	<i>peptide tubéro-infundibulaire de 39 acides aminés</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TNFR1	<i>Tumor Necrosis Factor-α Receptor 1</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Résumé :

Diverses glomérulopathies comme la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA, la néphropathie diabétique et les glomérulonéphrites, sont caractérisées par une atteinte précoce des cellules mésangiales (CM) glomérulaires. L'atteinte des CM conduit à leur activation et à la sécrétion de facteurs proinflammatoires et de facteurs de croissance, ce qui déclenche une inflammation locale. La réponse des CM se manifeste également par leur prolifération et leur apoptose. La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) est une cytokine ubiquitaire à action locale. Elle est surexprimée dans les CM lors des lésions glomérulaires. La PTHrP agit *via* deux voies d'action principales : la voie autocrine/paracrine par l'activation de son récepteur R-PTH1 et la voie intracrine après son transfert dans le noyau. Dans ce travail, nous avons étudié les effets de la PTHrP sur la prolifération, l'apoptose et l'inflammation mésangiales en utilisant un système CreLoxP pour la PTHrP permettant l'abrogation spécifique de celle-ci dans les cellules exprimant l' α SMA, ce qui est le cas des CM *in vitro*. Nous avons aussi surexprimé différentes formes de PTHrP agissant exclusivement par l'une des voies autocrine/paracrine ou intracrine ou traité les CM par la PTHrP exogène. Nos résultats montrent que la PTHrP avait des effets divers sur les CM et cela dépendamment de sa voie d'action. La PTHrP était mitogène par *la voie intracrine*, augmentant l'expression de c-Myc et E2F1, deux facteurs de transcription impliqués dans l'avancement du cycle cellulaire, et diminuant celle de P27^{KIP1}, qui lui est un inhibiteur du cycle. La PTHrP exerçait un effet anti-apoptotique par les deux voies d'action intracrine nucléaire et autocrine/paracrine, avec une contribution majoritaire de cette dernière voie. La PTHrP, par l'activation de son récepteur R-PTH1, mettait en jeu les voies signalétiques de l'AMPC/PKA et la PI3-K/Akt qui mutuellement semblent activer le NF κ B. Nous avons également cherché si l'expression de la PTHrP était régulée par des stimuli inflammatoires. Nous montrons que le TNF- α et l'IL-1 β étaient tous les deux capables de majorer la PTHrP dans les CM. L'effet de l'IL-1 β était transcriptionnel et mettait en jeu la stabilisation de l'ARNm de la PTHrP *via* la protéine HuR prolongeant donc sa demi-vie. Après transfection stable par la PTHrP native, les CM résistaient également à l'apoptose induite par TNF- α ou IL-1 β . La PTHrP elle-même était capable d'induire l'expression rapide de multiples cytokines comme l'IL-17, IL-16, IL-6, IL-1 α (2 h) et des chimiokines comme RANTES, MIP-2, TARC et I-TAC avec une cinétique plus longue (2 et 4h). La PTHrP *via* l'activation du R-PTH1 majorait sa propre expression et celle de la cyclooxygénase-2 (COX-2) *via* l'activation de NF κ B. Nous avons montré également que la COX-2 était la principale responsable de l'effet anti-apoptotique de la PTHrP sur les CM. Finalement, dans un modèle de glomérulonéphrite mésangioproliférative aiguë induit par une injection de venin de serpent Habu (HSV), la PTHrP était surexprimée dans les glomérules lésés à J1. Le HSV augmentait l'expression de la PTHrP dans les CM en culture et majorait l'apoptose des CM délétées en PTHrP. L'ensemble de ces résultats place la PTHrP comme un puissant facteur de prolifération et de survie des CM. L'expression de la PTHrP est régulée par des facteurs proinflammatoires dont elle-même est capable d'induire l'expression et elle pourrait contribuer à l'inflammation glomérulaire locale.

Mots clef : Cellules mésangiales, PTHrP, prolifération, apoptose, autocrine, intracrine, cytokines, chimiokines, inflammation, cyclooxygénase-2, glomérulonéphrite mésangioproliférative, HSV

Abstract

Several glomerulopathies such as IgA nephropathy, diabetic glomerulopathy and mesangial proliferative glomerulonephritis are characterized by an early mesangial cell (MC) injury. MC lesion leads to their activation and secretion of many inflammatory and growth factors which trigger a local inflammation. MC also respond by proliferation and apoptosis. The parathyroid hormone-related protein (PTHrP) is a cytokine-like factor with ubiquitous expression and local action that has been found to be upregulated in MC in many glomerulopathies. PTHrP acts through two principal pathways: an autocrine/paracrine via the activation of its receptor PTH1-R and an intracrine one, when it is translocated to the nuclei. In this work, we studied the effects of PTHrP on MC proliferation, apoptosis and inflammation using a CreLoxP system allowing PTHrP gene excision specifically in cells expressing α SMA, which is the case of cultures MC. We also overexpressed different forms of PTHrP acting only through the autocrine/paracrine or intracrine pathways or treated MC with exogenous PTHrP. Our results show that PTHrP exerted many effects on MC in a pathway-dependant fashion. PTHrP was mitogenic through intracrine pathway, increasing the expression of c-Myc and E2F1, which are transcription factors implicated in the cell-cycle progression, while decreasing p27^{KIP1}, an inhibitor of the cell cycle. PTHrP promoted MC survival through both aforementioned pathways, with a major contribution of the autocrine/paracrine one. PTHrP activation of PTH1-R triggered cAMP/PKA and PI3-K/Akt signalization, both were needed for the distal activation of NF κ B. We also looked if PTHrP expression in MC was regulated by proinflammatory factors. We show that TNF- α and IL-1 β upregulated PTHrP in MC. IL-1 β not only transcriptionally induced PTHrP overexpression but also stabilized its mRNA *via* the protein HuR. Moreover, stably transfected MC with wild-type PTHrP resisted to TNF- α and IL-1 β induced apoptosis. PTHrP itself was capable of eliciting a rapid (2 h) expression of many cytokines like IL-17, IL-16, IL-6 and IL-1 α and it also upregulated several chemokines like RANTES, MIP-2, TARC et I-TAC, in a more prolonged fashion (2 to 4h). The PTHrP, by PTH1-R stimulation, induced its own expression and that of the cyclooxygenase-2 (COX-2) through NF κ B activation. The COX-2 was also the major actor in the PTHrP-induced survival. Finally, PTHrP was upregulated in injured glomerular cells in a mouse model of mesangial proliferative glomerulonephritis induced by a sole injection of Habu snake venom (HSV). HSV was able to increase PTHrP expression in MC in culture and enhanced the apoptosis of MC in which PTHrP was abrogated. Altogether, these results situate PTHrP as prominent proliferative and anti-apoptotic factor of MC and show its capacity to contribute to the local glomerular inflammation.

Key words: Mesangial cells, PTHrP, proliferation, apoptosis, autocrine, intracrine, cytokines, chemokines, inflammation, cyclooxygenase-2, mesangioproliferative glomerulonephritis, HSV

Abbréviations	0
Chapitre 1 Introduction bibliographique	12
Partie A - « La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) »	14
La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne « PTHrP »	15
Il était une fois...	16
La PTHrP comme facteur de l'HHM	16
Structure du gène de la PTHrP	18
La PTHrP, une famille nombreuse	20
Trois isoformes, les PTHrP(1-139), PTHrP(1-141) et PTHrP(1-173)	20
La PTHrP(1-36)	20
Les fragments intermédiaires : PTHrP(38-94), (38-95) et (38-101)	22
La PTHrP(107-139)	24
La PTHrP(141-173)	24
Et des modifications post-traductionnelles...	25
Le R-PTH1 et la signalisation autocrine/paracrine	26
Activation du R-PTH1 et voies signalétiques	26
Particularités du R-PTH1	30
Les autres récepteur de la PTH ou PTHrP	31
Les souris transgéniques pour la PTHrP ou le R-PTH1	31
Expression et effets physiologiques du système PTHrP/R-PTH1 dans le rein	32
Les interactions de la PTHrP avec les cytokines et chimiokines	33
Les cytokines inflammatoires induisent l'expression de la PTHrP	34
Les cytokines inflammatoires interfèrent avec les effets de la PTHrP	34
La PTHrP dans l'endotoxémie et le choc septique	34
La PTHrP, via NFκB, induit l'expression de cytokines et chimiokines	35
La PTHrP et les chimiokines dans la résorption osseuse	36
Effets de la PTHrP sur la prolifération cellulaire	36
Le cycle cellulaire	38
La PTHrP et la prolifération cellulaire	39
Effets de la PTHrP sur la survie cellulaire	44
L'apoptose, un suicide sophistiqué	44
La PTHrP et l'apoptose cellulaire	46
Partie B - « La Physiopathologie de la cellule mésangiale »	50
Origine des cellules mésangiales	52
Historique	52
Le statut développemental des CM	54
Rôles physiologiques des cellules mésangiales	55
Le maintien de la structure capillaire glomérulaire	55
La synthèse de la matrice extracellulaire	55
La régulation fine de la filtration glomérulaire	56
La phagocytose de macromolécules	57
Les pathologies rénales : le point sur les glomérulopathies	58
La maladie rénale	58
Les glomérulopathies	60
Les glomérulopathies primitives non spécifiques	60

Les glomérulopathies secondaires spécifiques _____	64
La néphropathie lupique _____	69
La néphropathie hypertensive _____	70
Modèles expérimentaux de glomérulopathies _____	70
Inflammation et glomérulopathies _____	76
Contexte global de l'inflammation _____	76
La famille de l'interleukine-1 _____	80
Le TNF- α _____	84
Les chimiokines _____	86
La cyclooxygénase dans les glomérulopathies _____	92
Et la cellule mésangiale dans tout cela... _____	94
La cellule mésangiale dans tous ses états _____	95
Cellule mésangiale et inflammation _____	95
La régulation de la prolifération des cellules mésangiales _____	98
L'hypertrophie des cellules mésangiales _____	102
L'apoptose des cellules mésangiales _____	103
La cellule mésangiale...du monologue au dialogue _____	106
Objectifs de cette thèse _____	108
Chapitre 2 <i>Matériels et Méthodes</i> _____	110
Modèle expérimental : CM en culture primaire _____	112
Préparation des cultures primaires des CM _____	112
Souris « CreloxP » α SMA-CreER ^{T2} / PTHrP ^{loxP/loxP} _____	112
Excision de la PTHrP sur les CM ^{CreLox} et vérification de l'excision _____	112
Surexpression de gènes : transfections plasmidiques _____	114
Caractérisation des CM _____	116
Etudes <i>in vitro</i> _____	116
Protocoles expérimentaux _____	116
Etude de la prolifération des CM par incorporation de BrdU _____	116
Etude de la prolifération des CM par cytométrie de flux (FACS) _____	118
Etude de l'apoptose des CM par cytométrie de flux (FACS) _____	118
Etude de l'apoptose des CM par la technique TUNEL _____	119
Mesure de l'AMP cyclique _____	119
Etudes <i>in vivo</i> _____	120
La glomérulonéphrite au venin de serpent Habu (HSV, Habu snake venom) _____	120
Etude de l'expression des ARNs _____	121
Extraction _____	121
Transcription inverse _____	121
qRT-PCR _____	122
Immunoprécipitation ("HuR-PTHrP mRNA complex Pull-down assay") _____	122
Etude de l'expression des protéines _____	124
Extraction des protéines totales _____	124
Dosage des protéines _____	124
Western blot _____	124
Profilage protéomique _____	124
Immunocytochimie par immunofluorescence _____	125
Immunohistochimie _____	125
Expression des résultats et analyse statistique _____	126

Chapitre 3 “Parathyroid hormone-related protein is a mitogenic and a survival factor of mesangial cells: role of intracrine and paracrine pathways” _____ 128

Chapitre 4 “Parathyroid hormone-related protein modulates cytokines and chemokines expression in mesangial cells and blunts apoptosis by enhancing Cox-2 expression” _____ 164

Chapitre 5 “La PTHrP dans un modèle de glomérulonéphrite mésangioproliférative chez la souris” _____ 194

Chapitre 6 Discussion générale et Conclusion _____ 212

Discussion générale des résultats _____	214
Toute histoire a un début... _____	214
La PTHrP un facteur de croissance des CM ? _____	214
Quels outils pour analyser les effets de la PTHrP endogène et intracrine ? _____	216
La PTHrP endogène est mitogène sur les CM _____	216
La PTHrP endogène est mitogène sur les CM par la voie intracrine _____	217
Quels sont les acteurs de cette pièce ? _____	217
Un rôle pour les PTHrP intermédiaires et C-terminale ? _____	218
Un effet de la PTHrP exogène sur l’apoptose ? _____	218
La PTHrP endogène, un facteur de survie des CM ? _____	219
Quelle part pour la PTHrP intracrine ? _____	219
Quelles voies de signalisation pour la PTHrP paracrine dans la survie des CM ? _____	219
Pourquoi s’intéresser à NHERF1 et NHERF2 ? _____	220
La PTHrP retient les CM sur place...! _____	222
Comment est régulée l’expression de la PTHrP dans les CM ? _____	222
La PTHrP, une cytokine...induisant l’expression d’autres cytokines et chimiokines ? _____	224
La PTHrP anti-apoptotique ? ...ça dépend...! _____	226
La PTHrP, source d’autres facteurs impliqués dans l’inflammation ? _____	226
Quel rôle pour la Cox-2 surexprimée par la PTHrP ? _____	227
Mais qu’en est-il dans la vraie vie.... <i>in vivo</i> ...? _____	227
Analyse et Conclusions _____	229

Chapitre 7 Références bibliographiques _____ 232

Chapitre 1

Introduction bibliographique

***Partie A -
« La protéine apparentée à l'hormone
parathyroïdienne (PTHrP) »***

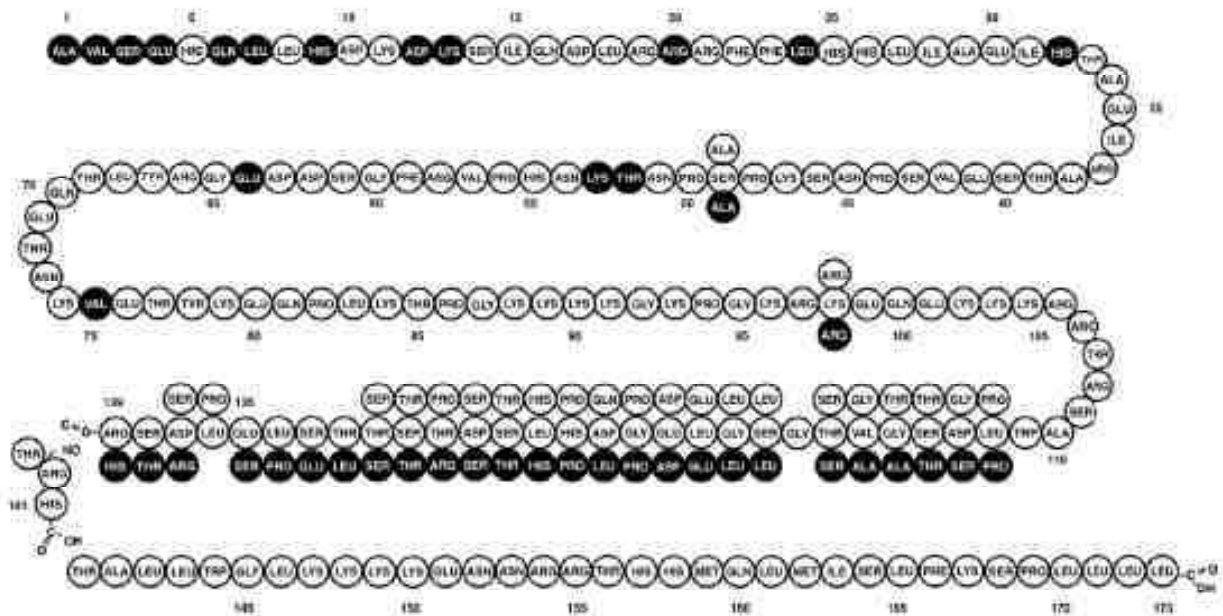
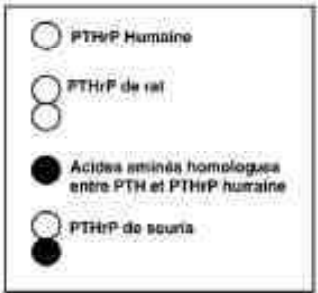


Figure 1.1 : Structure primaire de la PTHrP humaine, de rat et de souris. Les trois isoformes de la PTHrP humaine (139, 141 et 173 acides aminés) sont schématisées. La PTHrP de rat comporte 141 acides aminés et celle de souris en comporte 139.



La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne « PTHrP »

Il était une fois...

...l'hypercalcémie humorale maligne (HHM), un syndrome paranéoplasique associé aux tumeurs solides sans métastases osseuses, telles que les carcinomes du sein, du rein, de la prostate ou du poumon. L'HHM se caractérise par une hypercalcémie associée à une hypophosphatémie évoquant l'hyperparathyroïdisme primaire mais sans l'élévation caractéristique du taux sanguin de l'hormone parathyroïdienne (PTH). De surcroît, l'HHM se distingue par une réduction des concentrations circulantes de PTH et de 1,25-dihydroxyvitamine D, ainsi qu'une plus grande excrétion fractionnelle du calcium (Stewart et al., 1980). D'autre part, le taux de résorption osseuse est compensé par sa néoformation dans l'hyperparathyroïdisme, alors que la perte osseuse est majeure dans l'HHM, ce qui élimine définitivement l'hypothèse de la PTH comme facteur responsable de l'HHM.

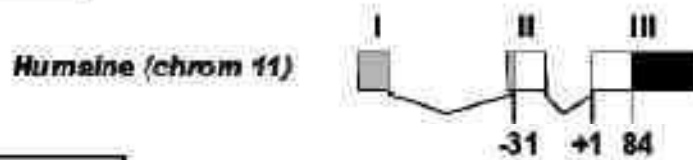
Cependant, le facteur impliqué dans l'HHM partage avec la PTH plusieurs caractéristiques, notamment l'augmentation de sécrétion d'AMPC néphrogénique (Stewart et al., 1980). Des extraits tumoraux associés à l'HHM stimulent *in vitro* la voie de l'adénylate cyclase (AC)-PTH-dépendante sur le rein et l'os (Stewart et al., 1983; Strewler et al., 1983), et cet effet est inhibé par un antagoniste spécifique du récepteur de la PTH, le (Nle⁸,Nle¹⁸,Tyr³⁴) bPTH(3-34) amide (Rodan et al., 1983), mais non par un anticorps ciblant la PTH (Stewart et al., 1983; Strewler et al., 1983). Il apparaît ainsi que le facteur recherché est capable de se lier au même récepteur que la PTH.

Burtis montre par la suite que les extraits de tumeurs, ou le milieu de culture conditionné par des tumeurs associées à l'HHM, contiennent une protéine (ou une famille de protéines) qui stimule le système AC PTH-dépendant dans les membranes corticales rénales de chien, mais dont la taille est supérieure à celle de la PTH elle-même. Il identifie une protéine de 17 kD qui mime les effets de la PTH (Burtis et al., 1987). En 1987, trois laboratoires de New Haven (USA), Melbourne (Australie) et San Francisco (USA) identifient simultanément et purifient le facteur responsable de ce syndrome (Burtis et al., 1987; Moseley et al., 1987; Strewler et al., 1987). Il sera dénommé « protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne » ou PTHrP. Ce nom est choisi pour rappeler l'homologie de séquence de la partie N-terminale de ce facteur avec la PTH, puisque 9 des 13 premiers acides aminés de la PTHrP sont identiques à ceux de la PTH humaine, bovine et de rat, les séquences divergeant totalement au-delà du 13ème acide aminé (**Figure 1.1**).

La PTHrP comme facteur de l'HHM

Le séquençage complet de la PTHrP (Mangin et al., 1988b; Suva et al., 1987) a permis de confirmer l'homologie de séquence entre les 13 premiers acides aminés de la PTH et la PTHrP. L'ADNc de la PTHrP est un fragment de 2 kb codant pour une protéine constituée d'une séquence pré-peptidique de 36 acides aminés et d'un peptide mature de 141 acides aminés (**Figure 1.2**) (Mangin et al., 1988a). La PTHrP partage avec la PTH ses propriétés phosphaturiques et hypocalciuriques sur le tubule rénal par l'activation du récepteur de la PTH grâce à une partie N-terminale commune, nécessaire pour la liaison au récepteur (Habener et al., 1984). Les études de biologie moléculaire

PTH



PTHrP

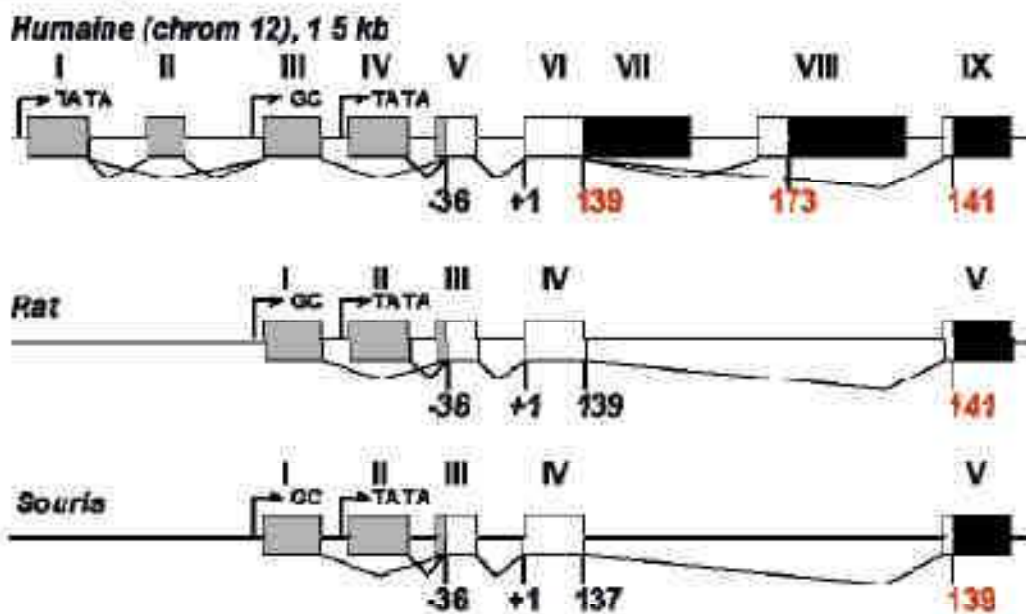


Figure 12 : Comparaison de l'organisation des gènes de la PTHrP humaine, de rat et de souris avec celle de la PTH humaine.

Les exons sont numérotés en chiffres romains. Les régions codantes sont représentées par les rectangles blancs, les régions non traduites en 5' sont en gris et les régions non traduites en 3' sont représentées en noir. Les séquences promotrices sont signalées par les flèches noires. Les sites potentiels d'excision/épissage alternatif sont indiqués par les traits joignant les différents exons.

portant sur des tumeurs associées à l'HMM ou des cellules humaines normales (kératinocytes) ont révélé la présence de multiples ARNm de cette protéine. Les analyses par Southern blot réalisées sur l'ADN humain ont démontré la présence du gène sous forme d'une seule copie, codant pour trois protéines de 139, 141 et 173 acides aminés par épissage alternatif du pré-messager (Mangin et al., 1988a).

La PTHrP est considérée comme un facteur produit et sécrété par les tumeurs, dont les cibles sont essentiellement l'os et le rein, et donc comme un facteur délétère responsable de l'HMM. En effet, les taux sériques de PTHrP sont augmentés chez 80 % des patients développant un cancer, notamment chez ceux porteurs de tumeurs solides (Rankin et al., 1997; Wysolmerski and Broadus, 1994). L'hypercalcémie provoquée par cette augmentation de la PTHrP sérique survient brusquement, est le plus souvent sévère (Strewler, 2000) et est synonyme de mauvais pronostic avec une survie moyenne d'environ six semaines (Solimando, 2001; Strewler, 2000).

Structure du gène de la PTHrP

La structure du gène de la PTHrP a été décrite chez l'homme, le rat et la souris (Philbrick et al., 1996).

- **Legène de la PTHrP** humaine s'étend sur plus de 15 kb au niveau du bras court du chromosome 12 et présente une structure génomique plus complexe (Philbrick et al., 1996) que le gène de la PTH situé dans une position homologue sur le chromosome 11 (**Figure 1.2**). Chez l'homme, le gène de la PTHrP comporte 9 exons, l'exon 6 codant pour la majorité de la protéine. Trois ARNm peuvent être transcrits à partir de ce gène, aboutissant à trois protéines de 139, 141 et 173 acides aminés, différentes seulement au niveau de leur partie C-terminale (Mangin et al., 1989). Le gène de la PTHrP présente une organisation plus simple chez le rat et la souris (Philbrick et al., 1996; Stewart and Broadus, 1990; Yasuda et al., 1989b). Il est situé sur le chromosome 4 chez le rat, le chromosome 6 chez la souris, et ne comporte dans les deux cas que 5 exons. Chez la souris, l'isoforme majoritaire de la PTHrP est une protéine de 139 acides aminés (Mangin et al., 1990a; Seldin et al., 1992).

- **La région promotrice** du gène de la PTHrP humaine comporte trois éléments. Les promoteurs P1 et P3 sont des séquences consensus appelées *boîtes* « TATA » qui se situent respectivement en amont de l'exon I et entre l'exon III et IV (Mangin et al., 1989; Thiede et al., 1988; Yasuda et al., 1989a). Le promoteur P2 est une région riche en « GC » située entre les exons II et III (Vasavada et al., 1993), contenant de nombreux sites de liaisons pour des facteurs de transcriptions, comme **NFκB** ou encore les **Smads** (Kakonen et al., 2002; Nadella et al., 2007), suggérant une régulation fine et complexe de l'expression de la protéine. Comme la plupart des gènes eucaryotiques, le gène de la PTHrP comporte, en plus des 3 promoteurs, des sites de régulation en « cis ». Ces sites peuvent être activateurs (Campos et al., 1992), inhibiteurs, ou sensibles à différents facteurs comme la vitamine D3, les glucocorticoïdes (Mangin et al., 1990b) ou l'AMPc (Ikeda et al., 1993a; Mangin et al., 1989; Mangin et al., 1990b).

- **La région codante** pour la PTHrP est répartie chez l'homme sur 9 exons. L'exon 5 code pour la majeure partie de la séquence « prépro » (-36 à -8), et l'exon 6 pour les 7 derniers acides aminés de cette séquence. Cette séquence « prépro » est clivée au cours de la maturation de la protéine. L'exon 6 (ou 4 chez la souris et le rat) code également pour la forme mature de la PTHrP, la PTHrP(1-139), les autres isoformes de la PTHrP (1-141 et 1-173) étant produites par l'épissage alternatif des exons 7 et 8 (Mangin et al., 1990a; Mangin et al., 1988b; Yasuda et al., 1989a). L'expression de ces différentes isoformes semble dépendre du type tissulaire : les transcrits des formes courtes seraient principalement retrouvés dans les tissus normaux et les transcrits de la PTHrP(1-173) correspondraient au tissu néoplasique (Campos et al., 1994). Cependant dans notre laboratoire, l'étude des carcinomes à cellules claires (CCC), qui représentent 90% des cancers du rein, a montré que la forme majoritaire était la PTHrP(1-141) (Danilin et al., 2009).

- **La région 3' non traduite (3'UTR, UnTranslated Region)** du gène de la PTHrP caractérise son profil d'expression. L'ARNm de la PTHrP a une demi-vie courte, entre 30 min et 2h. Or cette région 3' non traduite de l'ARNm contient des motifs riches en nucléotides adénine et uridine « AUUUA », qui permettent une dégradation rapide de l'ARNm afin de limiter la réponse après l'initiation de la transcription. La partie 3'UTR de l'ARNm de la PTHrP contient 5 motifs AUUUA et correspond donc à la classe 2 caractéristique des cytokines (Tourriere et al., 2002). De plus, des séquences TTTTGTA, présentes dans de nombreux gènes à réponse précoce, ont été identifiées à l'extrémité 3' des exons 7 et 9 (Gillespie and Martin, 1994). La présence des motifs riches en AU non seulement permet la dégradation de l'ARNm de la PTHrP, mais aussi l'interaction avec des protéines stabilisatrices. Cette interaction se fait grâce à la reconnaissance des séquences AUUUA par les membres de la famille ELAV (*Embryonic Lethal Abnormal Vision*) à l'image de la protéine HuR (ou ELAV1). Des études de notre laboratoire ont mis en évidence le rôle de HuR dans la stabilisation de l'ARNm de la PTHrP, et donc l'augmentation de sa demi-vie, dans les cellules cancéreuses rénales, avec un effet majoritaire sur la forme 141, la forme la plus exprimée dans ce cancer (Danilin et al., 2009).

La demi-vie des différents isoformes de la PTHrP est d'ailleurs différente dans un même type cellulaire : ainsi, par exemple dans des cellules cancéreuses squameuses HARA, elle est de 90 min pour la PTHrP 141, de 120 min pour la PTHrP 139 et de 4h pour la PTHrP 173. Elle est par

1. L'essentiel.... sur le gène de la PTHrP

- *Le gène de la PTHrP est composé de 9 exons chez l'homme et de 5 exons chez le rat et la souris*
- *L'exon 6 et l'exon 4 codent pour la majorité de la protéine chez l'homme et la souris, respectivement*
- *Trois promoteurs P1, P2 et P3 sont responsables d'une transcription constitutive, P2 contient des domaines reconnus par NFκB et smads suggérant une transcription inductible*
- *Des domaines riches en AU dans la partie 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm confèrent une demi-vie courte et des caractéristiques de gène à réponse rapide et immédiate à la PTHrP*
- *La région 3'UTR est reconnue par des protéines stabilisatrices comme HuR qui augmentent la demi-vie du transcrit de la PTHrP*

ailleurs spécifique pour chaque type cellulaire : ainsi, sur d'autres cellules de carcinome squameux, les $\frac{1}{2}$ vies sont respectivement de 45 min pour la PTHrP 141 et de 90 min pour la PTHrP 139. Enfin, l'augmentation de la stabilité des ARNm peut être sélective pour un isoforme : il en est ainsi du TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor- β 1*) qui augmente exclusivement la stabilité de l'ARNm de la PTHrP(1-141) dans le carcinome squameux (Sellers et al., 2004).

La régulation de l'expression du gène de la PTHrP est ainsi multifactorielle, et met en jeu des régulations à la fois à l'extrémité 5' *via* les 3 promoteurs, et à l'extrémité 3' en stabilisant les transcrits. Il en est ainsi de l'EGF (*Epithelial Growth Factor*) et du TGF- β 1 qui augmentent la transcription de la PTHrP et stabilisent aussi ses ARNm mettant en jeu la partie 3'UTR (Heath et al., 1995; Werkmeister et al., 1998).

La PTHrP, une famille nombreuse

Trois isoformes, les PTHrP(1-139), PTHrP(1-141) et PTHrP(1-173)

La traduction des différents ARNm de la PTHrP génère chez l'homme trois isoformes qui, après clivage de la séquence signal « prépro » de 36 acides aminés, conduisent aux PTHrP(1-139), PTHrP(1-141) et PTHrP(1-173) différentes par leur partie C-terminale plus ou moins longue (**Figure 1.3**).

Après le clivage de la séquence « pré » lors du cheminement intracellulaire, la séquence « pro », qui contient un motif peptidique de 5-15 acides aminés nommé peptide signal (SP, *signal peptide*), permet le clivage de la chaîne peptidique néoformée au niveau du réticulum endoplasmique rugueux et la guide vers les voies de sécrétion. Les trois peptides peuvent subir par la suite une protéolyse pour donner naissance aux divers fragments de la PTHrP que je vais décrire dans les prochains paragraphes (Philbrick et al., 1996) (**Figure 1.3**).

La PTHrP(1-36)

L'arginine qui se trouve en position 37 de la partie N-terminale de la PTHrP permet son clivage par une famille d'enzymes, les pro-hormones convertases monobasiques. Ce clivage conduit à la libération d'un fragment mature de 36 acides aminés, la PTHrP(1-36). Elle se caractérise par une homologie de séquence dans ses treize premiers acides aminés avec la PTH et est donc capable d'activer le même récepteur que la PTH, le récepteur PTH/PTHrP ou R-PTH1 (Everhart-Caye et al., 1996). Les deux séquences divergent après le 13^{ème} acide aminé, bien que les acides aminés (14-34) semblent avoir une structure tridimensionnelle comparable permettant la fixation de la PTHrP et de la PTH au même récepteur, avec une affinité similaire. La PTHrP(1-36) est généralement utilisée dans les études pharmacologiques puisqu'elle reproduit les effets de la PTHrP(1-139) sur le R-PTH1. Je l'ai utilisée durant ma thèse sur les cellules mésangiales, pour reproduire les effets auto/paracrine de la PTHrP *via* l'activation du R-PTH1. Je référerai également à cette approche en parlant de PTHrP exogène.

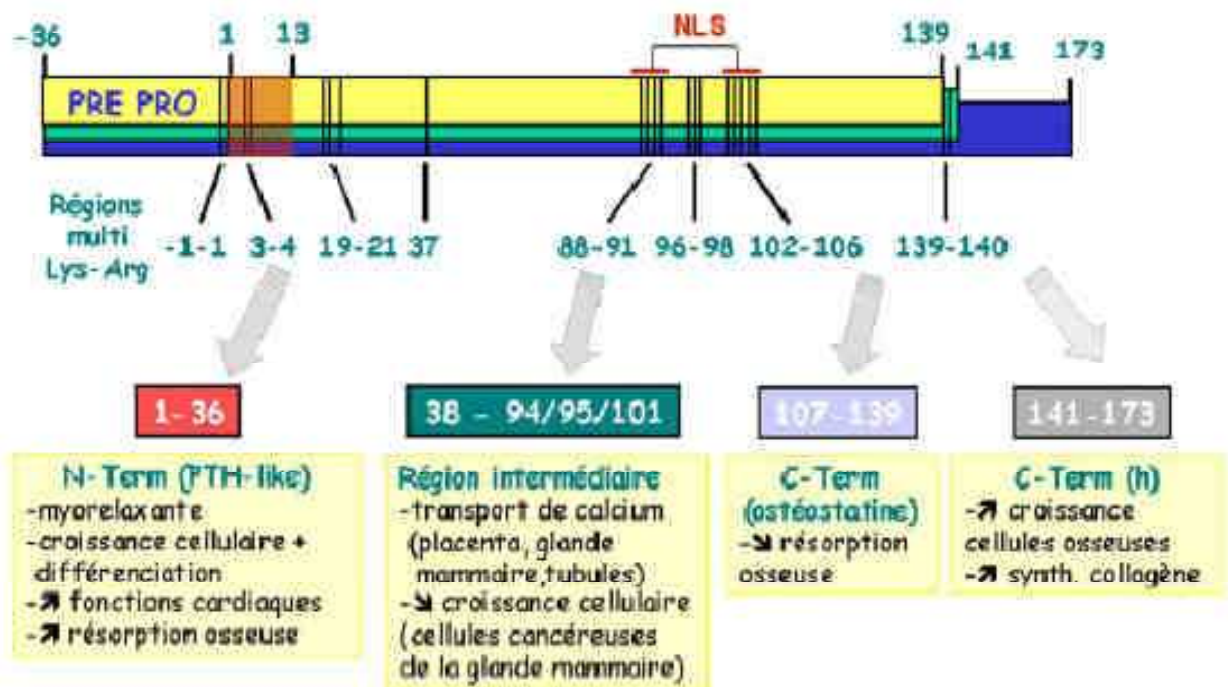


Figure 1.3 : Représentation schématique des trois isoformes initiales de la PTHrP issues de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager. Les modifications post-traductionnelles génèrent les formes matures de sécrétion N-terminale, intermédiaire et C-terminale de la PTHrP, par endoprotéolyse par la furine convertase au niveau des sites multi-basiques Lysine-Arginine: après clivage du peptide signal (région -36 à -8) et de la séquence pro (-8 à -1), cinq produits de sécrétion matures sont possibles : la PTHrP(1-36), les fragments intermédiaires (38-94), (38-95) ou (38-101) et un fragment C-terminal (107-139). Il existe chez l'homme un fragment (141-173) supplémentaire. Les principales fonctions physiologiques connues de ces formes matures sont précisées. NLS signifie séquence de localisation nucléaire. D'après Clemens TL et al., 2001.

Les fragments intermédiaires : PTHrP(38-94), (38-95) et (38-101)

La région intermédiaire de la PTHrP, qui s'étend des acides aminés 35 à 111, ne ressemble à aucune autre protéine connue. Cette région est extrêmement conservée phylogénétiquement (Philbrick et al., 1996). La région intermédiaire (87-106) correspond à un site de clivage potentiel pour les pro-hormones convertases (**Figure 1.3**). Un fragment intermédiaire a été identifié comme une forme mature de la PTHrP. Il débute au niveau du 38^{ème} acide aminé (une alanine), a un poids moléculaire d'environ 7000 Da et possède de nombreux sites de clivages multibasiques pour les pro-hormones convertases (Philbrick et al., 1996; Soifer et al., 1992). La région C-terminale de ce fragment présente trois formes différentes, d'où trois formes pour la PTHrP intermédiaire : les PTHrP(38-94), (38-95) et peut-être (38-101) (Wu et al., 1996b). Ces différents fragments peuvent être retrouvés en quantité importante dans la circulation sanguine des patients souffrant de l'HHM (Burtis et al., 1994). Par ailleurs, il a été postulé que la PTHrP intermédiaire soit sécrétée de manière constitutive dans toutes les cellules, et de manière régulée dans les cellules endocrines (**Figure 1.4**). Il en est ainsi, par exemple, dans les cellules β pancréatiques où la PTHrP intermédiaire se trouve dans les vésicules de sécrétion, côte à côte avec l'insuline (Plawner et al., 1995). La PTHrP(38-94) joue un rôle prépondérant dans l'établissement du gradient calcique materno-fœtal (Care et al., 1990), un effet qu'elle ne partage ni avec la PTH ni avec la PTHrP(1-36). La PTHrP(38-94) a également été étudiée dans des lignées issues de cellules β pancréatiques (RIN 1046-38), de carcinomes squameux humains (YCC-SQ-1) ou de cellules musculaires vasculaires (A10) où elle augmente les concentrations de calcium cytosolique (Wu et al., 1996b). Enfin, la PTHrP(38-94) induit un ralentissement de la croissance tumorale, *in vitro* et *in vivo*, sur une lignée de cellules du cancer du sein ; son action pourrait alors être celle d'un facteur de transcription, puisqu'elle a été retrouvée dans le noyau au contact de l'ADN (Luparello, 2010). **La PTHrP intracrine** : La région intermédiaire de la PTHrP comporte deux régions multibasiques, entre les acides aminés 88 et 91, puis 102 et 106 (Henderson et al., 1995). Ces séquences sont structurellement proches des séquences de localisation nucléaire (NLS) retrouvées dans certaines protéines rétrovirales ou le FGF (*Fibroblast Growth Factor*). Cette région intermédiaire joue ainsi un rôle dans le trafic intracellulaire de la PTHrP, en particulier son transport vers le noyau au travers des pores nucléaires (Massfelder et al., 1997).

▪ **Comment la PTHrP peut-elle gagner le noyau ?** : Cette question mérite d'être posée puisque la PTHrP est une protéine qui est normalement sécrétée, de part la présence d'une séquence prépro. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer ce détournement de trafic, avec parfois des preuves fonctionnelles expliquant la régulation de la translocation nucléaire de la PTHrP.

- Le premier mécanisme postule une sécrétion de la PTHrP suivie par son endocytose. Cette endocytose peut être dépendante ou non du récepteur R-PTH1. Dans le premier cas, la liaison PTHrP/R-PTH1 conduit à l'internalisation du complexe et à la libération de la PTHrP dans le cytosol, ce qui permettrait son transfert vers le noyau. Ceci a été observé dans une lignée cellulaire murine de sarcome ostéogénique, où l'ajout de PTHrP(1-108) taguée au milieu de culture des cellules a été suivie d'une localisation nucléaire de la protéine, translocation qui a été empêchée par un excès de PTHrP non taguée. Dans ce travail, les auteurs prouvent également le rôle de l'importine β /RAN-GTP dans le transfert nucléaire de la PTHrP (Lam et al., 1999). Il est intéressant de noter que le R-PTH1 contient lui-même un domaine NLS et qu'il est capable de migrer vers le noyau (Patterson et al., 2007). Cependant, la même translocation nucléaire a été observée sur des cellules n'exprimant pas le R-PTH1, en ajoutant de la PTHrP(1-141) biotinylée au milieu de culture ; la translocation était

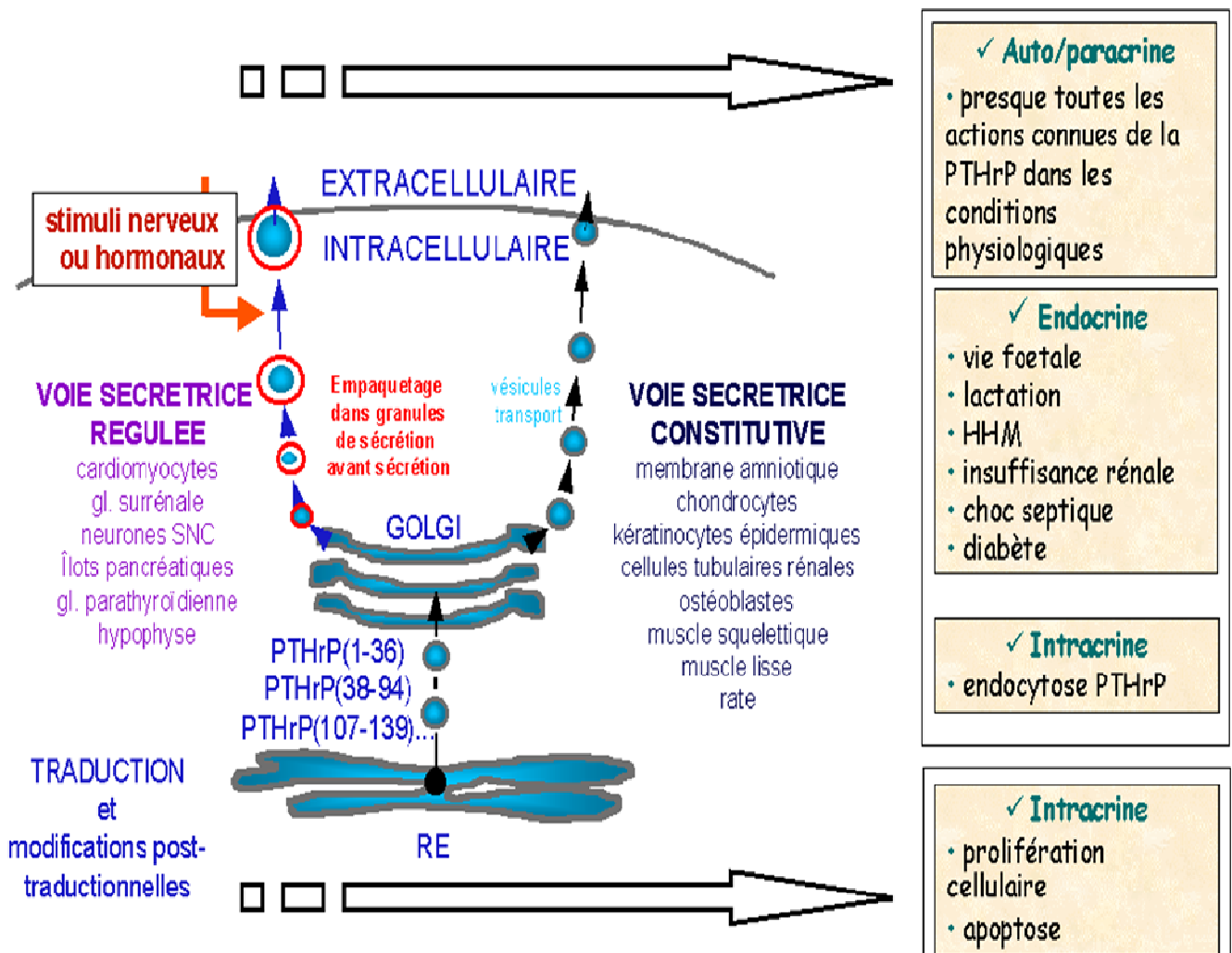


Figure 1.4 : Représentation des voies de sécrétion de la PTHrP et de ses actions autocrines/paracrines, endocrine et intracrine. La PTHrP nouvellement synthétisée subit de multiples modifications post-traductionnelles qui conduisent à la formation des fragments N-terminal (1-36), intermédiaires, et C-terminal. La sécrétion de ces fragments est régulée dans les cellules neuroendocrines alors qu'elle est constitutive dans le reste des cellules. La PTHrP peut être transférée également dans le noyau où elle agit par voie intracrine sans être sécrétée. La PTHrP est détectée dans la circulation dans des cas précis illustrés dans cette figure; en dehors de ces conditions, elle est exprimée localement (indétectable dans la circulation).

également abrogée par un excès d'un fragment synthétique, la PTHrP(74-113). Ceci a conduit à suggérer qu'un récepteur autre que le R-PTH1 puisse participer à l'entrée de la PTHrP(1-141) dans le cytoplasme (Aarts et al., 1999b). On ignore toujours comment la PTHrP et/ou son récepteur peuvent quitter l'endosome.

- Un second mécanisme a été proposé avec une transcription alternative du gène de la PTHrP. Dans ce cas, la transcription ne serait pas initiée par le codon habituel chez les mammifères, AUG codant pour une méthionine, mais un autre codon (Nguyen et al., 2001). La transcription commencerait dans l'un des quatre codons CUG présents dans la partie peptide signal, et conduirait à la synthèse d'une protéine mature ne comportant qu'une partie tronquée de son domaine prépro. Elle échapperait au passage dans le réticulum endoplasmique, et gagnerait le noyau. La PTHrP est un substrat du système d'ubiquitination protéolytique, ce qui n'est pas habituel pour une protéine sécrétée (Meerovitch et al., 1997). Lorsqu'elle est présente dans le cytosol, elle échapperait à la protéolyse en interagissant avec une forme du récepteur R-PTH1 issue d'épissage alternatif et se trouvant préférentiellement dans le cytoplasme. Cette forme de R-PTH1, dépourvue de son signal peptide, a été clonée et se trouve distinctement dans le rein et les ovaires du rat (Joun et al., 1997).
- La PTHrP est aussi capable de sortir du noyau, comme elle y est entrée, au travers des pores d'import/export se servant des protéines CRM1/RAN-GTP (Lam et al., 2001). Une fonction de la PTHrP comme « navette » pour le transport des l'ARNm nouvellement synthétisés entre le noyau et le cytoplasme a été suggérée (Aarts et al., 1999a).
- Finalement, la localisation de la PTHrP dans le noyau est variable. Elle a été observée dans les nucléoles, et dans les domaines de synthèse des ARN ribosomiaux dans les chondrocytes où une fonction liée au cycle cellulaire a été suggérée (Aarts et al., 2001; Henderson et al., 1995). Dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), la localisation nucléaire de la PTHrP était diffuse (Massfelder et al., 1997).

La PTHrP(107-139)

La PTHrP(107-139) est une autre forme de sécrétion mature libérée par les pro-hormones convertases (Fenton et al., 1991). Egalement appelé ostéostatine, la PTHrP(107-139) inhibe la résorption osseuse, en inhibant l'activité des ostéoclastes et en stimulant celle des ostéoblastes (Fenton et al., 1991; Seitz et al., 1995). Sur ces derniers, elle est aussi capable d'induire la libération de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Esbrit et al., 2000). L'effet de la PTHrP(107-139) ne passe pas par une activation du R-PTH1 (Valin et al., 2001), mais du récepteur-2 du VEGF (Alonso et al., 2008). Des souris transgéniques portant une délétion de ce fragment C-terminal montrent son importance dans le développement foetal (Strewler, 2000).

La PTHrP(141-173)

Ce fragment C-terminal, qualifié d'« extrême », est spécifique à l'homme (Mangin et al., 1990a; Philbrick et al., 1996). Il a été dosé dans de nombreuses conditions par des tests radio-immunologiques : le lait maternel, le sang du cordon ombilical, le milieu de culture des kératinocytes, ou encore les carcinomes squameux et rénaux (Burtis et al., 1992). Son rôle cependant reste inconnu.

En résumé, il apparaît donc qu'au moins six formes matures de sécrétion sont potentiellement produites par les pro-hormones convertases à partir de la PTHrP native (**Figures 1.3 et 1.4**). Toutes ces formes matures sont synthétisées par les tumeurs liées à l'HHM, mais seules sont retrouvées de façon majeure dans la circulation les PTHrP(37-94) et (109-138), avec respectivement un facteur 9 et 3 par rapport à la PTHrP(1-74) (Burtis et al., 1994). Si la PTHrP(37-94) semble avoir un effet bénéfique en limitant la croissance tumorale (Luparello et al., 2001), la PTHrP(109-138) aurait plutôt un effet délétère en favorisant la néoangiogénèse au niveau de la tumeur, *via* le VEGF (De Miguel et al., 1999; Esbrit et al., 2000).

Ces formes de sécrétions matures peuvent également être retrouvées dans certaines situations physiologiques ou physiopathologiques :

- Par exemple, le fragment N-terminal est sécrété au niveau de la glande mammaire lors de l'allaitement (Anai et al., 1999; Grill et al., 1992; Lippuner et al., 1996), ou de manière systémique lors du choc endotoxémique (Funk et al., 1996).

- D'un autre côté, la PTHrP(109-138) s'accumule au cours de l'insuffisance rénale chronique, en corrélation avec l'importance de l'altération de la fonction rénale, mais sans rapport avec la calcémie qui reste dans les normes. Cette accumulation du fragment C-terminal de la PTHrP résulte à priori d'un défaut d'élimination rénale puisqu'elle diminue chez les patients sous dialyse péritonéale ambulatoire chronique (Orloff et al., 1993).

Et des modifications post-traductionnelles...

Comme pour beaucoup d'autres facteurs, la chaîne protéique de la PTHrP peut être modifiée après sa synthèse. Si la PTHrP humaine ne contient aucun site de N-glycosylation, elle peut en revanche être O-glycosylée sur les nombreux résidus sérine, thréonine et proline. C'est ainsi que les kératinocytes peuvent synthétiser une PTHrP fortement glycosylée avec un poids moléculaire passant de 10 à 18 kDa (Wu et al., 1991), et que les cellules endothéliales vasculaires sécrètent une PTHrP avec un poids moléculaire proche de 50 kDa (Schluter et al., 2000).

2. L'essentiel... sur la PTHrP et ses fragments protéiques

- Une famille de peptides de 139, 141 et 173 aa chez l'homme, mais seulement 139 aa chez la souris
- La PTHrP n'est circulante que dans l'HHM, pendant l'allaitement et dans la circulation mère-fœtus où elle régule le gradient calcique
- La PTHrP(1-36) est nécessaire et suffisante pour activer le R-PTH1, récepteur commun avec la PTH
- Les PTHrP intermédiaires, 38-94/95, 38-67 et 38-101 interagiraient avec un ou plusieurs récepteurs inconnus ; leur sécrétion est régulée dans les cellules endocrines MAIS est constitutive dans les autres cellules
- La PTHrP comprend deux domaines de localisation nucléaire (NLS) entre les aa 88-91 et 102-108, permettant sa translocation vers le noyau et/ou les nucléoles par de multiples mécanismes
- La PTHrP(107-139) ou ostéostatine favorise la formation de l'os, à l'opposé des effets de la PTHrP(1-36)
- La plupart des effets de la PTHrP sont locaux, liés à des actions auto/paracrines ou encore intracrines

Le R-PTH1 et la signalisation autocrine/paracrine

La plupart des effets physiologiques documentés de la PTHrP passent par l'activation de son récepteur membranaire le R-PTH1. Comme cela a déjà été évoqué, un épissage alternatif conduit à la transcription de quatre ARNm du R-PTH1, l'un d'entre eux (la forme III) se trouvant préférentiellement dans le cytoplasme. En effet, ce variant ne comporte pas de peptide signal et n'est donc pas dirigé vers la membrane cellulaire. *L'expression du gène du R-PTH1 est régulée par trois promoteurs* P1, P2 et P3 ; le promoteur P2 a une activité constitutive et ubiquitaire, c'est lui aussi qui est actif pendant la vie fœtale ; le promoteur P1 est spécifique du rein, mais a une activité faible chez l'homme où le promoteur P3 a l'activité rénale la plus importante. Chez la souris, il y a seulement deux promoteurs, P1 et P2, avec le promoteur P1 sélectif pour le rein et très actif (Bettoun et al., 1998). La différence d'activité de ces promoteurs suggère une régulation particulière par certains stimuli, en fonction des organes/tissus alors que la capacité du R-PTH1 à PTHrP reste la même (Bettoun et al., 1997).

Activation du R-PTH1 et voies signalétiques

La présence des trois premiers acides aminés de la PTHrP(1-36) est primordiale pour l'activation du R-PTH1. Leur absence, comme dans la PTH(3-34) ou la PTHrP(3-36), conduit à une activité antagoniste de ces deux peptides. Le R-PTH1 est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G (classe IIb). L'activation de ce récepteur de manière autocrine/paracrine met en jeu différentes voies de signalisation selon le type cellulaire.

- **La voie de l'AC/AMPC** est dominante dans les cellules musculaires lisses, et elle conduit, *via* l'activation de la sous-unité α de la protéine Gs, à une augmentation de la synthèse d'AMPc et à l'activation de la protéine kinase A (PKA)(**Figure 1.5**)(Ishikawa et al., 1994; Jiang et al., 1995). D'autres sous-unités de la protéine G comme Gq α , peuvent aussi être activées et mettent alors en jeu **la voie de PLC β /PKC**. Les deux voies peuvent être activées dans la même cellule, ce qui est le cas des cellules épithéliales tubulaires(Bringhurst et al., 1993)(**Figure 1.5**). L'activation de **la voie PI3-K/Akt/NF κ B** a aussi été décrite suite à la stimulation du R-PTH1 dans les cellules tumorales rénales (Agouni et al., 2007; Sourbier et al., 2006).

- De manière intéressante, le R-PTH1, par sa partie C-terminale intracellulaire, peut établir **des liaisons protéine-protéine**. Le R-PTH1 contient en effet dans son extrémité intracellulaire un motif (ETVM) qui peut être reconnu par le domaine PDZ2 de **NHERF1** ou **NHERF2** (*Sodium/Hydrogen Exchanger Regulatory Factor*)(**Figure 1.6**). Quatre types de NHERF ont été identifiés à ce jour (NHERF1, NHERF2, NHERF3 et NHERF4). Parmi ceux-ci, NHERF1 et NHERF2 sont connus pour interagir avec le R-PTH1, mais leur distribution au niveau du rein n'est pas la même. En effet, NHERF1 est présent dans les cellules épithéliales du tubule proximal, où il constitue une protéine adaptatrice entre le R-PTH1 et le cotransporteur Na-Pi (Npt2a) et l'échangeur Na⁺/H⁺ (NHE3). La délétion de NHERF1 conduit à une dérégulation de la distribution membranaire du Npt2a qui n'est plus exprimé sur le pôle apical de la cellule, et à la fuite de phosphates dans l'urine (Shenolikar et al.,

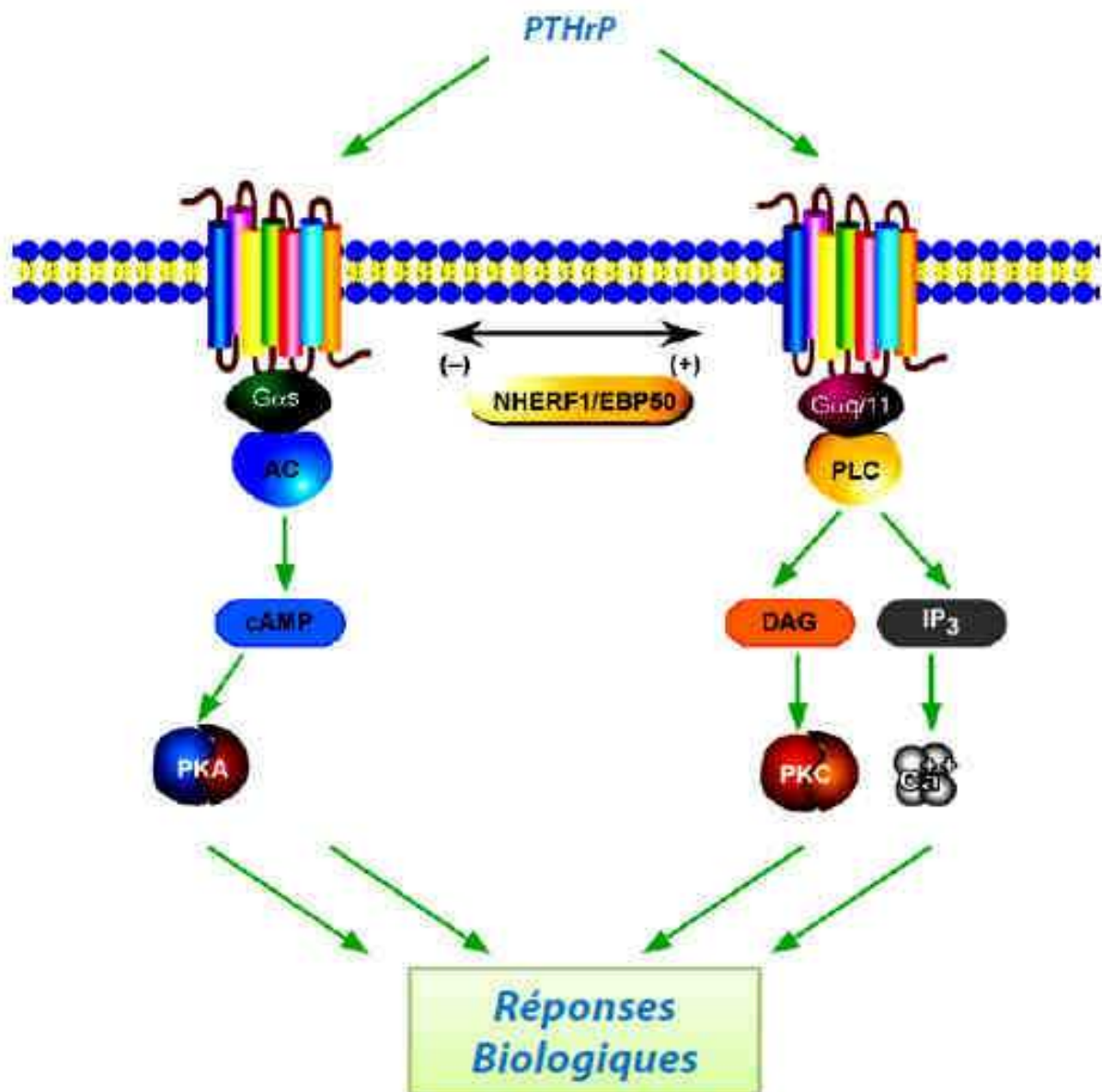


Figure 1.5 : Voies de signalisation classiques activées par la PTHrP sur le R-PTH1.

Selon le type cellulaire, le R-PTH1 est préférentiellement couplé à la voie Adénylate Cyclase/ Protéine Kinase A (AC/PKA) ou à la voie Phospholipase C/ Protéine Kinase C (PLC/PKC). L'activation de la voie AC/PKA passe par le recrutement au niveau du R-PTH1 d'une protéine G α_s qui active l'AC et conduit à la synthèse de l'AMPc. Celui-ci se lie aux sous-unités régulatrices de la PKA, entraînant la libération des sous-unités effectrices et la phosphorylation des protéines cibles. La voie PLC/PKC est activée par le recrutement de la protéine G α_q ; celle-ci active la PLC qui clive le phosphatidyl-inositol-biphosphate (PIP₂) en 1,4,5-inositol-triphosphate (IP₃) qui augmente le calcium intracellulaire, et en diacylglycérol (DAG) permettant l'activation de la PKC par le calcium. La présence ou l'absence des protéines adaptatrices NHERF1/2 conduit à la bifurcation de la voie signalétique de la voie AMPc/PKA vers la voie PLC/PKC. *Adapté de Swarthout et al, 2002*

2004). NHERF2 est par contre exprimé dans le glomérule, notamment au niveau des podocytes où il interagit avec la podocalyxin et l'actine du cytosquelette, maintenant l'architecture de la barrière de filtration glomérulaire (Takeda, 2003). NHERF1 et NHERF2 contiennent deux domaines PDZ (PDZ1 et PDZ2) permettant leur interaction avec le R-PTH1 avec une affinité égale pour les deux domaines PDZ (Sun and Mierke, 2005). NHERF1 et NHERF2 sont souvent présents sous forme d'oligomères (Weinman et al., 2006). L'interaction R-PTH1 avec NHERF1 ou 2 conduit à l'activation de la **PLCβ1** (Mahon et al., 2002) et à la bifurcation de la voie classique de signalisation (AMPC) vers la voie PKCβ/IP3 (**Figure 1.5**). De surcroît, NHERF1 et 2 se lie à l'ezrin/actine du cytosquelette et cette interaction conduit à la rétention du R-PTH1 plus longtemps à la membrane, retardant son internalisation sans affecter son recyclage vers la membrane (Wang et al., 2007a). L'isoforme de NHERF intervient également dans le recrutement des sous-types des protéines G par le R-PTH1 : ainsi, dans les cellules HEK-293, NHERF2 permet l'interaction de R-PTH1 avec les protéines Gq et Gi, alors que NHERF1 ne tolère que la protéine Gq (Wang et al., 2010a). La famille NHERF, par ses interactions avec d'autres protéines, comme celles du cytosquelette, ou d'autres récepteurs couplés aux protéines G (Weinman et al., 2006), se retrouve impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires. Récemment, il a été démontré que NHERF1 interagissait directement avec Akt pour inhiber la voie de signalisation de ERK1/2 (*extracellular signal-regulated protein kinase 1/2*) induite par la PTH(1-34) dans les cellules CHO (Wang et al., 2008a).

- L'activation du récepteur à la PTHrP pourrait également stimuler d'**autres voies de signalisation** en aval à PKA ou PKC. Ceci est le cas dans les cellules progénitrices des adipocytes où la PTHrP induit la phosphorylation des ERK1/2 de **la voie MAPK** via l'activation de PKA. La voie ERK1/2 empêche la différenciation des adipocytes et augmente leur prolifération. Un autre exemple est l'effet de la PTHrP sur les cellules progénitrices mésenchymateuses de la moelle osseuse qui présentent le R-PTH1 à leur surface. La PTHrP(1-36) conduit à la stimulation de la protéine Gαq qui va à son tour activer la voie PLCβ/PKC et déclencher le cascade des MAPK *via* Ras/Raf/MEK/ERK aboutissant finalement à la prolifération de ces cellules (Miao et al., 2001). Enfin, les deux voies PKA et PKC convergent pour activer la voie MAPK dans les ostéoblastes, en partie directement par la PKA et PKC *via* la cascade Ras/Raf/MEK, et en partie par l'activation de la kinase soluble Src qui interagirait avec la voie PI3-K, elle-même stimulée par les sous-unités βγ de la protéine G (Carpio et al., 2001).

- D'autres protéines peuvent venir se lier à l'extrémité C-terminale du récepteur R-PTH1 (Figure 1.6). La calmoduline est une de ces protéines qui se lie aussi à d'autres membres des RCPGs de classe II (Mahon and Shimada, 2005). Elle pourrait moduler négativement l'interaction entre le R-PTH1 et la PLC (Mahon and Shimada, 2005), et ses antagonistes inhibent la production de monoxyde d'azote en réponse à la PTHrP dans les cultures primaires de cellules endothéliales (Kalinowski et al., 2001).

- La **protéine 14-3-3** peut également interagir avec une séquence de la queue cytoplasmique du R-PTH1 sans affecter sa translocation nucléaire (**Figure 1.6**). Il a été suggéré que cette interaction contribue à la dimérisation du R-PTH1, 14-3-3 étant une protéine qui participe à la localisation cytoplasmique/nucléaire de ses partenaires et peut entrer en jeu dans le cycle cellulaire ou l'apoptose (Tazawa et al., 2003).

- L'interaction entre le R-PTH1 et la protéine **ezrin** a été étudiée sur une lignée de cellules épithéliales tubulaires, les LLC-PK1, où elle favorise la localisation luminale du récepteur (Mahon,

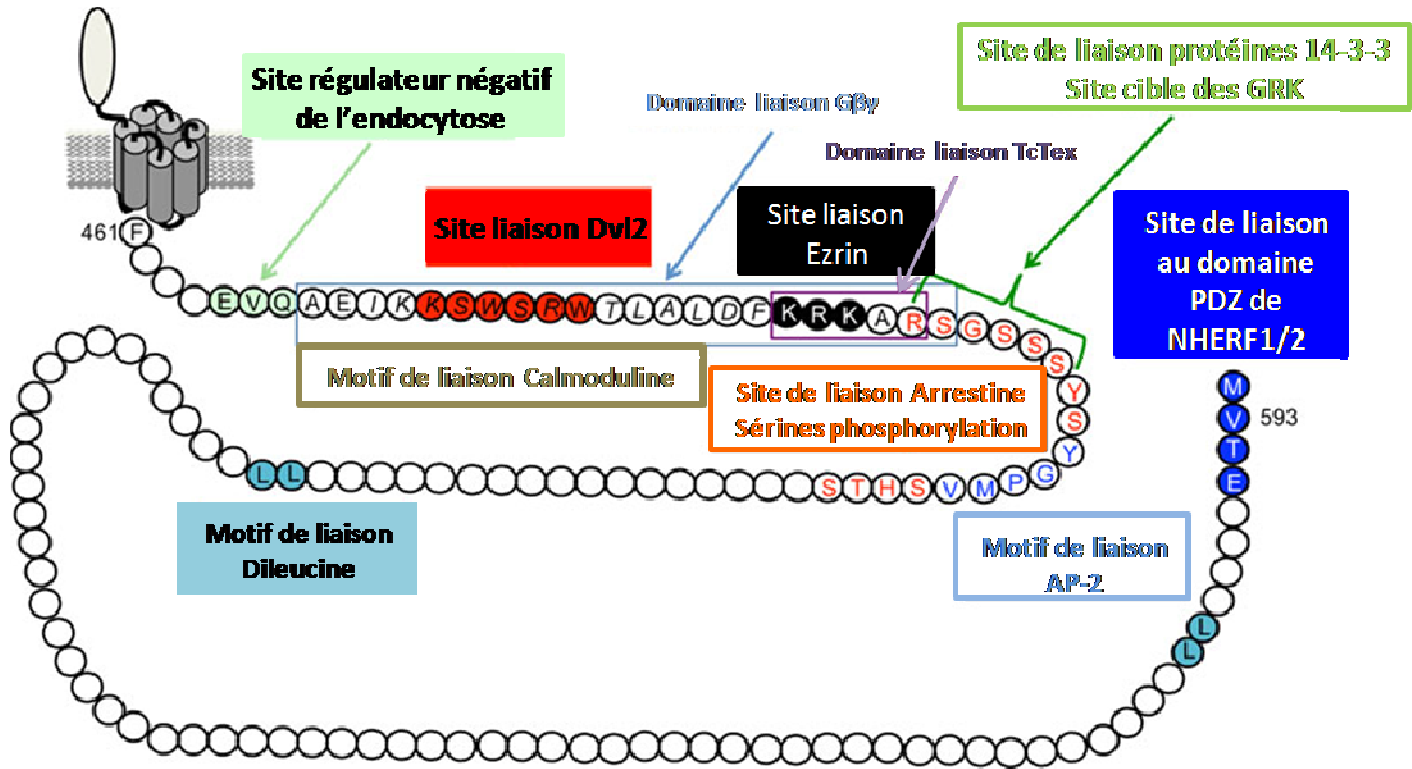


Figure 1.6 : Structure de l'extrémité cytoplasmique du R-PTH1 humain montrant les domaines d'interaction avec les protéines adaptatrices.

Les sites d'interactions sont indiqués dans la couleur de leur partenaire. Les motifs de liaison di-leucine, TcTex et à l'adaptine-2 (AP-2) entrent en jeu dans l'endocytose du récepteur. Les autres domaines et sites cibles sont explicités dans le texte. GRK: *G-protein coupled receptor kinase*. D'après Vilardaga et al., 2011

2009). Ezrin intervient en effet dans la localisation intracellulaire de son partenaire en modulant l'activité de NHERF1.

▪ Une activation de la voie β -caténine a aussi été décrite. En effet, le R-PTH1 peut interagir directement avec la protéine **Dvl2** (*Dishevelled 2*) et activer cette voie comme cela a été décrit dans les cellules murines d'ostéosarcome (Romero et al., 2010). Alternativement, le R-PTH1 activé par la PTH semble pouvoir recruter le corécepteur **LRP6** des récepteurs frizzled conduisant à une phosphorylation de LRP6 et à la stabilisation de la β -caténine, qui pourra migrer alors vers le noyau et exercer son activité. Ceci est une manière indirecte par laquelle la PTHrP active la voie Wnt dans les ostéoblastes *in vitro* et *in vivo* et contribue à la formation osseuse (Wan et al., 2008).

Particularités du R-PTH1

▪ **Un récepteur transféré vers le noyau.** Le R-PTH1 a été retrouvé dans le noyau de cellules ovariennes et hépatiques chez le rat (Watson et al., 2000). Comme pour d'autres récepteurs de la classe II, il possède une séquence NLS qui lui permet une interaction avec les importines α/β et son ciblage vers le noyau (Pickard et al., 2007), mais son rôle y reste inconnu.

▪ **Internalisation, désensibilisation du R-PTH1.** L'interaction du R-PTH1 avec l'antagoniste PTH(7-34) conduit à son internalisation, indépendamment de l'arrestine β , mais seulement dans les cellules n'exprimant pas NHERF1. Le R-PTH1 est également désensibilisé *via* les protéines GRK (*G protein-coupled receptor kinases*, GRK2,3 et 5) sans la phosphorylation de sa partie C-terminale intracellulaire, mais par une interaction protéine-protéine avec ces enzymes (Dicker et al., 1999).

▪ **Durée d'activation variable du R-PTH1 :** Le R-PTH1, comme d'autres récepteurs de la famille IIb, est caractérisé par un niveau d'activation dépendant de sa

3. L'essentiel....

sur le R-PTH1 et la voie auto/paracrine

- *Le récepteur R-PTH1 est un récepteur membranaire couplé aux protéines G de la famille IIB*
- *L'expression du R-PTH1 est ubiquitaire, sous le contrôle de trois promoteurs P1, P2 et P3. Le rein et l'os sont les organes où le R-PTH1 est le plus abondant*
- *Le R-PTH1 peut aussi être présent dans le cytosol et le noyau, mais son rôle n'y est pas connu actuellement*
- *Le R-PTH1 est activé par les parties N-terminales de la PTH et la PTHrP, avec la même affinité, mais les deux ligands se différencient par la durée de l'activation*
- *L'activation du R-PTH1 stimule les voies AMPc/PKA, et PLC/PKC. Ce sont des voies dites « classiques »*
- *Le R-PTH1 active d'autres voies de signalisation notamment PI3-K/Akt/NF κ B, la voie Wnt/ β -Caténine (indirectement) et MAPK (MEK/ERK)*
- *Le R-PTH1 interagit avec de nombreuses protéines adaptatrices comme NHERF1/2, la protéine 14-3-3 et l'ezrin régulant sa distribution dans la cellule et sa signalisation*
- *Les voies de signalisation couplées au R-PTH1 sont dépendantes du type cellulaire*

conformation spatiotemporelle, déterminée par le fait qu'il soit complexé préalablement aux protéines G ou non. Ainsi, le R-PTH1 a une plus grande affinité pour le ligand lorsqu'il n'est pas complexé avec les protéines G. Dans cet état, appelé R⁰, la liaison R-PTH1/ligand peut durer plus longtemps. Ceci a été surtout décrit pour la PTH qui, en interagissant avec le R-PTH1-R⁰, peut rester dans une phase de latence avant d'induire un signal, ou peut conduire à l'induction de signaux répétitifs et prolongés. La PTHrP a par contre moins d'affinité pour la forme R⁰. Cette situation dépend également de l'abondance des protéines G dans une cellule donnée. Lorsqu'elles sont abondantes, la PTHrP se détache plus rapidement et complètement du R-PTH1 et son signal dure moins longtemps. Lorsqu'elles sont moins exprimées, la liaison de la PTHrP est plus prolongée avec le R-PTH1, mais cependant moins que pour la PTH. En revanche, la PTH est capable de produire un état d'activation du R-PTH1 qui se prolonge un moment après le détachement du ligand (Vilardaga et al., 2010).

- **Les mutations du R-PTH1** peuvent conduire soit à une activation constitutive, soit à une inactivation permanente du R-PTH1. Dans le 1^{er} cas, il en résulte une chondrodysplasie de Jansen, caractérisée par un nanisme avec des membres courts. Le R-PTH1 est constitutivement activé, même en l'absence des ligands PTH ou PTHrP (Juppner, 1995). Dans le 2^{ème} cas, la perte d'activité du R-PTH1 conduit à une chondrodysplasie type Blomstrand, une maladie létale caractérisée par une maturation précoce et rapide des chondrocytes (Zhang et al., 1998).

Les autres récepteur de la PTH ou PTHrP

- **Le récepteur PTH2 ou R-PTH2** présente une grande homologie (37 à 42%) avec d'autres récepteurs de la classe II des RCPGs. De plus, sa séquence en acides aminés a 52 % d'homologie avec le R-PTH1 humain, avec 33 résidus identiques sur les 67 premiers résidus de la partie N-terminale extracellulaire des deux récepteurs (Dobolyi et al., 2010; Usdin, 2000; Usdin et al., 2002). Le profil pharmacologique du R-PTH2 humain est cependant fondamentalement différent de celui du R-PTH1. Le R-PTH1 est en effet activé par la PTH et par un peptide tubéro-infundibulaire de 39 résidus, appelé TIP39, mais non par la PTHrP (Dobolyi et al., 2010; Hoare and Usdin, 2001).
- **Le récepteur PTH3 ou R-PTH3** est un récepteur identifié chez le poisson zèbre, qui exprime également tous les autres membres du système des hormones parathyroïdiennes (Guerreiro et al., 2007; Rubin and Juppner, 1999). Ce récepteur présente une plus grande homologie avec le R-PTH1 humain qu'avec le R-PTH2. Il a une plus grande affinité pour la PTHrP(1-36) humaine et la PTHrP présente chez les poissons que pour la PTH(1-34) (Rubin and Juppner, 1999). A ce jour, aucun homologue de ce récepteur n'a été décrit chez les mammifères.

Les souris transgéniques pour la PTHrP ou le R-PTH1

Les travaux réalisés chez la souris en invalidant le gène (souris *knock-out*) de la PTHrP ou du R-PTH1 ont mis en exergue son rôle essentiel dans le développement osseux. En effet, les souris R-PTH1^{-/-} ou PTHrP^{-/-} meurent *in utéro* ou dès la naissance par ossification prématurée de leur cage thoracique. Sur le plan histologique, les plaques de croissance osseuse présentent une ossification endochondrale et péri-chondrale prématurée, ainsi qu'un nombre diminué de chondrocytes

prolifératifs (Amizuka et al., 1994; Juppner, 2000; Karaplis et al., 1994). Ces résultats démontrent que la PTHrP joue un rôle central dans le développement du cartilage, où elle accroît la prolifération des cellules cartilagineuses mais s'oppose à leur progression vers un stade différencié (Strewler, 2000). Ainsi, les souris PTHrP^{-/-}, chez lesquelles la PTHrP est en outre réexprimée spécifiquement dans les chondrocytes sous le contrôle du promoteur du collagène II, survivent et naissent avec un squelette cartilagineux (Weir et al., 1996). Les souris *knock-out* pour la PTHrP présentent également d'autres malformations et retards de croissance : au niveau du poumon, la PTHrP est indispensable à la formation des canaux alvéolaires, à la différenciation des cellules alvéolaires et à la production de surfactant (Rubin et al., 2004) ; la PTHrP N-terminale est aussi nécessaire au développement de la glande mammaire et des dents (Wysolmerski et al., 1998). Les souris R-PTH1^{-/-} montrent le même profil de létalité associé à un défaut de la croissance et de la minéralisation des os. Le croisement de ces animaux avec des souris exprimant un récepteur constitutivement activé au niveau des chondrocytes permet de rétablir une ossification correcte mais ces souris meurent toujours *in utero* (Soegiarto et al., 2001). Il est ainsi apparu que le système PTHrP/R-PTH1 est nécessaire au développement de divers organes, et que la létalité *in utero* était due à des malformations cardiaques et à la mort brutale et massive des cardiomyocytes (Qian et al., 2003).

Les délétions ciblées de certaines formes matures de la PTHrP peuvent conduire à des phénotypes similaires. Les souris délétées en PTHrP intermédiaire et en PTHrP C-terminale montrent que la PTHrP active par la voie intracrine est fondamentale dans l'organogenèse et le développement embryonnaire (Miao et al., 2008; Toribio et al., 2010). En effet, bien que le poids à la naissance ne soit pas différent entre les souris transgéniques et la souche sauvage excluant la perte du rôle anabolique de la PTHrP, les anomalies observées sont nombreuses : retard de croissance, vieillissement prématuré, ostéogenèse imparfaite, hématopoïèse altérée, anomalies touchant tous les organes, et mort prématurée après 3 semaines de vie. L'ensemble de ces phénomènes est lié à une altération de la prolifération cellulaire et une majoration de l'apoptose, avec une accélération de la sénescence cellulaire (Miao et al., 2008; Toribio et al., 2010).

Expression et effets physiologiques du système PTHrP/R-PTH1 dans le rein

Dans les conditions physiologiques, la PTHrP a été détectée en termes d'ARNm et protéine (immunohistochimie) dans le cortex rénal (Largo et al., 1999), le glomérule (podocytes) et les vaisseaux rénaux (muscle lisse et endothélium) mais pas au niveau des cellules mésangiales ni dans l'endothélium glomérulaire (Massfelder et al., 1996; Soifer et al., 1993; Yang et al., 1997). L'expression du R-PTH1 dans le rein a déjà été mentionnée plus haut. Ce récepteur est présent dans les artérioles intra-rénales (Nickols et al., 1990), dans le glomérule et les tubules proximaux et distaux (Yang et al., 1997). Il n'a pas été trouvé dans les cellules mésangiales dans les premières études, probablement pour des raisons méthodologiques (Bosch et al., 1999; Lee et al., 1996). L'ARNm du R-PTH1 présent dans les podocytes, les cellules endothéliales glomérulaires et les vaisseaux rénaux est exclusivement transcrit sous le contrôle du promoteur P1 spécifique au rein (Lee et al., 1996), ce qui suggère une régulation du gène du R-PTH1 rénal indépendante d'autres organes (Amizuka et al., 1997).

Le système glomérulo-vasculaire joue un rôle clé dans le contrôle homéostatique des volumes liquidiens de l'organisme. La formation du filtrat glomérulaire est contrôlée par la modification des résistances vasculaires pré- et post-glomérulaires. Notre laboratoire a largement contribué à démontrer que la PTHrP induit une vasodilatation rénale et majore le débit sanguin rénal (Massfelder et al., 1996; Musso et al., 1989; Saussine et al., 1993). Elle stimule aussi la sécrétion de rénine (Saussine et al., 1993). Ses effets vasodilatateurs prédominent sur les artéioles préglomérulaires et elle augmente le débit de filtration glomérulaire (Endlich et al., 1995; Massfelder et al., 1996). Sur le rein hydronéphrotique qui permet de visualiser les vaisseaux intra-rénaux, l'administration de PTH(1-34) ou de PTHrP(1-36) induisait une dilatation plus importante de l'artère inter-lobulaire et des artéioles préglomérulaires proximales. Les artéioles post-glomérulaires efférentes n'étaient en revanche pas affectées, car la vasodilatation y était masquée par une vasoconstriction *via* l'angiotensine II (AngII) formée après stimulation de la libération de rénine par la PTHrP (Endlich et al., 1995). Les effets vasculaires de la PTHrP ont également été étudiés chez l'homme. L'injection de doses suffisamment faibles pour ne pas affecter la pression artérielle systémique, augmentait de 40% le flux plasmatique rénal (Wolzt et al., 1997). Dans certaines de ces études, l'administration d'antagonistes dérivés de la partie N-terminale de la PTHrP a contré les effets de la PTHrP, ce qui témoigne de l'activation du R-PTH1. La vasodilatation rénale met en jeu la stimulation de l'AMPc (Musso et al., 1989), et la libération de NO d'origine non-endothéliale (Massfelder et al., 1996). Plus récemment, une étude de notre laboratoire a confirmé le rôle de la PTHrP endogène dans la régulation de l'hémodynamique rénale en condition physiologique (Raison et al., 2011). Pour ce faire, des souris transgéniques porteuses d'un système CreLoxP ont été utilisées, permettant une délétion conditionnelle du gène de la PTHrP, de manière spécifique dans les cellules exprimant l' α actine des muscles lisses, et de manière contrôlée, c'est-à-dire inductible par un traitement au tamoxifène.

La PTHrP en activant son récepteur R-PTH1 au niveau des tubules rénaux proximaux et distaux participe à l'homéostasie du phospho-calcique. En effet, l'activation du R-PTH1 présent dans le tubule proximal, conduit ici à l'internalisation du cotransporteur Na/Pi et inhibe l'absorption des phosphates (Murer et al., 2003; Traebert et al., 2000) alors que l'activation du R-PTH1 au niveau du tubule distal mène à la réabsorption du calcium.

Les interactions de la PTHrP avec les cytokines et chimiokines

Dans les conditions physiologiques, la PTHrP est une protéine d'expression constitutive et pratiquement ubiquitaire. En dehors des situations mentionnées dans l'essentiel 2, elle peut aussi être surexprimée dans diverses conditions pathologiques, notamment en réponse à des stimuli inflammatoires. Elle n'est alors généralement pas détectable dans la circulation, mais agit localement par la voie autocrine/paracrine ou encore intracrine. L'expression de la PTHrP est induite rapidement et de manière transitoire en réponse à divers stimuli, ce qui témoigne de son caractère de cytokine à réponse rapide et immédiate « *early-immediate gene response* ». Les réponses diffèrent souvent d'un type cellulaire à un autre.

Les cytokines inflammatoires induisent l'expression de la PTHrP

L'interleukine-1 β (IL-1 β) majore l'expression protéique de la PTHrP de 8 fois dans les **cellules endothéliales** issues de la veine ombilicale. Cette majoration était inhibée en présence de l'antagoniste endogène du récepteur de IL-1 (IL-1Ra). Le mécanisme d'induction de la PTHrP par IL-1 β impliquait la transcription de son ARNm et la synthèse *de novo* de la protéine. L'induction de la PTHrP était inhibée par l'actinomycine D et le cycloheximide, de puissants inhibiteurs de la transcription et de la traduction, respectivement. L'exposition des mêmes cellules à IL-4, une cytokine ayant habituellement des propriétés anti-inflammatoires, ou l'activation de PKC, conduisait également à une majoration de l'expression de la PTHrP, un effet qui persistait au-delà de 12h (Ferguson et al., 1995). Dans les **synoviocytes**, la PTHrP était inducible par IL-1 β et le TNF- α , un effet qui était abrogé par la dexaméthasone ou l'IFN γ . De plus, la PTHrP(1-34) stimulait elle-même l'expression d'IL-6 *via* l'activation du R-PTH1 qui est présent sur ces cellules (Funk et al., 1998). Dans les **lymphocytes T responsables de la leucémie** chez l'adulte, IL-2 est un facteur de croissance essentiel. Dans ces cellules, IL-2 majorait l'expression de la PTHrP, alors qu'aucune réponse n'était observée lorsque les cellules étaient exposées à IL-1, IL-3, IL-4 ou IL-6. Les auteurs suggèrent que IL-2, *via* la sécrétion de PTHrP, soit impliquée dans l'HMM associée à cette pathologie (Ikeda et al., 1993b).

Les cytokines inflammatoires interfèrent avec les effets de la PTHrP

Dans une lignée d'**ostéoblastes** où la PTHrP stimulait l'adénylate cyclase et l'accumulation d'AMPc, un traitement par IL-1 β ou le TNF- α diminuait les réponses à la PTHrP. Cet effet était dû à une baisse de l'expression du R-PTH1 induite par les cytokines (Katz et al., 1992). Dans une autre **étude in vivo**, la PTHrP, IL-1 α ou les deux facteurs ensemble ont été perfusés à des rats par minipompe, par voie sous-cutanée ou iv. Les rats recevant la PTHrP avaient une calcémie et une phosphaturie élevées, avec une réduction de la formation osseuse. L'administration concomitante de IL-1 α et de PTHrP minorait les effets de la PTHrP sur la calcémie et la phosphaturie, mais sans modifier les effets de la PTHrP sur la formation osseuse. Ces données suggèrent que IL-1 α interfère directement avec les actions rénales de la PTHrP (Torrington et al., 1992). Les auteurs n'ont pas regardé dans ce travail si l'expression du R-PTH1 était altérée. Dans une **étude sur des souris nude**, les effets de IL-4 ont été évalués sur l'HMM. IL-4 s'est opposé à l'augmentation de la calcémie induite par une perfusion de PTHrP, ou par la greffe de cellules cancéreuses. Le mécanisme de cet effet de IL-4 n'a pas été exploré, mais il est probable qu'il mette en jeu les effets de IL-4 sur l'os où cette cytokine s'oppose à la résorption osseuse (Nagasaki et al., 1991).

La PTHrP dans l'endotoxémie et le choc septique

Le **modèle d'endotoxémie** induite chez la souris par les lipopolysaccharides (LPS) est un autre exemple de la régulation complexe de la PTHrP dans les conditions inflammatoires. Dans ce modèle, une faible dose de LPS conduisait à une surexpression de la PTHrP dans la rate, en terme d'ARNm et de protéine, avec un pic à 2 h et un retour au niveau basal après 4 h. Cette surexpression de PTHrP était par contre absente chez des souris résistantes au LPS et n'exprimant que de faibles quantités de TNF- α et d'IL-1 β , suggérant que ces cytokines soient importantes (Funk et al., 1993). La PTHrP s'accumulait dans la rate, plus précisément dans le stroma et les CML mais non dans la pulpe blanche riche en lymphocytes. Cet effet s'accompagnait d'une diminution de l'ARNm du R-PTH1

(Funk et al., 1995). L'administration de TNF- α ou d'IL-1 β aux souris reproduisait la majoration de la PTHrP splénique. En revanche, seule la neutralisation du TNF- α mais non celle de IL-1 β abaissait (d'environ 70%) la surexpression de PTHrP induite par le LPS, mettant ainsi clairement en évidence le rôle prépondérant du TNF- α (Funk et al., 1993). Dans ce même modèle, les essais entrepris pour contrer la surexpression de la PTHrP par l'utilisation de facteurs anti-inflammatoires (IL-4 et IFN α) n'ont eu aucun succès et majoraient même davantage l'expression de la PTHrP. Un traitement par l'IFN γ , qui agit habituellement en synergie avec le TNF- α , a paradoxalement inhibé l'expression de la PTHrP. Ce travail montre que la PTHrP semble interagir avec un réseau de cytokines capable d'exercer des effets contradictoires en modulant probablement d'autres facteurs non explorés dans ces études (Funk et al., 1994). Dans les études mentionnées ci-dessus, la surexpression de la PTHrP dans la rate ne s'accompagnait pas de taux détectables de PTHrP dans la circulation, témoignant du caractère local de la régulation de cette protéine.

En revanche, l'injection d'une dose sublétales de LPS conduisait à un **choc septique** et à une réponse généralisée avec hypotension et une insuffisance multi-organe. L'expression de la PTHrP (ARNm) était alors majorée dans tous les organes vitaux (cœur < poumon < rate < foie < rein). L'induction de cette expression débutait une ½ heure après l'injection, avec un pic à 1-2 h pour le cœur, le poumon et la rate, à 2 h dans le rein, et entre 3-4 h dans le foie. De surcroît, une augmentation de la PTHrP plasmatisque (reconnue par un anticorps contre la partie N-terminale) était observée, dès la 45^{ème} min après l'injection de LPS. Dans cette étude, le traitement des souris par un anticorps neutralisant la PTHrP(1-34) majorait la survie des animaux pendant les premières 48 h, mais cet effet s'estompait au-delà de ce temps (Funk et al., 1996). Ces données montrent que la surexpression de PTHrP dans le choc septique aggrave l'état des animaux. On peut penser qu'une part de cet effet délétère tient à l'hypotension induite par la PTHrP circulante, contribuant à la défaillance multi-organe, mais ceci reste à être démontré. Dans le même modèle de choc septique induit par le LPS, l'expression hépatique de facteurs de la réponse inflammatoire aiguë, amyloïde sérique A (ASA) et triglycérides, était augmentée. L'administration de PTHrP à des souris augmentait de même l'expression de l'ASA et la synthèse de triglycérides par les cellules hépatiques. Cette réponse était comparable à celle suscitée par le LPS pour l'ASA, mais était plus transitoire pour les triglycérides. Ces marqueurs de la phase aiguë de l'inflammation sont considérés comme protecteurs, puisqu'ils éliminent l'excès d'endotoxines au cours d'une infection (Funk et al., 1997).

La PTHrP, via NF κ B, induit l'expression de cytokines et chimiokines

De nombreuses cytokines sont des cibles et ont pour cible l'activation de NF κ B. Ce facteur de transcription semble être la clé de voûte dans les processus inflammatoires (Hayden and Ghosh, 2012). La PTHrP elle-même est capable d'induire l'expression de cytokines et de chimiokines (des cytokines chimiotactiques) et d'activer la voie de NF κ B. Pour la nomenclature des chimiokines et de leurs récepteurs, il sera utile de se référer aux tableaux (**Tableau 1.5 et 1.6**)

Dans **les ostéoblastes**, l'exposition des cellules à la PTHrP(1-36) ou à la PTHrP(107-139) a conduit à l'activation de NF κ B, à la translocation nucléaire de la sous-unité p65, à son interaction avec l'ADN et à l'augmentation de l'expression d'IL-6. Ces effets étaient dus à l'activation de la PKA par la PTHrP(1-36), et à l'élévation des taux calciques intracellulaires par la PTHrP(107-139) (Guillen et al., 2002). Dans **les CMLV en culture**, la PTHrP(1-36) était capable d'activer NF κ B par une voie PKA- mais pas

PKC-dépendante. Elle majorait l'expression d'une chimiokine, le MCP-1/CCL2 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*). Cet effet semblait contribuer à l'atteinte vasculaire athérosclérotique en favorisant l'infiltration des macrophages (Martin-Ventura et al., 2003). Dans un **modèle d'obstruction de l'uretère chez la souris**, l'activation de NFκB était majorée davantage chez des souris transgéniques surexprimant la PTHrP dans le tubule proximal que chez des souris contrôles (Ramila et al., 2008). Ces souris exprimaient également des taux de chimiokines plus élevés, comme MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 (*Regulated Upon Activation, Normal T cells Expressed and Secreted*), CCR2 (le récepteur de MCP-1 présent sur les monocytes) et IL-6. Enfin, l'infiltration des macrophages et des lymphocytes T était plus marquée chez les souris transgéniques. Sur **un lignée de cellules tubulaires corticales** de souris, la PTHrP activait NFκB et les voies ERK1/2, et majorait l'expression de MCP-1, RANTES, CCR2 et IL-6 (Ramila et al., 2008). Enfin, **dans le thymus**, la PTHrP est exprimée ainsi que son récepteur dans les cellules épithéliales et dendritiques, et une expression du R-PTH1 a quelquefois été observée dans les noyaux des cellules épithéliales. Lorsque ces cellules étaient exposées à la PTHrP, elles surexprimaient IL-6, une cytokine impliquée dans la différenciation et la maturation des thymocytes (Gessi et al., 2005).

La PTHrP et les chimiokines dans la résorption osseuse

La PTHrP induit l'expression de certaines chimiokines non seulement pour la migration des cellules immunitaires vers les sites de l'inflammation, mais également pour induire une réponse homéostatique conduisant, par exemple, à la résorption osseuse. Il en est ainsi pour la **formation d'ostéoclastes** durant l'éruption dentaire (Wise, 1998; Wise et al., 2000). En effet, la PTHrP *via* l'activation de son récepteur stimulait l'expression de MCP-1/CCL2 et de CSF-1 (*Colony-Stimulating Factor-1*) et initiait la migration des cellules mononucléaires vers le follicule dentaire, où ces cellules fusionnaient et formaient des ostéoclastes impliqués dans la résorption osseuse (Wise et al., 2000). Dans les ostéoblastes, la PTHrP induisait l'expression de GROα/CXCL1 qui, en activant son récepteur CXCR2 présent sur les ostéoclastes, les incitait à migrer et favorisait la résorption osseuse (Onan et al., 2009). Enfin dans un autre contexte, la PTHrP sécrétée par les cellules du cancer de la prostate induisait une surexpression du MCP-1 dans les ostéoblastes. Le MCP-1, à son tour, favorisait la maturation des précurseurs d'ostéoclastes et conduisait à la résorption osseuse observée dans le cancer de prostate métastatique (Li et al., 2009).

La PTHrP semble donc avoir sa place dans la toile sibylline des cytokines. Elle est capable de contribuer à une réponse inflammatoire, pro- ou anti-inflammatoire, de manière dépendant largement du contexte.

Effets de la PTHrP sur la prolifération cellulaire

La PTHrP est un facteur pléiotropique impliqué dans de nombreuses tâches dans l'organisme. Son rôle de facteur de croissance est connu de longue date (Burton et al., 1990). C'est dans ce domaine, mais aussi dans l'apoptose, que les effets de la PTHrP intracrine ont été les mieux analysés. Ces effets intracrines vont parfois de pair avec ses effets paracrines ou s'opposent à eux.

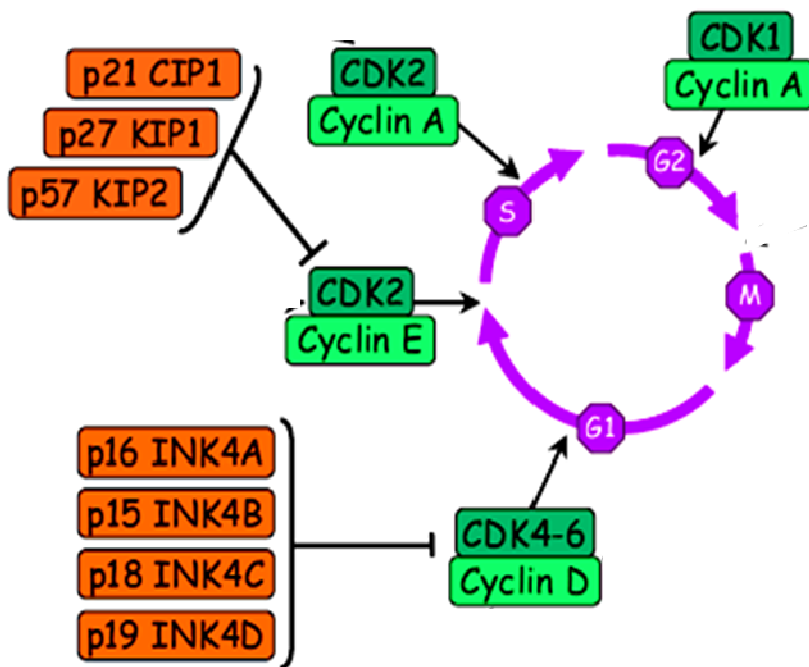
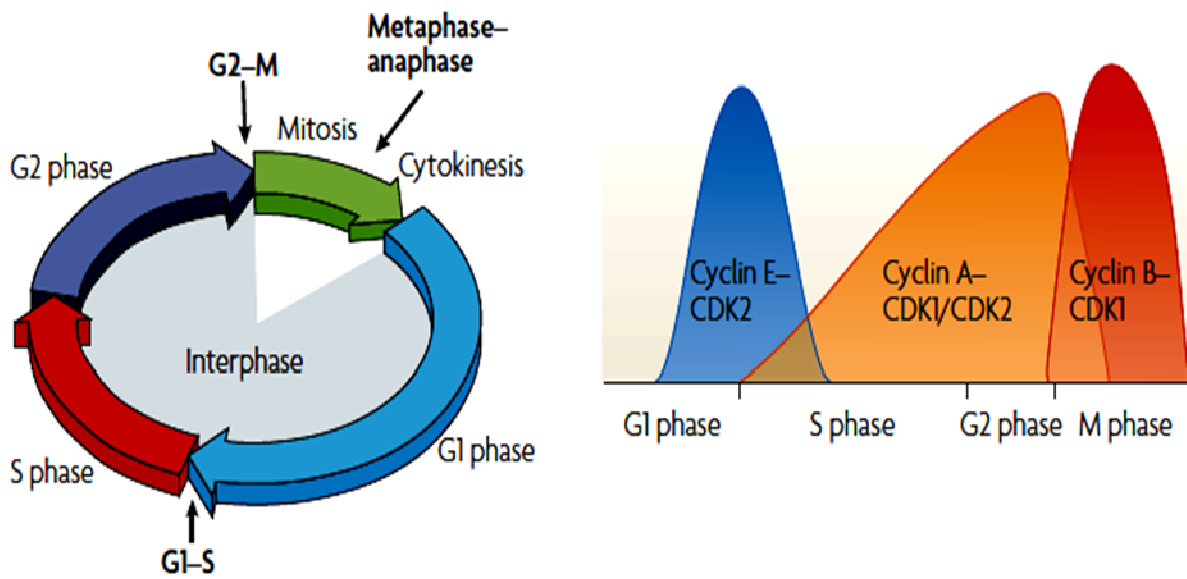


Figure 1.7. Représentation schématique du cycle cellulaire. Schéma du cycle avec les phases successives, G1, S, G2 et M. Régulation du cycle par les différents complexes cycline/CDK et leurs inhibiteurs. Importance de CDK4/6 et de la cycline D dans la phase G1, et de CDK2 avec la cycline E pour le passage en phase S. *Adapté de Nature Reviews Molecular Cell Biology 9, 910-916 (November 2008).*

Mais avant de détailler les effets de la PTHrP sur la prolifération des cellules, je rappellerai quelques notions essentielles sur le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire

Le cycle de division cellulaire comporte plusieurs étapes hautement régulées et synchronisées. Les protéines kinases, et en particulier les kinases cyclines dépendantes (CDK) et les protéases jouent un rôle prépondérant dans le déclenchement, le déroulement et le couplage de ces étapes. Le cycle cellulaire est généralement divisé en **quatre phases (Figure 1.7)**. L'entrée de la cellule en prolifération est marquée par le passage de la phase **G0** (quiescence) vers la phase **G1**. Il s'en suit une synthèse d'ADN (phase **S**), puis la cellule continue sa croissance durant la phase **G2**, avant de se dupliquer durant la phase **M**.

▪ **Les facteurs activateurs et inhibiteurs du cycle.** Le passage des cellules d'une phase à l'autre se fait grâce à un ensemble complexe de facteurs activateurs et inhibiteurs. La plupart de ces facteurs sont encore en cours d'étude, et tout n'est pas encore connu sur leurs interactions. Parmi eux, on trouve 3 classes de facteurs dont l'activité est essentielle pour la progression du cycle cellulaire :

- Les cyclines : il y en a 25 ; ce sont des unités régulatrices dépourvues par elles-mêmes d'activité enzymatique ; en interagissant avec les CDK, elles permettent leur activation. Elles sont spécifiques aux différentes phases du cycle : cycline D1, 2 et 3 (G0 → G1), cycline E1 et 2 (fin G1), cycline A (S), cycline B (M) ;

- Des protéines kinases cycline-dépendantes : il y en a 13 ; parmi celles-ci, les CDK1, 2, 3, et 4 ont un rôle dans la régulation du cycle cellulaire jusqu'à la mitose ; elles ne s'associent qu'avec certaines cyclines spécifiques : CDK4 et 6 (+ cycline D), CDK2 (+ cycline E et cycline A), Cdc2 (=CDK1) (+ cycline B) ;

- Des inhibiteurs du cycle cellulaire : ce sont des inhibiteurs des CDK ; les INK4 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}) inhibent les CDK4 et 6 ; la famille Cip/Kip (p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}) inhibe les CDK4 et 6, la CDK2 et la Cdc2.

▪ **Induction de la prolifération.** Le cycle cellulaire débute par le passage de la phase G0 (quiescence) vers la phase G1. Ceci est le résultat d'une signalisation extra et intracellulaire déclenchée par des facteurs mitogènes de diverses natures mettant en jeu des voies comme celles des MAPK et de PI3-K/Akt. Ces voies conduisent à l'activation de la transcription des gènes essentiels pour l'entrée en division, à l'image de la cycline D, des CDK et du facteur de transcription c-Myc. Ce dernier favorise, par ses interactions protéine-protéine et sa capacité transcriptionnelle, l'entrée en G1.

▪ **La progression de G1 en S.** Le début du cycle cellulaire nécessite la transcription d'un certain nombre de gènes, tels que ceux des cyclines D et E, p21^{CIP1}, p27^{KIP1} et des gènes sous le contrôle des facteurs de transcription de la famille E2F, comme la cycline E. Les cellules sont maintenues en G1 grâce aux protéines de la famille du rétinoblastome, pRb, p107 et p130 (« *pocket proteins* »). Ces suppresseurs de tumeurs bloquent le cycle cellulaire en s'associant avec E2F. Le complexe pRb/facteurs E2F, associé au co-facteur de transcription DP (*Dimerization Partner of E2F*), est inactif ; pRb, p107, p130 maintiennent donc la cellule en G1. Au cours de G1, les CDKs phosphorylent pRb, ce qui conduit à la dissociation du complexe pRb/E2F, et donc à la libération de facteurs E2F actifs. La

famille E2F régule l'expression de gènes impliqués dans *la transition G1/S*, mais aussi de gènes codant des protéines contrôlant la réplication (MCM, cdc6), et des enzymes nécessaires à la synthèse d'ADN. C'est pourquoi les inhibiteurs naturels de CDKs, des familles INK4 et CIP1/KIP, en maintenant pRb sous forme hypo-phosphorylée, donc liée à E2F, constituent des inhibiteurs puissants du cycle cellulaire. Les CDK sont régulées de manières différentes, par interaction avec leur partenaires les cyclines, par phosphorylation, par translocation nucléo-cytoplasmique et vice versa, ainsi que par des associations transitoires avec des inhibiteurs protéiques (**Figure 1.7**). Il en existe deux types, la famille INK4, dont les membres interfèrent avec la fixation des cyclines de type D sur la CDK, et la famille CIP/KIP, dont les membres se fixent sur les complexes CDK/cyclines et les inactivent (Coqueret, 2003). De façon surprenante, p21^{CIP1} et p27^{KIP1} se fixent sur CDK4 sans en inhiber l'activité kinase, ils sont en fait nécessaires pour l'assemblage du complexe CDK4/cycline D et sa translocation dans le noyau. Par contre ces deux protéines sont d'excellents inhibiteurs de CDK2/cycline E. L'apparition de p21^{CIP1} et p27^{KIP1} permet donc la formation des complexes CDK4/cyclines D, tout en retardant l'activation des complexes CDK2/cycline E. Enfin, CDK2/cycline E, en phosphorylant p27^{KIP1}, conduit à son ubiquitination par Skp1/Skp2, et à sa destruction par le protéasome (Bloom and Pagano, 2003). Cette élimination de p27^{KIP1} contribue à **l'entrée en phase S**. Durant cette phase, l'ADN est synthétisé, cette phase est hautement régulée afin de faire une copie identique de l'ADN mère.

- **La mitose** est la phase finale qui se caractérise essentiellement par les changements morphologiques. Elle comprend 5 étapes : la prophase correspond à la fin de la condensation des chromosomes et à la rupture de l'enveloppe nucléaire, la prométaphase est la période de formation du fuseau et du début d'alignement des chromosomes, la métaphase est la phase d'alignement des chromosomes dans le fuseau, à équidistance des pôles, l'anaphase voit la disjonction des chromosomes et la télophase est caractérisée par le mouvement des chromosomes vers les pôles, la disparition du fuseau, la décondensation des chromosomes et le début de la cytokinèse.

La PTHrP et la prolifération cellulaire

Ces effets ont été étudiés sur divers types cellulaires. Le **tableau 1.1** en donne un aperçu synthétique.

- **Cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).** Les effets de la PTHrP sur la prolifération des CMLV ont été évalués dans de multiples études. La PTHrP et son récepteur R-PTH1 sont exprimés dans ces cellules et l'activation de R-PTH1 conduit à l'accumulation d'AMPc. Dans les premiers travaux, une surexpression de la PTHrP a été rapportée dans des CMLV aortiques murines exposées au sérum. La PTHrP était sécrétée dans le milieu de culture. Le sérum induisait une prolifération des cellules, mais l'ajout de PTHrP(1-141) n'avait aucun effet sur ce paramètre (Hongo et al., 1991). Dans des CMLV proliférant en présence de sérum, l'expression de la PTHrP endogène (ARNm et protéine) était plus importante dans la phase finale de la division cellulaire, sans qu'un rôle précis ait pu y être attribué (Okano et al., 1995). Par la suite, les études ont montré que la PTH(1-34) comme la PTHrP(1-34) exogène diminuaient la prolifération des CMLV *via* l'activation du R-PTH1 (Ishikawa et al., 1998; Jiang et al., 1995; Massfelder et al., 1997). La transfection des CMLV avec la PTHrP(1-139) native (WT, *wild type*) augmentait leur prolifération, alors que l'exposition des cellules à différentes PTHrP, comportant toutes la partie N-terminale activant le R-PTH1, la diminuait (Ishikawa et al., 1998; Massfelder et al., 1997). De surcroît, la PTHrP(1-36) ou le dibutyryl-cAMP conduisaient à l'arrêt du

cycle cellulaire en phase G1, et s'opposait à l'activité de la cycline D1/CDK4 *via* l'augmentation de l'inhibiteur p27^{KIP1} et la baisse de la phosphorylation de pRb ; il n'y avait aucun effet sur la cycline E et CDK2 requises pour le passage G1/S (Stuart et al., 2000). L'exposition des CMLV aux parties intermédiaires de la PTHrP, avec un domaine N-terminal tronqué, ou bien à la PTHrP C-terminale, ne modifiait pas leur prolifération (Massfelder et al., 1997). L'effet mitogène observé lors de la surexpression de la PTHrP-WT était perdu lors de la transfection avec une PTHrP tronquée de l'un ou l'autre des domaines de localisation nucléaire NLS ; une transfection avec la PTHrP délétée de sa partie peptide signal, ne subissant plus de modifications post traductionnelles et ne pouvant plus être sécrétée, reproduisait l'effet mitogène de la PTHrP-WT (de Miguel et al., 2001; Fiaschi-Taesch et al., 2004). Ces résultats démontrent que l'effet mitogène de la PTHrP est lié à sa translocation nucléaire, et que l'activation du R-PTH1 conduit à un effet anti-mitogène. De plus, des aortes prélevées à la naissance sur des souris *knockout* pour la PTHrP présentaient une prolifération moindre de leurs CMLV (Massfelder et al., 1997). Par la suite, Nathalie Fiaschi-Taesch a pu démontrer que cet effet mitogène de la PTHrP par voie intracrine avait une pertinence physiopathologique. En effet, dans un modèle d'angioplastie de la carotide chez le rat, les CMLV prolifèrent et forment une néo-intima obstructive. La PTHrP était surexprimée dans ce modèle. La transfection de la carotide avec une PTHrP-ΔNLS (qui sera alors la forme majeure exprimée localement) inhibait complètement la formation de la néo-intima vasculaire (Fiaschi-Taesch et al., 2004). Ainsi, la PTHrP paracrine s'oppose à l'effet mitogénique de la PTHrP intracrine dans les CMLV. Pour ce faire, elle emploie les mêmes mécanismes mais en les modifiant en sens inverse. En effet, la PTHrP intracrine augmentait la phosphorylation de pRb et réduisait l'expression de p27^{KIP1} en accroissant sa dégradation par le protéasome. Ceci permettait le passage vers la phase S en augmentant l'activité kinase du complexe cycline E/CDK2 (Fiaschi-Taesch et al., 2006). La PTHrP favorisait la dégradation de p27^{KIP1} par la surexpression du facteur de transcription c-Myc et une augmentation de Skp2 (*S-phase Kinase associated protein-2*) ; la Skp-2 fait partie d'un ensemble de protéines qui reconnaissent p27^{KIP1} et la conduisent à la machinerie protéosomale pour sa dégradation (Sicari et al., 2012). C'est dans ces travaux sur les CMLV que les mécanismes intracellulaires mis en jeu par la PTHrP intracrine pour induire la prolifération ont été le mieux étudiés.

- Sur des **fibroblastes humain** mis en culture à partir de la peau, la PTHrP(1-40) exogène a majoré la synthèse de cAMP et a diminué la prolifération des cellules, témoignant d'un effet anti-mitogène par la voie autocrine (Maioli et al., 2002).
- Les effets de la PTHrP ont également été évalués sur la prolifération **des cellules épithéliales issues du tubule proximal**. La PTHrP exogène majorait la prolifération de ces cellules *via* le R-PTH1 et l'activation de PKC (Garcia-Ocana et al., 1995). Ce résultat est cohérent avec une autre étude sur une lignée de cellules épithéliales humaines dérivée du tubule proximal. Ces cellules ont été soumises *in vitro* à un stress mimant l'ischémie/reperfusion *in vivo*. Cela a été réalisé en incubant les cellules dans un milieu dépourvu de glucose et d'acides aminés et en présence d'antimycine A (un inhibiteur du transport d'électrons mitochondrial) pendant 2h, puis les cellules retournaient dans un milieu de culture normal. Dans ces conditions, les auteurs montraient une surexpression de la PTHrP qui persistait pendant 6h dans la phase de récupération, et qui s'accompagnait d'une prolifération des cellules. La prolifération était réduite par un anticorps neutralisant la PTHrP(1-36), conduisant les auteurs à suggérer que l'effet mitogène de la PTHrP endogène était probablement lié à une action paracrine (Garcia-Ocana et al., 1999). Dans un autre type de cellules épithéliales, des

Tableau 1.1 Effets de la PTHrP sur la prolifération des cellules

Cellules musculaires lisses vasculaires (A10, CMLV en culture primaire)	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>PTHrP exogène = anti-mitogénique</u> via l'activation du R-PTH1 et stabilisation de p27^{kip1} (Ishikawa et al., 1998; Jiang et al., 1995; Massfelder et al., 1997; Stuart et al., 2000) ▪ <u>PTHrP intracrine = mitogénique</u> PTHrP(108-139) indispensable par dégradation de p27^{kip1} par le proteasome (importance de skp2 et c-Myc), majorant l'activité de la cycline E/CDK2 et la phosphorylation de pRb (de Miguel et al., 2001; Fiaschi-Taesch et al., 2006; Fiaschi-Taesch et al., 2004; Massfelder et al., 1997; Sicari et al., 2012); 	
Fibroblastes : <u>PTHrP exogène = anti-mitogénique</u>	(Maioli et al., 2002)
Cellules épithéliales : <u>PTHrP = mitogénique</u>	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tubule proximal : par la voie autocrine/paracrine, via PKC (Garcia-Ocana et al., 1995) ▪ Cellules intestinales : par la voie intracrine (Ye et al., 2001) 	
Cellules mésangiales :	
PTHrP exogène = mitogénique	(Bosch et al., 1999; Soifer et al., 1993)
PTHrP exogène = hypertrophie	(Ortega et al., 2011)
Cellules β pancréatiques :	
<u>PTHrP exogène = mitogénique</u> par la surexpression du complexe cycline E/CDK2	(Guthalu Kondegowda et al., 2010)
Cellules cancéreuses	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cancer de la prostate (PC-3) : PTHrP exogène et intracrine = mitogénique ; vitD3 anti-mitogénique (Tovar Sepulveda and Falzon, 2002) ▪ Cancer du colon (LoVo) : PTHrP intracrine = mitogénique, PTHrP paracrine = anti-mitogénique (Bhatia et al., 2009) ▪ Cancer sein (MCF-7) : PTHrP intracrine = mitogénique, prédomine sur PTHrP paracrine = anti-mitogénique (Falzon and Du, 2000; Tovar Sepulveda et al., 2002) ▪ Cancer du sein (MDA-MB231) : PTHrP(38-94) = anti-mitogénique par voie intracrine ; interaction avec ADN (Luparello et al., 2001); (Luparello, 2010) (Hastings et al., 2001) ▪ Cancer poumon (BEN) PTHrP(1-34) anti-mitogénique 	

cellules intestinales de rat en culture primaire, la PTHrP exogène n'affectait pas la prolifération. Par des transfections stables de PTHrP-WT et de PTHrP- Δ NLS, les auteurs démontrent que la PTHrP est mitogène sur ces cellules par la voie intracrine (Ye et al., 2001a).

- Un effet mitogène de la PTHrP a également été décrit sur **les cellules β pancréatiques** où la PTHrP est normalement exprimée (Gaich et al., 1993). Elle fait l'objet d'études approfondies dans le contexte du diabète sucré (Clemens et al., 2001) et dans la pancréatite aiguë (Bhatia et al., 2012). L'expression du R-PTH1 a récemment été rapportée dans les cellules β pancréatiques humaines. Son activation par la PTHrP(1-36) induisait une prolifération importante des cellules par l'augmentation de l'expression du complexe cycline E/CDK2, sans modifier l'expression d'aucun autre acteur du cycle cellulaire (cyclines, CDKs ou inhibiteurs). La transfection des cellules avec la PTHrP- Δ SP, exclusivement active par voie intracrine, n'affectait pas la prolifération, confirmant que la PTHrP est mitogène sur les cellules β pancréatiques par la voie autocrine/paracrine. Le fait que seule la surexpression du complexe cycline E/CDK2 était suffisante pour la progression du cycle cellulaire a été vérifié en transfectant les cellules avec la cycline E. De plus, la surexpression de PTHrP-WT augmentait la sécrétion d'insuline sans modifier l'état de différenciation des cellules (Guthalu Kondegowda et al., 2010). Un traitement par la PTHrP exogène devrait donc être bénéfique chez les sujets diabétiques.

- La PTHrP est exprimée par **diverses cellules cancéreuses** où, sécrétée massivement dans la circulation, elle est responsable de l'HMM. Mais la PTHrP contribue aussi à la croissance et à la survie des cellules tumorales dans la plupart des cas. Dans une lignée dérivée du cancer de prostate (PC-3), la PTHrP induit la prolifération par les deux voies intracrine et auto/paracrine et les deux bras de la partie NLS étaient nécessaires pour induire l'effet maximal (Tovar Sepulveda and Falzon, 2002a). La prolifération des cellules a été abaissée par la vitamine D3 active (VitD3a) (*1,25 dihydroxy-vitamine D3, calcitriol*) qui réduisait l'expression de la PTHrP en réprimant ses promoteurs P1 et P3 et en abaissant la stabilité de son ARNm. La surexpression de la PTHrP (ARNm et protéine) induite par l'EGF (*Epidermal growth factor*) était de même abaissée par la VitD3a (Bhatia et al., 2011; Shen et al., 2007; Tovar Sepulveda and Falzon, 2002b). Sur des cellules du cancer du sein (MCF-7), la PTHrP endogène majorait la prolifération, un effet résultant d'un effet mitogène prédominant de la PTHrP par voie intracrine et d'un effet anti-mitogène plus faible par la voie auto/paracrine *via* le R-PTH1 (Falzon and Du, 2000; Tovar Sepulveda et al., 2002). Dans la lignée MDA-MB231 par contre, la PTHrP(38-94) exogène réduisait la prolifération des cellules *in vitro* et *in vivo* chez des souris *nude*, mais par un effet intracrine (Luparello et al., 2001). Cet effet, unique pour la PTHrP intermédiaire, était associé à sa translocation nucléaire et à sa liaison à l'ADN évoquant un rôle de facteur de transcription. La PTHrP(38-94) modifiait d'ailleurs l'expression de divers gènes impliqués dans la réponse au stress ou dans l'apoptose, mais non dans la régulation du cycle cellulaire (Luparello, 2010). Dans la lignée MCF-7 la PTHrP augmente la croissance tumorale par l'activation du R-PTH1 (Hoey et al., 2003). Dans une lignée du cancer du colon (LoVo), la PTHrP a été de même décrite comme pro-mitogène par la voie intracrine et anti-mitogène par la voie paracrine après transfection des cellules par la PTHrP-WT, PTHrP Δ NLS et PTHrP Δ SP (Bhatia et al., 2009b). Enfin, dans une lignée de cancer pulmonaire (BEN), la PTHrP(1-34) diminuait la prolifération, un effet confirmé *in vivo* chez la souris *nude* où un traitement des souris par un anticorps neutralisant la PTHrP augmentait la taille des tumeurs (Hastings et al., 2001).

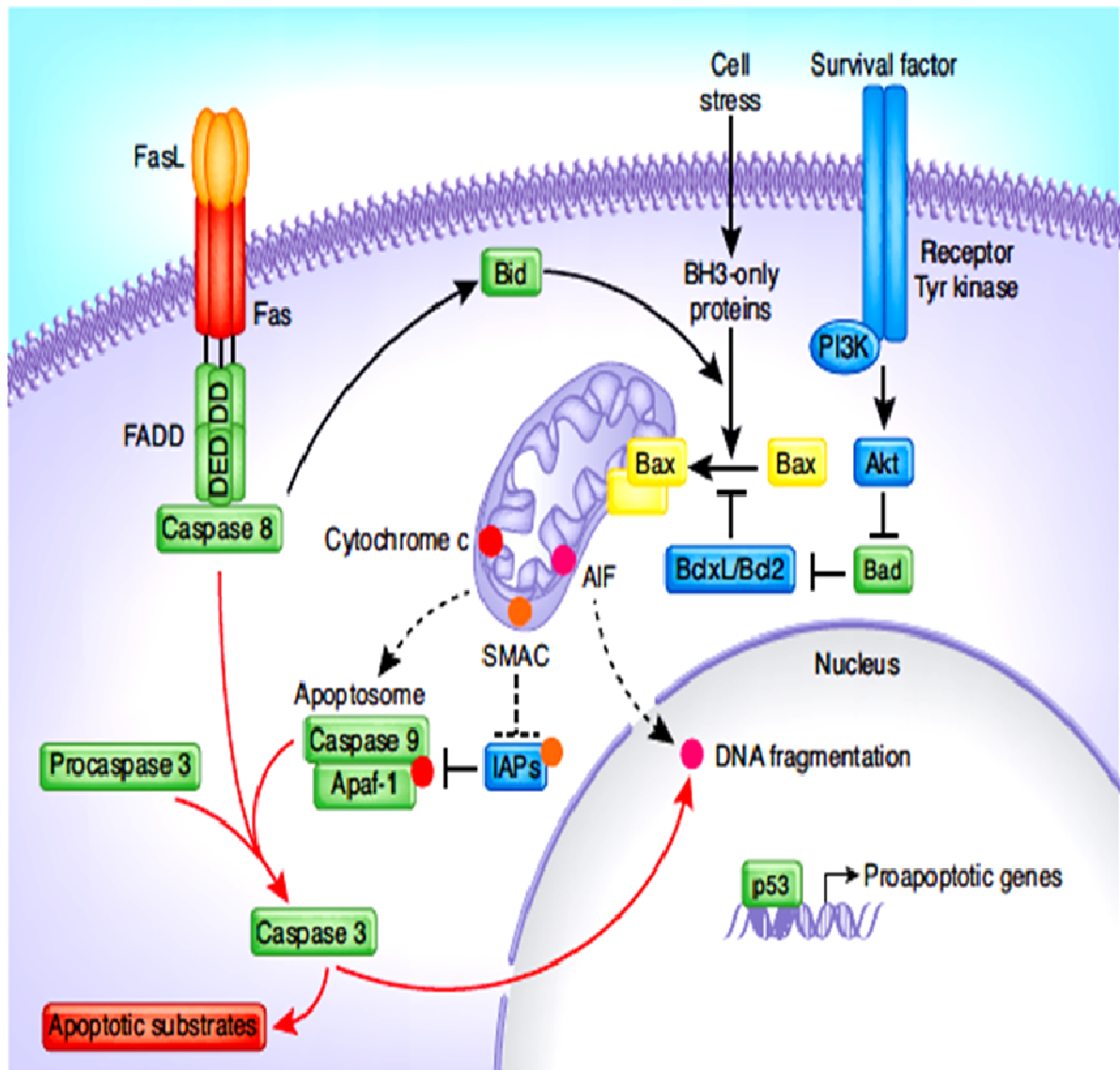


Figure 1.8 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans l'apoptose des cellules. L'apoptose est déclenchée par deux voies distinctes, la voie extrinsèque dont les acteurs principaux sont les récepteurs de la superfamille du TNF-RI (dont le FAS illustré ici) et la caspase-8, et la voie intrinsèque mitochondriale, enclenchée par un stress majeur ou un dommage de l'ADN irréparable, mettant en jeu la famille Bcl-2, le cytochrome c et la caspase -9. Les deux voies convergent vers l'activation de la caspase-3 exécutive. Les IAP (inhibiteurs de l'apoptose) s'opposent à la formation du complexe de caspase active; la voie PI3-K/Akt s'oppose également à l'apoptose par la phosphorylation et l'inactivation de Bad. Apaf-1 est une protéine adaptatrice impliquée dans la formation du complexe caspase active. *Adapté de Nature, 2000 Oct 12;407(6805):770-6.*

- De nombreuses études ont analysé les effets de la PTHrP sur les **chondrocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes** puisque la PTHrP est impliquée dans la formation et la résorption osseuse. Les résultats de la littérature cependant sont rarement concordants. Je n'aborderai donc pas ce point ici.
- Les effets de la PTHrP sur la prolifération des **cellules mésangiales** sera détaillé dans la seconde partie de cette introduction bibliographique.

Effets de la PTHrP sur la survie cellulaire

*Assassiner n'est pas seulement tuer,*de même se suicider n'est pas seulement mourir...*

Le nombre de cellules se détermine par l'équilibre entre leur taux de renouvellement et leur mort. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus actif visant à éliminer les cellules endommagées et/ou à réduire l'excès cellulaire sans endommager les tissus voisins. Ce processus dépend du microenvironnement et de la présence de signaux de mort ou de survie spécifiques que reçoit toute cellule. Ces signaux amorcent une machinerie intracellulaire stricte mettant en jeu des mécanismes signalétiques d'origine dite intrinsèque ou extrinsèque. Durant ce processus, les cellules subissent des changements morphologiques caractéristiques avec un rétrécissement cellulaire, une condensation nucléaire et membranaire, la formation de corps apoptotiques puis la fragmentation de la cellule. Les débris cellulaires formés sont alors reconnus par les cellules voisines ou les macrophages qui font le ménage. On peut donc voir l'apoptose comme un phénomène positif mais, ce n'est pas toujours aussi simple...

L'apoptose, un suicide sophistiqué

Plusieurs voies, protéines adaptatrices et enzymes sont requises pour induire la mort cellulaire programmée. Leurs actions aboutissent, de concert, à la libération des endonucléases qui procèdent à la fragmentation caractéristique de l'ADN en échelle, et conduisent aux changements morphologiques décrits ci-dessus.

- **Quelques familles de protéines au cœur de l'apoptose (Figure 1.8)**

- Les caspases : ce sont des protéases à cystéine. Elles reconnaissent des motifs tétra-peptides et clivent leurs substrats du côté carboxyle d'un résidu aspartate. Il en existe 14 mais toutes ne sont pas impliquées dans l'apoptose, comme par exemple la caspase-1 qui a un rôle dans la libération d'IL-1 β active. Il y a deux types de caspases apoptotiques : les caspases initiatrices comme la caspase-8 et la caspase-9, et les caspases effectrices (ou exécuteurs) comme la caspase-3, la caspase-6 et la caspase-7. A l'état basal, les caspases sont des pro-enzymes inactives ; leur activation nécessite leur clivage et la formation d'hétéro-tétramères. Elles sont ensuite capables de lyser des protéines importante pour l'intégrité de la cellule comme la lamine ou les enzymes réparatrices de l'ADN. La mission essentielle des caspases effectrices est de dégrader la protéine iCAD (*inhibitor of Caspase-Activated DNase*) ce qui conduit au final à la libération des endonucléases (Budihardjo et al., 1999; Strasser et al., 2000).

- Les protéines adaptatrices : ce sont les protéines qui font le lien entre les caspases et les récepteurs impliqués dans le signal apoptotique (récepteurs de la superfamille du TNF-RI et protéines de la famille Bcl-2). Elles interagissent physiquement à la fois avec les récepteurs par leurs domaines

*André Malraux, *La condition humaine*, Gallimard - Le Livre de Poche "Texte intégral" n°27 - Edition 1954

DD (*Death Domain*) et DED (*Death Effector Domain*), et les caspases par leur région CARD (*CAspase Recruitment Domain*). Parmi ces protéines adaptatrices, on en trouve qui sont pro-apoptotiques comme Apaf-1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*), FADD (*Fas associated protein with death domaine*)/MORT1 et RIP (*Receptor Interacting Protein*), et d'autres qui sont anti-apoptotiques comme FLIP_L (*FLICE-inhibitory protein*) qui empêche le recrutement de la caspase-8 par le récepteur TNF-RI (Budihardjo et al., 1999; Strasser et al., 2000).

- La superfamille des récepteurs de la mort : ce sont des récepteurs qui comportent tous dans leur extrémité intracellulaire des domaines DD et DED. Le récepteur I du TNF (TNF-RI), CD95/Fas/Apo-1, NGFR-p75 (*Nerve growth factor receptor-p75 subunit*) et les récepteurs au TRAIL. Il est intéressant de noter que l'activation de ces récepteurs pourrait induire un signal inverse et promouvoir la prolifération, la différenciation et la survie des cellules par la mise en jeu de voies comme NFκB et Jun Kinase (JNK).

- La famille Bcl-2 : cette famille contient des protéines ayant toutes des domaines d'homologie avec la Bcl-2, nommés BH1, BH2 et BH3. La famille comprend des facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w, des facteurs pro-apoptotiques tels que Bax et Bcl-x_s, et aussi des « cousins éloignés » pro-apoptotiques qui n'ont que le domaine BH3 tels que Bad, Bid, Bim et Blk. Ces derniers sont de puissants facteurs pro-apoptotiques dont certains sont régulés par clivage ou phosphorylation, à l'image de Bad qui devient inactif lors de sa phosphorylation par Akt ou PKA. Le rôle de ces facteurs pro-apoptotiques est essentiellement de séquestrer les protéines anti-apoptotiques. Ces dernières, au contraire, interagissent avec les protéines adaptatrices pour les empêcher de former des complexes actifs des caspases. Les facteurs pro-apoptotiques forment aussi des pores dans les membranes mitochondriales et permettent la libération du cytochrome C qui fait également partie de la machinerie active des caspases lors d'un signal apoptotique (Bortner and Cidlowski, 2002).

- Les inhibiteurs de l'apoptose IAP (*Inhibitors of Apoptosis*) : il y en a huit. Ils sont capables de bloquer les caspases exécutrices en s'intercalant à la place des substrats. Ils ont également une activité E3-ligase, et contribuent à l'ubiquitination des domaines d'interaction protéine-protéine des substrats, mais conduisent aussi à leur propre ubiquitination. C'est la balance critique entre ces deux événements qui déterminerait l'issue pour la cellule (Mace et al., 2010). De manière intéressante, des données récentes montrent que les IAP régulent l'activité de NFκB (Cartier et al., 2012; Damgaard and Gyrd-Hansen, 2011).

▪ **La voie apoptotique extrinsèque et intrinsèque.** Le déclenchement de l'apoptose par l'une ou l'autre voie est spécifique. La voie extrinsèque passe par l'activation des récepteurs de la superfamille de TNF-RI, alors que la voie intrinsèque est déclenchée par la cellule même à l'issue d'un stress majeur comme, par exemple, lors d'un dommage irréparable de l'ADN ou, *in vitro*, en privant les cellules de sérum et des facteurs de croissance qui y sont inclus. Les deux voies diffèrent quant à la caspase initiatrice, la caspase-8 servant pour la voie extrinsèque, et la caspase-9 pour la voie intrinsèque. Les deux voies convergent par la suite vers la caspase-3 qui exécute l'ordre de mort (Hengartner, 2000)(Figure 1.8).

▪ **Une prise de décision...**La prise de décision d'une mise à mort ne se prend pas à la légère par la cellule. C'est sous la contrainte des circonstances qu'elle se prend, comme dans le cas où une cellule subit une atteinte importante qui, non seulement l'a endommagée, mais qui pourrait mettre en péril son entourage. Ce suicide est donc un fait "altruiste". Ceci est clair quand on considère, par exemple, les cellules infectées par un virus qui majorent l'expression du complexe d'histocompatibilité majeure de type I en y associant un fragment protéique du virus intrus. Elles

allument une sorte de phare qui va attirer l'attention des lymphocytes T cytotoxiques pour les euthanasier !

La PTHrP et l'apoptose cellulaire

La PTHrP participe à cette prise de décision, de vie ou de mort, dans de multiples types cellulaires. Elle favorise souvent la survie, mais elle peut aussi quelquefois promouvoir la mort cellulaire. Les mécanismes, là encore, dépendent à la fois du type cellulaire et des voies signalétiques mises en jeu (**Tableau 1.2**).

▪ **La survie des cellules, premier effet intracrine décrit pour la PTHrP.** Lors de la découverte que la PTHrP était capable de gagner le noyau des cellules dans les chondrocytes, les cellules COS-7 et les ostéoblastes (Henderson et al., 1995), le premier effet décrit de cette PTHrP nucléaire concernait l'apoptose. Les auteurs ont observé la présence de PTHrP dans 10-15% des noyaux cellulaires, du fait de la présence de motifs NLS responsables de sa translocation. Par la surexpression de PTHrP-WT ou dépourvue de NLS, ils montrent que la PTHrP, capable de passer dans le noyau (intracrine), était associée à une meilleure survie des chondrocytes privés de sérum (Henderson et al., 1995). Cette localisation nucléaire de la PTHrP a été confirmée *in vivo*, sur des sections d'os long préparées à partir de tibias de fœtus de souris. La localisation de la PTHrP était confinée aux nucléoles des ostéoblastes et s'associait aux ARN ribosomiques nouvellement synthétisés. La PTHrP était absente dans les ostéoblastes de souris PTHrP^{-/-} (Henderson et al., 1995). L'idée que la survie induite par la PTHrP dans les chondrocytes soit liée à un effet intracrine a été confirmée par la suite, en reproduisant cet effet sur des chondrocytes dépourvus de R-PTH1 (lignée 27m21) traités par la PTHrP(87-107) ou transfectés par la PTHrP-WT (Aarts et al., 2001). De plus, la PTHrP s'accumulait dans les noyaux lors du passage des cellules vers la phase G0/G1 (quiescence/arrêt de prolifération), alors qu'elle était cytoplasmique pendant la prolifération. Ce résultat est complètement à l'opposé de ce qui se passe dans les CMLV où la PTHrP nucléaire est mitogène et s'accumule dans le noyau en fin de cycle, dans les cellules sur le point de se diviser (Massfelder et al., 1996). La transfection par la PTHrP-WT s'accompagnait également d'une baisse accentuée et rapide de la traduction protéique, cet effet étant plus tardif dans les cellules contrôles (Aarts et al., 2001). Sur une autre lignée de chondrocytes (ATDC5) et sur des chondrocytes de tibia et de fémur en culture primaire, la PTHrP augmentait également la survie des cellules mais par un effet paracrine, *via* l'expression de Bcl-2 (Amling et al 1997). *In vivo*, les chondrocytes présents dans le cartilage, puis dans la plaque de croissance des os prolifèrent, se différencient en chondrocytes hypertrophiques qui participent à la minéralisation de la matrice du cartilage, puis meurent par apoptose. La PTHrP contribue à la prolifération des chondrocytes, mais retarde leur différenciation. Ceci explique pourquoi les souris *knockout* pour la PTHrP ne sont pas viables ; elles meurent rapidement après leur naissance à cause d'une ossification prématurée de leur cage thoracique qui les empêche de respirer (Karaplis et al., 1994). L'effet anti-apoptotique de la PTHrP sur les chondrocytes a pu être confirmé sur ces souris, où

Tableau 1.2. Effets de la PTHrP sur l'apoptose des cellules

Effet par voie autocrine/paracrine (A), par voie intracrine (I), pro-apoptotique (+), anti-apoptotique (-)

A I Chondrocytes	
-	Lignée CFK2 : PTHrP nucléaire = anti-apoptotique (Henderson et al., 1995)
-	Lignée 27m21 (sans R-PTH1) : PTHrP-WT et PTHrP(87-107) = survie par voie intracrine, interaction avec ARN ribosomal (Aats et al., 2001)
-	Lignée ATDC5 : PTHrP exogène = survie et ↑ Bcl2 (Yamanaka et al., 2003)
-	culture primaire : PTHrP exogène = survie (Amling et al., 1997)
Fibroblastes	
-	Rénaux (NRK-49F) : PTHrP exogène = survie (Ortega et al., 2006)
-	Cellules β pancréatiques : PTHrP paracrine = survie sur apoptose induite par la streptozotocine ou la privation de sérum/glucose (Cebrian et al., 2002)
Cellules épithéliales	
-	Tubule proximal (NRK-52^E) : PTHrP exogène = survie (apoptose par acide folique), <i>via</i> ↑ Bcl-XL/Bax (Ortega et al., 2006)
+	Cellules intestinales (IEC-6) : PTHrP intracrine = pro-apoptotique ; ratio Bax/Bcl-x _L majoré (Ye et al., 2001)
+	Pneumocytes : PTHrP(1-34) et PTHrP(67-86) potentialisent apoptose induite par UV (Hastings et al., 2003)
Cellules cancéreuses	
-	Cancer du sein (MCF-7) : PTHrP intracrine = anti-apoptotique par intégrines/Akt/NFκB/p-Bad (Tovar Sepulveda et al., 2002 ; Shen et al., 2004; Shen and Falzon, 2006 ; Bhatia et al., 2009)
-	Cancer de la prostate (PC-3) : PTHrP intracrine = anti-apoptotique induite par doxorubicine
-	Cancer poumon (BEN) : PTHrP(1-34) et PTHrP(140-173) = anti-apoptotique sur voie extrinsèque (Hastings et al., 2003 ; Hastings et al., 2004)
-	Cancer rénal à cellules claires : PTHrP paracrine = anti-apoptotique, <i>via</i> PI3-K/ILK/Akt/NFκB (Massfelder et al., 2004; Talon et al., 2006 ; Agouni et al., 2007)
-	Ostéosarcome (Saos) : la PTHrP(1-34) = anti-apoptotique, sur voie extrinsèque, intrinsèque et p53 (Gagiannis et al., 2009)

l'apoptose des chondrocytes dans les plaques de croissance était majorée sur des fœtus de 19 jours de souris PTHrP^{-/-} (Amizuka et al., 1996). Les souris *knockout* pour Bcl-2 présentait un phénotype comparable, mais moins accentué que celui des PTHrP^{-/-}. Que Bcl-2 soit distal à la PTHrP dans les chondrocytes a aussi pu être démontré sur des souris transgéniques surexprimant spécifiquement la PTHrP dans ces cellules ; il s'en est suivi une majoration de l'expression de Bcl-2 dans les chondrocytes hypertrophiques et un retard de l'ossification ressemblant à la chondrodysplasie de Janssen (Amling et al., 1997).

- Un seul travail a été réalisé sur **les cellules β pancréatiques**. Lorsque ces cellules surexprimaient la PTHrP, *in vivo* ou *in vitro*, elles étaient plus résistantes à l'apoptose induite par la streptozotocine, un toxique pour ces cellules (Cebrian et al., 2002). Les auteurs ont par ailleurs montré *in vitro* que l'effet de la PTHrP sur la survie était lié à la voie autocrine/paracrine.

- L'effet de la PTHrP sur l'apoptose des **cellules épithéliales** a été analysé sur divers types de cellules. Sur les **cellules épithéliales tubulaires rénales**, elle a été étudiée dans un modèle d'atteinte tubulaire, induite par injection d'acide folique chez des souris surexprimant ou non la PTHrP dans le tubule proximal. Ces souris transgéniques présentent un système de contrôle « *off* » permettant l'abrogation de la surexpression constitutive de la PTHrP par un traitement à la doxycycline. Les souris surexprimant la PTHrP avaient une expression constitutive basale de Bcl-x_L plus élevée et étaient protégées, au niveau tubulaire proximal, de l'apoptose induite par l'acide folique. De plus, l'extinction de la surexpression de la PTHrP majorait le nombre de cellules apoptotiques après traitement à l'acide folique. *In vitro*, sur des cellules épithéliales tubulaires proximales du rat, la PTHrP(1-36) s'opposait aussi à l'apoptose induite par l'acide folique, en activant le R-PTH1 et en phosphorylant Akt et Bad. De manière identique, la PTHrP augmentait aussi la survie des **fibroblastes rénaux** (Ortega et al., 2006).

- Sur deux autres types de cellules épithéliales, la PTHrP induisait un effet pro-apoptotique. Il en était ainsi sur **les cellules intestinales de rat** (IEC-6) où elle agissait par la voie intracrine. La transfection par la PTHrP-WT, mais non par la PTHrP- Δ NLS, potentialisait l'apoptose induite par la privation de sérum. Cet effet s'accompagnait d'un ratio Bax/Bcl-x_L majoré (Ye et al., 2001b). De même, sur les **pneumocytes**, la PTHrP majorait l'apoptose induite par une irradiation UV, mais l'effet était dû cette fois-ci à la PTHrP paracrine ; l'activation de la voie PLC/IP3 y a été impliquée (Hastings et al., 2003b).

- Dans les nombreuses **cellules cancéreuses** qui expriment le R-PTH1 et la PTHrP, elle agit généralement comme un facteur de survie. Dans le **cancer du sein**, la PTHrP était exprimée abondamment ; elle augmentait la croissance des cellules tumorales et s'opposait à l'apoptose induite par la privation de sérum. La PTHrP intracrine, et non pas paracrine, était responsable de ces effets ; elle majorait les ratios Bcl-2/Bax et Bcl-x_L/Bax (Tovar Sepulveda et al., 2002). La surexpression de la PTHrP-WT dans ces cellules, mais non celle de la PTHrP- Δ NLS, induisait une augmentation de l'expression de l'intégrine α 6 β 4 et la phosphorylation de Akt et de GSK-3 β , trois événements impliqués dans la survie produite par la PTHrP (Shen and Falzon, 2006; Shen et al., 2004). Sur des cellules de **cancer de la prostate**, la PTHrP était de même un facteur de survie face à l'apoptose induite par la doxorubicine, en agissant par la voie intracrine (Bhatia et al., 2009a). Sur les cellules de **cancer pulmonaire** par contre, elle était active comme facteur de survie en activant le R-PTH1 (Hastings et al., 2003a). Il en était de même dans diverses lignées de cellules du **carcinome rénal à cellules claires** comme nous l'avons montré dans notre laboratoire. La PTHrP et son récepteur R-

PTH1 étaient exprimés dans différentes lignées de cellules du carcinome rénal à cellules claires. Ce cancer se caractérise par une mutation du gène suppresseur de tumeur VHL (*von Hippel-Lindau*). Un traitement *in vitro* par un antagoniste du R-PTH1 ou un anticorps neutralisant la PTHrP majorait de manière importante l'apoptose de ces cellules, et conduisait *in vivo* à une régression tumorale par une baisse de la survie et de la prolifération de l'ordre de 70% (Massfelder et al., 2004; Talon et al., 2006). De plus, les études ont prouvé que la PTHrP activait la voie PI3-K/Akt/NFκB. L'activation de Akt passait en partie par la kinase liée à l'intégrine, ILK (*Integrin-Linked Kinase*) (Agouni et al., 2007).

En résumé : A partir des études détaillées ci-dessus, deux aspects apparaissaient clairement :

- En premier lieu, la PTHrP exerçait des effets variables selon le type cellulaire, le plus souvent anti-apoptotiques, et pour ce faire elle agissait indifféremment soit par la voie paracrine, soit par la voie intracrine.
- Le deuxième aspect qui ressort de ces études, concerne le fait que la PTHrP semble souvent interagir avec la voie intrinsèque. En effet, la privation de sérum (utilisée le plus souvent pour induire l'apoptose) met en jeu la voie intrinsèque, le ratio Bax/Bcl-x_L accompagnait l'effet pro-apoptotique de la PTHrP dans les pneumocytes et les cellules intestinales (d'ailleurs aussi bien quand la PTHrP agissait par voie autocrine que intracrine), Bcl-2 était en aval de la signalisation de la PTHrP pour ses effets anti-apoptotiques dans les chondrocytes, et enfin Bcl-x_L et Bad étaient pilotés par la PTHrP pour induire la survie des cellules épithéliales tubulaires et des fibroblastes rénaux respectivement.

La question de savoir si la PTHrP était capable de **contrer l'apoptose induite par la voie intrinsèque et par la voie extrinsèque** a fait l'objet d'une étude réalisée sur les cellules tumorales pulmonaires. Dans cette étude, l'apoptose a été induite par une irradiation UV, une méthode conduisant à des taux d'apoptose reproductibles. Les mécanismes des deux voies apoptotiques majeures étaient activés, à savoir la caspase-9 (voie intrinsèque) et la caspase-8 (voie extrinsèque). Le prétraitement des cellules par les PTHrP(1-36) et PTHrP(140-173) diminuait l'apoptose induite par les rayons UV, réduisait l'activité de la caspase-3 (commune aux deux voies), de la caspase-9 et de la caspase-8. Lors de l'induction de l'apoptose spécifiquement par la voie extrinsèque (par un anticorps activateur anti-FASL), les deux PTHrP étaient capables d'abroger l'activité des caspases-8 et 3, alors qu'elles étaient sans effet lorsque la caspase-9 était sélectivement activée par la staurosporine (inducteur de la voie mitochondriale intrinsèque) (Hastings et al., 2003a). Cette étude montrait pour la première fois que la PTHrP était capable d'interférer avec la voie extrinsèque. Les deux PTHrP majoraient la survie des cellules tumorales pulmonaires par l'activation de l'AMPC/PKA, mais le mécanisme de cette activation par la PTHrP(141-173) reste à ce jour énigmatique (*via* un récepteur non connu ou un effet direct ?) (Hastings et al., 2004). Dans une autre étude sur une lignée de cellules d'ostéosarcome (Saos), la PTHrP(1-34) était capable d'inhiber l'ensemble des voies apoptotiques, extrinsèque (induite par stimulation des récepteurs CD95, TNF-RI et TRAIL-R), intrinsèque (induite par des molécules cytostatiques (bleomycine, doxorubicine, mitoxantrone) ou la voie de p53. La PTHrP conférait ainsi une chimiorésistance à ces cellules rendant leur traitement difficile (Gagiannis et al., 2009).

Ainsi, la PTHrP est un facteur important de survie d'un grand nombre de cellules, normales ou cancéreuses. Elle peut s'opposer à des signaux apoptotiques émanant des différentes voies, extrinsèque ou intrinsèque. Elle est plus rarement pro-apoptotique. La PTHrP peut contribuer à la survie des cellules, comme à leur mort, par l'une de ses deux voies d'action : autocrine/paracrine via l'activation de R-PTH1 ou intracrine après sa translocation dans le noyau.

***Partie B -
« La Physiopathologie de la cellule
mésangiale »***

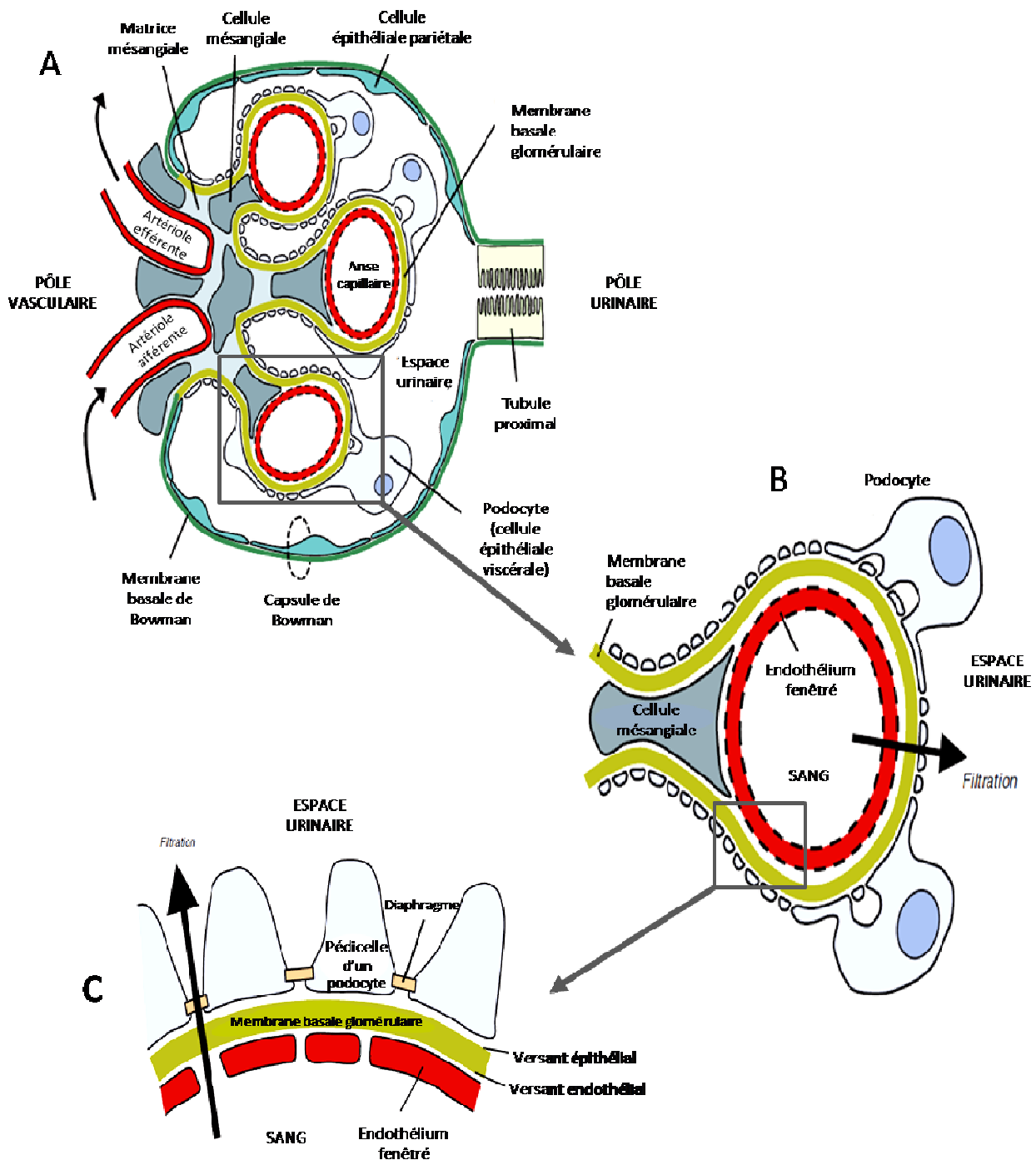


Figure 1.9 : Composition d'un glomérule. Le glomérule, lieu de filtration du sang et de formation de l'urine primitive, est composé (A) d'un pôle vasculaire (artériole afférente, anses capillaires puis artériole efférente) et d'un pôle urinaire, avec la capsule de Bowman puis l'embouchure du tubule proximal. Le sang est épuré à travers une barrière de filtration glomérulaire (B), composée de l'endothélium capillaire, de la membrane basale glomérulaire et des podocytes. Le filtrat glomérulaire passe donc (C) à travers les fenêtres de l'endothélium capillaire, de la membrane basale glomérulaire puis des fentes de filtration, entre les pédocelles podocytaires recouvertes d'un mince diaphragme.

Les cellules mésangiales sont au cœur du floculus capillaire (A), en contact étroit avec l'endothélium fenêtré et la membrane basale glomérulaire (B).

Origine des cellules mésangiales

Le glomérule rénal est composé de trois types cellulaires distincts (**Figure 1.9**) : les cellules épithéliales pariétales et podocytaires, les cellules mésangiales (CM) et les cellules endothéliales capillaires. Les cellules épithéliales pariétales forment la capsule de Bowman. Les CM se trouvent au sein du glomérule rénal en contact direct avec l'endothélium capillaire et la membrane basale glomérulaire.

Le glomérule est une unité anatomique rénale responsable de la filtration/épuration du sang et de la formation de l'urine primitive. Le sang entre dans le glomérule par l'artériole afférente et en ressort par l'artériole efférente. La filtration se fait grâce au jeu des pressions : la pression hydrostatique dans l'espace sanguin (pression artérielle dans les capillaires glomérulaires) en est le moteur majeur ; elle s'oppose à une pression hydrostatique très faible dans la capsule de Bowman. La pression oncotique artérielle, liée aux protéines sanguines, tend à retenir le filtrat ; elle s'oppose à une pression oncotique nulle dans l'urine primitive dépourvue normalement de protéines. Ceci est dû à l'existence d'une barrière de filtration comportant trois couches : une couche endothéliale fine et fenestrée, une membrane basale capillaire chargée négativement, et une couche épithéliale formée par les podocytes et leurs pédicelles. Les podocytes recouvrent la membrane basale du côté urinaire, leurs pédicelles formant des digitations qui s'interpénètrent. Le filtrat glomérulaire filtre à travers les espaces entre les digitations (*slit-diaphragm*).

Historique

Les glomérules sont connus des scientifiques et des anatomo-pathologistes depuis le 19^{ème} siècle. Ils pensaient que seules des cellules endothéliales et épithéliales constituaient le glomérule. L'existence d'un troisième type cellulaire était controversée jusqu'en 1933 où Karl Wilhelm Zimmermann, un microscopiste suisse, décrit pour la première fois la présence d'un tissu de soutien représenté par les noyaux du flocculus glomérulaire. Il l'appelle « mésangium », de *meso*, pour milieu et *angis* pour vaisseaux. Zimmermann se contente de décrire la structure du mésangium, pensant qu'il s'agissait de fibroblastes, sans chercher à identifier une fonction. Ses idées n'ont cependant pas eu de grand succès auprès de la communauté scientifique. Ce n'est qu'en 1962 que Farquhar et Palade apportent une preuve fonctionnelle de l'existence du mésangium (Farquhar and Palade, 1962). Ces auteurs, qui appellent les cellules mésangiales « *Deep cells* », montrent qu'elles sont capables, contrairement aux cellules endothéliales, de phagocyter des macromolécules comme la ferrine ou l'or colloïdal. Ces cellules ressemblent aux péricytes qui entourent l'endothélium capillaire.

Entre 1963 et 1975, les études morphologiques, essentiellement basées sur l'histologie, décrivent la participation des CM, avec les cellules épithéliales, à la synthèse de la matrice extracellulaire (Kortge et al., 1969). L'expression d'actomyosine dans les CM suggère leur éventuelle contractilité (Becker, 1972). Les termes de glomérulonéphrite mésangiocapillaire (Cameron et al., 1973) ou de glomérulonéphrite proliférative mésangiale (White, 1973) font leur apparition. D'autres études impliquent les CM dans la néphropathie diabétique (Anjo and Couturier, 1975), la néphropathie membraneuse (Portch and Williams, 1973) et la néphropathie lupique (Dillard et al., 1975).

À partir de 1975, la mise en culture de CM, sous forme de cultures primaires à partir de reins humains ou de rongeurs (Camazine et al., 1976; Fish et al., 1975; Scheinman et al., 1976) permet des

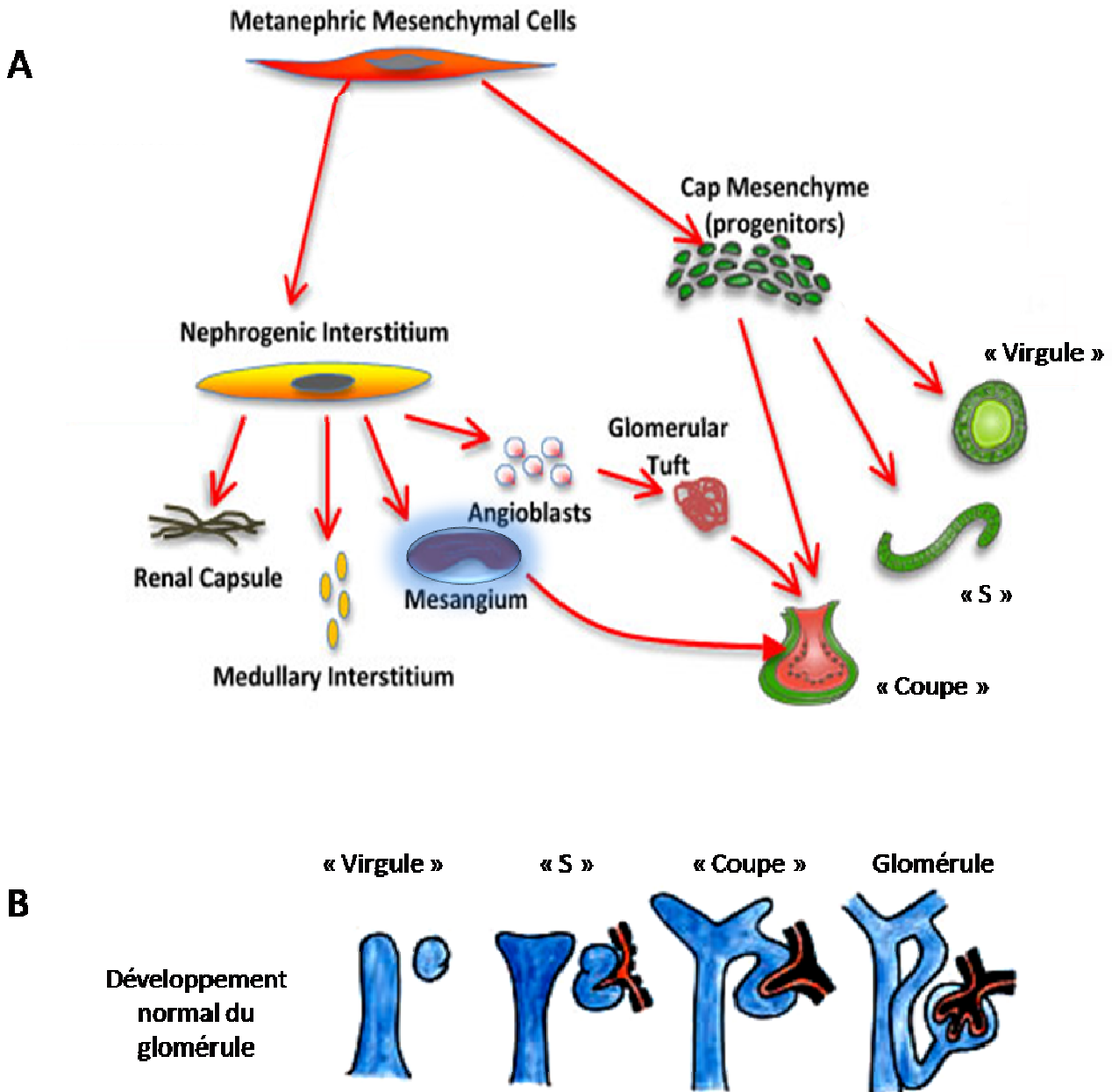


Figure 1.10 : Origine des cellules mésangiales et développement du glomérule. A) Les cellules mésangiales proviendraient du mésenchyme métanéphrique, qui donne naissance au mésenchyme et aux futures cellules épithéliales, ainsi qu'à l'interstitium néphrogénique. Ce dernier se différencie, entre autres, en angioblastes qui vont migrer et donner naissance à l'endothélium capillaire glomérulaire, et en mésangium, dont les cellules mésangiales migrent secondairement pour contribuer à la mise en place de l'architecture glomérulaire. **B)** Les différents stades jusqu'à la formation du glomérule. D'après Gavino Faa et al., *J. Cell. Physiol.* 227: 1257–1268, (2012) et Per Lindahl et al., *Development* 125, 3313-3322 (1998)

études plus approfondies. Une lignée de CM de souris, modifiées par insertion d'un fragment du virus 40 du singe est établie en 1988 (*Mes13*) (MacKay et al., 1988). Ces cellules sont caractérisées *in vitro* par leur forme en fuseau les faisant ressembler à des cellules musculaires lisses, et par l'expression de marqueurs spécifiques. Ainsi, elles présentent à la surface de leur membrane un antigène caractérisé sur les cellules du thymus, Thy1 (**Thy1.1** chez le rat, **Thy1.2** chez la souris). Cet antigène qui n'est présent sur aucune autre cellule du glomérule, est considéré comme un marqueur sélectif. Les CM sont par ailleurs négatives pour le facteur de von Willebrand (spécifique des cellules endothéliales) et les cytokératines (spécifiques des cellules épithéliales). Elles expriment aussi l' α -actine du muscle lisse (α SMA, *smooth muscle actin*) lorsqu'elles sont en culture, ce qui n'est pas le cas *in vivo* pour les CM quiescentes dans un glomérule normal. L'expression d' α SMA témoigne d'un état de pseudo-activation lié aux conditions de culture qui favorisent un état de stress oxydant (Lewinska et al., 2007). C'est pourquoi les CM en culture ressemblent davantage *in vivo* aux CM dans des conditions pathologiques qu'aux CM en conditions normales (Floege et al., 1994).

Le statut développemental des CM

La néphrogenèse est un phénomène complexe qui conduit à travers de multiples étapes à la formation du système urinaire mature. Ce phénomène se termine chez l'homme vers la 36^{ème} semaine de grossesse alors qu'il se poursuit chez les rongeurs après la naissance et durant le période d'allaitement.

L'origine des cellules mésangiales au cours du développement fœtal n'est pas complètement déterminée et reste largement débattue. Deux hypothèses sont proposées.

- La première hypothèse suggère une origine commune aux CM et aux cellules endothéliales, toutes deux issues du mésenchyme métanéphrique (**Figure 1.10**). Ce dernier, lui-même issu du blastème métanéphrique, donne naissance à un interstitium néphrogénique qui se différencie, entre autres, en angioblastes, les futures cellules endothéliales (Robert et al., 2000) et en mésangium. Les cellules endothéliales migrent les premières vers ce qui est, à ce stade, la vésicule rénale et établissent une seule boucle capillaire (Eremina et al., 2003). Les CM migrent à leur tour et forment un noyau de cellules autour de cette boucle (Ricono et al., 2003). Ainsi, les CM organisent le capillaire glomérulaire et leur absence conduit à sa dérégulation (Kikkawa et al., 2003). La plupart des études menées dans ce sens sont basées sur l'immunomarquage avec des anticorps dirigés, pour les CM, contre α SMA (exprimée au cours du développement) et le Thy 1.1, et pour les cellules endothéliales contre le CD31 et RECA-1 (Ricono et al., 2003; Yuasa et al.). Dans d'autres travaux, la greffe du rein fœtal de souris dans la chambre oculaire antérieure d'un hôte adulte d'une autre espèce (rat) a permis de prouver que les CM proviennent exclusivement du donneur et non pas de l'hôte (Hyink et al., 1996).

- Quant à la deuxième hypothèse, elle envisage une origine « extérieure » des CM, à partir de cellules souches hématopoïétiques dérivées de la moelle osseuse (Imasawa et al., 2001; Ito et al., 2001). Un clone de ces cellules, dénommé $lin^-/Scal^+/c-kit^+/CD34^-$, et identifié récemment (Masuya et al., 2003), montre une capacité à se différencier en CM et à repeupler le mésangium (Abe et al., 2005). Ce clone dérive probablement du lignage granulocyte/macrophage.

Les facteurs qui permettent le développement d'une CM dans le mésenchyme rénal ne sont actuellement pas connus. Ceci pourrait expliquer le manque de modèle expérimental viable qui permettrait une manipulation génétique spécifique de CM. Néanmoins, certains facteurs semblent

jouer un rôle dans l'organisation des capillaires glomérulaires impliquant la migration, la différenciation ou la prolifération des CM. Parmi ces facteurs se trouvent des facteurs de croissance comme le PDGF-BB(Lindahl et al., 1998), le VEGF-A (Eremina et al., 2003) et l'éphrine B2 (Foo et al., 2006), le récepteur couplé à la protéine G-4 (Yang et al., 2007), ainsi que des facteurs de transcription comme Pod1, Foxc2 (Takemoto et al., 2006) et des constituants de la membrane basale glomérulaire comme la laminine $\alpha 5$ et des molécules d'adhésion comme l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$ (Kreidberg et al., 1996).

Rôles physiologiques des cellules mésangiales

Le maintien de la structure capillaire glomérulaire

Les CM constituent environ 30 à 40% de la population cellulaire dans le glomérule chez l'adulte (Faa et al., 2011). Elles ont été décrites dès leur découverte comme un tissu de soutien qui permet de maintenir la structure glomérulaire, un rôle comparable à celui attribué aux pérycytes qui entourent les microvaisseaux (Schlondorff, 1987).

Du point de vue développemental, diverses études sur le rein ont montré que l'absence de CM génère des anomalies dans la structure capillaire endothéliale, qui devient une boucle élargie ou ballonnée (Ricono et al., 2003). En effet, durant le 3^{ème} stade du développement du néphron, les cellules endothéliales forment une boucle capillaire initiale qui sera par la suite scindée en plusieurs boucles par un phénomène faisant intervenir la prolifération de CM (Vaughan and Quaggin, 2008). Le mécanisme proposé à ce jour repose sur la prolifération des CM en réponse à un signal émis par l'endothélium, le PDGF-B, qui active son récepteur, le PDGFR β , exprimé par les CM qui se trouvent avec les cellules endothéliales dans la vésicule rénale. Les souris déficientes en PDGF-B (Lindahl et al., 1998) ou en PDGFR β (Soriano, 1994) meurent dans la période prénatale avec des anomalies multiples dont une absence complète de CM dans le flocculus glomérulaire. Il est intéressant de noter que les reins de ces souris présentent des glomérules avec un capillaire unique. Ces auteurs suggèrent un rôle du PDGF-B produit par les cellules endothéliales capillaires, non seulement comme facteur prolifératif, mais aussi comme signal chimiotactique critique permettant aux CM de se frayer un chemin vers la vésicule rénale.

Un phénotype similaire est observé après délétion du facteur de transcription Pod1 qui est exprimé essentiellement dans les podocytes. Les CM sont alors présentes dans la vésicule rénale mais elles prolifèrent très peu et les boucles capillaires sont déformées.

Les CM participent également à la synthèse de la matrice extracellulaire dont l'un des rôles est de préserver l'intégrité de la structure du glomérule.

La synthèse de la matrice extracellulaire

Les CM produisent leur propre matrice extracellulaire, un environnement qui a non seulement un rôle structurel, mais assure aussi l'interaction entre cellules et la signalisation matrice-cellule.

De nombreuses protéines sont présentes dans la matrice mésangiale : le collagène de type IV (Courtoy et al., 1982) composé surtout des chaînes α_1 et α_2 (Butkowski et al., 1989), le collagène V (Abrass et al., 1988), la laminine (seulement les sous-unités β_1 , β_2 , γ_1 et $\alpha'm$) (Hansen et al., 1998), la fibronectine (Courtoy et al., 1980), le nidogene (Katz et al., 1991), et des protéoglycanes comme la chondroïtine (Kanwar et al., 1983) et le leprecan (Lauer et al., 2007).

Ces composants sont continuellement dégradés et recyclés de manière hautement régulée. Leur dégradation dépend de la présence de protéases spécifiques et de leurs inhibiteurs. Les CM sécrètent le PA (*plasminogen activator*) et son inhibiteur PAI-1 (Hagege et al., 1992), des MMP (*matrix metalloproteinase*) comme la gélatinase-A ou MMP2 (Lelongt et al., 2001) ainsi que son activateur (MT1-MMP) et son inhibiteur (TIMP-2).

Les CM sont sensibles à la composition de leur matrice et aux éléments de la membrane basale glomérulaire grâce à la présence de récepteurs transmembranaires. Les récepteurs les mieux caractérisés sont les intégrines qui sont des hétéro-dimères composés de deux sous-unités α et β . Les CM expriment les sous-unités α_1 , α_2 , α_3 , α_5 qui se lient à la sous-unité β_1 pour former les récepteurs de la laminine, la fibronectine, le collagène IV et le collagène I. L'intégrine $\alpha_8\beta_1$ reconnaît l'ostéopontine, la ténascine-C et la vitronectine (Prols et al., 1999), alors que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ reconnaît le facteur de von Willebrand qui est exprimé par les cellules endothéliales capillaires (Hafdi et al., 1997). Ces récepteurs contrôlent diverses interactions cellule-matrice comme l'adhésion, la croissance et la différenciation et contribuent probablement à l'homéostasie glomérulaire.

La matrice séquestre également des facteurs de croissance comme l'HB-EGF (*Heparin-Binding Epithelial Growth Factor*) (Uttarwar et al., 2011) ou encore le TGF- β , un facteur pro-fibrosant (Hori et al., 1998).

La composition et le maintien de la matrice mésangiale sont fonction de l'état homéostatique du glomérule. La synthèse et la sécrétion par les CM des éléments de la matrice extracellulaire sont des processus régulés par de nombreux facteurs, des agents vasoactifs comme l'AngII (Ikehara et al., 2003), des facteurs proinflammatoires (IL-1 β , TNF- α) (Nee et al., 2007), des facteurs de croissance (PDGF-B) et bien sûr des facteurs pro-fibrosants typiques (TGF- β , CTGF ou *Connective Tissue Growth Factor*) (Mason and Wahab, 2003). Ces facteurs contribuent, en cas de lésion rénale, à la synthèse de collagène fibrillaire (collagène I et III) et perturbent la balance entre la synthèse et la dégradation de matrice extracellulaire. Il s'en suit une accumulation de la matrice mésangiale qui a été observée dans diverses pathologies rénales comme la néphropathie diabétique (Mason and Wahab, 2003) et la néphropathie à dépôts d'IgA (Darvill and Ballardie, 2006). Cette accumulation signe la progression vers la glomérulosclérose et la perte de la fonction glomérulaire.

La régulation fine de la filtration glomérulaire

Il a été proposé que les CM puissent participer à la régulation fine de la filtration glomérulaire impliquant l'ultrafiltration du plasma dans le glomérule. Le débit de filtration glomérulaire (DFG) est estimé par la formule suivante :

$$\text{DFG} = P_{\text{uf}} \times K_f$$

P_{uf} est la pression nette de filtration qui dépend de la différence de pressions hydrostatiques et oncotiques entre le capillaire glomérulaire et l'espace de Bowman.

K_f est le coefficient d'ultrafiltration qui dépend de la perméabilité de la membrane basale glomérulaire et de la surface de filtration.

Il a été suggéré que les CM, grâce à leur contractilité, puissent participer à la régulation fine du DFG par la modulation du diamètre des capillaires glomérulaires et donc de la surface de filtration. Les CM ont en effet été considérées à l'origine comme des cellules musculaires lisses vasculaires modifiées, et d'autres chercheurs qualifiaient les CM de péricytes « spécialisés » capables de se contracter et de réduire la surface d'ultrafiltration (Schlondorff, 1987). Becker et coll. montrent par immunohistochimie la présence d'une protéine participant à la contraction, l'actomyosine dans les CM humaines *in vivo* et suggèrent que les CM puissent se contracter (Becker, 1972). D'autres études montrent que les CM en culture expriment des protéines contractiles comme la tropomyosine, la caldesmone, l' α -actinine, l' α SMA et la myosine (Ishino et al., 1991).

Toutefois, les CM n'expriment pas l' α SMA dans les conditions normales *in vivo*, en dehors de la phase du développement rénal (Elger et al., 1993). De plus, la myosine exprimée par la CM en culture est différente de celle de la cellule musculaire lisse (Nakai et al., 1995). Divers vasoconstricteurs (AngII, endothéline I, vasopressine) ont montré une capacité à contracter les CM *in vitro*, mais la pertinence de ces résultats *in vivo* n'est pas clairement établie. Le fait que les CM puissent modifier la filtration glomérulaire est actuellement débattu à deux niveaux : d'une part concernant la méthodologie employée, d'autre part par la divergence des résultats obtenus (Ghayur et al., 2008).

À côté de tous les travaux qui affirmaient un rôle des CM dans la régulation de la filtration, d'autres travaux suggéraient que le mésangium, selon la disposition de ses microfilaments par rapport à la membrane basale glomérulaire, aurait plutôt une fonction statique dans le glomérule et que l'effet final de sa contractilité soit infime (Kriz et al., 1990a; Kriz et al., 1990b). Il est intéressant de mentionner l'émergence de l'hypothèse que les podocytes eux aussi expriment des protéines contractiles comme la smoothéline, la calponine, la chaîne lourde de la myosine et seraient capables de réguler la surface de filtration glomérulaire grâce à leur contractilité (Kriz et al., 1994; Pavenstadt et al., 2003; Saleem et al., 2008).

La phagocytose de macromolécules

La première preuve fonctionnelle de l'existence de CM était basée sur leur faculté de phagocyter des macromolécules, après une injection intraveineuse d'or colloïdal ou de ferritine à des rats normaux ou avec protéinurie (Farquhar and Palade, 1962). Les auteurs constatent la formation de zones denses dans la région mésangiale, avec des invaginations plus ou moins larges dans les membranes des CM. Par la suite, la capacité des CM à phagocyter d'autres composants (complexes immuns, cellules apoptotiques, lipoprotéines anormales) a été mise en évidence dans des modèles expérimentaux de glomérulonéphrite ; la phagocytose était alors considérée comme un processus permettant l'élimination des composants phagocités (Baker et al., 1994; Lynn et al., 1997; Shinkai, 1982). Les voies de signalisation activées lors de la phagocytose ont aussi fait l'objet de multiples travaux, ciblant notamment l'activation des ROS (*reactive oxygen species*) (Baud et al., 1983), et le rôle des prostaglandines comme la PGE₂ (Baud et al., 1986; Schlondorff et al., 1984). Les CM expriment également les récepteurs Fc- α et Fc- γ capables de reconnaître les agrégats d'IgA et d'IgG (Gomez-Guerrero et al., 1994).

L'élimination des macromolécules par les CM de manière décrite comme « semiprofessionnelle » est un mécanisme de défense qui sert à limiter les lésions glomérulaires dans les pathologies rénales. Plusieurs études ont montré que les CM pourraient être issues de cellules souches hématopoïétiques dérivées de la moelle osseuse (Abe et al., 2005; Imasawa et al., 2001; Ito et al., 2001; Masuya et al., 2003). Abe et coll. montrent que les CM partagent les mêmes origines que les granulocytes/macrophages (Abe et al., 2005; Imasawa et al., 2001; Ito et al., 2001; Masuya et al., 2003). Il n'est donc pas surprenant que ces cellules aient cette propriété réservée généralement aux cellules immunitaires.

Les pathologies rénales : le point sur les glomérulopathies

La maladie rénale

La maladie rénale est un terme hétérogène qui regroupe de nombreux désordres qui affectent la structure ou la fonction rénale, pour conduire finalement à l'insuffisance rénale. On peut classer les maladies rénales selon leur durée et leur sévérité en deux catégories : les maladies aiguës et les maladies chroniques. Au cours des deux pathologies, bien que les symptômes ne soient pas identiques, l'atteinte rénale se manifeste par une albuminurie et/ou une diminution du DFG (< 60 mL/min pour un sujet de 1,73 m²) qui traduit la baisse de la fonction rénale. La maladie rénale est considérée comme chronique lorsque ces critères persistent pendant trois mois ou plus.

- L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est liée à des mécanismes pré-rénaux, intrinsèques ou post-rénaux (Figure 1.11A). Les mécanismes pré-rénaux sont les plus fréquents (40 à 80% des patients en IRA). Il s'agit de l'ischémie rénale, de l'insuffisance cardiaque, des maladies hépatiques et de la chirurgie abdominale lourde (Uchino et al., 2005). La septicémie constitue un facteur de risque majeur d'IRA chez les patients hospitalisés (50% des cas d'IRA d'origine pré-rénale) (Bagshaw et al., 2007). Les lésions rénales d'origine intrinsèque (ou idiopathique) comptent pour 12% des cas d'IRA ; elles conduisent à la néphrite interstitielle aiguë (Praga and Gonzalez), à la glomérulonéphrite (Vinen and Oliveira, 2003) et à la nécrose tubulaire aiguë (Rosen and Stillman, 2008). Ces trois dernières entités peuvent également résulter de mécanismes pré-rénaux dans certains cas. Enfin, l'obstruction des voies excrétrices urinaires conduit à une IRA dite post-rénale (< 10% de patients) (Organ and Norman). L'évolution des patients en IRA est très diverse, la rémission peut être complète mais les patients peuvent aussi développer une forme chronique, aggraver une forme chronique préexistante (*acute-on-chronic*), ou encore évoluer rapidement vers une phase terminale d'insuffisance rénale (Cerdeira et al., 2008).

- L'insuffisance rénale chronique (IRC) résulte d'une destruction progressive et irréversible des unités anatomiques fonctionnelles du rein, les néphrons. Elle est définie par un DFG <60 mL/min (pour un sujet de 1,73 m²) pendant plus de 3 mois. Elle est souvent la conséquence d'une néphropathie primitive. Pour le reste, les principaux facteurs conduisant à l'IRC en l'Europe et aux Etats-Unis, sont la vieillesse (Abdelhafiz et al., 2010), l'hypertension artérielle (Hanratty et al., 2010), le diabète (Levey and Coresh, 2011), l'obésité (Kopple, 2010) et les maladies cardiovasculaires (Weir, 2012). La polykystose représente également une cause importante d'IRC. La prévalence de la forme

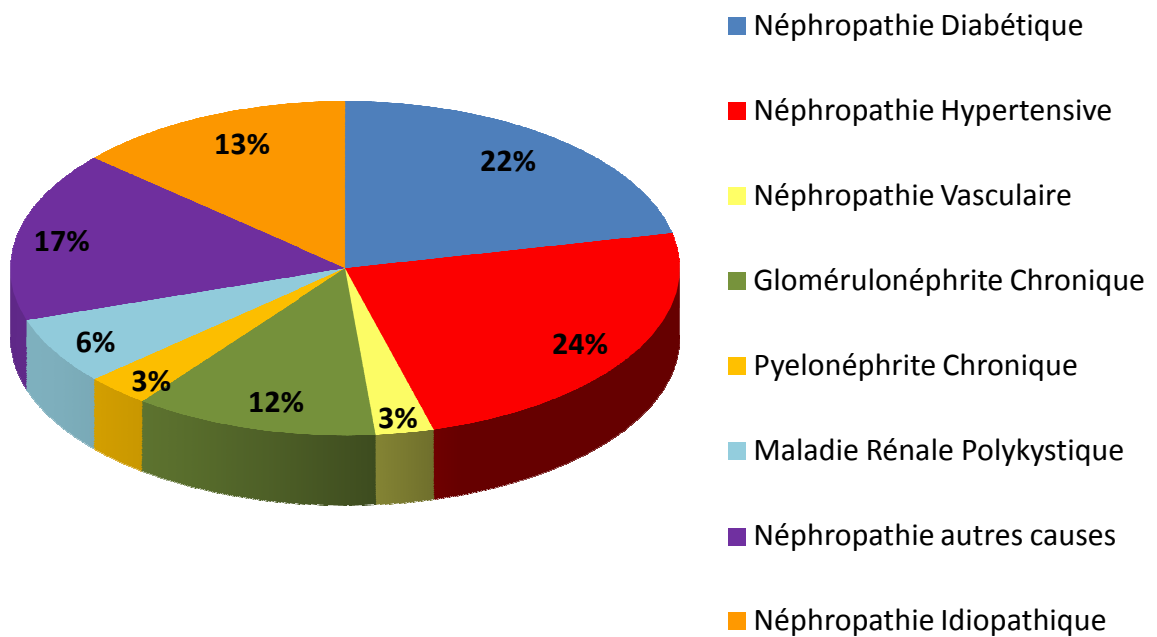
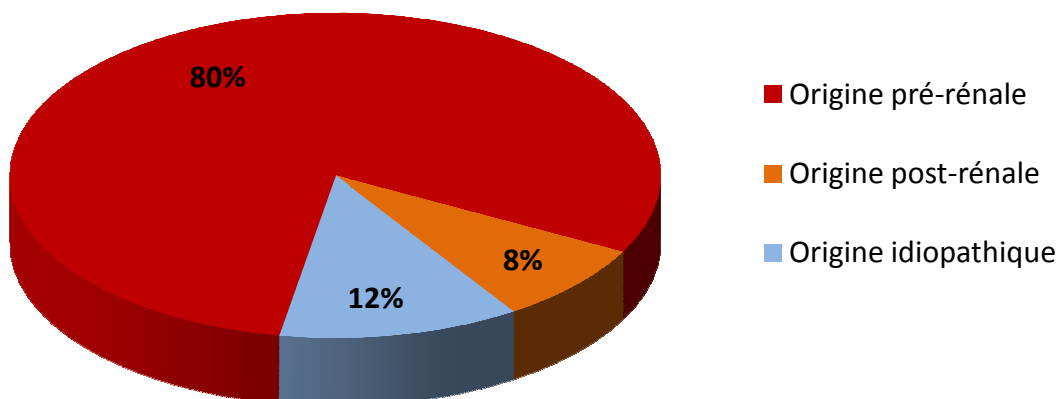
A**B**

Figure 1.11 : Causes des insuffisance rénales aiguës et chroniques. A *Origine des néphropathies aiguës.* L'insuffisance rénale aiguë est dans la plus grande partie des cas (80%) d'origine pré-rénale (septicémie, insuffisance cardiaque, ischémie rénale, etc...), mais peut résulter de l'obstruction des voies excrétrices urinaires (origine post-rénale, 8%: lithiase, tumeurs) ou d'une cause inconnue (origine idiopathique ou intrinsèque, 12%). **B** *Répartition des patients entre les divers types de néphropathies lors de leur mise sous dialyse (statistiques de 2007).* Les deux causes les plus fréquentes sont les néphropathies hypertensives et diabétiques, avec respectivement 24 et 22% des patients. Les néphropathies «autre causes» regroupent les néphropathies immunologiques, toxiques et obstructives. D'après Kessler et Loos-Ayav, 2010 (BEH thématique 9-10).

chronique est estimée à 1000 cas/million d'habitants en France avec une incidence de l'ordre de 200 nouveaux cas/million par an (Levey and Coresh, 2011).

Les néphropathies chroniques peuvent être classées en trois grandes catégories selon la structure anatomique rénale touchée initialement :

Les néphropathies vasculaires d'origine artériolaire, artérielle ou plus rarement veineuse ou capillaire ; elles sont souvent liées à l'hypertension artérielle et à des sténoses ou des embolies qui conduisent à une hypertension intrarénale permanente.

Les néphropathies interstitielles et tubulointerstitielles qui résultent d'une agression toxique continue, idiopathique, ou immunitaire liée à une pathologie systémique. Les atteintes tubulaires se caractérisent par une altération de l'équilibre cellulaire, la prolifération de myofibroblastes interstitiels (provenant des fibroblastes résidents, des cellules épithéliales activées et/ou des fibrocytes), l'augmentation de la synthèse des éléments de la matrice extracellulaire. La progression de ces mécanismes conduit à une atrophie tubulaire, à la fibrose et à la perte de la fonction tubulaire.

Les glomérulopathies, maladies d'origine glomérulaire, sont les plus fréquentes. Les cellules mésangiales y sont impliquées. Je vais les décrire plus en détails ci-après.

L'IRC évolue vers l'IR terminale (DFG < 15 mL/min pour un sujet de 1,73 m²) où les seules alternatives pour suppléer les reins déficients sont la dialyse et la transplantation rénale. La répartition des patients, lors de leur mise en dialyse, entre les différents types de néphropathies est représentée sur la **Figure 1.11B**. Ce diagramme montre que les néphropathies diabétiques et hypertensives, où le glomérule est en première ligne, sont responsables de près de la moitié des cas. Les glomérulonéphrites chroniques rajoutent 12% de cas supplémentaires.

Les glomérulopathies

L'atteinte du glomérule, quelles que soient l'étiologie et la physiopathologie sous-jacentes, est caractérisée par la fuite des protéines plasmatiques dans l'urine. Elle est souvent estimée par la mesure urinaire de l'albumine qui représente environ 60% des protéines plasmatiques. Au cours des dernières années, de nombreux travaux ont montré que les podocytes sont des éléments essentiels dans le contrôle de la qualité du filtrat. Leur altération conduit à la protéinurie (Jefferson et al., 2008). Ces effets sont certainement plus importants qu'un supposé effet contractile évoqué précédemment.

Les pathologies glomérulaires se classent en deux catégories histo-étiologiques, i.e. basées à la fois sur l'image histologique des lésions (spécifique, non spécifique), et la cause des lésions, les lésions étant « **primitives** » si la cause n'est pas identifiée, « **secondaires** » si la cause est connue.

Les glomérulopathies primitives non spécifiques

Lésions glomérulaires minimales (« minimal change disease »)

Ce sont les pathologies glomérulaires les plus répandues chez l'enfant (environ 70 à 80 % des glomérulopathies vs 20% chez l'adulte). Elles présentent un bilan histologique avec absence d'anomalie sous microscope optique où aucune altération morphologique n'est remarquée. La maladie idiopathique est liée à un problème immunitaire. Elle touche principalement les podocytes

Tableau 1.3 : Glomérulopathies primitives ou secondaires à une pathologie systémique.

	Pathologies	Etiologie	Conséquences	Cellule Mésangiale
Pathologies primitives	<i>Glomérulopathies à lésions minimales</i> 80% GN enfant 20% GN adulte	Podocytopathie	Albuminurie et protéinurie massive	/
	<i>Glomérulosclérose focale et segmentaire (FSGS)</i> 20% GN enfant 40% GN adulte	Podocytopathie	Albuminurie et protéinurie massive	- Hypercellularité - Résistance aux traitements
	<i>Glomérulonéphrite extramembraneuse</i> 40% GN adulte	Dépôts IgGs sur versant épithélial de la MB	Altération des podocytes Albuminurie et protéinurie massive Epaississement de la MB	Cellularité normale
	<i>Glomérulonéphrite membranoproliférative (GNMP)</i> 4% GN enfant 7% GN adulte	Dépôts complexes immuns sur versant endothélial de la MB <u>GNMP type II</u> : dépôts dense de produits de clivage de C3		Hypercellularité +++
Pathologies non spécifiques	<i>Néphropathie diabétique</i> 22% patients IRC terminale	Hyperglycémie (AGEs/RAGE, ROS, AngII, TGFβ)	Hyperfiltration glomérulaire Inflammation Albuminurie Glomérulosclérose et fibrose tubulointerstitielle	- Prolifération initiale - Hypertrophie
	<i>Glomérulonéphrite à dépôts d'IgA</i>	Défaut de galactosylation de IgA1 Défaut d'élimination hépatique des IgA1 et accumulation dans le sang	Auto-anticorps anormales anti-IgA1	Dépôt de complexes IgA1/IgG dans le mésangium - Prolifération des CM - Activation des CM - Inflammation
	<i>Glomérulonéphrite lupique</i>	Défaut de propriétés phagocytaires des macrophages	Auto-anticorps anti-nucléosomes, anti-ADN double brin	Dépôts des complexes immuns dans le mésangium et la membrane basale glomérulaire

et conduit à une protéinurie massive et une hypoalbuminémie. Elle est caractérisée par l'effacement des pédicelles, la différenciation des podocytes et leur apoptose. L'ensemble mène à une fragilisation de la barrière de filtration glomérulaire et une altération de sa charge et de sa perméabilité (Leeuwis et al., 2010). Le facteur responsable de cette altération ainsi que le mécanisme originel de la lésion podocytaire ne sont pas encore connus (Audard et al., 2008). Une proportion minime des patients présente des dépôts mésangiaux, comme c'est le cas dans des lésions minimales chez certains patients atteints de lupus érythémateux (Dube et al., 2002)(**Tableau 1.3**).

La glomérulosclérose(hyalinose) segmentaire et focale (HSF ou FSGS)

Dans les stades précoces, cette pathologie touche un nombre limité de glomérules (focale) et seulement une partie de leur architecture (segmentaire) mais elle peut se diffuser et évoluer rapidement vers l'IRC. Elle compte pour environ 20% des maladies glomérulaires de l'enfant et près de 40% de ces pathologies chez l'adulte (D'Agati et al., 2011). Elle comporte un tableau complexe sur les plans histologiques (5 variantes morphologiques proposées), étiologiques (primitive et secondaire) et physiopathologiques (D'Agati et al., 2004). Comme dans les lésions glomérulaires minimales, elle se caractérise par une fuite urinaire de protéines plasmatiques, mais de manière non sélective, i.e. associée à la taille protéique plutôt qu'à la charge(Cho et al., 2007). Elle touche essentiellement les podocytes mais l'atteinte podocytaire est plus sévère que dans les lésions glomérulaires minimales. Elle peut évoluer rapidement vers la perte du néphron (Kiffel et al., 2011). Contrairement aux lésions glomérulaires minimales, elle résiste aux traitements conventionnels, avec un risque accru de récurrence après transplantation rénale (Mathieson, 2007). L'atteinte histologique est distincte avec une hyalinisation artériolaire, une expansion mésangiale et une adhérence du flocculus à la capsule de Bowman (D'Agati et al., 2004).

La FSGS et la glomérulopathie à lésions minimales sont classées aujourd'hui, dans une nouvelle catégorie de maladies rénales nommée : les podocytopathies (Barisoni et al., 2009; Ishimoto et al., 2011; Leeuwis et al., 2010). En effet, l'atteinte des podocytes induit une réorganisation de leur cytosquelette et un effacement partiel des pédicelles. La persistance du stress conduit par la suite à un détachement des podocytes de la membrane basale, suivi d'une perte de la barrière de filtration, d'une accumulation de matrice extracellulaire et d'une sclérose de la partie du capillaire touché (D'Agati et al., 2011). Dans cette pathologie, l'atteinte mésangiale se caractérise par une hypercellularité et est associée à un risque plus important de récurrence après transplantation(Shimizu et al., 2011). Un rôle a été attribué également aux cellules épithéliales pariétales qui semblent être responsables de la lésion focale (Smeets et al., 2011). En effet, cette étude montre une lésion focale précoce des cellules pariétales qui deviennent activées, migrent dans l'espace de Bowman, sécrètent ensuite des éléments de la matrice et participent ainsi à la sclérose.

Plusieurs points restent à éclaircir : 1) on ne connaît actuellement pas quelles sont les cellules qui sont touchées en premier lieu, les cellules mésangiales ou les podocytes, bien que le rôle prépondérant des podocytes dans le processus physiopathologique soit clairement établi, 2) Le facteur responsable de la détérioration segmentaire du glomérule, et donc du défaut de la perméabilité de la membrane basale, n'est pas identifié, 3) la résistance au traitement augmente de manière plus importante avec la progression de la pathologie et le niveau d'hypercellularité mésangiale, mais le rôle potentiel des cellules mésangiales dans cette résistance n'est pas établi (Cho et al., 2007).

La glomérulonéphrite extramembraneuse (« membranous glomerulopathy »)

Cette pathologie est une des causes les plus fréquentes du syndrome néphrotique de l'adulte (responsable de 40 % des cas), alors qu'elle est rare chez l'enfant. La maladie est souvent d'origine idiopathique mais elle peut aussi survenir de manière secondaire à d'autres pathologies systémiques. Elle est provoquée par un dépôt d'immunoglobulines qui aurait lieu sur le versant épithélial de la membrane basale. Sur le plan histologique, la lésion est invisible dans la phase précoce de la maladie. Avec sa progression, les dépôts des complexes anticorps-antigène confèrent à la membrane basale une forme anormale, les pédicelles des podocytes s'effacent, la membrane basale s'épaissit mais la cellularité du flocculus glomérulaire reste normale. Cliniquement, la maladie se manifeste par une protéinurie massive avec ou sans syndrome néphrotique (Wasserstein, 1997).

De nombreuses études ont été faites pour identifier la nature du complexe anticorps-antigène qui se dépose. Il est maintenant admis que les IgGs circulants, en particulier les sous-types IgG1 et IgG4, en font partie (Imai et al., 1997a). Le premier antigène identifié est l'endopeptidase neutre ou NEP, dans la maladie alloimmune rare anténatale, transmise par la mère déficiente en protéine NEP (Debiec et al., 2003; Ronco and Debiec, 2006). Parmi les autres antigènes identifiés, on trouve le PLA2R1, un récepteur des phospholipases A2, présent sur les membranes des podocytes (Beck et al., 2009). Les IgG4 circulants, traversant la membrane basale, interagissent avec le domaine extracellulaire du PLA2R1 et forment des dépôts sous-membranaires (Glassock, 2012). D'autres antigènes ont été également identifiés comme la superoxyde dismutase-2 et l'aldose réductase, deux protéines exprimées anormalement dans les podocytes dans la glomérulopathie membraneuse (Murtas et al., 2011; Prunotto et al., 2010).

La glomérulonéphrite membranoproliférative (GNMP)

Cette pathologie, appelée aussi glomérulonéphrite mésangiocapillaire, est relativement rare. Elle concerne environ 4% de glomérulopathies chez l'enfant et 7% chez l'adulte. La maladie d'origine idiopathique est classée en trois types : la GNMP de type I est de loin la plus fréquente ; la GNMP de type II, appelée aussi maladie à dépôt dense, est associée à un pronostic plus alarmant puisque 50% des patients évolueront vers la phase terminale de l'insuffisance rénale, nécessitant dialyse et transplantation rénale (Appel et al., 2005) ; la GNMP de type III est rare, avec un tableau histologique et physiopathologique différent (Alchi and Jayne, 2010; Sethi and Fervenza, 2012). Cliniquement, cette pathologie se manifeste par une protéinurie, une hématurie, une hypocomplémentémie, souvent associés à une hypertension artérielle. La GNMP est caractérisée, comme la glomérulonéphrite membraneuse, par un épaissement de la membrane basale, bien que les mécanismes physiopathologiques impliqués soient différents et découlent ici de dépôts de complexes anticorps-antigène sur le versant endothélial de la membrane. Cela conduit à l'activation du système du complément, à la sécrétion de facteurs chimio-attractants, à l'accumulation de leucocytes qui libèrent des protéases détruisant la membrane basale. La formation d'une « nouvelle membrane basale » commence par l'accumulation des débris cellulaires, des éléments de la matrice et des dépôts immuns et conduit à une membrane à double contour. La libération de cytokines et de facteurs de croissance par les cellules glomérulaires ou les leucocytes infiltrés conduit à une hypercellularité mésangiale et une prolifération endocapillaire (Sethi and Fervenza, 2011). L'activation du système du complément suit la voie classique dans la GNMP de type I alors que dans les GNMP de type II et III, ce sont les voies alternatives qui sont mises en jeu. Dans la GNMP de type II, la prolifération des CM est présente dans environ 25 à 45 % des cas et l'analyse par microscopie

électronique montre des dépôts denses des produits de clivage du C3 sur la membrane basale glomérulaire (Cruz Corchado and Smith, 1993). La GNMP de type III ne semble par contre pas associée aux complexes immuns (Appel et al., 2005). C'est une forme rare qui a été très peu étudiée (Ramesh Prasad et al., 2004). Elle présente des dépôts immuns sur les versants endothéliaux et épithéliaux de la membrane basale avec peu de prolifération mésangiale (Iitaka et al., 2002). Elle semble être une variante du type I (Alchi and Jayne, 2010).

Les glomérulopathies secondaires spécifiques

Ces glomérulopathies correspondent à des étiologies connues, extrarénales. Elles présentent des lésions plus spécifiques sur le plan histologique (**Tableau 1.3**).

La néphropathie diabétique (et la glomérulosclérose)

Lediabète est une pathologie métabolique résultant d'un défaut de sécrétion d'insuline, de son action ou des deux. Il existe deux types de diabète, **le diabète de type 1**, insulino-dépendant, qui résulte de la destruction auto-immune ou idiopathique des cellules β du pancréas avec un déficit total en insuline, et **le diabète de type 2**, non-insulino-dépendant, qui est caractérisé par une résistance à l'insuline avec des taux d'insuline insuffisants pour compenser la défaillance fonctionnelle. C'est une pathologie dont l'importance ne cesse d'augmenter dans le monde. En France, sa prévalence est de 4,4% en 2010 **selon l'Institut de veille sanitaire**.

- ***La néphropathie diabétique*** est une complication sérieuse des diabètes de type 1 et 2. Elle atteint environ 50% des patients diabétiques et constitue une des causes les plus importantes d'IRC en phase terminale dans le monde (Gariani et al., 2012). La néphropathie diabétique est une pathologie multifactorielle, liée à la fois aux facteurs métaboliques (hyperglycémie, hyperlipidémie), hémodynamique (hypertension artérielle) et inflammatoire (sécrétion de cytokines/chimiokines). L'atteinte rénale touche à la fois les vaisseaux, le glomérule et les tubules. La néphropathie diabétique **début**e par une hyperfiltration glomérulaire (DFG >140 mL/min/1.73 m²) (Frische, 2011), suivie d'un épaissement de la membrane basale avec une hyalinisation des artérioles afférentes et efférentes et une expansion mésangiale. **L'hypertrophie mésangiale** est un processus remarquable dans cette pathologie. Associée à la synthèse excessive de la matrice extracellulaire, elle conduit aux lésions nodulaires (lésions de Kimmelstiel–Wilson) observées chez 30% des patients diabétiques. L'évolution de la maladie se termine par une sclérose glomérulaire diffuse (Zelmanovitz et al., 2009). Cliniquement, **la** néphropathie diabétique se manifeste par une microalbuminurie qui progresse vers une macroalbuminurie et finit par une diminution du taux de filtration glomérulaire et une protéinurie permanente qui annonce la perte de la fonction glomérulaire et l'évolution vers la phase terminale d'IRC (Macisaac and Jerums, 2011). Il n'y a pas de différence fondamentale dans les tableaux histologiques et sémiologiques entre néphropathies associées aux diabètes de type 1 ou 2. Cependant, dans le diabète de type 2, le bilan clinique est souvent compliqué par des pathologies concomitantes (hypertension artérielle, obésité, problèmes cardiovasculaires) qui aggravent le pronostic en terme de mortalité (Mogensen, 1999).
- ***Implication des divers types cellulaires dans la néphropathie diabétique***. Les modèles expérimentaux de néphropathie diabétique montrent une implication précoce des **podocytes**, avec élargissement des pédicelles et perte de la néphrine, une protéine spécifique des podocytes qui est alors excrétée dans l'urine (Wolf et al., 2005). Néanmoins, en clinique, l'atteinte podocytaire est

moins évidente et la néphrinurie n'est retrouvée que chez peu de patients (Najafian and Mauer, 2009; Wolf and Ziyadeh, 2007). Les **tubules** contribuent également à l'évolution de la néphropathie diabétique. En effet, la réabsorption accrue de glucose/ Na^+ par le tubule proximal participe à l'hyperfiltration glomérulaire précoce *via* un mécanisme de rétrocontrôle tubuloglomérulaire (Vallon and Thomson, 2012). Les cellules épithéliales sont par ailleurs exposées aux AGEs, ainsi qu'aux cytokines, chimiokines et ROS libérés par les cellules glomérulaires et présents dans l'urine primitive, et enfin à l'albumine passant à travers un filtre glomérulaire altéré. L'ensemble de ces facteurs conduit à la transition des cellules épithéliales en myofibroblastes, à l'épaississement de la membrane basale tubulaire, et à une fibrose interstitielle (Mandache et al., 2011). Les **cellules mésangiales** sont une des cibles privilégiées de l'hyperglycémie au niveau du rein (Young et al., 1995).

- Les perturbations métaboliques. Lorsque le taux de glucose extracellulaire est élevé, le métabolisme intracellulaire du glucose est perturbé et conduit à l'accumulation de divers produits délétères pour les CM.

- **Le glycérol phosphate** (formé par glycolyse enzymatique) : c'est un précurseur du diacylglycérol (DAG) bien connu pour son rôle dans l'activation de la voie PKC. Dans les CM, l'excès de DAG intracellulaire est corrélé à une activation renforcée des formes de PKC DAG-dépendantes (Whiteside and Dlugosz, 2002). La PKC est au cœur des diverses voies de signalisation activées dans la néphropathie diabétique (Meier et al., 2007). Elle stimule l'activité de la NADPH oxydase, source d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et majore l'expression des éléments du SRA (rénine, angiotensinogène, enzyme de conversion) dans les CM (McCarty, 2006).

- **La N-acétyl-glucosamine** (formé par la voie d'hexosamine) : cette voie mène à l'activation du TGF- β , à l'accumulation de matrice extracellulaire (Weigert et al., 2003) et au stress oxydant (Singh et al., 2007a).

- **La voie des polyols** avec accumulation de sorbitol par l'aldose réductase : cette voie conduit à un stress oxydant, à une diminution de l'oxyde nitrique (NO) avec des effets délétères sur les microvaisseaux (Chung et al., 2003). La délétion génétique d'aldose réductase chez la souris améliore les signes moléculaires et biologiques de la néphropathie diabétique de type 1 (Liu et al., 2011). Dans les CM, l'aldose réductase participe aux effets du TGF- β , à la synthèse de fibronectine et de collagène IV (Jiang et al., 2006; Zhang et al., 2010a).

- **Le myo-inositol** est le substrat de la myo-inositol oxygénase, une enzyme exprimée exclusivement dans le rein (Arner et al., 2006). Cette enzyme est surexprimée dans la néphropathie diabétique et contribue à l'atteinte tubulointerstitielle diabétique (Lu et al., 2009).

D'autres facteurs jouent un rôle essentiel dans la néphropathie diabétique.

- Les AGEs (*advanced glycation end products*) désignent l'ensemble de produits formés, en présence de sucres réducteurs, par glycation (réactions non enzymatiques) sur des protéines, ADN ou lipides (Daroux et al., 2010). Les AGEs sont produits en grande quantité dans un environnement hyperglycémique. Ils activent des récepteurs membranaires dont le récepteur RAGE est le mieux caractérisé (Yamagishi and Matsui, 2010). RAGE est exprimé dans les CM et son activation conduit à la génération des ROS, à une surexpression d'AngII, de TGF- β et de fibronectine, à bloquer le cycle cellulaire et à une hypertrophie mésangiale (Fukami et al., 2004). Les AGEs sont aussi capables de

stimuler les voies de MAPK et d'activer NFκB (Berrou et al., 2009). De plus, les AGEs extracellulaires sont complexés de manière irréversible avec les éléments de la matrice extracellulaire et de la membrane basale glomérulaire, ce qui empêche leur dégradation par les métalloprotéases (McLennan et al., 2002; Mott et al., 1997).

▪ Le système rénine-angiotensine (SRA) a également été impliqué dans la néphropathie diabétique, notamment pour expliquer l'hyperfiltration glomérulaire précoce observée dans cette pathologie. L'hyperfiltration glomérulaire est liée à une augmentation de la pression hydrostatique dans les capillaires glomérulaires. L'AngII contribue à cet effet en exerçant une action vasoconstrictrice préférentiellement sur l'artériole efférente du glomérule (Remuzzi et al., 2005). Dans la néphropathie diabétique, trois aspects sont à souligner concernant l'AngII :

- L'AngII et ses récepteurs sont exprimés dans les CM et les podocytes et leur expression est majorée dans un environnement hyperglycémique ; il s'agit donc d'une activation locale du SRA alors que l'activité rénine plasmatique est généralement basse chez les sujets diabétiques (Amiri et al., 2002; Durvasula and Shankland, 2008; Naito et al., 2009; Vidotti et al., 2004)
- La surexpression locale glomérulaire d'AngII favorise ses effets hémodynamiques sur l'artériole efférente ; l'inhibition du SRA corrige l'hyperfiltration glomérulaire dans des modèles expérimentaux de néphropathie diabétique et améliore la microalbuminurie (Abdel-Rahman et al., 2012; Giunti et al., 2006)
- En dehors de ses effets hémodynamiques, l'AngII est aussi un facteur inflammatoire et hypertrophique qui conduit à la formation des ROS, à l'expression du TGF-β, à l'accumulation de matrice extracellulaire et en fin de compte à l'amplification de la pathologie (Davis et al., 2008; Fukami et al., 2004; Leehey et al., 2005).

L'inhibition du SRA par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'AngI ou par des antagonistes du récepteur AT1 reste le traitement le plus utilisé pour retarder l'évolution de l'IRC.

▪ Le TGF-β enfin mérite une mention spéciale. Au niveau glomérulaire, il est exprimé dans les CM, les podocytes et les cellules épithéliales pariétales. Dans la néphropathie diabétique, divers facteurs (hyperglycémie, AGEs, ROS et AngII) convergent pour majorer la synthèse et la sécrétion de TGF-β1 par les cellules mésangiales. Le TGF-β1 est responsable, dans la phase précoce de la néphropathie diabétique, de l'hypertrophie rénale liée à l'hypertrophie des cellules mésangiales qui est une particularité de cette pathologie. Les mécanismes impliqués dans cette hypertrophie seront détaillés ci-dessous. Par la suite, le TGF-β participe avec d'autres facteurs à la synthèse excessive de matrice extracellulaire par les CM et à la glomérulosclérose (McCarty, 2006). Ses taux d'expression ont été corrélés avec l'évolution de la néphropathie diabétique (Umezono et al., 2006) et diverses manœuvres interférant avec ses effets (anticorps neutralisant, souris transgéniques pour smad3) dans des modèles expérimentaux de diabète préviennent ou réversent l'hypertrophie mésangiale et la glomérulosclérose (Ziyadeh, 2008).

La glomérulonéphrite à dépôts mésangiaux d'IgA (IgA nephropathy ou néphropathie à IgA)

La néphropathie à IgA est la forme la plus répandue des glomérulonéphrites et une cause importante d'IRC en phase terminale (McGrogan et al., 2010). La maladie est caractérisée par des dépôts focaux ou diffus des complexes IgA₁-C3 ou IgA₁-IgM dans le mésangium. Des dépôts mésangiaux d'IgA sont présents chez 5 et 15% de la population générale, mais seulement 2% développent une néphropathie (Glasscock, 2008). Généralement, la maladie évolue discrètement et une lésion rénale est découverte par hasard lors d'un examen urinaire de routine qui montre une

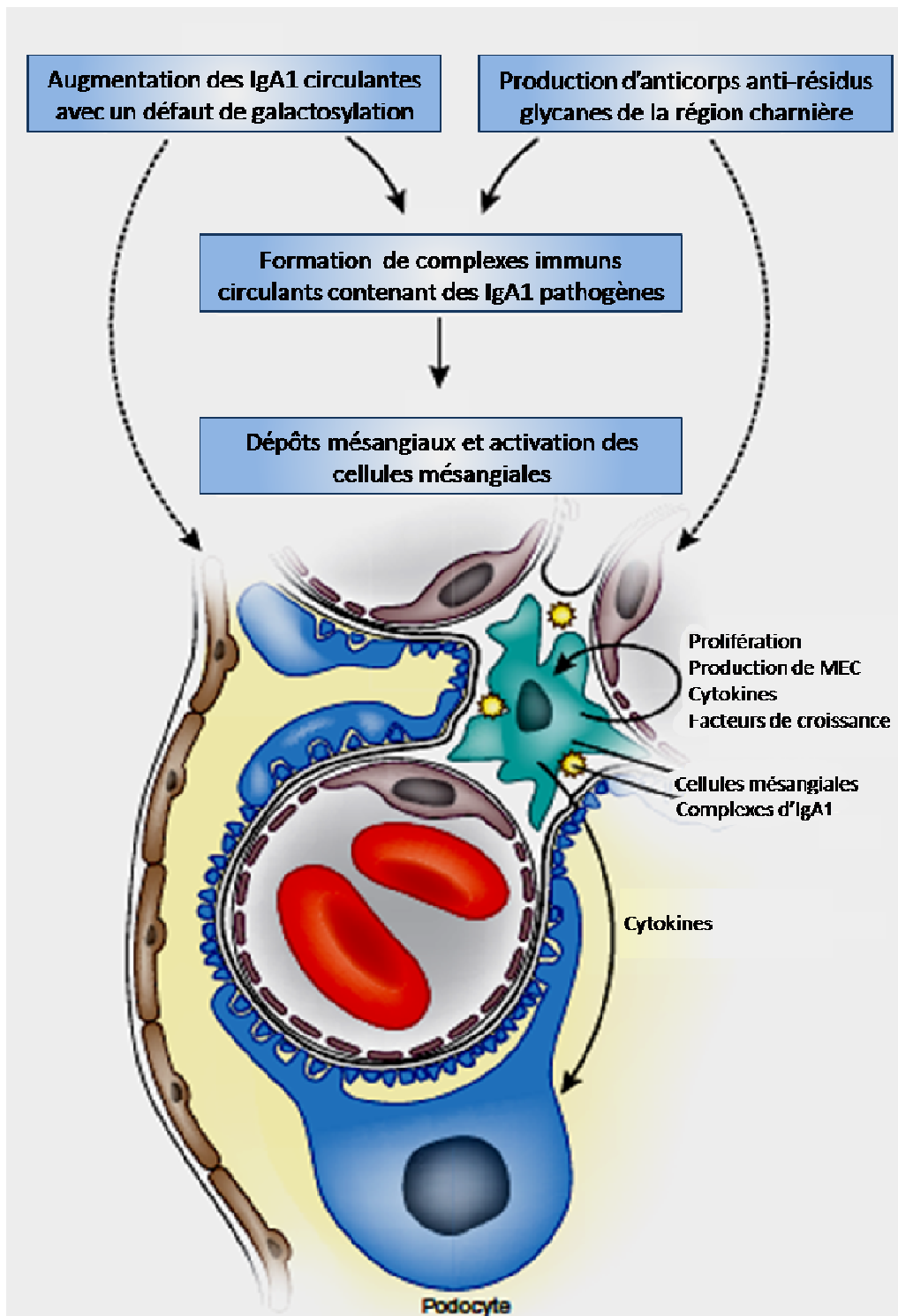


Figure 1.12: Mécanisme d'installation de la glomérulopathie à dépôts mésangiaux d'IgA. La formation d'IgA₁ présentant des défauts de glycosylation de la partie charnière conduit à leur agrégation ou à la formation de complexes avec des auto-anticorps (IgG) dirigés contre les résidus glycanes de ces IgA₁. Ces agrégats se déposent au niveau du mésangium et conduisent à l'activation des cellules mésangiales, qui prolifèrent et produisent des cytokines, des facteurs de croissance et des composants de la matrice extracellulaire, menant à terme à une lésion glomérulaire. *D'après Hitoshi Suzuki et al., J Am Soc Nephrol 22: 1795–1803, 2011*

protéinurie et/ou une hématurie. Le diagnostic est ensuite confirmé par un examen histologique présentant :

- une lésion nécrotique avec mésangiolyse, rupture de la membrane basale capillaire et infiltration leucocytaire,
- une hypercellularité mésangiale segmentaire, diffuse ou sclérotique,
- une atrophie tubulaire dans les phases avancées de la pathologie.

Le marquage par immunofluorescence révèle des dépôts mésangiaux d'IgA₁.

Une IgA₁ anormale se déposant dans le mésangium. Deux sous-classes d'IgA existent chez l'homme : IgA₁ et IgA₂. Contrairement à l'IgA₂, l'IgA₁ contient une région charnière plus longue de 13 acides aminés et riche en sérine et thréonine. Ces acides aminés peuvent être O-glycosylés et ainsi avoir un nombre variable d'oligosaccharides composés de N-acétylgalactosamine (GalNac) et de galactose (Gal). Les oligosaccharides peuvent ensuite être sialylés. L'IgA₁ présente dans les dépôts mésangiaux chez les patients atteints de néphropathie à IgA a un défaut de galactosylation de sa partie charnière. Ce défaut a été lié à une diminution de l'activité de la β-1,3 galactosyltransférase et/ou à la sialylation excessive et prématurée des résidus GalNac empêchant l'addition du galactose. L'IgA₁ avec une conformation aberrante s'accumule dans la circulation par défaut d'élimination hépatique et tissulaire. Les IgA₁ sont également capables de s'agrèger *via* leurs parties charnières et former des dimères IgA₁-IgA₁. Enfin, les IgA₁ défectueux peuvent conduire à la production d'auto-anticorps essentiellement de type IgG (dirigés contre les résidus glycans de la région charnière). L'interaction IgA₁-IgG forme des complexes immuns qui se déposent dans le mésangium. Les raisons de ce dépôt sélectif d'IgA₁ dans le mésangium au cours de la néphropathie à IgA ne sont actuellement pas comprises et le rôle éventuel joué par la présence du récepteur Fc-α des IgA sur les CM reste à être évalué.

▪ L'activation des CM. (**Figure 1.12**) Les dépôts mésangiaux d'IgA₁ conduisent à l'activation des CM. Cette activation se manifeste par la sécrétion de divers facteurs de croissance et de cytokines proinflammatoires. Il a été montré que les IgA interagissent avec le récepteur Fc-α présent sur la membrane des CM, et que l'activation de ce récepteur stimule la prolifération des CM et l'expression de l'IL-6 et du TNF-α (Gomez-Guerrero et al., 1994). L'IgA conduit aussi à l'activation de NFκB et à la libération d'IL-8 et de MCP-1 (Duque et al., 1997). MCP-1 est impliqué dans l'infiltration leucocytaire rénale ; ce facteur est surexprimé dans les reins des patients, excrété dans leur urine (Wasilewska et al., 2010), et sa concentration urinaire est corrélée à la sévérité de la maladie (Yokoyama et al., 1998). *In vitro*, l'exposition des CM en culture à l'IgA₁ provenant de patients avec néphropathie à IgA conduit à une surexpression de la protéine MIF (*macrophage inhibitory factor*), une protéine qui se trouve en haut de la chaîne proinflammatoire et qui augmente l'activité transcriptionnelle de NFκB (Leung et al., 2003). Les cytokines sécrétées par les CM ont également été impliquées dans la communication glomérulo-tubulaire et la fibrose interstitielle. En effet, l'exposition de cellules épithéliales du tubule proximal en culture, aux milieux conditionnés des CM traitées par des IgA de patients, a majoré la prolifération des cellules épithéliales et l'expression de facteurs proinflammatoires (TNF-α, MIF). De surcroît, la neutralisation du TNF-α (mais non du PDGF ou du TGF-β1) par un anticorps a été suffisante pour abroger ces effets. Les IgA n'auraient par contre pas d'effet direct sur les cellules épithéliales du tubule proximal (Chan et al., 2005). La même discussion existe pour les podocytes. Je reviendrai sur ce point en discutant du dialogue entre CM et podocytes.

▪ D'autres facteurs semblent impliqués dans l'évolution de la néphropathie à IgA, comme le **PDGF**, et le **TGF-β1**. Quatre types de PDGF sont connus (PDGF-A, B, C et D). Le PDGF-B est le facteur de prolifération privilégié des CM. Il est surexprimé dans la néphropathie à IgA majoritairement dans les cellules endothéliales et les CM, et son expression chez l'homme est corrélée avec la prolifération mésangiale (Niemir et al., 1995). Plus récemment, un rôle du PDGF-D a été suggéré dans l'initiation de la néphropathie à IgA en raison de son niveau systémique élevé chez les patients durant les phases précoces de la pathologie (Boor et al., 2009). Le PDGF-D a été également étudié dans des modèles expérimentaux de glomérulonéphrite mésangioproliférative chez le rat. Ces études montrent une diminution de la prolifération mésangiale, de l'accumulation de la matrice extracellulaire et une amélioration générale de la fonction rénale en traitant les animaux par des anticorps neutralisant dirigé contre le PDGF-D (Boor et al., 2007; Ostendorf et al., 2003).

Le **TGF-β1** a également été associé à l'évolution de la néphropathie à IgA. Les IgA des patients stimulent son expression dans les CM en culture et cette expression est abaissée en présence d'inhibiteurs du SRA (Lai et al., 2003). Le TGF-β sécrété par les CM participe aussi aux lésions tubulaires et podocytaires (Lai et al., 2009). Les taux de TGF-β ont été associés à une atteinte plus précoce dans la néphropathie à IgA et à une protéinurie plus abondante (Brabcova et al., 2011; Nonaka Takahashi et al., 2008). Néanmoins, le TGF-β peut exercer des effets opposés sur les CM selon l'état d'activation de la cellule. C'est une cytokine qui active les cellules quiescentes et mène à l'accumulation de matrice extracellulaire, ou bien elle réprime les cellules activées, diminue leur prolifération et induit leur apoptose (Kitamura and Suto, 1997) (**Tableau 1.3**).

La néphropathie lupique

Le lupus érythémateux disséminé est une maladie auto-immune caractérisée par une grande variété de manifestations cliniques. C'est une pathologie à prédominance féminine (sexe-ratio de 9/1). Elle touche les femmes entre l'adolescence et la cinquantaine et est plus sévère chez les jeunes adolescentes (Sato et al., 2012). L'atteinte rénale survient chez 20 à 50% des malades. Elle est généralement précoce et se déclare durant la première année du lupus. L'atteinte rénale est souvent glomérulaire et touche en premier lieu les CM et la membrane basale glomérulaire. La forme la plus fréquente est la glomérulonéphrite lupique (GN lupique). La classification histologique des GN lupiques a fait l'objet en 2003 d'un consensus (révisé en 2004) visant à catégoriser les différentes formes histopathologiques. Il a défini six classes, allant d'une lésion mésangiale minimale (classe I) ayant un aspect glomérulaire normal en microscopie optique et un bon pronostic, à des formes prolifératives mésangiales et endocapillaires (classes II à IV), jusqu'à une glomérulosclérose avancée (classe VI). La classe V de la GN lupique se caractérise par des dépôts immuns sur le versant épithélial de la membrane basale. C'est donc une **glomérulonéphrite extramembraneuse « lupique »** associée, contrairement à la GN extramembraneuse décrite plus haut, à une prolifération mésangiale (Weening et al., 2004). La GN lupique se manifeste, selon la sévérité de la pathologie, par une protéinurie à des degrés divers, une micro-hématurie et une insuffisance rénale. La pathophysiologie de GN lupique est liée aux dépôts glomérulaires, mésangiaux et membranaires, d'immunoglobulines et du complément. Des anticorps anti-nucléosome et anti-DNA double brin sont souvent à l'origine de ces complexes immuns. Le nucléosome est composé d'un cœur protéique (les histones) autour duquel s'enroule l'ADN. Cette structure, confinée au noyau, est présentée à la surface cellulaire lors de l'apoptose. Elle sensibilise les macrophages et les incite à phagocyter les corps apoptotiques formés. Un défaut dans les propriétés phagocytaires des macrophages et dans

l'élimination des corps apoptotiques conduit à la production de complexes immuns composés d'**auto-anticorps spécifiques contre les nucléosomes**, l'ADN double-brin, les histones, les ribonucléoprotéides et les produits issus d'une phagocytose insuffisante des corps apoptotiques (Gaipl et al., 2005; Licht et al., 2004). Les complexes immuns se retrouvent dans la circulation et se déposent sur la membrane basale glomérulaire (MBG) et le mésangium (Amoura et al., 1999). D'autres hypothèses suggèrent une formation des complexes immuns *in situ* (Kalaaji et al., 2006). Ces dépôts induisent l'expression des cytokines/chimiokines, majoritairement par les cellules rénales intrinsèques établissant une inflammation chronique (de Zubiria Salgado and Herrera-Diaz, 2012). La néphrite lupique est également caractérisée par une suractivation des lymphocytes B et du système immunitaire adaptatif

La néphropathie hypertensive

L'hypertension artérielle est la seconde cause d'insuffisance rénale (**Figure 1.11B**). Physiologiquement, le rein adapte son fonctionnement lorsqu'il est soumis à une majoration de la pression artérielle. L'auto-régulation rénale, avec une vasoconstriction de l'artéριοle afférente du glomérule, lui permet de maintenir un débit de filtration stable entre 80 et 120 mm Hg. Par ailleurs, le SRA sera inhibé et l'excrétion de sodium sera majorée pour rétablir une balance sodée favorable à un retour de la pression artérielle à un niveau normal. Dans l'hypertension artérielle essentielle (d'origine non connue), le rein ne peut plus remplir correctement cette fonction de régulation et la pression artérielle restera élevée. Elle sera aussi augmentée dans les vaisseaux intrarénaux et les capillaires glomérulaires. Ceci conduit à un épaississement des parois vasculaires et à une hypertrophie des cellules mésangiales, conduisant peu à peu à l'altération de la filtration glomérulaire et de la balance sodée (London et al., 2007). L'hypertension artérielle est ainsi à la fois une cause et une conséquence de l'IRC. Le rein peut aussi être lui-même à l'origine de l'hypertension artérielle en cas de sténose de l'artère rénale, avec hypoperfusion rénale, activation du SRA et néphropathie ischémique sur le rein sténosé (Kendrick and Chonchol, 2008).

Expérimentalement, l'augmentation de la pression qui s'exerce sur les cellules a été mimée *in vitro* en soumettant les cellules à un stretch cyclique. Ainsi, il a été montré sur les CM que le stretch majore la synthèse de TGF- β et le dépôt de matrice extracellulaire (Riser et al., 1996; Riser et al., 1992). Il induit aussi un stress oxydant, active la voie de NF κ B et majore MCP-1 (Gruden et al., 2005; Zhang et al., 2010b). Sur les podocytes, le stretch est responsable de l'activation d'un SRA local (Durvasula et al., 2004). Il modifie le cytosquelette notamment celui des pédicelles et l'adhérence des cellules (Endlich and Endlich, 2006).

Modèles expérimentaux de glomérulopathies

Divers modèles expérimentaux ont été développés afin d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires des différentes formes de pathologies glomérulaires. L'ensemble des modèles, avec des atteintes spécifiques des podocytes, des cellules endothéliales ou mésangiales, sont présentés dans le **Tableau 1.4**. Je ne détaillerai dans ce paragraphe que certains modèles touchant spécifiquement les cellules mésangiales.

Tableau 1.4 : Modèles expérimentaux d'atteintes glomérulaires selon le type cellulaire

1. Modèles expérimentaux d'atteinte podocytaire

Modèle Expérimental	Cellules touchées	Espèces	Mécanisme de l'atteinte	Voie d'injection	Signes physiopathologiques	Maladie étudiée
Néphrose induite par la puromycine ou PAN (Puromycin Aminonucleoside Nephroses)	podocytes	Rat	Cytotoxicité liée à une forte dose de puromycine	SC, IP ou IV	<ul style="list-style-type: none"> - effacement réversible des pédicelles - détachement des podocytes - protéinurie à J5-J8 - résolution à environ J28 - infiltration tubulo-interstitielle de cellules mononucléaires 	<p>Les lésions glomérulaires minimales</p> <p>La glomérulosclérose focale et segmentaire (doses répétées)</p>
Néphropathie induite par l' adriamycine (<i>ADR-Nephrosis</i>)	podocytes	Rat Souris (BALB/cJ, 129/SvJ)	Cytotoxicité directe de l'adriamycine	IV et IP	<ul style="list-style-type: none"> - effacement des pédicelles - protéinurie à J5-J7, culminant à 4 sem - glomérulosclérose segmentaire à 4 sem - fibrose tubulointerstitielle à 6 sem 	La glomérulosclérose focale et segmentaire
Néphrite passive de Heymann	podocytes	Rat	Complexes immuns accumulés sur le versant épithélial de la membrane basale	IV et IP	<ul style="list-style-type: none"> - accumulation des complexes immuns sur le versant épithélial de la membrane basale à J2 - effacement des pédicelles et protéinurie à partir de J4 - progression vers une insuffisance rénale et glomérulosclérose (chronologie variable) 	La glomérulopathie extramembraneuse

Adapté de *Methodes in Molecular Medicine*, vol.86 : Renal Disease : Techniques and protocols. Edition : M.S.Goligorsky©Humana Press Inc., Totawa NJ. (2003)

Tableau 1.4 : Modèles expérimentaux d'atteintes glomérulaires selon le type cellulaire

2. Modèles expérimentaux d'atteinte endothéliale glomérulaire

Modèle Expérimental	Cellules touchées	Espèces	Mécanisme de l'atteinte	Voie d'injection	Signes physiopathologiques	Maladie étudiée
Vasculite induite par anticorps dirigé contre les cellules endothéliales glomérulaires	endothéliales	Rat	Ac anti-cellules endothéliales glomérulaires + activation du système du complément	Perfusion dans l'artère mésentérique supérieure (Ac purifiés de mouton)	<ul style="list-style-type: none"> - atteinte endothéliale avec agrégation plaquettaire endocapillaire rénale - enflure et dénudation de la membrane basale - mésangiolyse 	La mésangiolyse avec signes de microangiopathie thrombotique
Concanavoline (Con-A)	endothéliales	Souris	Interaction Ac-Ag + activation du système du complément	Perfusion dans l'artère rénale (Con-A, puis Ac anti-Con-A)	<ul style="list-style-type: none"> - atteinte endothéliale avec agrégation plaquettaire endocapillaire rénale - thromboses glomérulaires et péri-tubulaires - nécrose tubulaire et protéinurie - baisse (50%) des cellules glomérulaires à 4 h - prolifération à J3 - rétablissement glomérulaire à J7 	La glomérulonéphrite proliférative avec microangiopathie thrombotique
Anti-MBG Anti-membrane basale glomérulaire	membrane basale du glomérule	Rat Souris Chi en Chat Lapin Singe	Antisérum anti-membrane basale	IV	<ul style="list-style-type: none"> - réponse hétérologue initiale (4 h), infiltration et prolifération des macrophages - rupture de la membrane basale - à J10 protéinurie causée par la réponse immune homologue 	La Maladie de Goodpasture La glomérulonéphrite membranoproliférative

Tableau 1.4 : Modèles expérimentaux d'atteintes glomérulaires selon le type cellulaire

3. Modèles expérimentaux d'atteinte mésangiale

Modèle Expérimental	Cellules touchées	Espèces	Mécanisme de l'atteinte	Voie d'injection	Signes physiopathologiques	Maladie étudiée
Néphrite Anti-Thy1.1	mésangiales	Rat	Interaction Ac-Ag (antigène Thy1.1 présent sur les CM de rat)	IV	<ul style="list-style-type: none"> - mésangiolyse rapide (48h) avec dissolution de la matrice et infiltration leucocytaire - prolifération intense et migration des CM de la région juxtaglomérulaire (J3) - hypercellularité mésangiale (J5) - retour spontané à l'état basal (6-8 sem) par apoptose des CM 	La néphropathie à IgA La néphrite lupique La Glomérulonéphrite focale et segmentaire
Néphrite de HSV (<i>Habu Snake Venom</i>)	mésangiales	Rat Souris	Dose périlétale de venin du serpent <i>trimeresurus flavoviridis</i>	IV	<ul style="list-style-type: none"> - atteinte initiale probable de la matrice mésangiale et mésangiolyse rapide (24h) - prolifération des cellules endothéliales puis des CM - protéinurie à 48h - retour à état basal (chronologie variable) 	La glomérulonéphrite mésangioproliférative sévère avec microaneurisme
Glomérulo-néphrite induite par un complexe immun	mésangiales	Rat Souris	Injection d'apoferritine équine, avec ou sans LPS (doses et durée de traitement variables)	IV, IP	atteinte glomérulaire après 2 à 4 sem prolifération mésangiale expansion de la matrice protéinurie	La néphropathie à IgA

Tableau 1.4 : Modèles expérimentaux d'atteintes glomérulaires selon le type cellulaire

4. Modèles expérimentaux d'atteinte glomérulaire

Modèle Expérimental	Cellules touchées	Espèces	Mécanisme de l'atteinte	Voie d'injection	Signes physiopathologiques	Maladie étudiée
Néphropathie diabétique	mésangialesp odocytes	Souris Rat	Injection de la Streptozotocin (à faibles doses répétées durant 5 jours consécutifs ou à forte dose unique)	IP, IV	le diabète en 1 à 2 semaines albuminurie (5 ^{ème} semaine) hypertrophie glomérulaire précoce Expansion mésangiale et Glomerulosclérose et hyalinose artérielle (rare, dépend largement de la souche) au bout de 15-30 semaines	Néphropathie diabétique liée au diabète de type 1
Néphropathie Diabétique Souris db/db	mésangialesp odocytes	Souris	Mutation dans le récepteur à la leptine	/	Diabète sucré à l'âge de 4 mois Hypertrophie glomérulaire (2 -4 mois) Hyperfiltration glomérulaire Expansion mésangiale et albuminurie à taux variable (mais 15 à 30 fois > aux souris homozygotes) Hyalinose artériolaire (observée parfois)	Néphropathie diabétique liée au diabète de type 2
Glomérulo-néphritehypertensive (Rein 5/6)	endothéliales ++ mésangialesp odocytes	Rat, Souris Chat Mouton	Ablation 5/6 du rein ❶ ablation 2/3 rein gauche et néphrectomie du rein droit ❷ ou ligature 2/3 artères rénales et néphrectomie du rein gauche	/	prolifération mésangiale (premiers jours) inflammation locale Hypertrophie glomérulaire Hyperfiltration glomérulaire Hypertension artériolaire Protéinurie Glomerulosclérose Fibrose interstitielle HTA tardive (6 semaines)❶ HTA précoce (2 semaines)❷	Atteinte rénale progressive liée à l'HTA et à la réduction néphronique

Modèles de glomérulonéphrite mésangioproliférative

▪ **Le modèle de néphrite par anticorps anti-Thy1** : le Thy1.1 est un antigène glycosylé membranaire de 18 kDa, exprimé dans les thymocytes, mais aussi spécifiquement sur la surface des CM du rat. Le modèle est inductible par une seule injection d'anticorps mono ou polyclonal dirigé contre le Thy1.1 chez le rat. Les CM de souris expriment le Thy1.2 et les anticorps anti-Thy1.1 ne sont pas efficaces chez la souris. Le traitement des souris par un anticorps anti-Thy1.2 conduit à une atteinte rénale, mais avec des effets systémiques importants (Sharma et al., 2006), rendant le modèle inutilisable

L'atteinte initiale se manifeste par une mésangiolyse intense et rapide, réduisant le nombre des CM d'environ 90% au bout de 48 h et dissolvant la matrice extracellulaire (Morita et al., 1998). Durant la mésangiolyse, des cellules immunitaires (monocytes, lymphocytes) s'infiltrent dans le glomérule et l'ensemble fragilise la structure capillaire. À J3, les CM restantes ripostent par une prolifération soutenue et une migration mésangiale à partir de la région juxtaglomérulaire conduisant, à J5, à un nombre de CM trois fois plus important qu'à l'état physiologique (Bagchus et al., 1990). Ceci s'accompagne d'une dédifférenciation des CM en myofibroblastes, qui ré-expriment l' α SMA, sécrètent des facteurs proinflammatoires (IL-1 β , TNF- α), mitogènes (PDGF, FGF) et des éléments de la matrice extracellulaire comme les collagène I et III qui ne font pas partie de la matrice normale. Le modèle est réversible et finit par un retour spontané à l'état basal après 6-8 semaines. La normalisation du nombre de CM se fait par l'amorçage d'une machinerie apoptotique cicatrisante. Le modèle conduit à la glomérulosclérose en cas d'injections répétées d'anticorps anti-Thy-1.1 ou de la pratique d'une néphrectomie unilatérale initiale.

Ce modèle a été utilisé afin d'étudier les mécanismes de trois maladies glomérulaire humaines avec prolifération mésangiale : la néphropathie à dépôt d'IgA, la néphrite lupique et la glomérulonéphrite focale et segmentaire (Bagchus et al., 1990), qui toutes présentent un phénotype mésangial marqué.

▪ **Le modèle de néphrite induite par le venin de serpent Habu (Habu Snake Venom, HSV)** : Divers venins de serpents peuvent induire des atteintes glomérulaires (Sitprija, 2006), mais seul le venin de *trimeresurus flavoviridis* (HSV) a été utilisé avec succès dans les modèles expérimentaux.

Ce modèle est connu depuis 1963 où il a été appliqué avec succès au lapin dans une étude où le terme « mésangiolyse » a été utilisé pour la première fois (Sakaguchi and Kawamura, 1963). Les auteurs ont décrit une diminution dans la densité de la matrice mésangiale, mais ils ont aussi pensé que les CM se différenciaient en cellules endothéliales lorsqu'elles étaient en contact avec le sang. Le modèle consiste à injecter par voie intraveineuse une dose péri-létale de 2 à 6 mg/kg de HSV chez la souris ou le rat. Ce modèle a été réalisé avec ou sans néphrectomie unilatérale, une semaine ou 24 h après l'injection de venin. Suite à cette injection, une mésangiolyse apparaît rapidement dans les premières 24 h, liée probablement à une dissolution de la matrice mésangiale par les protéases du venin (Morita et al., 1998). Une lésion endothéliale s'ajoute à l'atteinte mésangiale et semble conduire à une prolifération des cellules de l'endothélium plus précocement que des CM. Le venin HSV est riche en phospholipase A2, une enzyme clé pour la synthèse de médiateurs de l'inflammation, prostaglandines et thromboxanes, leucotriènes, lysophospholipides et PAF (*Platelet Activating Factor*). Le modèle est associé à une inflammation locale comme le montre l'infiltration des glomérules en neutrophiles polynucléaires et en monocytes/macrophages (Nakao et al., 1998). *In vitro*, sur des CM en culture, le HSV majore l'expression de MCP-1 et diminue la viabilité des

cellules (Kubo et al., 2002). Des métalloprotéases ont d'ailleurs été isolées du venin, induisant l'apoptose des cellules endothéliales (Masuda et al., 2001; Wu et al., 2001). Enfin, le venin peut aussi induire l'apoptose en majorant les ROS comme cela a été montré sur des cellules cancéreuses (Sun et al., 2003).

L'évolution de la pathologie est variable selon l'animal utilisé, la souche et la pratique ou pas d'une néphrectomie controlatérale. On observe une albuminurie et une créatininémie élevées souvent 24 à 48 h après la mésangiolyse. Dans tous les cas, le modèle se caractérise, dans les premiers jours après l'injection du venin, par une prolifération mésangiale avec surexpression du PDGF, associée à des marqueurs d'apoptose (Nakao et al., 1998), puis évolue vers la restauration d'une structure glomérulaire normale. Il est important de noter que le dommage glomérulaire n'atteint que 30 à 40% des glomérules et qu'une glomérulosclérose n'a été observée que rarement sur la longue durée. La glomérulosclérose peut, en revanche, être induite chez le rat par la combinaison de ce modèle avec celui d'anticorps anti-Thy1.1. Ce modèle correspond donc particulièrement à une glomérulonéphrite aiguë. Il est également associé à des modifications hémodynamiques rénovasculaires avec une diminution de la pression artérielle et du débit sanguin rénal dose-dépendantes sans répercussions sur le débit cardiaque. C'est le modèle expérimental le plus utilisé chez la souris pour reproduire une pathologie mésangioproliférative. Je l'ai utilisé dans mon travail expérimental.

Inflammation et glomérulopathies

Kidney's highway to hell

Contexte global de l'inflammation

L'inflammation est un des modes de réponse les plus fréquents d'un organisme à une agression, quelle qu'en soit l'origine (infectieuse, immunologique, tumorale, traumatique ou nécrotique). Au niveau d'un organe, elle se manifeste durant la phase aiguë par une infiltration leucocytaire, une sécrétion de cytokines/chimiokines médiatrices de l'inflammation, et une vasodilatation locale avec hausse de la perméabilité vasculaire dues notamment à la bradykinine. La phase chronique est caractérisée par le développement de réponses spécifiques immunes, cellulaires et humorales à l'agression.

L'inflammation rénale fait appel dans tous les cas à l'immunité innée, avec parfois une réponse immunitaire adaptative antigène-spécifique (Anders and Muruve, 2011).

- La réponse de l'immunité innée ou naturelle passe par l'activation des **récepteurs Toll-like (TLR)** membranaires ou des **récepteurs cytoplasmiques NOD-like (NLR)**. Ces deux familles de récepteurs reconnaissent des motifs pathogènes conservés, par exemple, dans le LPS (*Lipopolysaccharides*) dérivé de membranes bactériennes. L'activation de ces récepteurs dans les leucocytes et les cellules glomérulaires (portant certains de ces récepteurs) (Banas et al., 2008; Lichtnekert et al., 2009) déclenche une signalisation intracellulaire menant à la libération de diverses cytokines/chimiokines médiatrices de l'inflammation. D'un autre côté, la réponse naturelle met en jeu **l'activation du système de complément**. Eventuellement, la stimulation des récepteurs TLR et NLR, et celle du système de complément peuvent s'intriquer et présenter une activation croisée (Couser, 2012). Les pathogènes ne sont pas exclusivement des agents « étrangers », mais ils peuvent être sécrétés

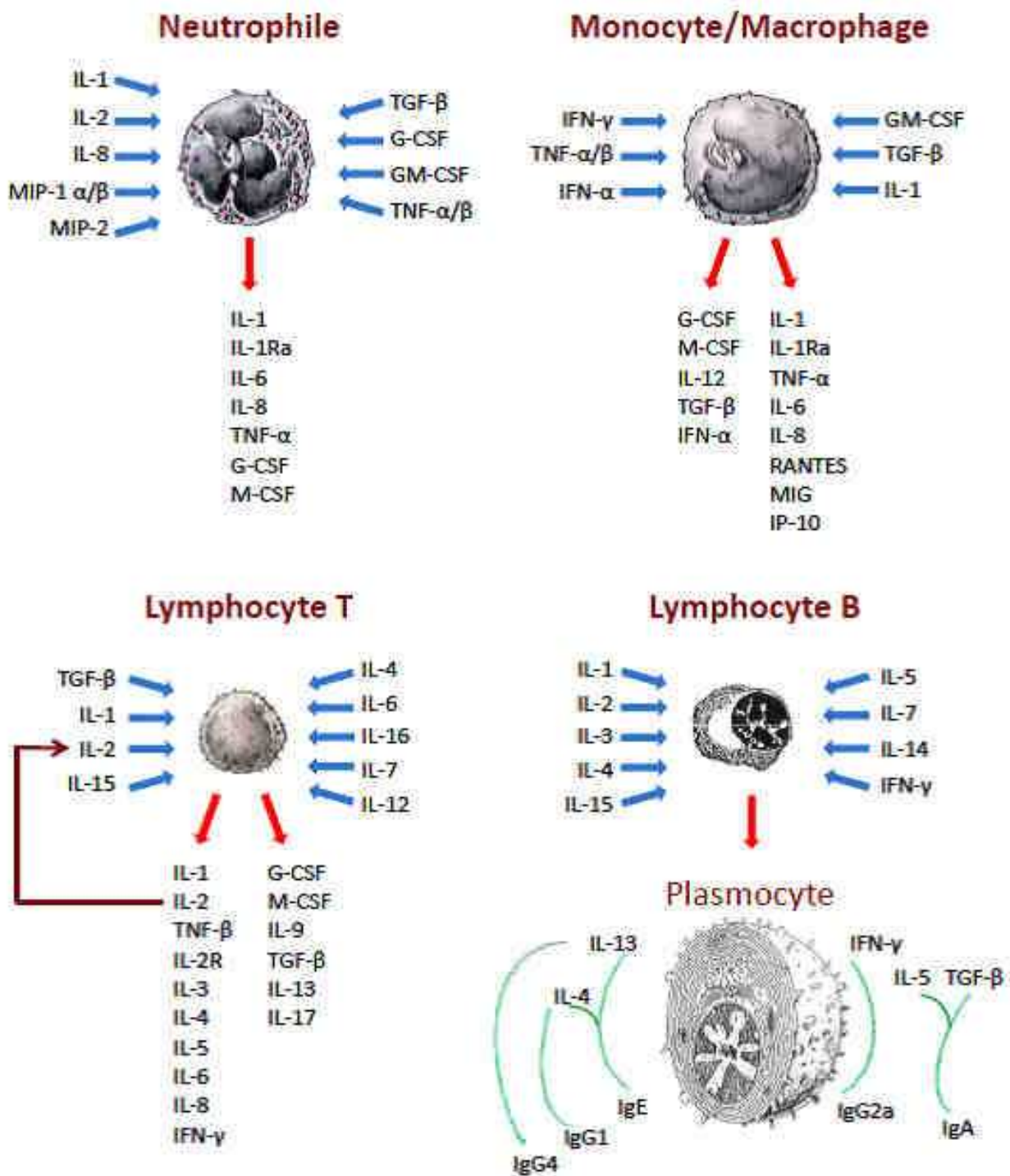


Figure 1.19: Cytokines activant les cellules immunitaires, et produites en réponse à cette activation. Les différents types de leucocytes sont activés en réponse aux cytokines produites localement par les cellules en souffrance comme les cellules immunitaires présentes. Il en résulte la production d'autres cytokines modulant la réponse inflammatoire locale, selon qu'elles soient pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8...) ou anti-inflammatoires (IL-4, IL-13, IFN- γ ...). Après activation, le lymphocyte B se différencie en plasmocyte produisant différentes immunoglobulines en réponse aux cytokines. Adapté de Carol A et al., *Frontiers in Bioscience 2, d12-26, January 1, 1997*

« activement » *in situ* par les cellules agressées ou bien « passivement » par les cellules nécrosées (Rosin and Okusa, 2011). Ainsi, face à une situation anormale continue ou ponctuelle telle que l'hyperglycémie, l'accumulation de complexes immuns ou encore un traitement cytotoxique, les cellules glomérulaires agressées produisent des cytokines/chimiokines alertant le système immunitaire et initiant un processus inflammatoire.

Cette réponse initiale naturelle met en jeu une cascade d'événements cellulaires ordonnés, initiée par l'activation des **cellules endothéliales** qui présentent alors, à leurs surfaces des molécules d'adhérence du type ICAM-1/2 (*InterCellular Adhesion Molecule1/2*), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), ainsi que la P-sélectine et la E-sélectine, attirant les leucocytes circulants (Wagner and Frenette, 2008). Les premiers à être attirés sont les **neutrophiles** polynucléaires et phagocytaires (**Figure 1.13**) qui traversent les parois des vaisseaux par un phénomène de diapédèse. Ils ont une vie courte et s'autodétruisent par nécrose à la fin du processus inflammatoire. Les neutrophiles sont activés par IL-1, IL-2 et IL-8, et sont capables de produire ces mêmes cytokines (Feghali and Wright, 1997). L'activation des neutrophiles a été associée à l'une des pathologies glomérulaires caractérisée par la présence d'auto-anticorps contre les neutrophiles activés : la vascularite à ANCA (*Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody*) (Xiao et al., 2007). Après les neutrophiles, ce sont les **monocytes** qui migrent vers le lieu de l'agression. Suite à leur passage dans les tissus, ils se transforment en **macrophages**. Ils sont pourvus de propriétés phagocytaires et d'un important arsenal de cytokines. Ces cellules portent également les récepteurs TLR (membranaire) et NLR (cytoplasmique) et peuvent présenter les antigènes sur leur surface afin d'activer les lymphocytes T. Les macrophages ne forment pas une population homogène, mais existent sous forme de deux types : les cellules M1 proinflammatoires, activées par IL-1 α / β et IFN γ , produisent un panel de cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) et de chimiokines (RANTES, MIG et IP-10) (Cassetta et al., 2011; Feghali and Wright, 1997) ; les cellules M2, activées par une voie dite alternative via IL-4 et IL-13, ont un rôle homéostatique. Les macrophages sont les cellules immunitaires les plus étudiées dans l'inflammation rénale. Dans un modèle de glomérulonéphrite mésangioproliférative induite chez le rat par injection d'anticorps anti-Thy1.1, le traitement par un antagoniste du récepteur CCR5, récepteur de RANTES présent sur les monocytes (Tableau 2.3.), a conduit à une diminution de l'infiltration des monocytes et à une réduction de la synthèse du collagène IV (Panzer et al., 1999). Dans une étude récente, des rôles distincts des M1/M2 ont été décrits dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez la souris. La déplétion en macrophages avant l'induction du modèle diminuait l'atteinte tubulaire, alors qu'une déplétion 5 jours après l'induction l'aggravait. Les auteurs démontrent que les M1 étaient majoritaires pendant les premières 48 h (phase inflammatoire) et qu'ils étaient remplacés par les M2 au bout de 5 jours (phase de réparation) (Lee et al., 2011). En clinique, les cellules M1/M2 ont par ailleurs été caractérisées dans la néphropathie à dépôts d'IgA chez l'enfant et l'adulte. Les M2 étaient présents chez l'adulte, en particulier dans les zones de fibrose interstitielle et d'expansion mésangiale importante. Chez l'enfant, la présence des macrophages (mais pas les M2) allait de pair avec l'hypercellularité mésangiale (Ikezumi et al., 2011). Les cytokines sécrétées par les macrophages stimulent les cellules résidentes et attirent les **cellules cytotoxiques** (*Natural Killers, NK*), avant la vague finale des **éosinophiles**, pareillement cytotoxiques. Néanmoins, le rôle des NK a été rarement étudié dans les pathologies glomérulaires, en dehors des pathologies survenant après transplantation rénale ou dans le rejet du greffon (Hidalgo et al., 2010)(**Figure 1.13**).

- La réponse inflammatoire peut s'arrêter à ce stade, ou bien induire une réponse immunitaire dite adaptative. Celle-ci est marquée par l'activation et la prolifération des **lymphocytes T auxiliaires** (*T helper cells*) de type Th1, Th2, Th17 et des **cellules T régulatrices** (Treg). Les lymphocytes T sont alertés par les macrophages et les cellules dendritiques présentatrices d'antigène. Ces cellules modulent le type cellulaire final des lymphocytes T auxiliaires. En effet, les M1 sont responsables de la maturation des Th1, également proinflammatoires, en les stimulant par IL-12, le TNF- α ou IFN γ , alors que les M2 participent à la maturation des Th2 suppresseurs des Th1 (Martinez et al., 2009). Les **cellules Th17** constituent un nouveau groupe de lymphocytes T proinflammatoires, activés par IL-23, un hétérodimère (p40/p19) membre de la famille d'IL-12 ; ils produisent IL-17, une cytokine proinflammatoire. De multiples travaux ont mis en évidence la participation des Th1 (CD4) dans l'évolution de la glomérulonéphrite induite par un complexe immun. Ainsi, dans l'étude de Tipping et al. (Tipping et al., 1998), l'absence de cellules CD4 minimise l'atteinte glomérulaire avec une protéinurie quasi absente. Les Th17 ont aussi été accusés d'avoir un rôle délétère dans la glomérulonéphrite induite chez la souris par l'injection de sérum néphrotoxique du mouton. Chez des souris ayant une quantité réduite de Th17 ou déficientes en IL-17, l'atteinte glomérulaire était moins sévère et la protéinurie réduite. De plus, IL-17 augmente l'expression de chimiokines comme MCP-1 et MIP-1 α dans les cellules mésangiales en culture (Paust et al., 2009). Le rôle exact de ces cellules dans les pathologies rénales chez l'homme ne pourra être établi que par des études plus poussées (Tipping and Kitching, 2005).

Les **cellules dendritiques** se trouvent *in situ* dans les tissus ou au niveau des ganglions lymphatiques. Elles se positionnent à l'interface entre les réactions immunitaires innées et adaptatives. Dans le rein, elles sont majoritairement présentes dans les compartiments tubulo-interstitiels et à un moindre degré dans le mésangium (Soos et al., 2006). La déplétion en cellules dendritiques atténue le phénotype pathologique dans divers modèles d'atteinte rénale comme l'ischémie/reperfusion, l'obstruction unilatérale de l'urètre ou encore la néphrite lupique (Hochheiser et al., 2011). En revanche, elle aggrave le phénotype rénal dans un modèle d'agression aiguë induite par le cisplatine (Tadagavadi and Reeves, 2009). Il en est de même dans un modèle de néphrite néphrotoxique, où les cellules dendritiques semblent jouer un rôle protecteur en stimulant l'expression d'IL-10 (Scholz et al., 2008). Leur rôle n'a pas encore été étudié dans la glomérulonéphrite mésangioproliférative.

- Les lymphocytes T activent à leur tour les **lymphocytes B** responsables de l'immunité humorale, activée soit par le contact cellule-cellule avec les lymphocytes T auxiliaires activés, soit par la production de cytokines telles que IL-4 et IL-13 conduisant à leur prolifération et à la sécrétion d'immunoglobulines.

Il est important de noter que toutes les maladies glomérulaires ne sont pas inflammatoires. Ainsi, la glomérulopathie segmentaire et focale, mais également les lésions glomérulaires minimales impliquent l'activation des voies du complément, mais sans générer d'inflammation locale «classique» (Couser, 2012).

Concernant les médiateurs de l'inflammation, je détaillerai plus précisément la famille de l'interleukine-1, du TNF- α et des chimiokines, en lien direct avec mes propres approches expérimentales.

La famille de l'interleukine-1

Les interleukines-1 (IL-1) constituent une famille de onze membres, dont seulement trois, IL-1 α , IL-1 β et IL-1Ra (*IL-1 Receptor antagonist*), ont une expression ubiquitaire. Les deux premiers sont des agonistes alors que l'IL-1Ra est un antagoniste endogène (Boraschi et al., 2011). Ces trois interleukines-1 interagissent avec deux récepteurs, IL-1RI et IL-1RII. L'activation du IL-1RI conduit à sa liaison à un corécepteur IL-1RAcP (*IL-1R Accessory Protein*) et à une signalisation intracellulaire, alors que IL-1RII est capable de lier les trois IL-1, mais sans induire de signal (Sims et al., 1993)(**Figure 1.13**). L'IL-1RII, appelé « *decoy receptor* », fonctionne donc comme un leurre retenant ses ligands et empêchant leur activité sur IL-1RI (Colotta et al., 1994). Les parties extracellulaires des récepteurs IL-1RI et II se trouvent également sous forme soluble dans la circulation (sIL-1RI et II) et servent de tampon pour les IL-1 dans les conditions physiologiques (Arend et al., 1994).

▪ Les trois formes majeures de IL-1, IL-1 β , IL-1 α et IL-1Ra, sont synthétisées en tant que précurseurs.

- **IL-1 β** est clivée par une enzyme spécifique, la ICE (*IL-1 converting enzyme*) appelée aussi caspase-1, avant d'être sécrétée sous forme mature et active (Dinarello, 1998). La biosynthèse d'IL-1 β est intrigante. En effet, la transcription de IL-1 β est inductible par les microbes et leurs produits. Elle est aussi induite par d'autres facteurs comme l'acide rétinoïque qui active la transcription et conduit à une accumulation de l'ARNm de IL-1 β sans que celui-ci n'atteigne sa forme mature et ne soit traduit. Un mécanisme de répression/inhibition semble empêcher la traduction d'IL-1 β (Jarrous and Kaempfer, 1994). De même, l'hypoxie, le composant C5a du complément ou l'adhérence à la surface induisent tous dans les monocytes une large quantité d'ARNm de IL-1 β sans qu'une traduction ne suive. Il y a vraisemblablement une dissociation entre la transcription et la traduction de cette cytokine (Dinarello and Schindler, 1990). En revanche, la stimulation de l'expression d'IL-1 β par elle-même ou par les endotoxines bactériennes accroît sa traduction en protéine (Schindler et al., 1990). Cela semble lié à un mécanisme de stabilisation de son ARNm (Turner et al., 1989), par la prévention de sa déadénylation ou la protection de sa partie 3' riche en résidus AU (Chen et al., 2006).

- Le précurseur d'**IL-1 α** est en revanche actif (Mosley et al., 1987), mais peut également être clivé par une autre protéase associée à la membrane et sensible aux ions de Ca⁺⁺, la calpaïne (Kobayashi et al., 1990). Il est intéressant de noter que IL-1 α reste séquestrée dans la cellule, liée par des groupements myristoyles au feuillet interne de la membrane cellulaire (Stevenson et al., 1993). Elle n'est libérée que si une mort cellulaire survient, ou par l'activation calcique de la calpaïne. La forme non clivée intracellulaire d'IL-1 α peut également être transloquée vers le noyau et agir par voie intracrine, sans avoir besoin du récepteur IL-1RI (Werman et al., 2004).

- **IL-1Ra**, comme IL-1 α , reste dans la cellule confinée à l'appareil de Golgi et doit être clivée avant d'être sécrétée (Andersson et al., 1992). La biologie des IL-1 α / β est finement régulée, non seulement au niveau de la transcription de leurs gènes, mais aussi par la présence d'inhibiteurs endogènes (IL-1Ra, IL-1RII, sIL-1RIet sIL-1RII) ; ces mécanismes sont probablement indispensables pour limiter les puissants effets biologiques de ces cytokines.

- Parmi les **autres membres de la famille IL-1**, IL-1F7b, IL-1F5 et IL-1F11 (ou IL-33) sont exprimées dans le rein (Boraschi et al., 2011). Parmi ces nouvelles cytokines, seule **IL-33** a été étudiée dans le rein, dans un modèle d'atteinte rénale aiguë induite par le cisplatine chez la souris.

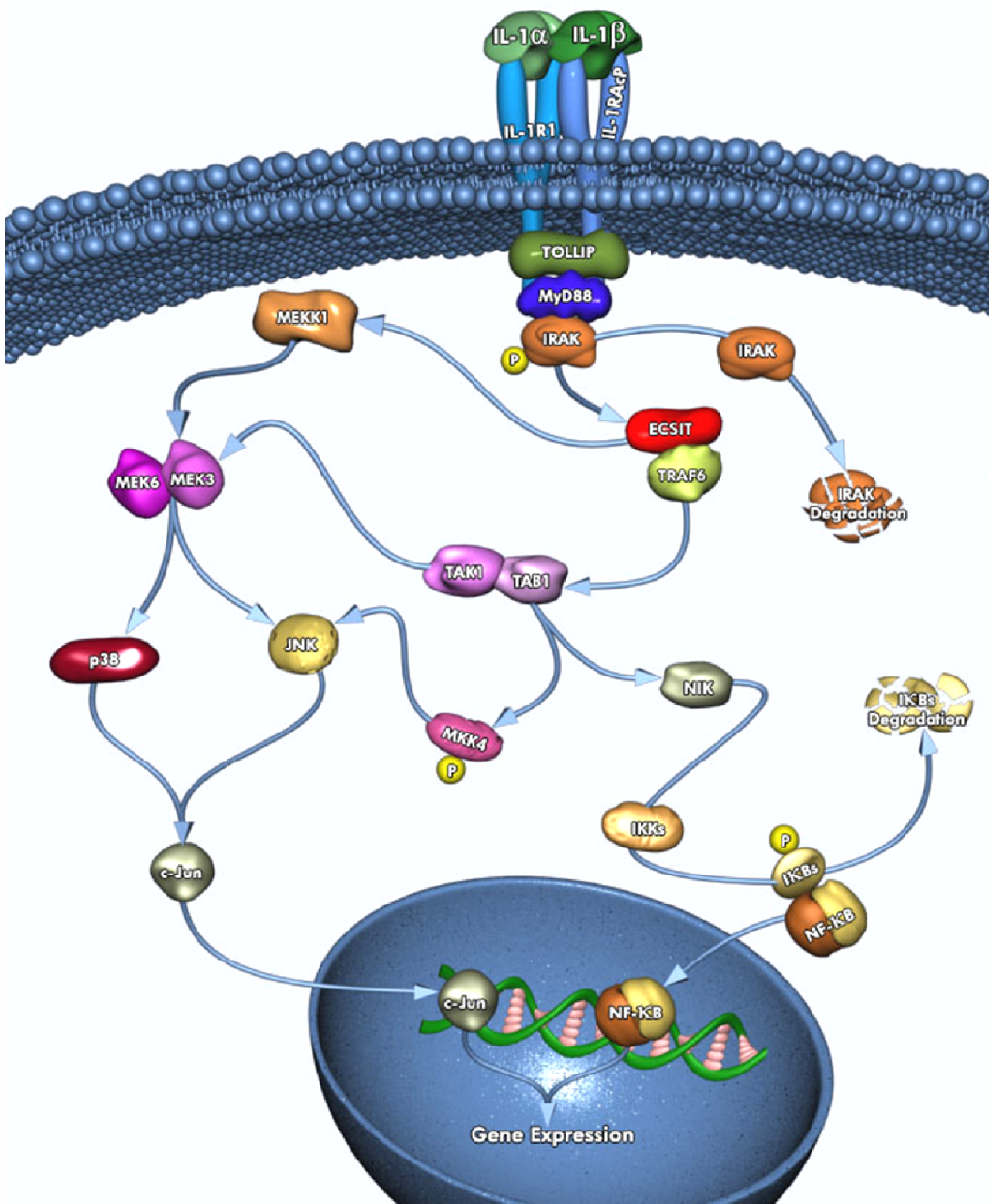


Figure 1.14 : Voie de signalisation de l'interleukine-1 (IL-1). La liaison de IL-1 α ou IL-1 β au récepteur IL-1RI entraîne le recrutement du corécepteur IL-1RAcP puis des protéines adaptatrices MyD88, TOLLIP et IRAK, initiant une cascade de signalisation intracellulaire menant à l'activation de divers facteurs de transcription comme NF- κ B ou c-Jun.

Dans ce modèle, la neutralisation d'IL-33 par la sST2 (protéine de fusion représentant une forme soluble de son récepteur) diminuait l'infiltration des lymphocytes T de type CD4, l'apoptose et la nécrose tubulaire, alors que l'administration d'IL-33 aggravait les symptômes. L'implication des lymphocytes T de type CD4 ainsi que des récepteurs de CXCL1 (CXCR2, **Tableaux 1.5 et 1.6**) dans la pathologie induite par IL-33, a été démontré en utilisant des souris déficientes en lymphocytes CD4 ou en CXCR2, chez qui les effets de IL-33 étaient amoindris (Akca et al., 2011).

- Le récepteur IL-1R ainsi que son corécepteur IL-1RAcP contiennent dans leurs parties cytosoliques des domaines similaires à celui de la protéine Toll retrouvée chez la drosophile. Ces domaines appelés TIR (*Toll-Interleukin-1 Receptor*) sont importants dans la signalisation de IL-1 α/β (**Figure 1.14**). Lors de son activation, IL-1RI forme un hétérodimère avec IL-1RAcP conduisant à un rapprochement de leurs domaines TIR et au recrutement des protéines adaptatrices MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*), IRAK (*IL-1R Associated kinase*) et TRAF6 (*TNFR associated factor 6*) et TOLLIP (Burns et al., 2000). L'ensemble mène à l'activation de diverses voies de signalisation impliquées dans les réponses inflammatoires aiguë et tardive, comme les voies p38/MAPK, NF κ B, AP-1 et JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) (O'Neill, 2008).

- Les effets de IL-1 α et IL-1 β dans les lésions rénales ont été mis en évidence initialement dans un modèle de choc septique induit par l'injection de LPS chez le rat. La neutralisation d'IL-1 β ou du TNF- α a diminué l'albuminurie, le recrutement des neutrophiles et la thrombose capillaire glomérulaire. Cependant la neutralisation d'IL-1 α dans cette même étude était sans effet (Karkar et al., 1992). Il a été démontré par la suite qu'après traitement par le LPS, IL-1 α agissait plus au niveau de la médulla rénale qu'au niveau du cortex, et favorisait la migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques (Roake et al., 1995). Dans une autre étude, une augmentation des taux sériques (mais pas locaux) d'IL-1 α a été notée (Lowell and Berton, 1998). Dans un modèle de néphropathie anti-MBG, l'expression d'IL-1 α était majorée mais seulement en terme d'ARNm (Lakkis et al., 1996).

- L'inflammasome. Des études récentes ont montré un nouveau mécanisme mis en œuvre dans le clivage d'IL-1 β en réponse à certains stimuli impliquant l'immunité innée, par l'activation d'un complexe protéique nommé inflammasome. L'inflammasome sert de support protéolytique activateur de la caspase-1. Il est constitué de récepteurs cytoplasmiques de la famille des NLRs (*Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*). Il existe 22 NLRs chez l'homme et 35 chez la souris. Parmi ces protéines, les 14 membres des NLRP (*NLR-Leucine-rich and pyrin domain-containing*) sont les mieux caractérisés, et les NLRP1 et 3 sont les plus étudiés (Anders and Muruve, 2011). L'inflammasome est activé en réponse à des facteurs PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular patterns*), l'adénosine triphosphate extracellulaire, des cristaux divers (acide urique, silice) et les ROS (Hoffman and Wanderer, 2010). L'activation de la NLRP3 par les PAMPs conduit à un changement de sa conformation, puis à la formation de complexes avec une protéine chaperonne l'ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) qui va recruter la caspase-1. Cette étape est suivie par la trimérisation du complexe formé et la libération, dans le cytoplasme, de la caspase-1 active. Elle clive alors la pro-IL-1 β (et IL-18) et génère une forme active de 17 kDa. Tous les membres de la sous-famille des NLRP sont exprimés dans le rein humain et dans celui de souris (Anders and Muruve, 2011). Une surexpression de NLRP3, ASC et de la caspase-1, associée à une augmentation sérique et urinaire de IL-1 β et IL-18, a été récemment trouvée dans un modèle de néphropathie diabétique de type-1 induite chez le rat par la streptozotocine (Wang et al., 2011). Des résultats similaires ont également été rapportés dans un modèle d'atteinte rénale induite par l'hyperlipidémie et l'hyperuricémie chez

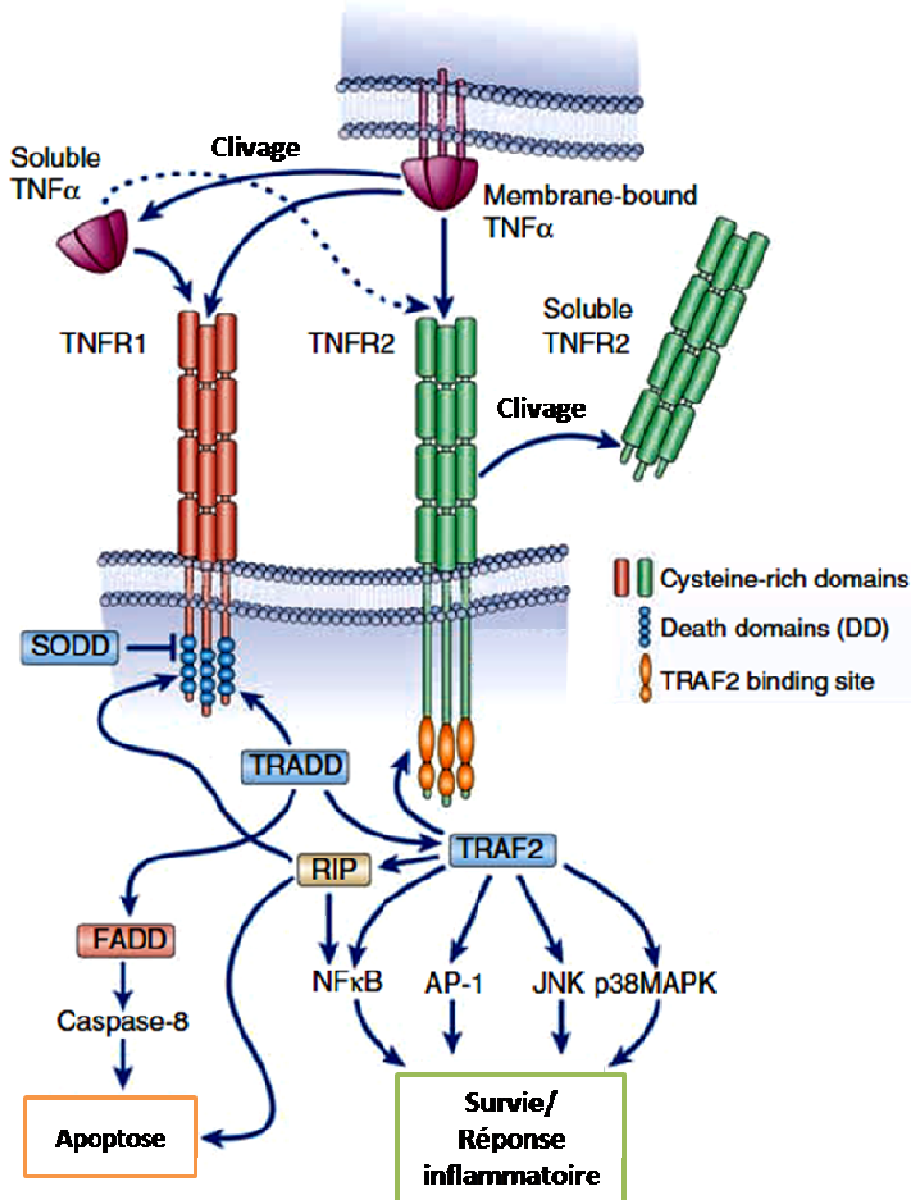


Figure 1.15 : Voie de signalisation de TNFα. Le TNF-α est exprimé à la surface extra-membranaire et peut être clivé par une enzyme, ADAM-17, pour obtenir une forme soluble. Le TNF-α, soluble ou lié à la membrane, peut se lier au récepteur TNFR1, alors que le TNFR2 ne lie que la forme non clivée. Les voies de signalisation de ces deux récepteurs se recoupent. L'activation de TNFR1 conduit à l'apoptose par le découvrage des domaines de mort et le recrutement des protéines TRADD et FADD, puis l'activation des caspases. L'activation de TNFR2 permet le recrutement de TRAF2 et l'activation de diverses voies de signalisation impliquées dans l'inflammation et la survie cellulaire (NF-κB, p38-MAPK...). Cependant l'activation de TNFR1 peut également mener au recrutement de TRAF2 *via* la protéine adaptatrice TRADD, et le TNFR2 peut induire l'apoptose *via* les protéines TRAF2 et RIP. D'après Thomas Hernandez and Tanya N. Mayadas, *Kidney International* (2009) 76, 262–276

le rat (par l'ingestion continue du fructose) (Hu et al., 2012), mais sans qu'un lien entre la NLRP3 et les taux sériques d'IL-1 β ne puisse être clairement établi. En revanche, l'inflammasome joue un rôle dans un modèle d'obstruction unilatérale de l'uretère chez la souris. Des souris NLRP3^{-/-} développent une atteinte rénale moins marquée, avec une infiltration des macrophages et une expression de MCP-1 amoindries à partir de J7. L'expression de la NLRP3 était majorée chez les souris contrôles, avec une hausse des formes clivées actives de la caspase-1, de IL-1 β et de IL-18, alors que ces formes étaient quasi absentes chez la souris NLRP3^{-/-} (Vilaysane et al., 2010). L'analyse des échantillons rénaux provenant de patients atteints de diverses néphropathies non diabétiques a également montré une surexpression de la NLRP3 dans les glomérulonéphrites (Vilaysane et al., 2010).

L'implication des IL-1 dans la pathologie glomérulaire semble cependant pouvoir être dissocié de l'inflammasome. Ainsi dans la glomérulonéphrite membranoproliférative induite par un anticorps anti-MBG, les phénotypes rénaux étaient identiques chez des souris déficientes en ASC, caspase-1 ou NLRP3, à l'exception d'une augmentation de l'urée sanguine dans le dernier groupe (Lichtnekert et al., 2011). En revanche, les souris déficientes en IL-1RI étaient protégées contre les lésions segmentaires glomérulaires et contre l'atrophie tubulaire, montrant par là un rôle d'IL-1 β dans la pathologie. De plus, l'absence de la protéine MyD88, requise pour la signalisation d'IL-1 β , diminuait la prolifération mésangiale, la synthèse de la matrice glomérulaire et la nécrose segmentaire. Les auteurs montrent aussi que les cellules glomérulaires ne produisent pas d'IL-1 β mature, mais que cette forme est sécrétée par les cellules dendritiques glomérulaires *via* l'activation de la caspase-1 (Lichtnekert et al., 2011). Dans cette étude, les auteurs ne se sont pas intéressés au rôle d'IL-1 α dans la glomérulonéphrite, l'autre ligand du IL-1RI. D'autres études suggèrent cependant que IL-1 α active le système de complément et la réponse immunitaire systémique, sans affecter des mécanismes locaux intrarénaux (Timoshanko et al., 2004).

Le TNF- α

▪ Le TNF- α et ses récepteurs. Le TNF- α est un homo-trimère transmembranaire fonctionnel de 26 kDa (Kriegler et al., 1988). Il peut être clivé par une métalloprotéase spécifique, ADAM-17 (*TNF- α -converting enzyme*), pour générer une forme soluble de 17 kDa (Black et al., 1997). Deux récepteurs du TNF- α sont connus, le TNFR1 et TNFR2 (**Figure 1.15**). Ces récepteurs sont caractérisés par leurs domaines extracellulaires riches en cystéine. Ils forment, comme le TNF- α , des homo-trimères. Les TNFR1 et TNFR2 partagent 28% d'homologie et sont dépourvus de domaines catalytiques dans leurs parties intracellulaires (MacEwan, 2002). Ces deux récepteurs ont une distribution distincte, le **TNFR1** semble exprimé dans tous les tissus, alors que le **TNFR2** est restreint aux cellules hématopoïétiques. Seul le TNFR1 contient un domaine **DD** (*death domain*). Ce domaine est masqué par la protéine SODD (*silencer of DD*). Lors de la fixation du TNF- α sur son récepteur TNFR1, **SODD** se libère et permet le déclenchement de la cascade des caspases et l'induction de l'apoptose. De manière intéressante, TNFR1 et TNFR2 peuvent interagir avec la protéine adaptatrice **TRAF2** (*TNF receptor-associated factor 2*) et activer diverses voies de signalisation (NF κ B, c-jun, JNK, p38-MAPK) qui ont un rôle dans la survie et l'inflammation (Hehlgans and Pfeffer, 2005). Cette interaction est directe pour le TNFR2 alors qu'elle nécessite le recrutement d'une tierce protéine **TRADD** (*TNFR1-Associated DD*) par le domaine DD du TNFR1. L'activation du TNFR2 induit ainsi l'apoptose de manière indépendante du DD, *via* une interaction TNFR2-TRAF2-RIP, alors que l'activation du TNFR1 met en jeu TNFR1-TRADD-FADD (*Fas-Associated protein with DD*) (Depuydt et al., 2005).

Contrairement au TNFR1, le TNFR2 n'interagit qu'avec la forme transmembranaire de TNF- α , suggérant un rôle de celui-ci dans l'interaction cellule-cellule (Grell et al., 1995). Enfin, les deux récepteurs TNFR1 et 2 peuvent être clivés par ADAM-17 et libérés dans la circulation en tant que protéines solubles. Ils pourront alors interagir avec le TNF- α et limiter son action (Bell et al., 2007).

- Rôle proinflammatoire du TNF- α . Dans le rein normal, le TNF- α ainsi que son récepteur TNFR2 ne sont pas détectables alors que le TNFR1 est exprimé dans le glomérule (Al-Lamki et al., 2001). Le TNF- α a été largement impliqué dans les glomérulopathies. Son expression, ainsi que celle de ses

deux récepteurs est augmentée dans la glomérulonéphrite mésangioproliférative chez l'homme (Wu et al., 1996a) et dans des modèles expérimentaux de glomérulonéphrite (Camussi et al., 1990). Le rôle proinflammatoire du TNF- α a été largement démontré dans des études où le blocage de ses actions a montré une amélioration du phénotype rénal, avec une diminution de la protéinurie, de l'infiltration des lymphocytes T, de l'expression de chimiokines comme MCP-1, RANTES et ICAM (Chen et al., 2004). Il a été aussi montré que l'activation de NF κ B était la voie majeure induite par le TNF- α dans les cellules glomérulaires *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'inhibition de l'interaction de NF κ B avec la région promotrice de ses gènes cibles diminuait l'expression des chimiokines (MCP-1, RANTES, ICAM), ainsi que celle de IL-1 α , IL-1 β et VCAM-1 (Tomita et al., 2001). Il est intéressant de noter que les cellules glomérulaires constituent la source principale du TNF- α et non pas les leucocytes infiltrés, comme cela a été montré dans l'élégante étude de Timoshanko et al. (Timoshanko et al., 2003). Une greffe de moelle osseuse a été réalisée entre des souris déficientes en TNF- α et des souris contrôles, avant d'induire une glomérulonéphrite membranoproliférative. Les souris déficientes en TNF- α , greffées ou non par la moelle osseuse des souris contrôles, étaient protégées et montraient une atteinte moins importante que les souris contrôles ou celles greffées avec la moelle osseuse des souris déficientes en TNF- α . Par ailleurs, des études sur des souris déficientes en TNFR1 ou 2 ont montré l'importance du TNFR2 dans le développement d'une glomérulonéphrite. En effet, l'absence du TNFR1 a conduit à une atteinte rénale tardive mais de même ampleur que celle produite chez les souris contrôles, alors que l'absence du TNFR2 a préservé le rein (Vielhauer et al., 2005).

- Néanmoins, le TNF- α est un régulateur important de l'immunité, innée et acquise, et exerce des effets protecteurs en activant les voies de survie (Ernandez and Mayadas, 2009). Ses effets délétères doivent donc être nuancés. En effet, le traitement de certaines maladies auto-immunes (maladie de Crohn, arthrite rhumatoïde, spondylite ankylosante) par un récepteur soluble de TNF- α ou des anticorps neutralisants, a conduit à l'apparition de glomérulopathies dans une proportion de patients de plus en plus importante (Gupta et al., 2010; Kaneko et al., 2010; Kaushik et al., 2011), avec quelquefois une évolution vers une insuffisance rénale nécessitant la dialyse (Chen et al., 2009). Le TNF- α est un immunosuppresseur et son absence s'accompagne de l'émergence des maladies auto-immunes dans le système nerveux central (Liu et al., 1998). Le TNF- α est nécessaire à l'homéostasie des lymphocytes T (Kontoyiannis and Kollias, 2000) et B (Lens et al., 1996), mais aussi pour l'activation des facteurs C1q et l'amyloïde P sérique dont l'absence induit une néphrite lupique (Botto et al., 1998).

Les chimiokines

La migration des cellules immunitaires vers les sites d'inflammation est chorégraphiée par divers facteurs chimio-attractants lipidiques (LTB₄, PGD₂) (Sadik and Luster, 2011), des fragments de protéines sériques (C5a) (DiScipio et al., 1999), des protéines tissulaires (peptides issues du collagène) (Gaggar et al., 2008) ou encore par les chimiokines.

- Les chimiokines sont un groupe de cytokines de faible poids moléculaire (entre 8 et 17 kDa) sécrétées par les tissus lésés ou les cellules immunitaires, ayant pour fonction de guider ces cellules vers les sites d'inflammation. Les chimiokines possèdent quatre résidus cystéines conservés dans leurs parties amino-terminales, reliés par des ponts bisulfides. L'espacement entre ces résidus a permis de les classer en quatre sous-groupes (CC, CXC, XC, CX₃C), X étant un acide aminé quelconque. On attribue la lettre **L** aux ligands et **R** aux récepteurs (**Tableau 1.5**). Cette classification comporte également un aspect fonctionnel, puisque les ligands d'une famille sont seulement capables d'activer les récepteurs de cette même famille. Cependant, un récepteur peut lier plusieurs ligands et un ligand peut interagir avec plusieurs récepteurs (**Figure 1.16, Tableau 1.5 et 1.6**).
- Les récepteurs des chimiokines font partie des récepteurs couplés aux protéines G et sont exprimés de manière distincte sur les différents types de cellules immunitaires et autres (**Tableau 1.6**) (Chung and Lan, 2011).
 - Les **neutrophiles** sont en général activés par les ligands **CXCL** qui stimulent les récepteurs **CXCR1/2** ;
 - les **monocytes** sont attirés par les **CCL** liant les récepteurs **CCR1/2** ;
 - les **Th1** et **NK** portent sur leur surface les récepteurs **CCR5**, **CXCR3/6** et **CX₃CR1** et sont donc guidés par les ligands de ceux-ci ;
 - les cellules **Th2** et les **éosinophiles** répondent aux signaux émis par les ligands des récepteurs **CCR3/4/8** ;
 - enfin, les **cellules dendritiques** expriment les **CCR4/6/7** et **8**.

Les cellules rénales (CM, podocytes et cellules endothéliales) expriment également certains de ces récepteurs (**Tableau 1.6**). Il est important de noter que les chimiokines, tout comme les cytokines, entretiennent une fonction homéostatique à côté de leur rôle dans l'inflammation. Certaines d'entre elles sont impliquées dans le processus de « *homing* » des lymphocytes vers les ganglions lymphatiques (Moore, 2002).

- Les chimiokines ont été largement impliquées dans les pathologies rénales, d'une part en fournissant des signaux chimiotactiques aux cellules de l'inflammation, et d'autre part en agissant directement sur les cellules rénales résidentes exprimant leurs récepteurs. Certaines ont été corrélées avec l'initiation et l'évolution de ces maladies à l'image d'IL-8, retrouvée dans l'urine des **patients** dans la phase aiguë de néphropathie à IgA et associée à l'hématurie, ou encore le MCP-1, excrété plus abondamment dans l'urine des patients en phase chronique et corrélé à une prolifération mésangiale et à une infiltration leucocytaire interstitielle plus importantes (Yokoyama et al., 1998). RANTES et son récepteur CCR5 suivent aussi le même schéma observé pour le MCP-1 dans cette maladie (Wagrowska-Danilewicz et al., 2005). La protéinurie seule semble être responsable d'une surexpression rénale de RANTES et MCP-1 chez l'homme dans les lésions glomérulaires minimales et la glomérulopathie focale et segmentaire, bien que ces pathologies ne soient pas réellement inflammatoires (Brabcova et al., 2007).

Tableau 1.5 : Tableaux de correspondances entre le nom commun des chimiokines, leur nomenclature systématique et leur(s) récepteur(s).

Ligand		Receptors	Function	Ligand		Receptors	Function
CCL1	I-309	CCR8	i	CXCL1	Gro α	CXCR1,2	i
CCL2	MCP-1	CCR2	i	CXCL2	Gro β		i
CCL3	MIP-1 α	CCR1,5	i	CXCL3	Groy		i
CCL4	MIP-1 β	CCR5	i	CXCL4	PF4	CXCR1,2	i
CCL5	RANTES	CCR1,3,5	i	CXCL5	ENA-78	CXCR2	i
CCL7	MCP-3	CCR1,2	i	CXCL6	GCP-2	CXCR1,2	i
CCL8	MCP-2	CCR1,2,5	i	CXCL7	NAP-2	CXCR2	i
CCL11	Eotaxin	CCR3	i	CXCL8	IL-8	CXCR1,2	i
CCL13	MCP-4	CCR1,2,3	i	CXCL9	Mig	CXCR3	i
CCL14	HCC-1	CCR1	i	CXCL10	IP-10	CXCR3	i
CCL15	HCC-2	CCR1	i	CXCL11	I-TAC	CXCR3	
CCL16	HCC-4	CCR1,8	i	CXCL12	SDF-1	CXCR4	h
CCL17	TARC	CCR4	i	CXCL13	BCA-1	CXCR5	
CCL18	DC-CK1			CXCL14	Bolequine		
CCL19	ELC	CCR7	h	CXCL15	Lungkine		h
CCL20	LARC	CCR6					
CCL21	SLC/6Ckine	CCR7	h	XCL			
CCL22	MDC	CCR4	i	XCL1	lymphotactin	XCR1	i
CCL23	MPIF-1	CCR1		XCL2	SCM-1 β		i
CCL24	Eotaxin-2	CCR3	i				
CCL25	TECK	CCR9	i				
CCL26	Eotaxin-3	CCR3	i	CX ₂ CL			
CCL27	CTAK/Eskine	CCR10		CX ₂ CL1	Fractalkine	CX ₂ CR1	h,j

Abbreviations are: h, homeostatic, i, inflammatory.

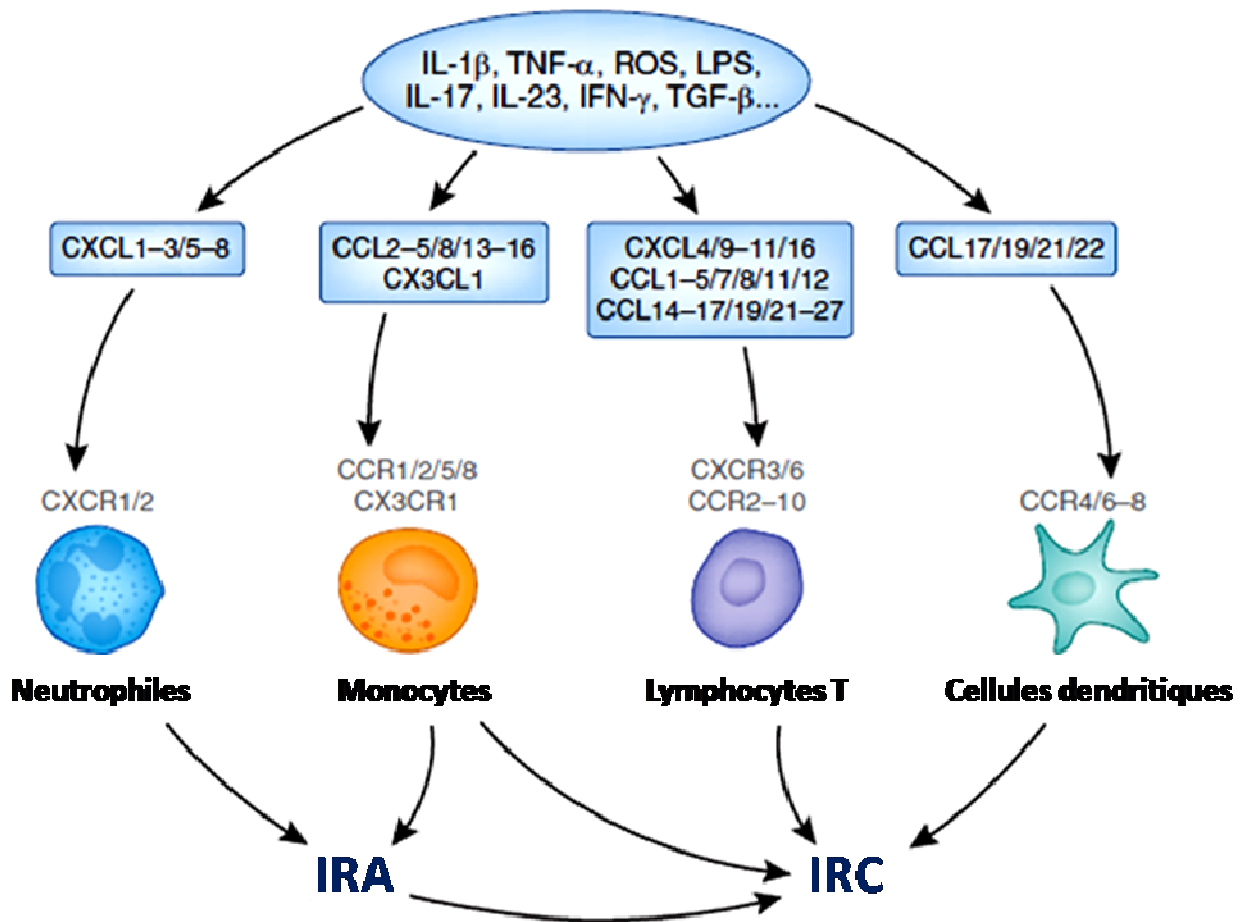


Figure 1.16 : Implication des cytokines et cellules immunitaires dans l'évolution des maladies rénales. L'expression locale de cytokines (IL-1 β , TNF- α ...) en réponse à une atteinte tissulaire conduit à la production de molécules chemo-attractantes, les chimiokines, permettant l'infiltration des différents types de leucocytes. Dans un premier temps (insuffisance rénale aigue, IRA), les neutrophiles et les monocytes/macrophages sont attirés respectivement par les ligands de types CXC (CXCL1,2,3,5,6,7 et 8) et CC/CX3CL (CCL2,3,4,5,8,13,14,15,16 et CX3CL1). Par la suite, avec la persistance du contexte inflammatoire, les lymphocytes T et les cellules dendritiques sont attirés par des molécules de types CC et CXC, signant alors l'évolution vers une insuffisance rénale chronique (IRC). D'après Arthur C. K. Chung and Hui Y. Lan, *J Am Soc Nephrol* 22: 802-809, 2011

Tableau 1.6 : Récepteurs des chimiokines exprimés sur les cellules immunitaires et glomérulaires et leurs ligands potentiels.

Cellules	Récepteurs	Chimiokines (Ligands)
<i>Neutrophiles</i>	CXCR1	IL-8, GCP-2(CXCL6)
	CXCR2	IL-8, GCP-2(CXCL6), GRO $\alpha/\beta/\gamma$, CXCL7
<i>Monocytes</i>	CCR1	MCP-3/4, MIP-1 α , RANTES, HCC1/2/3
	CCR2	MCP-1/2/3/4
	CCR5	MIP-1 α/β , RANTES
	CCR8	1-309 (CCL1)
	CX3CR1	Fractalkine
<i>Lymphocytes T (type Th1) & NK</i>	CXCR3	IP-10 (CXCL10), MIG, I-TAC
	CXCR6	CXCL16
	CCR5	MIP-1 α/β , RANTES
	CX3CR1	fractalkine
<i>Lymphocytes T (type Th2) & Eosinophiles</i>	CCR3	RANTES, Eotaxin1/2/3, HCC1/2/3
	CCR4	MCP-1, TARC (CCL17), MDC
	CCR8	1-309 (CCL1)
<i>Cellules dendritiques</i>	CCR4	MCP-1, TARC (CCL17), MDC
	CCR6	MIP-3 α
	CCR7	ELC (CCL19), SLC (CCL21)
	CCR8	1-309 (CCL1)
<i>Cellules mésangiales</i>	CCR2 (Inductible)	MCP-1/2/3/4
	CXCR3	IP-10 (CXCL10), MIG, I-TAC
	CXCR2 (inductible)	IL-8, GCP-2(CXCL6), GRO α/β (MIP-2)/ γ , CXCL7
	CCR1 (inductible)	MCP-3/4, MIP-1 α , RANTES , HCC1/2/3
	CCR7	ELC (CCL19), SLC (CCL21)

Tableau 1.4 : Récepteurs des chimiokines exprimés sur les cellules immunitaires et glomérulaires et leurs ligands potentiels.

<i>Podocytes</i>	CCR4	MCP-1, TARC (CCL17), MDC
	CCR8	1-309 (CCL1)
	CCR9	TECK
	CCR10	CTAK, MEC
	CXCR1	IL-8, GCP-2(cxcl6)
	CXCR3	IP-10 (CXCL10), MIG, I-TAC
	CXCR4	SDF-1 α/β
	CXCR5	BCA-1
<i>Cellules endothéliales glomérulaires</i>	CXCR2	IL-8, GCP-2(CXCL6), GRO $\alpha/\beta/\gamma$, CXCL7
	CCR6	MIP-3 α
	CX3CR	IP-10 (CXCL10), MIG, I-TAC

MCP: Monocyte-chemoattractantprotein; **GCP-2:** Granulocyte-chemotactic protein-2; **GRO:** Growth-related oncogen; **MIP:** Macrophage inflammatory protein; **IP-10:** IFN γ -induced protein-10; **RANTES:** Regulated upon activation normal T-cells expressed and secreted; **Eotaxin:** Eosinophil chemotactic protein; **HCC:** Hemofiltrate CC chemokine; **TARC:** Thymus and activation-regulated chemokine; **MDC:** Macrophage-derived chemokine, **ELC:** EBI1 ligand chemokine; **SLC:** secondary lymphoid-tissue chemokine; **MIG:** Modnokine induced by IFN γ ; **SDF:** Stromal-cell derived factor; **TECK:** Thymus expressed chemokine; **BCA:** B-cells attracting chemokine; **KC:** Keratinocytes-chemoattractant

REMARQUES : le tableau nous renseigne sur certaines caractéristiques des chimiokines. ❶ aucune chimiokine n'est capable d'attirer toutes les cellules immunitaires, ❷ certaines chimiokines, comme MCP-1 et RANTES, attirent plusieurs cellules immunes, suggérant que la régulation de l'expression spatiotemporelle de ces chimiokines peut moduler la réponse immune suscitée, ❸ les cellules glomérulaires expriment divers récepteurs des chimiokines ce qui signifie que le rôle des chimiokines dans le rein dépasse le phénomène de migration, au moins pour les cellules résidentes (il n'y a pas de données sur les cellules épithéliales pariétales à ce jour).

Le rôle des chimiokines dans l'évolution et la gravité des lésions rénales a pu être établi à l'aide de modèles expérimentaux de pathologies glomérulaires. Les résultats montrent que leur contribution est largement dépendante du contexte étiologique, de leur expression spatiotemporelle et, fonctionnellement, de l'inhibition ou de l'activation de l'un ou de l'autre des récepteurs. Dans un modèle de **glomérulonéphrite à ANCA** induite chez la souris par injection d'anti-myeloperoxidase/LPS, une expression distincte des chimiokines et de leurs récepteurs a été observée dans le rein, avec une augmentation plus importante dans les glomérules que dans les compartiments tubulointerstitiels. Le CXCR2 (récepteur exprimé par les neutrophiles) a été majoré à J1 pendant la phase aiguë, puis normalisé à J7, les taux de son ligand (MIP-2) dans la circulation étaient plus élevés à J7. Les récepteurs CCR2/5 et 8 (présents à la surface des monocytes) étaient, en revanche, surexprimés dans les glomérules plus tardivement à partir de J7. Ceci témoigne d'une régulation temporelle coordonnée de ces facteurs (van der Veen et al., 2009). Dans un modèle de **glomérulonéphrite mésangioproliférative** induite par l'injection d'apoferritine équine, l'albuminurie, l'infiltration des macrophages ainsi que la prolifération mésangiale ont été remarquées durant les deux premières semaines de la pathologie, avec un pic à J14, et diminuaient progressivement jusqu'à la résolution après 4 semaines. La première semaine était caractérisée par l'augmentation des chimiokines RANTES et MCP-1 parallèlement à celle de leurs récepteurs CCR1/2 et 5. Cette augmentation était prédominante dans le glomérule au niveau des cellules endothéliales, des CM et des macrophages infiltrés, mais était absente des podocytes. L'expression de ces chimiokines et de leurs récepteurs était normalisée à J14 coïncidant avec le pic de l'atteinte pathologique. Les auteurs expliquent cette cinétique par la mise en place d'un mécanisme d'autorégulation visant à ne pas induire de cercle vicieux, mais au contraire à favoriser la cicatrisation (Anders et al., 2001). Dans une autre étude, les auteurs ont utilisé des antagonistes du CCR5 (s'opposant à RANTES, MIP-1 α et β) afin d'en analyser l'aspect fonctionnel. L'injection de ces antagonistes a réduit de 50% le nombre de macrophages glomérulaires et a atténué la prolifération mésangiale. Elle a aussi conduit à un changement morphologique des macrophages, avec aggravation du phénotype glomérulaire (mesangiolyse et obstruction capillaire) et augmentation de la protéinurie. Ceci était lié à une activité accrue d'iNOS et un défaut d'élimination des corps apoptotiques par phagocytose (Anders et al., 2003a).

- Dans le rein, l'expression de chimiokines et de leurs récepteurs est induite par divers stimuli comme le TNF- α , et l'IFN γ et IL-1 β , principalement *via* l'activation du facteur de transcription **NF κ B** (Walpen et al., 2001). Le stress oxydatif, l'AngII et l'activation des smad2/3 par le TGF- β comptent aussi parmi les stimulateurs de l'expression de ces facteurs dans la néphropathie diabétique (Navarro-Gonzalez et al., 2011). Les facteurs de croissance comme le PDGF ou le bFGF, ainsi que l'accumulation des immunoglobines, peuvent à leur tour lancer des signaux chimiotactiques vers diverses cellules immunitaires à travers l'induction de chimiokines (Chung and Lan, 2011).
- Redondance des activités des divers systèmes chimiokine/récepteur et double rôle. Aucun système particulier n'a été accusé d'avoir un rôle prépondérant dans l'une ou l'autre pathologie rénale, ou pour le moins, ce système a échappé à mes recherches bibliographiques. Ceci peut se comprendre puisque plusieurs récepteurs sont exprimés à la surface des cellules immunitaires, que ces récepteurs peuvent être stimulés par plusieurs ligands, suggérant une redondance dans leur activité (Mantovani, 1999). Ainsi, l'antagonisme d'un des récepteurs ou le blocage d'un ligand (ou d'un groupe de ligands) n'était pas suffisant pour bloquer totalement l'infiltration des cellules (Anders et al., 2003a). De surcroît, l'activation d'un récepteur semble jouer un rôle double : la

déficiences en CCR1, effectuées par manipulation génétique chez la souris, a amoindri, dans un modèle de néphropathie néphrotoxique, le nombre de macrophages et de cellules T infiltrés au niveau du glomérule, tout en aggravant l'histopathologie rénale et la protéinurie (Topham et al., 1999). De même, dans le même modèle, l'absence du CCR2 a abaissée la protéinurie à J1 mais a aggravé l'atteinte rénale à J7 (Bird et al., 2000).

Finalement, l'inflammation est un processus homéostatique visant à limiter une action nocive, mais la nature, la durée, le lieu et la persistance de cette action sont à l'origine d'une réponse qui ferait plus ou moins de dégâts «collatéraux».

La cyclooxygénase dans les glomérulopathies

- Les isoformes de la cyclooxygénase. La cyclooxygénase (Cox) est l'enzyme limitant, responsable de la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. **Trois isoformes de la Cox** sont connues : la Cox-1, exprimée de manière constitutive, la Cox-2 qui est inductible et la Cox-3, issue de l'épissage alternatif de l'ARNm de la Cox-1, exprimée plus particulièrement dans le système nerveux central (Shaftel et al., 2003). Les Cox-1/2 sont exprimées distinctement dans le rein (**Figure 1.17**) avec une présence de la Cox-1 dans l'arbre vasculaire rénal et le canal collecteur, alors que la Cox-2 est présente de manière constitutive dans la branche corticale ascendante de l'anse de Henlé et la macula densa, ainsi que dans les cellules interstitielles médullaires (Breyer and Harris, 2001). La Cox-1 est connue comme une enzyme « domestique » entretenant une fonction homéostatique, alors que la Cox-2 est surtout connue pour être surexprimée dans les conditions inflammatoires, comme gène cible la NFκB. C'est cet aspect qui nous intéresse surtout ici.
- Au niveau rénal, le rôle de la Cox-2 dépend largement du contexte et des prostaglandines dominantes. **Durant la néphrogenèse,** la délétion de la Cox-2 par manipulation génétique chez la souris conduit à des lésions spécifiques rénales, cardiaques et ovariennes. Les lésions rénales se manifestent après la naissance (la néphrogenèse continue chez les rongeurs après la naissance et pendant la période d'allaitement) par un sous-développement cortical, avec un nombre limité de néphrons fonctionnels, de nombreux glomérules immatures de petite taille dans la région sous-corticale et une dysplasie tubulaire dans le compartiment cortico-médullaire. Ce tableau conduit à une insuffisance rénale marquée (Dinchuk et al., 1995). Les souris *knockout* de la Cox-1 n'ont, en revanche, aucune lésion rénale, suggérant un rôle prépondérant de la Cox-2 dans la néphrogenèse (Langenbach et al., 1995).
- Un rôle délétère des Cox dans les pathologies rénales. L'expression de la Cox-2 est majorée dans les reins de **patients** avec une glomérulonéphrite lupique (Tomasoni et al., 1998). Un rôle délétère des Cox a été récemment décrit dans un **modèle d'ischémie/reperfusion**. Le traitement des animaux par l'indométacine a montré une amélioration des paramètres fonctionnels rénaux et a amoindri l'atrophie tubulaire. L'expression de facteurs pro-inflammatoires rénaux était abaissée (TNF-α, IL-1β, ROS, IL-12p70, la forme active de IL-12) ainsi que celle de facteurs sériques (IFNγ, TNF-α) (Feitoza et al., 2009). Dans un modèle de **choc septique** induit chez des souris WT contrôles et transgéniques surexprimant la prostacycline synthase (PGIS), des résultats opposés protecteurs ou délétères ont été observés en lien avec le niveau de PGI₂. Chez la souris WT, l'injection d'une faible dose de LPS conduisait à une importante synthèse de PGI₂ sans affecter le débit de filtration glomérulaire, mais l'inhibition des Cox par l'indométacine réversait ces effets et menait à une insuffisance rénale aiguë.

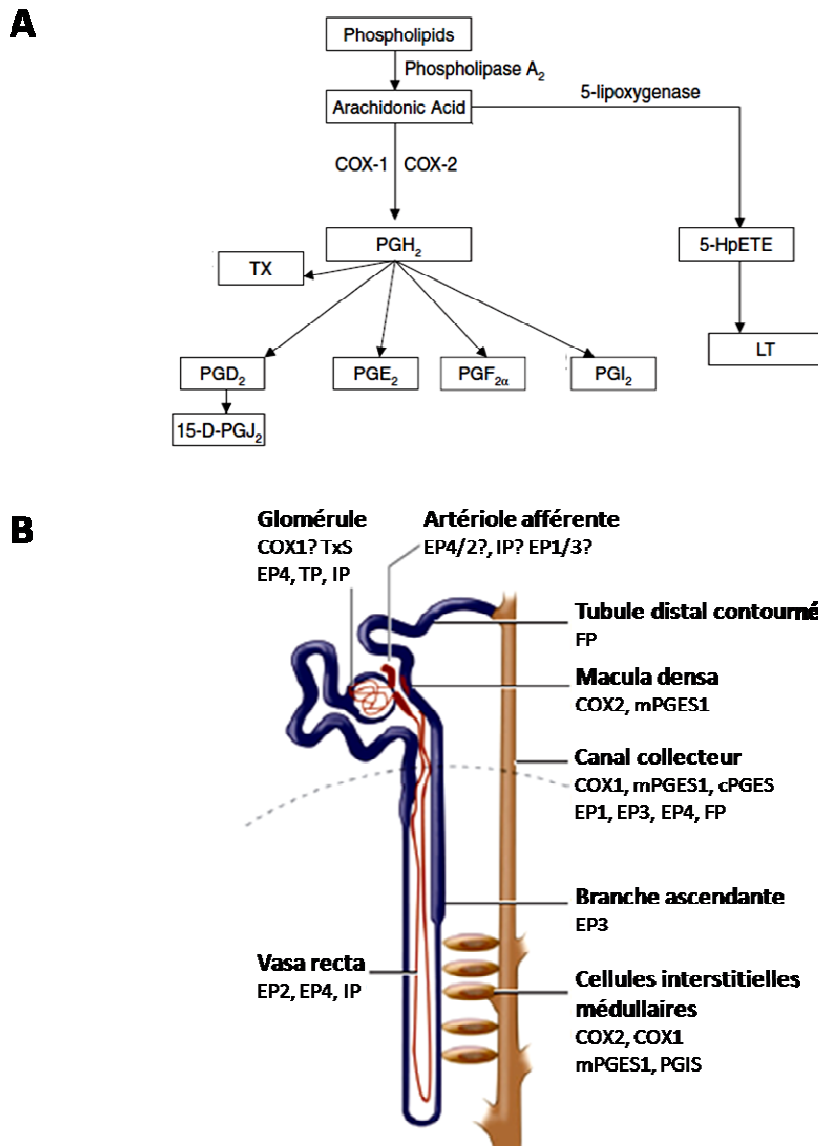


Figure 1.17 : Les différents produits de l'activité des Cyclooxygénase COX-1 et -2 et la distribution des COX, prostaglandine synthases et récepteurs au prostaglandines dans le rein. A) Les cyclooxygénases-1 et 2, d'expression respectivement constitutive et inducible, permettent la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine H₂ (PGH₂), précurseur des prostanoides. L'action de prostaglandines synthases ou de la thromboxane synthase (TxS) donne ensuite des molécules aux effets divers: vasodilatation (PGD₂, PGE₂, PGI₂), vaso-constriction (PGF_{2α} et TX), migration et prolifération lymphocytaire (PGD₂, PGE₂). Les leucotriènes (LT), molécules chimiotactiques résultent de l'action de la 5-lipo-oxygénase, une enzyme active dans les leucocytes et les macrophages. **B)** Cette figure relate la connaissance actuelle de la distribution des COX dans les différentes parties du néphron, ainsi que des prostaglandines synthases et de la thromboxane synthase (PGES, PGIS et TxS). Les récepteurs de PGE₂ (les EP1,2,3 et 4), de PGI₂ (IP) et de PGF_{2α} (FP) y sont aussi exprimés distinctement. Adapté de *Chuan-Ming Hao and Matthew D. Breyer Annu. Rev. Physiol. 2008. 70:357-77*

En revanche, les souris transgéniques ayant une synthèse accrue de PGI₂, étaient plus sensibles au LPS et leur IRA était amplifiée. Les auteurs expliquent cela par une activation exagérée du SRA induit par la PGI₂ qui aurait noyé tout effet vasodilatateur protecteur de la PGI₂ (Wang et al., 2007c). Dans **les glomérulonéphrites lupiques**, une surexpression de la Cox-2 a été rapportée dans les CM et les macrophages infiltrés (Tomasoni et al., 1998) avec la thromboxane A₂ comme métabolite majeur (Pierucci et al., 1989). Son inhibition à long terme a amélioré les paramètres fonctionnels rénaux et la survie dans un modèle de GN lupique chez la souris (Salvati et al., 1995). L'inhibition sélective de la Cox-2 a eu de même des effets bénéfiques sur la glomérulonéphrite proliférative lupique, majorant l'apoptose des leucocytes et réduisant l'atteinte glomérulaire après 6 semaines de traitement (Zhang et al., 2007). L'effet était plus important lorsque l'inhibition de la Cox-2 était combiné à un traitement immunosuppresseur (Zoja et al., 2001). Dans **la glomérulonéphrite mésangioproliférative**, les données ne sont pas concordantes. En effet, divers travaux attribuent un rôle bénéfique à la Cox-2, alors que d'autres auteurs démontrent ses effets délétères. L'inhibition des Cox après induction de la pathologie par injection d'anticorps anti-Thy1.1 augmente l'infiltration de macrophages et l'expression du MCP-1 au niveau glomérulaire, suggérant que les produits issus de l'activité enzymatique de la Cox exercent un effet inhibiteur sur la chimiotaxie (Schneider et al., 1999). Le même phénotype a été retrouvé dans un modèle de **néphropathie néphrotoxique** où l'administration de PGE₂ diminuait la protéinurie sans changer le taux d'infiltration des macrophages, alors que celui-ci était augmenté par l'inhibition des Cox. Les auteurs suggèrent une participation accrue, après inhibition des Cox, des lipooxygénases dans le métabolisme de l'acide arachidonique, qui seraient responsables de la détérioration glomérulaire (Nagamatsu et al., 1992). En revanche, chez le rat ayant subi une **néphrectomie unilatérale et une injection d'anticorps anti-Thy1.1**, l'administration de PGI₂ produit une dilatation des capillaires glomérulaire, aggrave les lésions locales et la prolifération mésangiale et conduit à la glomérulosclérose. L'inhibition des Cox allège par contre les manifestations pathologiques en agissant sur la circulation intra-glomérulaire (Nozawa et al., 2012).

- Une expression délétère de la Cox-2 dans les podocytes. Une surexpression de la Cox-2 a également été décrite dans les podocytes, notamment dans la néphropathie diabétique. La surexpression spécifique de la Cox-2 dans les podocytes dans des souris transgéniques a conduit à une aggravation de la protéinurie, alors que le débit de filtration glomérulaire, l'hyperglycémie et la pression artérielle n'étaient pas modifiés. La protéinurie allait de pair avec l'effacement des pédicelles et une expansion mésangiale modérée. La surexpression de la Cox-2 a également conduit à une apoptose accrue des podocytes en culture et une désorganisation de leur cytosquelette. *In vivo*, l'expression du récepteur de la prorénine était augmentée dans les podocytes des souris diabétiques et Cox-2 transgéniques, marquant l'implication du SRA. L'inhibition sélective de la Cox-2 a abaissé l'expression du récepteur de la prorénine, amélioré la protéinurie et atténué l'effacement des pédicelles (Cheng et al., 2011).

Et la cellule mésangiale dans tout cela...

L'analyse des pathologies glomérulaires montre que la CM est au cœur d'un nombre important de glomérulopathies, de la glomérulonéphrite focale et segmentaire (FSGS) à la glomérulonéphrite membranoproliférative (GNMP), en passant par la néphropathie diabétique, lupique et la

néphropathie à IgA. Dans ces pathologies, la CM est activée et devient un acteur de l'inflammation, elle prolifère ou meurt par apoptose.

L'**activation** des CM conduit à la sécrétion des facteurs proinflammatoires et profibrotiques, comme les cytokines, les facteurs trophiques et les facteurs de croissance.

La **prolifération** représente un signe de gravité, avec résistance aux thérapies dans la FSGS, un signe d'atteinte évolutive et alarmante dans la GNMP (de type I et II), un signe précoce d'une lésion rénale qui commence à s'installer chez les patients diabétiques (suivi d'une hypertrophie des CM) et finalement, un signe que les CM ne sont plus les spectatrices innocentes d'un dommage immun préexistant dans la néphropathie à IgA.

Un autre aspect de l'atteinte mésangiale se voit dans l'**apoptose** des CM, retrouvée dans la néphropathie diabétique, la glomérulonéphrite mésangioproliférative et lors de l'exposition à des agents néphrotoxiques. L'apoptose peut être bénéfique ou délétère selon le contexte.

Ces différents aspects fonctionnels des CM seront détaillés ci-dessous.

La cellule mésangiale dans tous ses états

Cellule mésangiale et inflammation

L'agression des CM conduit à leur « activation ». Elles acquièrent alors un phénotype myofibroblastique, réexpriment α SMA et se mettent à sécréter des facteurs inflammatoires. La cellule mésangiale est une source de facteurs tels que le TNF- α , IL-1 β et IL-6. Ces facteurs exercent des effets multiples sur ces cellules et sur les cellules voisines et participent à un ensemble complexe de réponses faisant le prélude d'un opéra qui manquerait quelquefois d'harmonie. De multiples études ont été faites sur les CM en culture. La transposition des effets de la multitude de facteurs étudiés *in vitro*, à une condition pathologique donnée *in vivo* est délicate, et ne permet pas de préjuger de la tonalité finale spécifique de la « réponse mésangiale ». Cependant, l'implication des CM dans une situation donnée se traduit souvent par la prolifération, l'apoptose, la sécrétion d'éléments de la matrice extracellulaire ainsi que l'expression de divers facteurs requis pour l'inflammation locale ou affectant les autres cellules glomérulaires voisines.

- Un phénomène de tolérance des CM vis-à-vis de certains stimuli inflammatoires a été décrit *in vitro* et *in vivo*, i.e. lorsque ces stimuli sont « réitérés » la réponse mésangiale est émoussée, ou bien, dans un contexte où plusieurs stimuli sont présents, le premier qui active les CM amoindrit la réponse aux stimuli suivants. Ainsi, il a été montré que l'exposition prolongée des CM aux macrophages activés ou à leur milieu de culture induisait le NF κ B, mais que cette induction était diminuée lorsque les mêmes CM y étaient réexposées. Les macrophages sécrétaient des quantités importantes d'IL-1 β et de TNF- α , mais seul le TNF- α semblait induire la tolérance. La tolérance observée après TNF- α concernait IL-1 β et les macrophages activés, elle passait par une diminution de l'activation du NF κ B, des voies ERK1/2 et p38/MAPK (Hayakawa et al., 2006). Cette tolérance existe aussi *in vivo*, comme le montre une étude réalisée *in vitro* sur des CM mises en culture à partir de rats traités 3 jours plus tôt avec un anticorps anti-Thy1.1 ; les CM ne répondaient plus aux macrophages activés (Hayakawa et al., 2006) ou au TNF- α (Hayakawa et al., 2009). Un phénomène

semblable a été décrit sur les monocytes/macrophages glomérulaires, naïfs ou activés dans un contexte de néphropathie néphrotoxique (Erwig et al., 2001; Erwig et al., 2000). Ce phénomène rappelle l'origine probable immunitaire des CM. Il nécessite des études complémentaires pour pouvoir en comprendre la portée dans la maladie glomérulaire humaine.

- Le TNF- α est exprimé par les CM en culture où il exerce un effet double sur l'apoptose. Le TNF- α produit **un effet pro-apoptotique** important, un effet partagé avec l'IL-1 α et qui semble impliquer les ROS (Bohler et al., 2000; Liu et al., 1996). L'effet pro-apoptotique du TNF- α est supposé être un des mécanismes de résolution de l'hypercellularité mésangiale dans la glomérulonéphrite, mais cet effet peut également être délétère dans la phase aiguë de cette pathologie, caractérisée par la mésangiolyse. Le TNF- α active également des voies de signalisation **anti-apoptotiques** sur les CM comme la voie p38/MAPK ou NF κ B (**Figure 1.15**). En effet, l'inhibition de la p38/MAPK ou de NF κ B majore l'apoptose induite par le TNF- α (Guo et al., 2001). Le TNF- α n'a par contre que peu d'effets sur l'expression de la COX-2, la cyclooxygénase inductible impliquée dans la réponse inflammatoire. L'expression de la COX-2 dans les CM est en revanche accentuée par la combinaison TNF- α /IL-1 β (Coyne et al., 1992). De plus, il a été montré que la surexpression de COX-2 dans les CM en culture s'opposait à l'apoptose induite par le TNF- α *via* la libération des deux prostaglandines, PGE₂ et PGI₂. L'effet apoptotique du TNF- α a été restauré par l'inhibition spécifique de la COX-2 (Ishaque et al., 2003).

- IL-1 β est une autre cytokine activatrice des CM. Elle est exprimée dans les CM en culture en réponse à un excès de glucose ambiant (Huang and Siragy, 2009) ou à l'exposition à des complexes immuns (Matsumoto and Hatano, 1991). Cette cytokine est majeure car son récepteur IL1-RI comporte un domaine TLR et est donc impliquée dans les maladies auto-immunes et inflammatoires. IL-1 β induit souvent des réponses cellulaires prolongées car elle augmente non seulement la transcription de ses gènes cibles mais stabilise aussi leurs ARNm. Ainsi, IL-1 β induit l'expression de la COX-2 dans les CM, de manière durable en terme de protéine mais sans changement important en terme d'ARNm, en stabilisant son ARNm (Rzymkiewicz et al., 1994). La protéine responsable de la stabilisation a été mise en évidence, c'est la protéine HuR, membre de la famille des protéines ELAV, impliquée dans la translocation des ARNm de leur sites de fabrication dans le noyau vers leurs sites de traduction au niveau du cytoplasme (Cok et al., 2003). IL-1 β initie, *via* la COX-2, la synthèse de la PGE₂, PGF_{2 α} et 6-keto-PGF_{1 α} (métabolite stable de la PGI₂). Combinée avec le PDGF, elle fonctionne en synergie et majore la synthèse de ces prostaglandines de plus de 200 fois (Floege et al., 1990). Elle induit aussi l'expression d'autres cytokines, notamment IL-6 et IL-8 dans les CM humaines en culture. Elle n'a pas d'effet sur la prolifération des CM (Abbott et al., 1991).

- D'autres interleukines impliquées dans les pathologies rénales agissent directement sur les CM. Les **IL-17** sont une famille de six membres dont l'expression semble restreinte aux cellules hématopoïétiques et aux cellules Th17. Elles agissent par contre sur de nombreux types cellulaires, grâce à la présence ubiquitaire de leurs récepteurs (Hirota et al., 2012). Les IL-17A et IL-17F activent les CM et conduisent à la sécrétion de chimiokines comme le MCP-1 et le MIP-2 de manière dose- et temps-dépendante. L'effet de IL-17A est plus marqué que celui de IL-17F. En se liant à leurs récepteurs sur les CM, ces deux cytokines activent les voies JNK, ERK1/2 et p38/MAPK (Iyoda et al., 2010).

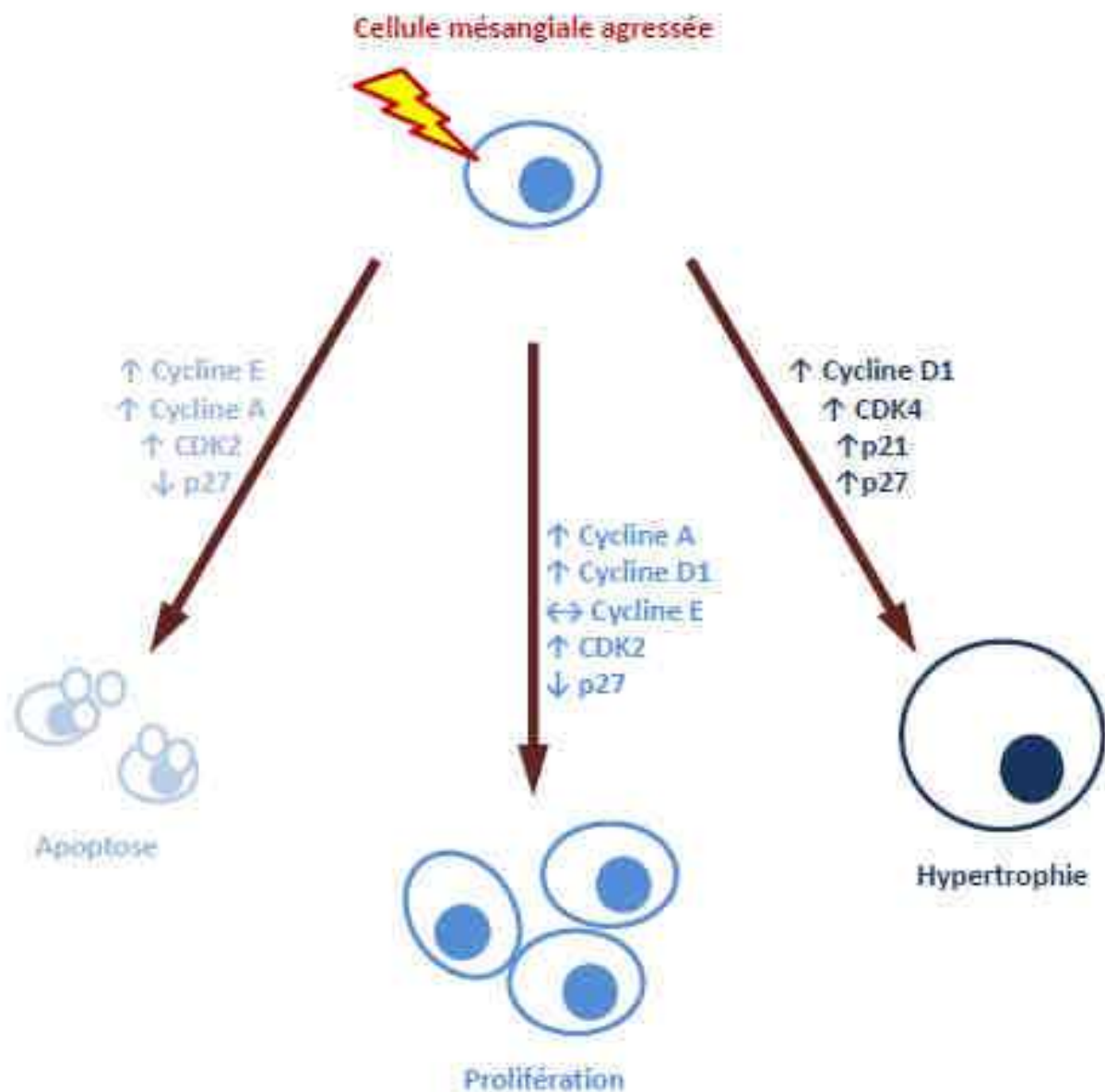


Figure 1.17: Destinées de la cellule mésangiale en condition pathologique. En condition physiologique, la cellule mésangiale est maintenue quiescente, grâce à l'expression de p16 et p19. Selon le contexte pathologique et les signaux que les cellules mésangiales reçoivent, l'expression de ces protéines fluctue, levant l'inhibition de l'expression de différentes cyclines et CDK (*Cyclin-dependant kinase*). Les différents acteurs du cycle cellulaire n'ont pas seulement un rôle dans la prolifération des cellules mésangiales mais sont également impliqués dans leur hypertrophie ou encore leur apoptose.

- Les CM portent sur leur surface des *récepteurs des chimiokines* (**Tableau 1.6**) et peuvent donc interagir avec de nombreuses chimiokines comme MCP-1, RANTES, IP-10, MIG, I-TAC, SLC, IL-8, et GRO α / β / γ . Les chimiokines ont été caractérisées initialement comme des agents chimiotactiques permettant d'acheminer les cellules immunitaires vers les lieux de l'inflammation. Néanmoins, l'expression de leurs récepteurs sur de multiples types cellulaires non-immunitaires a suggéré qu'elles ont un champ de fonctions plus étendu. Sur les CM, une récente étude a montré que l'exposition à l'endothéline-1 augmentait l'expression du collagène, de MCP-1 et IL-6. **MCP-1** et **IL-6** étaient aussi capables par eux-même d'augmenter la synthèse du collagène et le blocage des deux facteurs diminuait de 50% la réponse à l'endothéline-1. Ces résultats témoignent non seulement d'un rôle autre de ces chimiokines sur les CM, mais montre aussi leur capacité à agir de concert avec d'autres facteurs (Simonson and Ismail-Beigi, 2011). D'autres chimiokines, comme **SLC**, **IP-10** et **Mig**, activent également des récepteurs (CCR7, CXCR3 respectivement) constitutivement exprimés au niveau mésangial. Elles augmentent la prolifération des CM en culture, et SLC induit aussi la migration et la survie des cellules. **RANTES** active par contre un récepteur (CCR1) inductible par le TNF α , IL-1 β ou encore IFN γ , mais ne semble pas avoir d'effet direct sur la prolifération, la migration ou l'apoptose des cellules (Wornle et al., 2004). Les chimiokines peuvent aussi induire l'expression d'autres chimiokines sur les CM. Ainsi, l'exposition des CM au **MIP-2** (*GRO β* ou *CXCL2*) ou au **KC** (*keratinocytes chemoattractant*) induit l'expression de MCP-1 et RANTES, mais aussi leur propre expression, et majore la migration des CM traitées. Il s'agit d'une propriété particulière des CM, non retrouvée sur les cellules épithéliales tubulaires ou les macrophages péritonéaux (Luo et al., 1999).
- *Le récepteur TLR3* est exprimé sur les CM. C'est le seul récepteur de la famille TLR capable de lier des ARN viraux double brin. L'activation de ce récepteur met en jeu le système TNF- α /TNFR2 et conduit à une surexpression de **IP-10** qui augmente la prolifération mésangiale (Merkle et al., 2011). IP-10 active son récepteur CXCR3 sur les Th1 et NK, semble être impliqué dans la réponse immunitaire antivirale, mais aussi dans la glomérulonéphrite aiguë induite par l'hépatite C (Krotz, 2011).
- *L'IL-4* est considérée comme une cytokine anti-inflammatoire par rapport à ses activités vis-à-vis des macrophages. IL-4 s'oppose à la hausse de la synthèse de collagène I et IV induite par IL-1 α dans les CM, mais renforce par elle-même la synthèse du collagène III (Nakazato et al., 1996).

L'ensemble de ces données montre que la CM est à la fois une cible des cytokines/chimiokines et une source de ces composés. Leurs effets ne se limitent pas à entretenir ou amplifier la réaction inflammatoire locale, mais ces facteurs affectent aussi directement la prolifération et la survie des CM.

La régulation de la prolifération des cellules mésangiales

Le cycle cellulaire dans les cellules mésangiales

À l'état basal, les CM sont quiescentes avec un taux de prolifération ne dépassant pas 1% par jour (Pabst and Sterzel, 1983). Leur cycle cellulaire est régulé par divers signaux intra et extracellulaires, liés à une balance critique entre leur environnement cellulaire et l'expression de protéines régulatrices anti ou pro-mitogène.

Dans le glomérule, les CM sont les cellules les plus sensibles à un signal mitogène. En effet, elles ne se trouvent pas « passivement » en quiescence mais elles « se maintiennent » en quiescence et cela

par l'expression, dans les conditions physiologiques, de **divers inhibiteurs de prolifération** (**Figure 1.7**). Les études chez la souris ont montré que les inhibiteurs du cycle cellulaire **p16^{INK4a}** et **p19^{INK4d}** sont exprimés au niveau glomérulaire dans les CM. Les souris *knockout* de ces deux inhibiteurs ont un taux de prolifération mésangiale important avec infiltration de monocytes et accumulation de matrice extracellulaire, alors que les autres cellules glomérulaires ne semblent pas affectées (Wolstein et al., 2010). La **p27^{Kip1}** est également exprimée de manière constitutive dans le mésangium normal, mais l'abrogation génétique de son expression, qui conduit chez la souris durant le développement et au cours du jeune âge à une hyperplasie généralisée (Fero et al., 1996), mais n'a pas d'impact physiologique direct sur la prolifération des CM à l'âge adulte. En revanche, en condition pathologique, l'absence de **p27^{Kip1}** s'accompagne d'une prolifération mésangiale plus précoce et plus importante avec une augmentation de l'activité de CDK2 (Ophascharoensuk et al., 1998) (**Figure 1.18**). La **p21^{Cip1}** par contre n'est habituellement pas détectable dans le glomérule. Son expression augmente rapidement dans les CM en condition pathologique. Dans les souris *knockout* de cette protéine, l'agression glomérulaire conduit à un phénotype pathologique exagéré par rapport aux souris contrôles ayant subi la même agression, avec une prolifération et une mésangiolyse focales plus marquées (Monkawa et al., 2006).

La progression du cycle cellulaire est également contrôlée par le facteur de transcription E2F dont sept protéines sont identifiées à ce jour. E2F est retenu par les protéines du rétinoblastome (Rb) et libéré lors de leur phosphorylation (Dyson, 1998). E2F régule l'expression de diverses protéines requises pour l'avancement du cycle cellulaire comme les protéines c-Myc, cycline A, PCNA et CDK2 et permet le passage de la phase G1 à la phase S (Ren et al., 2002) (**Figure 1.7**). *In vitro*, une augmentation de l'expression de E2F a été observée dans les CM en prolifération (Inoshita et al., 1999). En clinique, les taux d'expression d'E2F dans les CM ont été corrélés avec la survenue et l'importance de la néphropathie à IgA (Qiu et al., 2004).

Dans le modèle expérimental de glomérulonéphrite mésangioproliférative induite par un anticorps anti-Thy1, la prolifération des CM était associée à une majoration de l'expression des cyclines D1 et A et de leurs partenaires CDK4 et CDK2 (Griffin et al., 2003) (**Figure 1.18**). CDK2 présente une expression quasi nulle dans le glomérule normal contrairement à une expression constitutive dans la plupart des cellules non rénales. Une majoration de l'expression et/ou de l'activité de CDK2 a été associée à la prolifération des CM, non seulement dans le modèle anti-Thy1, mais aussi dans le rein restant après néphrectomie unilatérale, ou dans les CM en culture exposées à des facteurs de croissance.

Les cytokines et facteurs de croissance des cellules mésangiales

De multiples facteurs de croissance et de cytokines exercent un effet mitogène sur les CM.

- **Le PDGF** (*platelet derived growth factor*) en est le chef de file. Les CM synthétisent et sécrètent le PDGF, et expriment aussi les deux sous-unités du récepteur membranaire de ce facteur (PDGFR α et PDGFR β). Le PDGF joue un rôle prépondérant dès les stades précoces de la néphrogenèse. Ses effets chimiotactiques et mitogènes sur les CM lors du développement ont été déjà décrits plus haut. Le PDGF est actif sous forme de dimères, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC et PDGF-DD, les isoformes B et A pouvant également s'associer pour former le PDGF-AB. Ces cinq dimères interagissent avec les récepteurs PDGFR- α et PDGFR- β qui forment également des homo- ou hétéro-dimères ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$). Tous les PDGF sont capables d'activer les trois récepteurs, mais les PDGF-CC et PDGF-DD interagissent préférentiellement avec les PDGFR- α et PDGFR- $\beta\beta$, respectivement (Floege

et al., 2008; Tallquist and Kazlauskas, 2004). Toutes les formes du PDGF, ainsi que le PDGFR- β , sont surexprimés dans les CM dans les différents modèles animaux de glomérulonéphrites (Floege et al., 2008). Les effets du PDGF sur la prolifération mésangiale ont été largement documentés, surtout pour le PDGF-B et D agissant *via* le PDGFR- β . L'antagonisme du PDGF-B par des oligonucléotides ou des anticorps neutralisant le PDGF-D ou le PDGFR- β , diminuent la prolifération mésangiale dans un modèle de glomérulonéphrite chez le rat, et empêchent la progression vers la glomérulosclérose (Floege et al., 2008; Ostendorf et al., 2001). Le PDGF-D surexprimé spécifiquement dans les podocytes reproduit la glomérulonéphrite mésangioproliférative et la sclérose glomérulaire, démontrant ainsi que le PDGF-D peut agir sur les CM par voie paracrine (van Roeyen et al., 2011). Chez l'homme, des taux systémiques importants de PDGF-D ont été trouvés chez des patients ayant une néphropathie à IgA précoce sans augmentation de l'expression de l'ARNm du PDGF-D au niveau rénal (Boor et al., 2009). Une étude récente montre que la délétion conditionnelle du PDGFR- β à l'âge adulte *via* un système Cre-LoxP n'affecte pas l'état général des animaux, mais diminue l'hypercellularité glomérulaire associée au vieillissement (Nakagawa et al., 2011). Dans ce modèle cependant, la néphrectomie unilatérale des souris délétées en PDGFR- β conduit à une albuminurie aiguë transitoire plus abondante que chez les souris contrôles, associée à une dérégulation capillaire, un faible nombre de CM et un déficit de synthèse de la matrice extracellulaire. Le PDGFR- β ne semble donc pas essentiel à la survie des CM dans la période postnatale, mais contribue à la régénération glomérulaire en situation pathologique (Li et al., 1995). Le PDGF-C, agissant *via* le PDGFR- α , est par contre un facteur pro-angiogénique impliqué dans la régénération capillaire glomérulaire dans les glomérulonéphrites (Boor et al., 2010) ;

- **Le bFGF** (*basic Fibroblast growth factor*) est un autre puissant facteur de prolifération des CM (Issandou and Darbon, 1991). Il est synthétisé par les CM en culture et agit par voie auto/paracrine *in vitro*. Il est surexprimé *in vivo* lors d'une atteinte glomérulaire et contribue à la prolifération mésangiale (Floege et al., 1992). Un anticorps neutralisant le bFGF réduit de 40% la prolifération des CM dans le modèle anti-Thy1 de glomérulonéphrite mésangioproliférative, mais n'a pas d'incidence sur la migration des cellules (Haseley et al., 1999). L'augmentation de la prolifération des CM par le bFGF et le PDGF-B est associée, entre autres, au niveau d'expression de la p27^{Kip1}. En effet, les deux facteurs diminuent l'expression de p27^{Kip1} et induisent une hausse de l'expression de la cycline A et de la CDK2. Ces effets étaient reversés par le TGF- β 1 (Shankland et al., 1997). Un rôle coordonné a été suggéré dans la progression de la glomérulonéphrite pour ces trois facteurs, le bFGF initiant la prolifération des CM, le PDGF la maintenant alors que le TGF- β 1 en marquerait l'arrêt (Floege et al., 1993).
- D'autres facteurs de croissance ont également des effets mitogènes sur les CM, comme l'**IGF I** (*Insulin growth factor 1*) (Feld et al., 1995) et le **HB-EGF** (*Heparin-binding Epithelial Growth Factor*) (Takemura et al., 1999). Parmi les cytokines exprimées par les CM, **IL-10** majore leur prolifération *in vitro* et *in vivo* (Chadban et al., 1997), un effet qui semble être dépendant du PDGF (Robertson et al., 2002). **IL-4** agit par ailleurs en potentialisant les effets mitogènes du PDGF et du bFGF sur les CM (Sommer et al., 2002). Concernant les autres cytokines/chimiokines exprimées dans les CM, les études sont discordantes et les effets sur la prolifération ne sont pas solidement démontrés.
- La **PTHrP** a aussi été décrite comme un facteur mitogène des CM humaines et des CM de rat (Bosch et al., 1999; Soifer et al., 1993). L'exposition des CM à la PTHrP(1-36) exogène majore en effet la prolifération de ces cellules pendant 24 h; les mécanismes impliqués ne sont actuellement pas

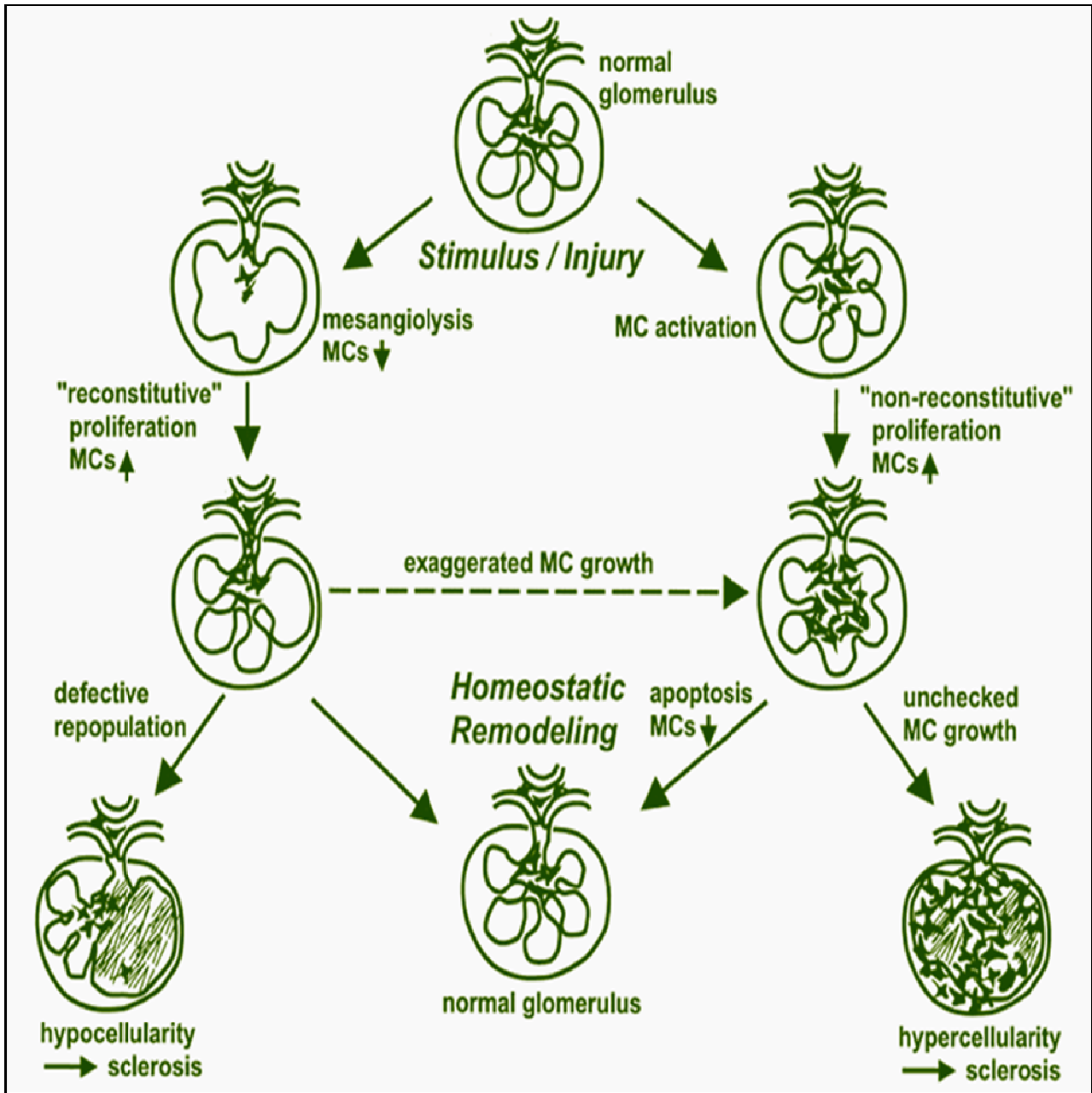


Figure 1.19: Conséquences d'une dérégulation de la balance prolifération/apoptose des cellules mésangiales. En cas d'atteintes, l'activation des cellules mésangiales conduit à la réactivation du cycle cellulaire et à leur prolifération dans un effort de maintien de l'intégrité glomérulaire. Si la mésangiolyse initiale est trop importante, la prolifération ne peut reconstituer la population cellulaire et se présente alors une hypocellularité délétère. A l'inverse, si la prolifération est trop importante, ou que l'apoptose successivement programmée n'est pas efficace, une hypercellularité mésangiale est retrouvée. D'après Schöcklmann HO et al., *Kidney Int*, Vol. 56 (1999), pp. 1199-1207

connus. Il faut souligner cependant que la PTHrP stimule la voie de l'AMPC/PKA sur les CM humaines (Bosch et al., 1999) et que l'accumulation d'AMPC dans les CM s'accompagne généralement d'un effet anti-mitogène (Chini et al., 1995; Ito et al., 2004; Li et al., 1995). Je reconsidérerai ce problème dans mon travail expérimental.

La matrice extracellulaire dans la prolifération des cellules mésangiales

La matrice extracellulaire conditionne la réponse des cellules mésangiales. Ainsi, elle apparaît comme un réservoir de multiples facteurs affectant la prolifération des CM, comme le bFGF, la thrombospondine-1 et le TGF- β . Le bFGF, retenu par l'héparane sulfate, induit la prolifération des CM lors de sa libération (Haseley et al., 1999). La thrombospondine-1, un activateur majeur de la forme latente du TGF- β 1, est elle-même anti-mitogène *in vitro* et *in vivo* (Hugo et al., 1999). Enfin, le TGF- β 1, connu comme facteur antiprolifératif des CM, devient mitogène après délétion des deux sous-unités α_1 et α_2 du collagène VIII. Il met alors en jeu les voies PI3-K/Akt et MAPK au lieu de la voie classique associée aux smads, et il conduit à la surexpression du FGF-21 *in vitro* et *in vivo* (Loeffler et al., 2011). Des facteurs régulant la composition de la matrice peuvent également moduler la prolifération des CM. Ainsi, l'abrogation de la MMP-2 dans les CM en culture les ramène au stade de quiescence, et l'inhibition de la MMP-2 *in vivo* atténue la prolifération des CM dans le modèle de glomérulonéphrite anti-Thy1 (Marti, 2002). L'interaction des CM avec la matrice extracellulaire se fait par les intégrines, des récepteurs transmembranaires spécifiques pour les divers composants de la matrice. Leur rôle dans la biologie des CM reste très discuté (Borza and Pozzi, 2012; Rupprecht et al., 1996). Concernant la prolifération des CM, l'intégrine $\alpha_8\beta_1$, récepteur de la ténascine-C, de la fibronectine et de la vitronectine fortement exprimés dans les CM, est particulièrement intéressante. Les souris déficientes en intégrine α_8 montrent une hypercellularité glomérulaire avec majoration du nombre de CM. Ces souris présentent aussi des atteintes glomérulaires plus graves si elles sont hypertendues, diabétiques ou développant une glomérulonéphrite mésangioproliférative (Borza et al., 2012; Hartner et al., 2008). *In vitro*, l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ prévient la prolifération des CM (Bieritz et al., 2003). Chez les souris *knockout* pour l'intégrine α_8 , les auteurs suggèrent une vulnérabilité accrue du mésangium face à l'étirement mécanique, ainsi qu'une fragilisation glomérulaire semblable à celle observée après abrogation de la ténascine-C, le ligand principal de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ (Hartner et al., 2008; Nakao et al., 1998).

Prolifération mésangiale : bénéfique ou délétère ?

Il est important de noter que la prolifération mésangiale n'est pas un symptôme exclusivement délétère, c'est un phénomène largement contextuel. En effet, cette prolifération est un processus bénéfique et indispensable lors d'une atteinte glomérulaire qui détruit une partie des CM. Elle permettra la restauration du mésangium et une cicatrisation sans séquelles apparentes. Ceci se voit plus particulièrement lors de la résolution des glomérulonéphrites aiguës. La prolifération ne devient délétère que lorsqu'elle se poursuit de manière excessive et incontrôlée, lorsque les stimuli mitogènes persistent dans les pathologies chroniques (**Figure 1.19**).

L'hypertrophie des cellules mésangiales

L'hypertrophie cellulaire, selon la définition biochimique, indique que dans une cellule le ratio protéine/ADN est anormalement élevé. La hausse de ce ratio peut survenir lors de l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1, avant que la cellule ne réplique son ADN durant la phase S (**Figure 1.18**).

Pendant la phase G1, la cellule continue de croître et augmente de taille grâce à une synthèse accrue de protéines. L'hypertrophie peut également être liée à une baisse de la dégradation des protéines par les protéases. Les éléments du cycle cellulaire participent largement à ce phénomène. En effet, l'inhibition du cycle cellulaire dans la phase G1 est fonction 1) de l'activité des inhibiteurs des CDK (majoration de p21^{Cip1} et de p27^{Kip1}) et 2) de l'expression des acteurs du cycle (majoration de la cycline D1 et de CDK4, diminution de la cycline E) participant à l'avancement vers la phase S (**Figures 1.7 et 1.18**).

L'hypertrophie des CM est une marque distincte de la **néphropathie diabétique**. Elle conduit à une synthèse plus importante des protéines y compris celles de la matrice extracellulaire contribuant donc à la glomérulosclérose (Wolf and Ziyadeh, 1999). Les études réalisées sur les CM en culture ont montré qu'une concentration élevée de glucose induit une réponse mésangiale bi-phasique caractérisée par une prolifération initiale pendant les premières 24h-48h, suivie par une hypertrophie durant les 72h-96h suivantes (Wolf et al., 1992). De nombreux facteurs participent à ce processus dont le TGF- β 1 est le chef de file. En effet, la survenue de la deuxième phase s'accompagne d'une surexpression de TGF- β 1 et elle est partiellement réversible par un anticorps neutralisant ce facteur (Wolf et al., 1992). D'autres travaux ont montré un rôle du CTGF (*Connecting Tissue Growth Factor*) qui agit sur les composants du cycle cellulaire pour le bloquer avant le passage vers la phase S (Abdel-Wahab et al., 2002). Des agents vasoactifs exercent aussi un effet hypertrophique mésangial ; parmi ceux-ci on trouve l'AngII (Mei et al., 2001), la vasopressine (Tahara et al., 2012) et l'endothéline (Goruppi et al., 2002).

Plus récemment, deux études montrent que la **PTHrP**, *via* l'activation du R-PTH1, semble faire partie des facteurs hypertrophiques mésangiaux. En effet, l'expression de la PTHrP et du R-PTH1 augmente *in vivo* dans le glomérule lorsqu'on induit un diabète de type-1 chez la souris, mais aussi dans les CM de souris *in vitro* lorsqu'elles sont exposées à une concentration élevée de glucose (Izquierdo et al., 2006). De plus, la PTHrP est également surexprimée dans le glomérule chez des patients diabétiques (Ortega et al., 2011). Dans les CM humaines en culture, la PTHrP induit une hypertrophie des cellules, associée à un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1. L'expression de p27^{Kip1} est accrue ainsi que celle de la cycline D1, alors que sont abaissées l'expression de la cycline E1 et l'activité kinase de la CDK2. Cet effet de la PTHrP semble suivre la chronologie bi-phasique stricte de l'effet du glucose sur la prolifération et l'hypertrophie mésangiale décrite par Wolf (Wolf et al., 1992). Elle passe par une induction par la PTHrP de l'expression de TGF- β 1 et de son récepteur après 72 h d'exposition (Ortega et al., 2011).

L'apoptose des cellules mésangiales

L'apoptose participe au recyclage cellulaire normal. Par conséquent, on ne s'attend pas à un taux d'apoptose élevé sur les CM, vu leur faible prolifération dans les conditions physiologiques. En revanche, lors d'une atteinte glomérulaire conduisant à une hypercellularité mésangiale, l'apoptose contrebalance l'excès de prolifération et apparaît donc comme bénéfique. Chez l'homme, l'apoptose semble participer à la réparation tissulaire et à la résolution de nombreuses pathologies glomérulaires caractérisées par une prolifération mésangiale. Il en est ainsi dans la néphropathie à IgA où le niveau d'apoptose mésangiale augmente parallèlement à celui de la prolifération (Ott et al., 2007; Tashiro et al., 1998), et dans la glomérulonéphrite aiguë post-streptococcale où l'apoptose contribue à la réversion de la pathologie (Oda et al., 2007). De même, dans la néphrite lupique, le

nombre de cellules glomérulaires apoptotiques est corrélé avec l'activité immunologique et la prolifération (Makino et al., 2003). Les mécanismes impliqués ont été largement décrits dans des modèles expérimentaux toxiques aiguës ou immunologiques. Dans le modèle anti-Thy1.1 chez le rat, l'atteinte glomérulaire se manifeste par une mésangiolyse initiale où l'apoptose joue un rôle important dans la mort des CM comme cela a pu être montré *in vitro* (Sato et al., 1996). Par la suite, les CM restantes prolifèrent afin de repeupler le mésangium. L'apoptose, dont le taux est alors 10 fois supérieur à celui d'un glomérule normal, est le principal mécanisme de clairance contrebalançant l'hypercellularité ; elle permet une cicatrisation et une résolution de l'atteinte glomérulaire (Baker et al., 1994). Si l'agression se poursuit et devient chronique, la balance entre ces mécanismes se dérègle et conduit soit à un excès de prolifération (hypercellularité), soit à un excès d'apoptose (hypocellularité) (Schocklmann et al., 1999) (**Figure 1.19**).

Les acteurs du cycle cellulaire dans l'apoptose des cellules mésangiales

De nombreux facteurs contribuent à l'induction et à la continuité des signaux pro- et anti-apoptotiques. Certains acteurs du cycle cellulaire semblent jouer un rôle, notamment p27^{Kip1} (**Figure 1.17**) (Marshall and Shankland, 2006). En effet, le niveau d'expression de p27^{Kip1} est minimum pendant la phase de résolution d'une glomérulonéphrite mésangioproliférative, quand l'apoptose des CM contrebalance leur prolifération. Par ailleurs, sur des souris délétées en facteur p27^{Kip1}, l'induction d'une glomérulonéphrite s'accompagne d'un effet plus marqué sur la prolifération des CM mais aussi sur leur apoptose (Ophascharoensuk et al., 1998). De plus, les études sur des CM en culture ont montré que l'absence de p27^{Kip1} majorait l'apoptose induite par la privation de sérum, sans affecter la prolifération. Cette réponse allait de pair avec une hausse de l'activité du complexe CDK2-cycline A, mais non pas à celle du complexe CDK2-cycline E1. La restauration de p27^{Kip1} ou l'inhibition de la CDK2 augmentait la survie des CM privées de sérum (Hiromura et al., 1999). L'augmentation sélective de l'activité CDK2-cycline A mais non de CDK2-cycline E1 produit un arrêt du cycle cellulaire dans la phase S de la synthèse d'ADN, qui serait perçu comme signal d'alarme par la CM qui mettrait alors en route la machinerie apoptotique. L'activité CDK2-cycline A est de même majorée dans les CM par deux autres stimuli apoptotiques, l'irradiation UV et l'abrogation de p53 (Hiromura et al., 2002b). Le complexe cycline A-CDK2, qui est nucléaire pour ses effets sur la prolifération cellulaire, se déplace vers le cytoplasme où il contrôle l'activité de la caspase-3, une des caspases exécutrices sur laquelle convergent les voies apoptotiques (**Figure 1.8**). L'ensemble de ce travail du groupe de Stuart Shankland à Seattle, qui suggère que p27^{Kip1} soit un facteur de survie des CM, reste à être confirmé par d'autres équipes. Il y a en effet quelques incohérences à résoudre. En effet, on s'attendrait plutôt à ce que des taux bas de p27^{Kip1} soient observés après activation des mécanismes de survie puisque la voie PI3-K/Akt phosphoryle directement p27^{Kip1}, ce qui conduit à sa séquestration dans le cytoplasme et son inactivité (Hanada et al., 2004). Elle phosphoryle aussi et inactive le facteur de transcription Forkhead (FOXO) dont p27^{Kip1} est un gène cible (Manning and Cantley, 2007).

Les facteurs de croissance et cytokines, facteurs de survie ou pro-apoptotiques

Les facteurs de croissance et cytokines exercent des effets divers sur la survie des CM. Le PDGF, connu pour son effet mitogène sur ces cellules, augmente également leur survie par l'activation de la voie PI3-K/Akt (Ghosh Choudhury et al., 2003; Shimamura et al., 2003). En effet, un mutant dominant négatif de Akt abolit l'effet anti-apoptotique du PDGF, alors qu'un mutant dominant positif de Akt s'oppose à l'apoptose induite par la privation du sérum. L'activation de la voie PI3-K/Akt met alors en jeu d'autres voies signalétiques plus distales. Ainsi, elle conduit à la

phosphorylation de I κ B et à l'activation de NF κ B, le principal responsable de l'effet anti-apoptotique du PDGF. Elle induit aussi une phosphorylation inactivatrice de la protéine Bad, un acteur pro-apoptotique impliqué dans l'activation de la voie mitochondriale (Ghosh Choudhury et al., 2003; Shimamura et al., 2003). Enfin, le PDGF, *via* Akt, phosphoryle et inactive le facteur de transcription FOXO, inhibant ainsi l'expression du ligand pro-apoptotique FasL (Ghosh Choudhury et al., 2003; Shimamura et al., 2003). D'autres facteurs de croissance comme **les IGF-I et II** protègent également les CM de l'apoptose induite par la privation de sérum ou par des agents cytotoxiques comme l'étoposide produisant des dommages à l'ADN, et le cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique (Mooney et al., 1997). L'IGF-1 active là encore la voie PI3-K/Akt, mais inhibe aussi GSK-3 β (*glycogen synthase kinase-3beta*), une autre cible phosphorylée par Akt (Singh et al., 2007b). Ceci majore l'expression de la protéine 14-3-3 ζ qui séquestre dans le cytoplasme de nombreuses protéines phosphorylées sur des résidus sérine ou thréonine (dont p-GSK-3 β) (Singh et al., 2007b) et joue un rôle dans la survie des cellules (Porter et al., 2006). Quant à **l'insuline**, elle est également un facteur de survie des CM en activant la voie PI3-K/Akt/GSK-3 β mais l'inhibition de la voie des MAP-kinases contribue partiellement à son effet ; en outre, l'insuline augmente l'expression de p21 qui semble être un acteur essentiel de son effet anti-apoptotique puisque celui-ci est absent sur des CM provenant de souris délétées en p21 (Hiromura et al., 2002a).

D'autres facteurs par contre induisent l'apoptose mésangiale, essentiellement des cytokines proinflammatoires telles que **l'IL-1 α** et le **TNF- α** (Bohler et al., 2000). En particulier, les effets du TNF- α ont été largement étudiés. Les membres de la superfamille du TNF sont en effet connus pour avoir à la fois des effets pro- et anti-apoptotiques dont la balance varie selon le type cellulaire (Gaur and Aggarwal, 2003). Le TNF- α , en activant ses récepteurs TNFR1 et 2 associés aux domaines DD (*death domain*), déclenche l'apoptose par la voie extrinsèque (**Figure 1.15**). Le TNFR1 est bien exprimé sur les CM, et son activation par le TNF- α induit l'apoptose des cellules *via* la formation de **ROS**, notamment l'anion superoxyde, et l'activation de la voie c-jun (Bohler et al., 2000; Moreno-Manzano et al., 2000). Cependant, l'effet pro-apoptotique du TNF- α est largement pondéré sur les CM par la mise en jeu de différents mécanismes anti-apoptotiques. Ainsi, l'apoptose mésangiale induite par le TNF- α est potentialisée après inhibition de NF κ B (Hirahashi et al., 2000; Sugiyama et al., 1999). La surexpression de COX-2 et la synthèse de PGE₂ et de PGI₂ contribuent aussi à pondérer l'induction de l'apoptose par le TNF- α (Ishaque et al., 2003).

La survie des CM est abaissée en présence d'une forte concentration de **glucose** induisant une libération importante de ROS (Kang et al., 2003) ou activant directement la voie intrinsèque par la libération du cytochrome C et le clivage de la caspase-9, comme cela a été montré *in vitro* ou *in vivo* dans un modèle de diabète de type II (Mishra et al., 2005).

Le **stress immun**, retrouvé dans la majorité des pathologies glomérulaires secondaires, est également une situation pro-apoptotique. Ceci a été démontré en traitant des CM en culture par un anticorps anti-Thy (IgG2 ou IgA), ou *via* l'activation du système du complément (Sato et al., 1999; Sato et al., 1996; Sato et al., 1997).

La matrice extracellulaire dans la survie des cellules mésangiales

L'interaction des CM avec la matrice extracellulaire joue un rôle dans leur survie. Les composants normaux de la matrice extracellulaire offrent une protection contre les signaux apoptotiques. Il en est ainsi pour la laminine, le collagène IV ou une matrice reproduisant la composition de la

membrane basale, alors que le collagène I et l'ostéonectine sécrétés dans les pathologies glomérulaires sensibilisent les CM aux signaux apoptotiques et permettent leur mort par apoptose (Mooney et al., 1999; Sugiyama et al., 1998). De surcroît, il a été montré qu'une matrice endommagée par un stress oxydatif conduit à la mort cellulaire par apoptose en activant la voie JNK (*Janus kinase*), amoindrit la phosphorylation des protéines kinase ERK1/2 ainsi que la phosphorylation et la translocation nucléaire de NFκB (Kochlatyi et al., 2002). L'inhibition des MMP augmente aussi l'apoptose des CM *in vitro* et *in vivo* en faisant intervenir l'arrêt du cycle cellulaire via l'activation de p53 et p21^{Cip1}, et l'entrée en apoptose modulée par Bax (Daniel et al., 2001).

Le cas de la fibronectine a été réexaminé plus récemment. Elle est en effet un constituant normal de la matrice extracellulaire tout en étant surexprimée par les CM activées. Elle exercerait un rôle protecteur. Les auteurs montrent que l'abrogation de l'expression de la fibronectine induit l'apoptose mésangiale, et que cet effet passe par la voie intrinsèque associée à la libération du cytochrome C et l'activation des caspase-3 et 9 (Wu et al., 2005). Par ailleurs, des souris délétées en sous-unité α₈ de l'intégrine α₈β₁, récepteur transmembranaire de la fibronectine, montrent un taux et une durée d'apoptose plus longs lors de l'agression glomérulaire dans un modèle de glomérulonéphrite aiguë (Hartner et al., 2008). Enfin, les constituants de la matrice, interagissant avec les diverses intégrines membranaires, activent ILK (*Integrin-Linked Kinase*) qui a été démontrée comme étant un facteur de survie des CM, en activant la voie de l'Akt (Ohnishi et al., 2006).

La cellule mésangiale...du monologue au dialogue

La cellule mésangiale se trouve dans un contexte pluricellulaire. Elle participe à un « dialogue » entre les différentes cellules présentes, endothéliales, mésangiales et épithéliales, où chacune semble être « entendue » par les autres.

- *Une polyphonie à trois voix.* Au cours du développement, c'est le **VEGF** sécrété par les podocytes qui incite les cellules endothéliales à se multiplier et à former un capillaire. Les cellules endothéliales produisent ensuite le **PDGF-B** qui permet à son tour aux CM de migrer du mésenchyme métanéphrique vers le glomérule, de se multiplier et de scinder ce capillaire unique en plusieurs boucles pour former le floculus. Cet ordre chronologique a été habilement démontré par une mutation hypomorphe du VEGF-A spécifique aux podocytes. Ces cellules produisent alors une forme peu active du VEGF-A. Les souris hétérozygotes naissent avec des glomérules normaux à J1, mais perdent ensuite leurs cellules endothéliales vers J3 puis leur mésangium au bout du cinquième jour. Les podocytes survivent pendant deux semaines attachés aux vestiges de la membrane basale d'un capillaire désormais « fantôme » (Eremina et al., 2006).
- *Les interactions entre CM et cellules endothéliales.* Les CM contribuent aussi à l'équilibre de la communauté en assurant la structure glomérulaire, en fabriquant la matrice et en épaulant l'endothélium au niveau du pôle capillaire. Quand Les CM et les cellules endothéliales se trouvent côte à côte dans un environnement propice, les CM participent à la différenciation des cellules endothéliales et à leur organisation dans le but de créer une structure capillaire (Kitahara et al., 2005). Dans une condition pathologique où les cellules endothéliales sont altérées, la prolifération des CM et la sécrétion de facteurs de survie pourraient contribuer à la cicatrisation. Les CM expriment et sécrètent le VEGF (Tahara et al., 2011). Dans un contexte d'atteinte mésangiale initiale induite par l'injection d'anticorps anti-Thy1.1, les CM expriment les collagène I et III, étrangers à la matrice extracellulaire normale. Ils auraient un rôle dans la régénération des capillaires

glomérulaires désormais ballonnés. Une fois restructurés, les capillaires en retour stabilisent les CM et les empêchent de produire de la matrice en excès (Zhang et al., 2001).

▪ La communication entre CM et podocytes avait aussi fait l'objet de nombreux travaux. Il est logique de penser que des facteurs sécrétés par les CM puissent avoir des effets sur les podocytes qui se trouvent en aval. C'est ce qui se passe dans la néphropathie à IgA, où les IgA1 pathologiques sont retenus spécifiquement par les CM, mais non par les podocytes (Lai et al., 2008). Les agrégats d'IgA1 isolés de patients sont dépourvus d'effet direct sur les podocytes (Lai et al., 2009), alors que leur altération est évidente en clinique. En exposant des CM à des IgA1 provenant de patients, et en testant le milieu ainsi conditionné sur des podocytes en culture, il a été établi que les CM communiquent avec les podocytes *via* le système rénine-angiotensine (SRA) et les incitent à synthétiser davantage de TGF- β 1 (Wang et al., 2010b), à sous-exprimer la néphrine (Wang et al., 2009), diminuant leur adhérence (Wang et al., 2012). Le TNF- α est un autre facteur impliqué dans cette communication. Sécrété par les CM exposées à des IgA1 pathologiques, il induit sa propre expression et celle de ses deux récepteurs dans les podocytes (Lai et al., 2008), et contribue à leur apoptose (Wang et al., 2007b). Une autre situation intéressante est l'énigmatique hypercellularité mésangiale dans la néphropathie focale et segmentaire (FSGS) qui touche initialement les podocytes. Une ébauche d'explication se fait jour. En effet, il a été montré qu'une surexpression du PDGF-D spécifiquement dans les podocytes conduit à une prolifération mésangiale et à des lésions focales semblables à celle observées dans la FSGS, marquées par l'effacement des pédicelles et la progression vers la glomérulosclérose (van Roeyen et al., 2011).

▪ Un dialogue complexe souvent malheureux. Ainsi, par exemple, la forme latente de TGF- β 1, produite par les CM et stockée dans la matrice extracellulaire, est libérée lors d'une lésion mésangiale. Le TGF β 1 actif s'accumule à la surface des podocytes, les invitant à sécréter des facteurs comme le VEGF et le CTGF. Ces facteurs agissent alors par voie paracrine sur les CM, et participent à l'expression des éléments de la matrice et à la progression de la lésion (Lee and Song, 2009).

▪ Un dialogue rétrograde par rapport au flux de l'ultrafiltrat. Dans plusieurs exemples décrits ci-dessus, des médiateurs émis par les podocytes communiquent avec les cellules endothéliales (VEGF) ou les CM (PDGF), c'est-à-dire à contre-courant du flux de l'ultrafiltrat passant à travers la membrane basale. Intuitivement curieux, ce trafic est une réalité maintenant bien établie. Il peut se comprendre en considérant plusieurs faits rappelés par Schlöndorff et Banas (Schlondorff and Banas, 2009).

- Dans le modèle proposé pour la membrane basale, la filtration se fait à travers des pores remplis de gel ; des médiateurs solubles peuvent « diffuser » en fonction d'un gradient de concentration plutôt que de bouger par convection ;

- La filtration se fait à travers les espaces réduits entre les pédicelles des podocytes (*slit diaphragm*), générant probablement des turbulences qui seraient favorables à un flux rétrograde en certains endroits ;

- L'ultrafiltration n'est pas uniforme tout au long des capillaires ; elle s'arrête lorsque les forces en présence s'équilibrent, favorisant alors une diffusion rétrograde des médiateurs ;

- Enfin, la filtration est bien efficace lorsque la barrière de filtration se compose des cellules endothéliales/membrane basale/podocytes ; on peut s'interroger sur l'existence d'une réelle filtration lorsque les CM s'interposent entre les cellules endothéliales et la membrane basale, une situation qui là encore serait favorable à la diffusion rétrograde.

Objectifs de cette thèse

Les cellules mésangiales sont au cœur de nombreuses pathologies rénales. Leur atteinte modifie l'environnement glomérulaire, fragilise la structure, s'étale sur les cellules adjacentes, empêche le bon fonctionnement glomérulaire et altère la filtration. Cette atteinte s'initie dans tous les cas par un **processus inflammatoire** caractérisé par un changement morpho-biologique des CM, elles répondent par une dédifférenciation et deviennent dès lors myo-fibroblastiques réexprimant des protéines qu'elles réprimaient durant leur fonctionnement normal telle que l' α SMA. Elles sont ainsi en état « d'activation ». Elles sécrètent de multiples **facteurs inflammatoires** participant à l'infiltration des cellules immunitaires et au remodelage nécessaire à la résolution de la lésion, elles **prolifèrent** et meurent par **apoptose**. La phase aiguë pourrait également se perpétuer lorsque l'agression continue, entraînant une amplification des processus et la chronicité de la maladie.

La PTHrP est un facteur pléiotropique. Son expression est ubiquitaire et est augmentée dans les inflammations multi-organiques. Avec son caractère de cytokine, la PTHrP participe au processus inflammatoire avec un rôle tantôt délétère tantôt protecteur. Avec ses effets sur la croissance de diverses cellules au cours du développement et jusqu'à la vie adulte, elle amorce un signal mitogène ou s'y oppose. Avec sa capacité à participer à la décision de vie et de mort cellulaire, elle favorise ou non la survie. Et finalement, elle emprunte des voies d'action doubles, intracrine et auto/paracrine et elle pilote des voies signalétiques variées afin de susciter dans une cellule donnée, à un moment donné, une réponse spécifique.

Basés sur l'ensemble des caractéristiques dépeintes plus haut, **les objectifs** de ma thèse étaient les suivants :

- Evaluer l'effet de la PTHrP sur la **prolifération**, l'**apoptose** et la **migration** des cellules mésangiales et analyser les voies d'action de la PTHrP dans ces processus (voie **auto/paracrine** ou voie **intracrine**). De même, évaluer les voies signalétiques mises en jeu par la PTHrP dans la régulation de la prolifération et l'apoptose des cellules mésangiales.
- Etudier le rôle de la PTHrP dans l'inflammation mésangiale, sa **régulation** par les facteurs de l'inflammation et la réponse mésangiale à la PTHrP vis-à-vis de ce processus afin de **resituer la PTHrP dans le contexte inflammatoire**.
- Etudier l'expression et le rôle de la PTHrP dans un contexte pathologique glomérulaire **in vivo**, mettant en jeu les paramètres majeurs étudiés : la prolifération et l'apoptose ainsi que l'inflammation locale.

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

Modèle expérimental : CM en culture primaire

Préparation des cultures primaires des CM

L'approche expérimentale *in vitro* est basée sur des cellules mésangiales (CM) en culture primaire. Ces cultures avaient été établies comme suit : les reins de souris (3 semaines) ont été prélevés et leur cortex soumis à un tamisage séquentiel afin d'obtenir un culot enrichi en glomérules ; cette préparation, mise en culture en présence de DMEM (*Dulbecco-modified Eagle medium* ; Life Technologies, Saint Aubin, France) enrichi en sérum de veau fœtal (30%SVF ; PAA Laboratories ; Les Mureaux, France) et en antibiotiques (pénicilline 100 U, streptomycine 0,1 mg/mL ; Life Technologies), permet d'obtenir en 3 semaines une culture pure de CM. Un passage en milieu DMEM 20%SVF enrichi en D-Valine (50 mM, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier) élimine les éventuels fibroblastes résiduels qui ne peuvent ni assimiler cet acide aminé, ni synthétiser la L-valine. Les CM sont ensuite maintenues en culture à 37°C dans une atmosphère humide contenant 10% de CO₂ dans l'air, en présence de DMEM 20%SVF et d'antibiotiques (milieu standard). Le milieu de culture est renouvelé deux fois par semaine. Les cellules sont trypsinisées à confluence (Trypsine/EDTA ; Eurobio, Les Ulis) et réensemencées dans des boîtes de 25 ou 75 cm² selon les protocoles. Les CM ont été utilisées dans l'ensemble des travaux entre les passages 4 et 16.

Les cultures primaires ont été établies à partir de souris $\alpha\text{SMA-CreER}^{T2}/\text{PTHrP}^{\text{loxP/loxP}}$ (CM^{CreLox}) ou de souris C57Bl/6 (CM^{Bl/6}), une lignée constituant plus de 70% du fond génétique de nos souris CreLox. Une lignée de CM très utilisée dans la littérature, les Mes-13 (SV40 MES13, ATCC CRL-1927), a également servi de contrôle.

Souris « CreloxP » $\alpha\text{SMA-CreER}^{T2}/\text{PTHrP}^{\text{loxP/loxP}}$

Les cultures primaires de cellules mésangiales CM^{CreLox} sont issues de souris « CreLox » (Figure 2.1), résultant du croisement de souris « floxées » sur le gène de la PTHrP ($\text{PTHrP}^{\text{loxP/loxP}}$) (He et al., 2001) avec des souris $\alpha\text{SMA-CreER}^{(T2)}$ exprimant une protéine de fusion associant une Cre-recombinase et un domaine de liaison d'un récepteur aux œstrogènes (ER), insensible aux œstrogènes naturels, sous le contrôle du promoteur de l' α -actine du muscle lisse (αSMA) (Metzger and Chambon, 2001). Les souris CreLoxP sont générées à l'IGBMC (Strasbourg) grâce à l'aide du Dr Daniel Metzger. Les souris $\text{PTHrP}^{\text{loxP/loxP}}$, qui comportent deux séquences LoxP de part et d'autre de l'exon 4 du gène de la PTHrP codant pour l'essentiel de la protéine, nous ont été fournies par le Dr Andy Karaplis (McGill, Montréal) (He et al., 2001). Puisque les CMs en culture expriment αSMA , un traitement par le 4-hydroxy-tamoxifène (4-OH-TAM) des CM^{CreLox} permet d'activer la Cre-recombinase et d'« exciser » le gène de la PTHrP.

Excision de la PTHrP sur les CM^{CreLox} et vérification de l'excision

Les CM^{CreLox} ont été traitées avec le 4-OH-TAM (Sigma-Aldrich) à 5 μM pendant 2 jours, puis ont été maintenues sans 4-OH-TAM pendant 4 semaines. Un lot de CM^{CreLox} a été retraité avec le 4-OH-TAM (5 μM) pendant 5 jours consécutifs avant de vérifier le niveau d'excision en semaine 5. Des CM^{CreLox} contrôles ont été traitées dans les mêmes conditions avec le solvant (1% éthanol en concentration finale dans le milieu). L'activation de la Cre-recombinase par le 4-OH-TAM doit conduire à l'excision

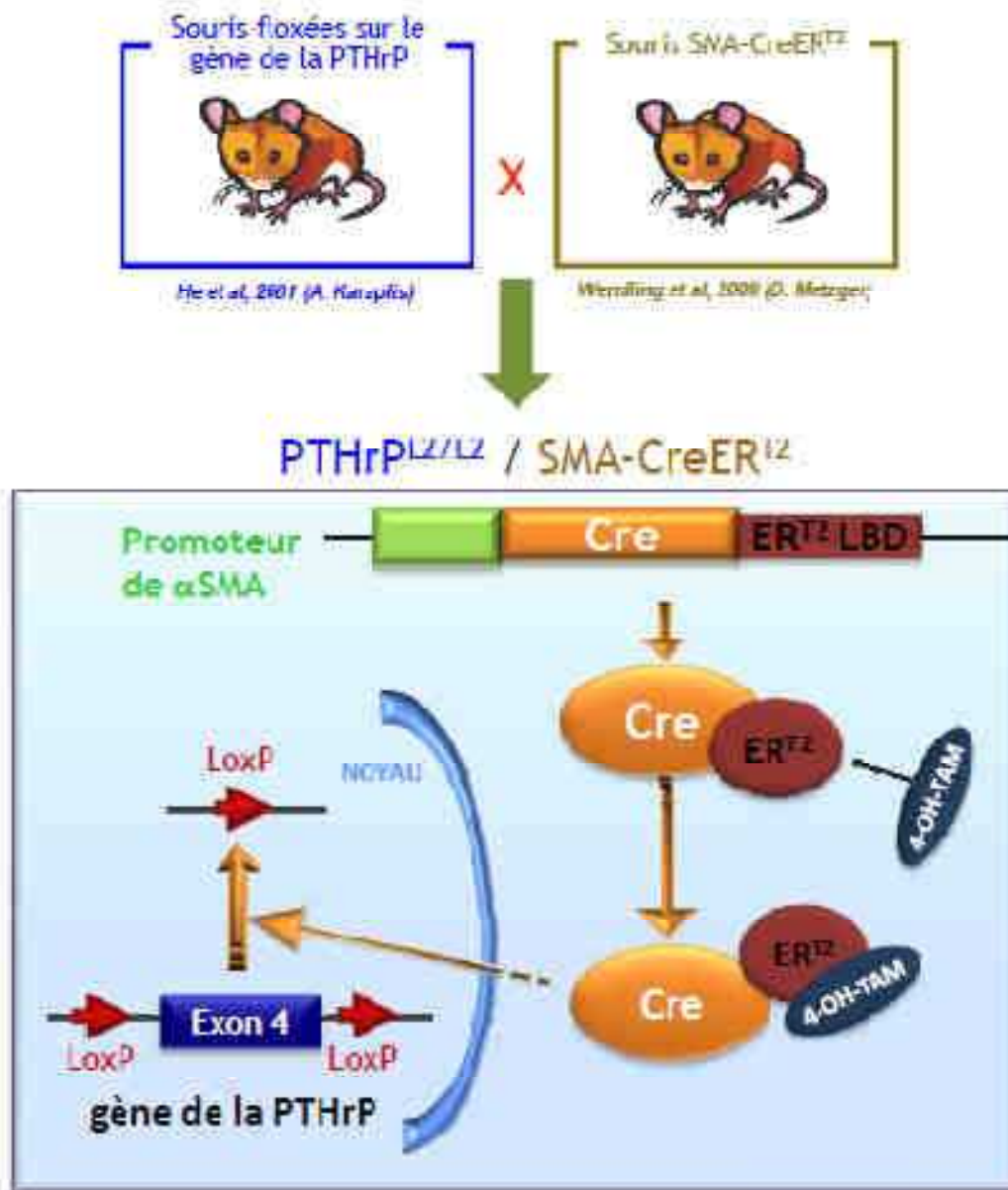


Figure 2.1 : Modèle de souris PTHrP^{loxP}/αSMA-CreER^{T2}

Ces souris résultent du croisement entre une souche de souris floxée sur le gène de la PTHrP (PTHrP^{L2/L2}) et une souche de souris exprimant une protéine de fusion sous le contrôle du promoteur de l'α-SMA (SMA-CreER^{T2}). Cette protéine de fusion associe la Cre-recombinase à un site de liaison chimérique du récepteur des oestrogènes (ER^{T2}LBD, *Estrogen Receptor Transformed² Ligand Binding Domain*). La Cre-recombinase est ainsi seulement activée par le métabolite actif du tamoxifène, et peut alors procéder à l'excision de l'exon 4 du gène de la PTHrP par la recombinaison entre les deux séquences LoxP.

de la séquence entre les deux LoxP du gène de la PTHrP. Ceci a été vérifié au niveau de l'ARNm de la PTHrP (RT-PCR) et au niveau de l'ADN (PCR et électrophorèse sur gel d'agarose).

Pour la vérification de l'excision sur l'ADN, les cellules sont recueillies par trypsinisation. Le culot de cellules est incubé une nuit dans un bain marie à 65°C, dans un tampon de lyse (50 mM Tris à pH 7-8, 5 mM EDTA, 1% SDS, 200 mM NaCl) en présence de 1 mg/mL de protéinase K (Sigma-Aldrich). L'ADN est extrait par un mélange phénol/chloroforme (v/v), précipité par l'éthanol absolu, rincé à l'éthanol 70% puis repris dans 10-30 µl d'eau (*DNase-free*). L'utilisation du couple d'amorces 920-923 (**tableau 2.1, Figure 2.2**) conduit à l'apparition d'une bande de 550 pb indiquant l'excision de l'exon 4. Le couple d'amorces 922-923 permet au contraire d'amplifier un fragment de 255 pb lorsque l'exon 4 est présent, mais cet amplicon disparaît en cas d'excision par la Cre-recombinase (l'amorce 922 reconnaît une séquence dans le fragment de gène excisé). Il permet de quantifier le degré d'excision à condition de réaliser la PCR avec 25 cycles, une condition où l'accumulation de cet amplicon est linéaire. La charge en ADN de l'échantillon analysé est vérifiée par les amorces ADN28 et ADN30 amplifiant un fragment de la myogénine (gène domestique).

La réaction d'amplification (PCR) de ces gènes a été réalisée dans un thermocycleur (Master cycler gradient, Eppendorf). Un volume de 30 µl contenant 2 µl d'ADN génomique, 1 nM dNTPs, 0,3 µM d'amorces et 1 unité de Taq polymérase (Roche) et son tampon concentré 10 fois (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8,8) a été utilisé. Après une dénaturation à 94°C pendant 5 min, l'amplification se déroule avec 25 cycles comme suit : dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation à 55°C pendant 30 s et élongation à 72°C pendant 30 s, suivie de 7 min à 72°C.

Surexpression de gènes : transfections plasmidiques

Nous avons utilisé les plasmides suivants : un plasmide codant pour la PTHrP(1-139) humaine entière (« *wild-type* », PTHrP-WT) ou tronquée pour la séquence NLS (PTHrP-ΔNLS) ou pour le peptide signal (PTHrP-ΔSP). Ces plasmides sont intégrés dans un vecteur pcDNA3 et codent pour l'expression de protéines de la PTHrP taguées à l'hémagglutinine (HA). Brièvement, pour **la multiplication** des plasmides, ils ont été incorporés aux bactéries *Escherichia coli* thermosensibles compétentes par choc thermique et la sélection des cellules transformées est réalisée par l'ajout d'ampicilline dans le milieu de culture. Après multiplication des cellules transformées, les plasmides sont purifiés avec le kit«HiSpeed® Plasmid Maxi kit» selon les instructions du fournisseur (Qiagen S.A.,Courtaboeuf, France), puis dosés à l'aide de l'appareil NanoDrop (ThermoScientific). Le rendement de la purification est également analysé en récoltant une fraction de l'éluât et de l'éluant à chaque étape de la purification, et en les analysant après dépôt sur gel d'agarose.

La transfection : Les CM^{CreLox} sont ensemencées dans des plaques 6 puits et mises en culture pendant 24h avant d'être transfectées avec 2µg de l'un des trois plasmides codant pour les protéines de fusion PTHrP-HA (PTHrP-WT, PTHrP-ΔNLS, PTHrP-ΔSP) ou avec le vecteur plasmidique vide (pcDNA3, groupe contrôle). Les transfections sont réalisées avec la Lipofectamine 2000® (Life Technologies) selon les instructions du fabricant. Les cultures transfectées de façon stable sont sélectionnées par un traitement à la généticine (G418, 300 µg/mL, Life Technologies). L'efficacité de la transfection est ensuite vérifiée au niveau de l'ARNm par RT-PCR à l'aide des amorces spécifiques pour la PTHrP humaine reconnaissant les trois formes (**Tableau 2.1**) et par immunomarquage avec un anticorps anti-HA (**Tableau 2.2** ; Merck Millipore, Saint Quentin-en-Yvelines). L'expression du

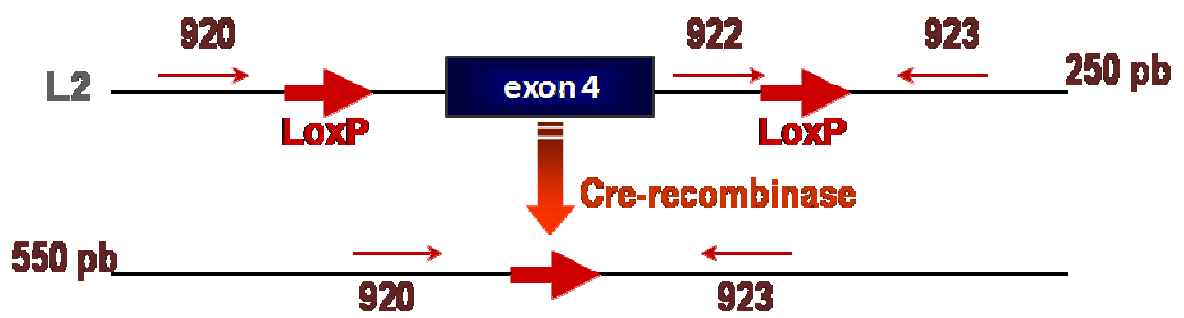


Figure 2.2 : Schéma représentant les séquences utilisées afin d'analyser l'excision du gène de la PTHrP.

récepteur R-PTH1 est vérifiée par Western blot. Les études sur les CM transfectées ont été réalisées entre le 1^{er} et le 4^{ème} passage après la transfection stable.

Caractérisation des CM

Avant toute utilisation, les CM sont caractérisées par un immunomarquage positif avec un anticorps dirigé contre le Thy1.2 (spécifique, dans le rein, des CM) et l' α SMA (exprimée par les CM en culture) ainsi qu'un immunomarquage négatif avec des anticorps dirigés contre les cytokératines (spécifiques des cellules épithéliales) (**Tableau 2.2**). Des cellules musculaires lisses aortiques de souris (CMLAo, culture primaire) ainsi que des cellules HK-2 (lignée de cellules épithéliales rénales humaines, ATCC CRL-2190) avaient été incluses comme contrôles positifs respectivement pour α SMA et les cytokératines. Les cellules mésangiales Mes-13, lignée très étudiée, ont également servi de contrôle.

Etudes *in vitro*

Protocoles expérimentaux

Pour évaluer les effets de IL-1 β sur l'expression de la PTHrP et d'autres facteurs, les CM^{CreLox} ensemencées dans des boîtes de 25 cm² à sous-confluence (80-90% de confluence), sont rendues quiescentes pendant 24h en milieu DMEM sans SVF mais supplémenté par 0,1% d'albumine sérique bovine (BSA), avant d'être traitées par IL-1 β (10 ng/mL ; Sigma Aldrich,) pendant des temps variables (5 min à 24h selon les protocoles). Les cellules sont alors i) soit trypsinisées et le culot congelé à -80°C pour l'extraction des ARN totaux, ii) soit lysées pour l'extraction des protéines. Suivant le même protocole, les effets d'autres facteurs influençant l'expression de la PTHrP ont été étudiés : TNF- α (10 ng/mL ; Sigma-Aldrich), PDGF-B (10ng/mL ; Sigma-Aldrich). Dans certaines études, les cellules ont été prétraitées avec l'actinomycine D (5 μ g/mL ; Sigma-Aldrich) pour bloquer la transcription (30 min avant), ou ont été traitées par l'actinomycine D après exposition à IL-1 β (10 ng/mL pendant 30 min) pour les études de stabilité des ARNm. Les études sur les voies de signalisations ont été réalisées par le prétraitement des cultures cellulaires pendant 1h avec des inhibiteurs spécifiques : Gö6983, un inhibiteur de la protéine kinase C (5 μ M, Sigma-Aldrich) ; H89, un inhibiteur de la protéine kinase A (1 μ M, Sigma Aldrich) ; BAY 11-7085, un inhibiteur de IKK β (10 μ M, Calbiochem) ; NS389, un inhibiteur sélectif de la COX-2 (10 μ M, Sigma-Aldrich) et LY294002, un inhibiteur de la PI3-K (20 μ M, Sigma-Aldrich).

Pour évaluer les effets de la PTHrP, les CM^{CreLox} à sous-confluence ont été soumises à un protocole analogue : synchronisation (24 h, DMEM 0,1%BSA), traitement avec 100 nM de PTHrP(1-36) (NeoMPS, Illkirch) pendant des temps variables (5 min à 24h), extraction des ARNm ou des protéines.

Etude de la prolifération des CM par incorporation de BrdU

Les cellules sont dispersées dans des plaques de 96 puits (10000 cellules/puits). Après 24h, les cellules sont synchronisées pendant 24h puis traitées pendant 24h à 72h. Le principe du test réside

Gène Cible	Amorce Sens	Amorce Anti-sens
Amorces souris qRT-PCR (ARN)		
PTHrP	CAG CCG AAA TCA GAG CTA CC	CTC CTG TTC TCT GCG TTT CC
R-PTH1	GGG CAC AAG AAG TGG AIC AI	GGC CAI GAA GAC GGI GIA GI
Cox-2	CCG TGC TGC TCT GTC TTA AC	TTG GGA ACC CTT CTT TGT TC
MCP-1	TTC CTC CAC CAC CAT GCA G	CCA GCC GGC AAC TGT GA
iNOS	CAG CTG GGC TGT ACA AAC C	CAT TGG AAG TGA AGC GTT T
VEGF	CAG GCT GCT GTA ACG ATG AA	GCA TTC ACA TCT GCT GTG CT
PDGF	GGA GCA CAG ACT GGA GGA	GTC GAG GAG CAG ACT GGA
PGE2 synthase 1	GAG TTT TCA CGT TCC GGT GI	GGT AGG CTG TCA GCT CAA GG
TxA synthase	AGG TGC TGG GAC AAC GTA TC	GCC TCT GCT GTG AAC CTT TC
<i>18S</i>	CAT GCC CGT TCT TAG TTG GT	CGC TGA GCC AGT CAG TGT AG
Amorces homme qRT-PCR (ARN)		
PTHrP	CAA GAT TTA CGG CGA CGA TT	GAG AGG GCT TGG AGT TAG GG
Amorces PCR semi-quantitative (ADN)		
Cre-recombinase	ATT TGC CTG CAT TAC CGG TC	ATC AAC GTT TTC TTT TCG G
PTHrP 920	TTTGGAGGGTGCTCACTTAGAGCAA	PTHrP 923
PTIhrP 922	GTCCTCCTCACAGCCAAGACTGACT	PTIhrP 923
PTHrP 923	PTHrP 920 ou 922	CAGCAAACCATGGTGAGGCTCATCA
<i>Myogénine</i>	TTACGTCCATCGTGGACAGC (ADN28)	TGGGCTGGGTGTAGCCTTA (ADN30)

Tableau 2.1 : Liste des amorces utilisées en RT-PCR quantitative en temps réel (ARN) et en PCR semi-quantitative (ADN).

dans l'incorporation du Bromo-déoxy-Uridine (BrdU) au niveau du nouvel ADN synthétisé dans les cellules prolifératives pendant le temps total de l'expérience. Le test est effectué suivant le protocole du fournisseur du kit (Calbiochem®, Merck, Darmstadt, Allemagne). Après fixation, les cellules sont mises en contact avec l'anticorps primaire anti-BrdU, puis avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase qui catalyse la conversion du tétra-méthylbenzidine (TMB) incolore en une solution bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de BrdU incorporée dans les cellules. Le produit de la réaction colorée est alors quantifié par une lecture au spectrophotomètre à 450 nm de longueur d'onde.

Etude de la prolifération des CM par cytométrie de flux (FACS)

La cytométrie de flux (ou FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting) permet la détection de cellules marquées et en suspension grâce à des lasers, et leur quantification par rapport au nombre total de cellules. Ces expériences ont été réalisées sur un FACScan (Becton Dickinson, New-York) avec l'aide du Dr. Jochen Barths pour les réglages, l'acquisition et l'analyse des données (Institut de Virologie, Strasbourg).

Pour cette étude, les cellules sont perméabilisées et l'ADN du noyau de toutes les cellules est marqué à l'IP. Cette technique permet d'évaluer le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en mettant à profit leurs variations en quantité d'ADN. Le pourcentage de cellules en prolifération (total des cellules en phases S et G2/M du cycle cellulaire) est calculé.

Les CM^{CreLox} contrôles et excisées (entre les semaines 3 et 5 après traitement par le 4-OH-TAM) ainsi que les CM transfectées ont étéensemencées dans des boîtes de culture de 25 cm² en présence de DMEM 20%SVF et ont été utilisées à 50-60% de confluence. Toutes les cellules ont été rendues quiescentes avant d'être soumises à la condition étudiée. Au jour J0 sont constitués les groupes SVF, BSA et le groupe traité quotidiennement par 100 nM de PTHrP(1-36) (groupe BSA+PTHrP). Les cellules sont analysées à J1 et à J2. Les cellules sont récupérées et centrifugées (1000 g pendant 5 min à 4°C), les culots sont lavés au PBS plusieurs fois, puis les cellules sont perméabilisées et conservées à 4° dans l'éthanol 70%. Le jour de l'analyse, les cellules sont incubées dans un tampon (140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES) en présence de 100 µg/mL d'IP (Sigma-Aldrich). La lecture au FACS peut être faite dans l'heure qui suit.

L'acquisition des données en FACS a été faite sur 20 000 cellules/échantillon. L'analyse des résultats a été réalisée avec le logiciel CellQuest.

Etude de l'apoptose des CM par cytométrie de flux (FACS)

Le double marquage Annexin-V/IP sur cellules non perméabilisées permet de distinguer l'apoptose de la nécrose et de quantifier ces deux phénomènes. L'annexin-V marque la phosphatidylsérine qui bascule du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane lors de l'apoptose précoce. L'IP est un intercalant de l'ADN permettant de visualiser l'ADN des cellules nécrotiques dont les membranes plasmiques sont rompues.

Les CM^{CreLox} contrôles et excisées (entre les semaines 3 et 5 après traitement par le 4-OH-TAM) ainsi que les CM transfectées, ont étéensemencées dans des boîtes de culture de 25 cm² en présence de DMEM 20%SVF et sont utilisées à sous-confluence. Toutes les cellules ont été rendues quiescentes avant d'être soumises à la condition étudiée. Au jour J0, le milieu est renouvelé par du

DMEM 20%SVF (groupe SVF) ou remplacé par du DMEM 0,1%BSA (groupe BSA) ; un troisième groupe est traité quotidiennement par 100 nM de PTHrP(1-36) (groupe BSA+PTHrP). Les cellules sont analysées à J2 et à J3. L'absence de sérum est alors suffisante pour induire l'apoptose. Les cellules et les surnageants (contenant les débris et les cellules détachées) sont récupérés et centrifugés (1000 g pendant 5 min à 4°C) ; les culots sont lavés deux fois au PBS. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans un tampon (140 mMNaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mMHEPES), puis incubées 10 min à 4°C en présence de 0,5% d'Annexin-V-FITC (Roche, Bâle) et 2 µg/mL d'IP à l'abri de la lumière. Les cellules sont centrifugées, fixées dans le formol à 1% et conservées à 4°C dans l'obscurité jusqu'à l'analyse (dans les 6 jours).

L'acquisition des données en FACS a été faite sur 20 000 cellules/échantillon. L'analyse des résultats a été réalisée avec le logiciel CellQuest.

Etude de l'apoptose des CM par la technique TUNEL

La technique TUNEL (*Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nicked End Labeling*) permet la quantification *in situ* de l'apoptose, par marquage et détection de la fragmentation de l'ADN résultant de l'activation des endonucléases au cours de l'apoptose. Cette méthode est basée sur le marquage des extrémités 3'-OH libres de l'ADN par la terminal-transférase (TdT) : cette enzyme catalyse l'accrochage aux extrémités 3'-OH libres de nucléotides marqués à la fluorescéine conjuguée à une peroxydase. Le marquage est ensuite observé au microscope. Les cellules sont mises en culture dans des chambres de culture sur lame de verre (« *Chamber-slides* ») (50 000cellules par puit). Elles sont rendues quiescentes puis traitées pendant 24h à 48h avec ou sans le traitement souhaité. Ensuite les cellules sont fixées par un mélange méthanol/acétone (v/v, 4°C). Les lames sont alors saturées, perméabilisées et marquées selon le protocole fourni avec le kit « *in situ cell death detection kit, POD* » (Roche Diagnostics, Meylan, France). Des photographies de plusieurs champs représentatifs des lames sont prises avec un microscope à fluorescence (10 à 20 photos/puit). Le ratio de noyaux marqués par rapport au nombre total de noyaux est alors calculé à l'aide du logiciel Image J (NIH).

Mesure de l'AMP cyclique

Les CM,ensemencées en boîtes de 25 cm², sont rendues quiescentes par incubation en milieu DMEM 0,1% BSA pendant 24h. Elles sont alors toutes prétraitées (15 min) par un inhibiteur de phosphodiesterase, la 3-isobutyl-1-méthyl-xanthine (IBMX 200 µM, Sigma-Aldrich) et, dans certains cas, par un antagoniste du R-PTH1, le (Asn¹⁰,Leu¹¹,D-Trp¹²)-PTHrP(7-34)amide (100 nM ; Bachem, Weil-am-Rhein, Germany). Elles sont ensuite exposées (pendant 15 min) à des concentrations croissantes de PTHrP(1-36) (1 à 100 nM), à la forskoline (1 µM ; Sigma-Aldrich), à la PTH (100 nM, Bachem) ou à l'isoprotérénol (100 nM, Sigma-Aldrich). Les milieux de culture sont prélevés et les cellules sont lysées en présence de 0,5 mL d'HCl 0,1M contenant 1% de Triton-X100 (20 min à 37°C). Le lysat est centrifugé à 1300 g (10 min 4°C) et le surnageant est utilisé pour le dosage direct de l'AMP cyclique selon les indications du fabricant (Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay kit, Assay Designs, Euromedex, Souffelweyersheim, France). Ce dosage est aussi fait sur les milieux de culture. Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry sur le culot recueilli lors de la centrifugation du lysat. Les résultats sont exprimés en pmol/mg de protéines et représentent

l'accumulation d'AMPC en 15 min, tant au niveau intracellulaire qu'en éventuel débordement dans le milieu de culture.

Etudes *in vivo*

La glomérulonéphrite induite par le venin de serpent Habu (HSV, Habusnakevenom)

Pour cette étude nous avons utilisé des souris mâles C57BL/6 (âgées de 8 semaines) (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Les souris ont séjourné au moins une semaine à l'animalerie de la Faculté de Médecine avant le début du protocole, dans un environnement contrôlé en température (20°C), hygrométrie (70%) et avec un cycle jour/nuit. Les animaux avaient un libre accès à la nourriture (bouchons A04) et à l'eau du robinet. Les expériences ont été réalisées conformément aux recommandations de la Communauté Européenne (directive 86/609/EEC) et du Gouvernement Français (décret 87-848) concernant l'utilisation des animaux en recherche.

Une préparation de venin du serpent Habu *Trimeresurus flavoviridis* (Latoxan, Valence, France) a été injectée aux souris par voie intraveineuse. L'injection dans la veine caudale étant hasardeuse chez la souris, nous avons choisi de faire cette injection dans la veine jugulaire, avec une chirurgie légère. Pour ce faire, les souris ont été anesthésiées par injection intra-péritonéale d'un mélange kétamine-xylazine (60 mg/kg et 8 mg/kg respectivement), et placées sur une table chauffante afin de maintenir leur température corporelle à 37°C jusqu'au réveil. La veine jugulaire a été cathétérisée et le venin a été injecté lentement, une seule fois à chaque souris. Les souris se réveillaient dans l'heure qui suivait l'injection.

Dans une expérimentation préliminaire, nous avons testé différentes doses de HSV sur des groupes de 2 souris, à savoir 2, 3, 4 et 5mg/kg de poids corporel. A la dose de 4 ou 5 mg/kg, toutes les souris sont mortes dans les 24h suivant l'injection, alors qu'elles ont toutes survécu à la dose de 3 mg/kg. Les altérations histologiques étant plus marquées à cette dose par rapport aux doses inférieures, nous avons retenu la dose de 4 mg/kg poids corporel pour notre étude. Les souris "contrôles" ont été injectées dans les mêmes conditions avec le solvant (0.9% NaCl). Nous n'avons pas réalisé de néphrectomie controlatérale pour disposer de plus de matériel, notamment pour la préparation des glomérules isolés. Trois souris par groupe ont ensuite été sacrifiées au 1^{er}, 3^{ème} et 7^{ème} jour après l'injection. Sous anesthésie kétamine-xylazine, un cathéter a été inséré dans l'aorte abdominale puis, après avoir clampé l'aorte au-dessus des reins, ceux-ci ont été perfusés et lavés avec du sérum physiologique (0.9% NaCl) à 4°C. Les deux reins ont été prélevés. Sur un rein ½, les glomérules ont été isolés avec une technique associant des sédimentations, filtrations et lavages sur des tamis de maillage 125 et 71 µm. La préparation finale retenue sur le tamis de 53 µm contient les glomérules avec environ 10% de fragments de tubules. Cette préparation a été utilisée pour extraire l'ARN total par la méthode au Trizol. Le ½ rein restant a été fixé par immersion pendant 3 h dans une solution de paraformaldéhyde (4%, pH 7.4) et inclus en bloc paraffine pour les études histologiques.

Etude de l'expression des ARNs

Extraction

Echantillon cellulaire

L'ARN total a été extrait des culots cellulaires grâce au kit RNeasy et selon les indications du fabricant (Qiagen). Brièvement, les culots cellulaires sont mis en suspension dans un tampon de lyse puis homogénéisés par passage sur une colonne. La suspension est ensuite passée sur une deuxième colonne dont la membrane adsorbe l'ARN. Ce kit comprend un traitement par ADNase afin que l'ARN extrait ne soit pas contaminé par de l'ADN. L'ARN total est ensuite élué avec de l'eau de qualité PCR, sans ARNases.

Echantillon tissulaire

L'ARN total a été extrait avec le TRIzol selon le protocole du fournisseur (Life Technologies). Le TRIzol est une solution mono-phasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui maintient l'intégrité de l'ARN tout en détruisant les cellules et en dissolvant les autres composés cellulaires. Les échantillons tissulaires (préparation enrichie en glomérules), conservés dans l'azote liquide, sont mélangés à 1 mL de TRIzol puis broyés mécaniquement avec un vibro-broyeur MM400 (Retsch), permettant une agitation mécanique latérale (30 s^{-1}) et le broyage complet du tissu par des billes en acier, pendant 30 secondes à 1 min. Le mélange obtenu est laissé à incuber à température ambiante pendant 10 min.

Ensuite, l'adjonction de chloroforme (0,2 mL par échantillon) est suivie d'une agitation vigoureuse pendant 15 secondes puis d'un contact prolongé à température ambiante (2 à 15 min). Les échantillons sont ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 15 min à 4°C ce qui sépare le contenu des tubes en trois phases distinctes : une phase inférieure organique contenant les protéines, une interphase renfermant l'ADN et une phase supérieure aqueuse transparente contenant exclusivement l'ARN.

L'ARN est précipité dans la phase aqueuse supérieure par addition de 0,5 mL d'isopropanol par échantillon. Les tubes sont ensuite agités, laissés à température ambiante pendant 10 min puis centrifugés à 12000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot d'ARN est lavé par une solution d'éthanol à 75 % et centrifugé pendant 5 min à 7500 g à 4°C. Le culot est récupéré et séché à l'air puis remis en suspension dans un volume d'eau de qualité PCR sans ARNases.

Transcription inverse

Les ADNc sont obtenus par une transcription réverse (RT) pendant 1h à 37°C sur 5 µg d'ARN totaux, dans un volume final de 40 µl, en présence de 200 U de transcriptase réverse M-MLV (Life Technologies), 40 U d'inhibiteur de RNase (Life Technologies), 1 mM de désoxynucléotidetriphosphates (dNTP ; Roche Diagnostics) et 2 µM d'amorces non spécifiques p(dT)₁₅ (Roche Diagnostics).

qRT-PCR

L'amplification sélective des fragments d'ADNc d'intérêt est alors réalisée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) dans un LightCycler[®] avec le kit « LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green » (Roche Diagnostics). La PCR est réalisée dans un volume de 10 µl, en présence de 2 µl d'ADNc et 0,5 µM d'amorces spécifiques sens et antisens, avec 4 mM de MgCl₂, 0,2 µM de sonde SYBR Green, 0,4 µM de sonde d'hybridation et tampon de réaction « FastStart » (ADN polymérase, dNTPs, tampon). Le **tableau 2.1** donne la liste des amorces utilisées. Après une première dénaturation à 95°C (10 min), la PCR est réalisée en 45 cycles de dénaturation (10 s à 95°C), d'amorçage (5 s à 60°C) et de polymérisation (20 s à 72°C). Chaque échantillon est analysé et quantifié avec le logiciel d'analyse pour LightCycler (Roche Diagnostics). L'expression relative des différents gènes est calculée en rapportant les taux d'ARNm à ceux de 18S utilisé comme gène domestique. La taille des fragments amplifiés par PCR a été vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose (1,5 %) en présence de bromure d'éthidium.

Immunoprécipitation ("HuR-PTHrP mRNA complex Pull-down assay")

Les CM sont ensemencées dans des boîtes de 75 cm², synchronisées et traitées pendant 1h avec de IL-1β (10ng/mL) ou le solvant. L'immunoprécipitation est réalisée selon le protocole décrit par Peritz et ses collègues (Peritz et al., 2006). Brièvement, les CM sont lysées dans un tampon PLB (Polysome Lysis Buffer : 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM dithiothréitol, 2 mM vanadyl-ribonucléase, 100 U/mL "RNase Out", 0,05% NP-40 and 25 µl/mL d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases, dans de l'eau de qualité PCR). Le lysat contenant les protéines et les ARNm est « prélavé » avec des billes d'agarose portant des protéines A et G (20µl/0,5 mg de protéines cellulaires), permettant d'ôter toutes les protéines et anticorps capables de créer des liaisons non spécifiques avec les billes (*protein A/G plus-Agarose beads*, Santa Cruz, TebuBio, Le Perray-en-Yvelines, France). Les billes sont jetées, le surnageant est récupéré et mis à incuber sous agitation pendant la nuit à 4°C en présence d'un anticorps monoclonal anti-HuR (2µg/0,5mg de protéines, Santa Cruz) (**tableau 2.2**) ou d'un anticorps non-spécifique (IgG1, contrôle interne). Des billes d'agarose, qui vont agréger les complexes anticorps-antigènes, sont ensuite ajoutées (50µl/0,5mg de protéines) pour une deuxième incubation de 4h à 4°C. Après une centrifugation (3 000g pendant 5 min), les billes sont récupérées et mises à incuber en présence de 100µl de tampon PLB supplémenté avec 0,1% de SDS et 30µg/µl de protéinase K, pendant 30 min à 50°C dans un bain-marie avec agitation, afin de casser les liaisons protéines-agarose et dégrader les protéines du mélange. L'ARN est alors extrait avec un mélange phénol-chloroforme, puis purifié à l'aide du kit RNeasy (Qiagen) et amplifié comme décrit précédemment.

Anticorps primaires			
Anticorps	Sources	Dilutions	Application
α-SMA	Monoclonal, lapin, Epitomics	1/500	ICC
Akt	Monoclonal, souris, Santa Cruz	1/200	WB
phospho(Ser473)-Akt	Polyclonal, lapin, Cell Signaling	1/500	WB
phospho(Ser473)-Akt	Polyclonal, lapin, Cell Signaling	1/250	ICC
phospho(Thr308)-Akt	Polyclonal, lapin, Santa Cruz	1/200	WB
β-actine	Monoclonal, souris, Sigma-Aldrich	1/10000	WB
C13 antisérum (PTHrP)	Polyclonal, lapin, P. Esbrit (Madrid)	1/1200	IHC
C-myc	Monoclonal, souris, Sigma Aldrich	1/5000	WB
Cox-2	Monoclonal, souris, Santa Cruz	1/200	WB
E2F1	Polyclonal, lapin, Santa Cruz	1/200	WB
GAPDH	Monoclonal, souris, Millipore	1/1000	WB
HA (hémagglutinine)	Monoclonal, rat, Roche Diagnostics	1/6000	WB
HA (hémagglutinine)	Monoclonal, souris, Merck Millipore	1/300	ICC
HuR	Monoclonal, souris, Santa Cruz	1/100	ICC
HuR	Monoclonal, souris, Santa Cruz	4 µg/mg protéine	IP
Ki-67	Polyclonal, chèvre, Santa Cruz	1/100	IHC
NF-κB p65	Monoclonal, souris, Santa Cruz	1/200	WB
phospho(S536)-NF-κB p65	Polyclonal, lapin, Santa Cruz	1/200	WB
phospho(S536) NF-κB p65	Polyclonal, lapin, Abcam	1/100	ICC
NHERF1	Polyclonal, souris, Abcam	1/250	ICC
NHERF2	Polyclonal, lapin, Santa Cruz	1/100	ICC
p27 ^{Kip1}	Monoclonal, lapin, Epitomics	1/500	WB
Pan-Cytokératine	Monoclonal, souris, Abcam	1/300	ICC
R-PTH1	Monoclonal, souris, Santa Cruz	1/50	ICC
R-PTH1	Monoclonal, souris, Santa Cruz	1/200	WB
PTHrP (N19)	Polyclonal, chèvre, Santa Cruz	1/200	WB
PTHrP 2E11	Monoclonal, souris, IGBMC	1/100	ICC
Thy-1.2	Monoclonal, souris, Sigma Aldrich	1/50	ICC

Tableau 2.2 : Liste des anticorps primaires utilisés pour le Western blot et l'immunochimie.

ICC, Immunocytochimie; IHC, Immunohistochimie; IP, Immunoprécipitation; WB, Western blot; Ser ou S, sérine; Thr, thréonine

Etude de l'expression des protéines

Extraction des protéines totales

Après lavage des cellules adhérentes avec le PBS, les protéines totales sont extraites avec 300 µl de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,02% azide de sodium, 100 µg/mL PMSF, 1 µg/mL aprotinine, 1% NP-40) pour une boîte de culture de 25 cm². Après 20 min d'incubation à 4°C, les cellules sont grattées et centrifugées à 12 000 g pendant 5 min à 4°C. Les protéines sont présentes dans le surnageant.

Dosage des protéines

Le dosage des protéines contenues dans les surnageants a été réalisé par la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951). La lecture des échantillons se fait par rapport à une gamme étalon établie à partir d'une solution de BSA.

Western blot

Après ajout du tampon de charge de Laemmli (contenant 5% de 2β-mercaptoéthanol) aux échantillons de surnageant (v/v), les protéines sont dénaturées à 100°C et les extraits (15 µg) sont déposés sur un gel de polyacrylamide (30% acrylamide/bisacrylamide, 1 M Tris, 10% SDS, 10% APS, TEMED). Les protéines sont séparées par électrophorèse (150 V, migration pendant 2h). Le transfert est réalisé sur membrane de PolyvinylidèneDifluoride (PVDF) pendant 7 min par un système de transfert à sec (iBlot™ Dry Blotting System, Life Technologies). Après 10 min de rinçage sous agitation légère dans un tampon salin Tris (TBS, pH 7,5) contenant 0,05% de tween-20 (TBST), la membrane est saturée pendant 1h, sous agitation, à température ambiante dans du TBST contenant 5% de lait écrémé (TBST/lait). La membrane est ensuite incubée pendant la nuit à 4°C avec un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt (**Tableau 2.2**) dilué dans le TBST/lait. Après 3 lavages sous agitation dans le TBST, la membrane est incubée pendant 1h avec l'anticorps secondaire adéquat couplé à la peroxydase dilué au 1/20000 dans le TBST à température ambiante. Après 3 lavages avec le TBST, la révélation du marquage par chimioluminescence est réalisée par le kit de détection (Immobilon Western, Millipore, Molsheim, France) (Fusion Fx7, VilberLourmat, Marne-la-Vallée) avec une exposition de 30 s à 3 min en fonction de l'intensité du signal. Afin de vérifier que la quantité de protéines déposée dans les puits est homogène, la membrane est réutilisée après traitement par le réactif de Reblot (kit Reblot plus, Merck Millipore), rincée, puis exposée selon le même protocole à un anticorps anti-GAPDH (dilution 1/1000 dans le TBST/lait). L'intensité des bandes est estimée par le logiciel Bio1D (VilberLourmat).

Profilage protéomique

Le profilage protéomique a été réalisé avec le kit «*Mouse cytokine Array Panel A*» selon les instructions du fabricant (R&D systems, Lille, France). Les cellules sontensemencées et mises en culture dans des boîtes de 75 cm², jusqu'à confluence de 80%. Les CM sont alors synchronisées pendant 24h avant d'être traitées avec la PTHrP(1-36) (100 nM) ou son solvant (groupe contrôle) pendant 2h ou 4h, puis lysées avec les réactifs du kit. Le lysat est déposé sur la membrane de test et

incubé pendant la nuit avec le cocktail d'anticorps de détection fourni dans le kit. Après le rinçage de la membrane, un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (streptavidin-horseradishperoxidase, dilution à 1/2000) est ajouté et permet d'observer un signal par chimiluminescence, quantifié à l'aide du programme Bio1D (VilberLourmat). Les mesures sont effectuées sur le lysat cellulaire total et sont faites en double sur la membrane. Les résultats pour chaque cytokine sont exprimés par la moyenne des deux mesures en densité de pixels, après soustraction du bruit de fond déterminé par les contrôles négatifs présents sur la même membrane. Les effets de la PTHrP à 2h et à 4h ont été exprimés par la différence à chaque temps avec le groupe contrôle correspondant. Une valeur de 1 signifie qu'il n'y a aucun changement. Seules les différences supérieures à 1,5 ont été considérées comme importantes.

Immunocytochimie par immunofluorescence

Les cellules ont étéensemencées dans des chambres de culture sur lame de verre (Lab-Tek II ChamberSlide ; Nalge Nunc, Rochester, USA) à raison de 10 000 cellules par puits, en présence de 1 mL du milieu de culture habituel. Lorsque les cellules sont à 50% de confluence, le milieu est remplacé par le milieu sans sérum pendant 24h, avant d'exposer les cellules ou non (contrôle) à la PTHrP(1-36). Les cellules étaient alors rincées au PBS, fixées sur la lame avec une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA, dilué dans du PBS), puis perméabilisées en présence de Triton-X100, avant d'en saturer les sites de liaison non spécifiques (3% sérum normal de lapin ou de chèvre, Merck Millipore). Les cellules sont ensuite exposées, pendant 1h à température ambiante ou pendant la nuit à 4°C, à un anticorps primaire dilué dans du PBS ciblant le facteur d'intérêt (**Tableau 2.2**). Après trois lavages au PBS, un anticorps secondaire approprié (ciblant l'isotype et l'espèce) et couplé à un fluorochrome (Hilyte-Fluor™ ou Alexa) était appliqué pendant 1h à température ambiante (**Tableau 2.2**), en même temps qu'un marqueur nucléaire, le Hoechst 33342 (dilution 1/100^e). Cet agent intercalant se complexe à l'ADN et émet une fluorescence bleue. Un contrôle négatif sans l'anticorps primaire, mais avec l'anticorps secondaire, était réalisé parallèlement. Après montage des lames avec une goutte de solution anti-reflet glycérol/Moviol, le marquage est analysé en microscope à fluorescence (Nikon Eclipse E800) avec le logiciel NIS-elements.

Immunohistochimie

Après 3h de fixation dans le tampon PFA (+ 4°C), les prélèvements de reins obtenus lors du **protocole HSV** ont été inclus dans un bloc de paraffine, puis coupés au microtome (7 µm). Dans une première série, les sections ont été colorées à l'hématoxyline/éosine (noyau en brun, cytoplasme en rose) pour en analyser l'histologie. Une deuxième série de coupes a été incubée au citrate de sodium (10 mM, 10 min au micro-onde) puis incubées pendant 1h à température ambiante dans une solution de blocage (5% de sérum normal approprié, dans du PBS supplémenté en 0,1% Triton X-100). Les sections ont été ensuite incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire spécifique dilué dans le tampon de blocage : anticorps polyclonal de chèvre anti-Ki67 (1/100, Santa Cruz), anticorps monoclonal de lapin anti-αSMA (1/500, Epitomics, Euromedex) (**Tableau 2.2**). Ces anticorps ont ensuite été ciblés par des anticorps secondaires appropriés biotinylés (1h d'incubation, IgGbiotinylés 1/200, VectorLabs, Eurobio). Après extinction de l'activité peroxydase endogène par incubation pendant 20 min avec 1,6% H₂O₂ (Sigma-Aldrich) dans le méthanol, les sections ont été traitées pendant 1h avec le complexe avidine-biotine-peroxydase (VectorLabs), suivi d'une

révélation en présence de 3,3'-diaminobenzidine comme chromogène (VectorLabs). Des contrôles négatifs ont été faits en omettant l'anticorps primaire. Les images ont été réalisées à divers grossissements avec un microscope Nikon.

Un marquage immunohistochimique en fluorescence a aussi été réalisé sur une troisième série de coupes, comme décrit ci-dessus pour le marquage sur les cellules. Les sections de rein ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec un anticorps polyclonal de lapin anti-PTHrP(24-35) (1/1200, antisérum C13 donné par le Dr Pedro Esbrit, Madrid), suivi d'un anticorps secondaire, IgG anti-lapin couplé à Alexa-488 (Life Technologies). Les noyaux sont marqués au bisBenzimide H 33342 (HOE 33342, Sigma-Aldrich). Des contrôles négatifs ont été faits en remplaçant l'anticorps primaire par un sérum de lapin non immun.

Expression des résultats et analyse statistique

Les résultats sont exprimés par leur moyenne \pm l'erreur standard sur la moyenne (ESM) pour 3 à 9 échantillons indépendants. Outre l'expression relative *versus* 18S (ARNm) ou la GAPDH (protéines) déjà signalée, les données présentées sur les graphes ont souvent été « normalisées », pour plus de clarté, par rapport au groupe contrôle correspondant au même temps (fixé à 1). Les analyses statistiques ont été réalisées par un test t de Student (2 groupes) ou une analyse de variance (ANOVA) suivie d'une localisation des différences individuelles par un test de Tukey; une transformation des données a été faite si nécessaire pour satisfaire aux tests de normalité et d'égalité des variances (SigmaStat 2.03, JandelScientific). Une différence est considérée significative pour $P < 0,05$.

Chapitre 3

“Parathyroid hormone-related protein is a mitogenic and a survival factor of mesangial cells : role of intracrine and paracrine pathways”

Mazène Hochane et al.

(Manuscrit soumis à Endocrinology, en révision le 5 septembre 2012)

Parathyroid hormone related protein is a mitogenic and a survival factor of mesangial cells: role of *intracrine* and *paracrine* pathways

Mazène Hochane, Denis Raison, Catherine Coquard, Olivier Imhoff, Thierry Massfelder, Bruno Moulin, Jean-Jacques Helwig, Mariette Barthelmebs

INSERM, U682, Equipe Cancer du rein et Physiopathologie rénale, Faculté de Médecine (M.H., D.R., C.C., T.M., J.J.H., M.B.), Université de Strasbourg (M.H., D.R., C.C., T.M., B.M., J.J.H., M.B.), Nouvel Hôpital Civil, Département de Néphrologie (O.I., B.M.), F-67000 Strasbourg, France.

Running headline: Mitotic and survival effects of PTHrP

(37 characters)

Word count: Abstract: 237
Manuscript: 4880

Keywords: PTHrP, mesangial cells, proliferation, apoptosis, intracrine/paracrine pathways

Corresponding authors :

Mazène Hochane, INSERM U682, Equipe Cancer du rein et Physiopathologie rénale, Faculté de Médecine, 11 rue Humann, F-67085 Strasbourg, France

Phone: 333.68.85.34.53; Fax: 333.68.85.34.59. E-mail: alicante81@yahoo.com

Dr Mariette Barthelmebs, INSERM U682, Equipe Cancer du rein et Physiopathologie rénale, Faculté de Médecine, 11 rue Humann, F-67085 Strasbourg, France

Phone: 333.68.85.34.60; Fax: 333.68.85.34.59. E-mail: barthelm@unistra.fr

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

ABSTRACT

Glomerulonephritis is characterized by the proliferation and apoptosis of mesangial cells (MC). The parathyroid-hormone related protein (PTHrP) is a locally active cytokine that affects these phenomena in many cell types, through either paracrine or intracrine pathways. The aim of this study was to evaluate the effect of both PTHrP pathways on MC proliferation and apoptosis. *In vitro* studies were based on MC from male transgenic mice allowing PTHrP-gene excision by a CreLoxP system. MC were also transfected with different PTHrP constructs: wild type PTHrP (PTHrP-WT), PTHrP devoid of its signal peptide (PTHrP- Δ SP) or of its nuclear localization sequence (PTHrP- Δ NLS). The results showed that PTHrP deletion in MC reduced their proliferation even in presence of serum and increased their apoptosis when serum-deprived. Treatment with exogenous PTHrP(1-36) had no effect on proliferation but improved MC survival. Transfection of MC with PTHrP- Δ SP significantly increased their proliferation and partially reduced their apoptosis. Overexpression of PTHrP- Δ NLS protected MC from apoptosis induced by serum deprivation without changing their proliferation rate. PTHrP-WT transfection conferred both mitogenic and survival effects. PTHrP-induced MC proliferation was associated with p27^{Kip1} downregulation and c-Myc/E2F1 upregulation. PTHrP increased MC survival through the activation of cAMP/PKA and PI3-K/Akt pathways. These results reveal that PTHrP is a cytokine of multiple roles in MC, acting as a mitogenic factor only through an intracrine pathway, and reducing apoptosis through both paracrine and intracrine pathways. Thus, PTHrP appears as a probable actor in MC injuries.

INTRODUCTION

Mesangial cells (MC) play a key role in both physiological and pathological functioning in the glomerulus. In normal conditions there is little mesangial turnover. However, aberrant proliferation of MC occurs in immune-mediated glomerular diseases, including IgA nephropathy and lupus nephritis (1). MC apoptosis is another characteristic of human and experimental glomerulonephritis (2, 3). Experimental models of glomerulonephritis show initial mesangiolysis linked to excessive MC apoptosis (4). Later during glomerulonephritis, MC apoptosis tends to balance the excessive proliferation of MC. This ends into either homeostatic cicatrization or progression into glomerulosclerosis and loss of kidney function (5, 6).

The parathyroid-hormone related protein (PTHrP), originally identified as the factor responsible of malignant hypercalcemia (7), was later found to be widely expressed in foetal and adult tissues where it acts locally rather than in an endocrine manner (8). PTHrP has a constitutive expression but may also be upregulated by inflammatory cytokines (9, 10). A role for PTHrP has been suggested in the pathogenesis of inflammatory/autoimmune diseases (11). The N-terminal PTH-like region of PTHrP allows it to interact with the PTH receptor (PTH/PTHrP receptor or PTH1R) in an auto/paracrine fashion. Cytosolic PTHrP can also use a *bipartite* multibasic nuclear localization signal (*bNLS*) to translocate to the nucleus and to act through an intracrine pathway (12). PTHrP effects on proliferation have been described in many cell types. These effects are largely pathway and cell-dependent. In vascular smooth muscle cells (VSMC), PTHrP has been shown to induce proliferation through the intracrine pathway, while it is antiproliferative through the paracrine one (12, 13). In renal epithelial and pancreatic β cells mitogenic effects of PTHrP have been reported through the paracrine pathway (14, 15). PTHrP has also been shown to regulate cell apoptosis. PTHrP is most often a survival factor either through intracrine or paracrine pathways, as shown in chondrocytes and renal carcinoma cells, respectively (16, 17). Opposite effects of the two pathways were also observed in prostate cancer cells where intracrine PTHrP increases, while paracrine PTHrP decreases survival (18).

In different animal models of renal disease, overexpression of PTHrP has been reported in the glomerulus, suggesting a role of PTHrP in the initiation or evolution of the pathology (19-23). *In vivo*, PTHrP seems not to be expressed in MC under physiological conditions, but immunoreactive PTHrP was present in MC after protein overload in the rat or in diabetic nephropathy in the mouse and patients (19, 23). The effects of PTHrP on MC proliferation have been analyzed in few studies. An increase in [³H]-thymidine incorporation was reported when exogenous PTHrP(1-36) was added to the culture media of rat or human MC (20, 24). However, the effect of intracrine PTHrP on MC proliferation has not yet been considered, and whether PTHrP has any effect on MC apoptosis remains unknown.

The aim of this work was to elucidate the effects of paracrine and intracrine PTHrP on MC proliferation and apoptosis. For this purpose, MC in primary culture were obtained from C57BL/6 mice kidneys (MC^{Bl6}) and from transgenic mice carrying a CreLoxP system for PTHrP (MC^{CreLoxP}) (25, 26). Transgenic mice allow specific knockdown of PTHrP by 4-

hydroxy-tamoxifen (4-OH-Tam) treatment in cells expressing alpha smooth muscle actin (α SMA) which is the case in MC in culture. Stable transfection of MC was also performed with different constructs of human PTHrP: PTHrP devoid of its NLS (Δ NLS), so only active through paracrine pathway, PTHrP devoid of its signal peptide (Δ SP) with only intracrine action, and wild type PTHrP (WT) (supplemental Fig. 1). Altogether, our results show that PTHrP induces MC proliferation through the intracrine pathway, while it reduces apoptosis through both paracrine and intracrine pathways.

MATERIALS AND METHODS

Mouse strains

Homozygous PTHrP-floxed (PTHrP^{L2/L2}) mice were crossmated with α SMA-Cre-ER^{T2(tg/0)} mice (25, 26). Male α SMA-Cre-ER^{T2}/PTHrP^{L2/L2} (PTHrP^{CreloxP}) mice as well as male C57BL/6 mice (Janvier, Le Genest Saint Isle) were used to prepare MC in primary culture. Mice breeding, maintenance and experiments were in compliance with guidelines of the European Community and the French government concerning the use of animals.

Mesangial cell culture

MC in primary culture were derived from glomeruli isolated from the PTHrP^{CreloxP} mice (MC^{CreloxP}) and C57BL/6 mice (MC^{Bl6}). Briefly, kidneys obtained from 6-week old mice were subjected to sequential sieving (125, 71 and 53 μ m) and sedimentation for extraction of glomeruli which were set in cultured in DMEM (Life Technologies, Saint Aubin, France) enriched with 30% foetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin, Life Technologies). MC outgrew from the glomeruli in about 1 week. Cells were further grown for 1 week in DMEM with high D-valine content (2.5 mg/ml, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier) for the elimination of fibroblasts. MC were then maintained in DMEM supplemented with 20% FBS and 1% antibiotics at 37° C in a 10% CO₂ atmosphere. Serum-free media was supplemented with 0.1% BSA. MC were used between passage 4 and 16.

Fluorescent immunocytochemistry

Cells growing in glass chamber slides (Lab-Tek II[®], Nalge Nunc, Rochester, USA) were used at 60% confluence. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min, washed with PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in 1 mM glycine-PBS for 10 min. After 40 min exposure to blocking buffer (3% BSA in PBS), cells were incubated for 1 h at room temperature with the specific primary antibodies diluted in blocking buffer, and then for 1 h in the dark with the appropriate Alexa-conjugated IgG secondary antibodies (Life Technologies). Nuclei were stained by bisBenzimide H 33342 (HOE 33342, Sigma-Aldrich). After final washes, cells were mounted with Moviol and visualized by fluorescence-microscopy (Nikon Eclipse E800) using NIS-elements program.

The characterization of MC was performed by positive staining to anti-Thy1.2 and anti- α SMA antibodies (Sigma-Aldrich), and negative staining for a marker of epithelial cells, anti-pancytokeratin (Abcam, Paris, France). HK-2 cells, a renal epithelial cell line (ATCC CRL-

2190, LGC France, Illkirch, France), Mes-13, a mesangial cell line (ATCC CRL-1927) and murine VSMC in primary culture were used as positive/negative controls (supplemental Fig. 2). HK-2 and Mes-13 cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS.

PTHrP deletion in MC and transfection with the various human PTHrP-HA constructs were verified by immunocytochemistry as detailed below. The activation of the PI3-K/Akt pathway by PTHrP was visualized with anti-phospho(S473)-Akt (Cell Signaling, Ozyme, Saint Quentin-en-Yvelines, France). Finally, the presence and distribution Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factors 1 and 2 (NHERF1 and NHERF2) were looked for, as well as colocalisation with the PTH1R, with specific antibodies (NHERF1: Abcam; NHERF2 and PTH1R: Santa Cruz, TebuBio, Le Perray-en-Yvelines, France).

PTHrP gene excision

MC^{CreloxP} were seeded in 25 cm² flasks at low confluence (20-30%) and treated for three alternative days with 4-OH-Tam (5 μM, Sigma-Aldrich). Control MCs were treated with the solvent (1% ethanol final concentration). To verify PTHrP gene excision, DNA was extracted by phenol/chloroform method and recombination of PTHrP floxed alleles was verified by PCR using the strategy depicted on Fig. 1 with primers shown on Table 1. The presence of amplicons was verified by electrophoresis in 1.5% agarose gel. PTHrP deletion was also verified by RT-PCR (primers on Table 1) and immunofluorescence staining using monoclonal anti-PTHrP(34-53) antibody (PTH2E11, IGBMC, Strasbourg, France). Effect on PTH1R expression was verified by Western blot. Control and PTHrP-excised MC were used within 4 passages after excision.

Mesangial cell transfection

MC^{CreloxP} were seeded in 6 well plaques, grown for 24 h and transfected with plasmids (2 μg) encoding for one of three HA-tagged human PTHrP(1-139) constructs (supplemental Figure 1): PTHrP-ΔNLS, PTHrP-ΔSP or the wild type PTHrP (PTHrP-WT) as previously reported (12, 27). MC transfected with the empty plasmid vector (pcDNA3) were taken as control. Transfection was performed with Lipofectamine 2000[®] (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Stably transfected cells were selected by geneticin treatment (G418, 300 μg/ml, Life Technologies). Transfection efficacy was verified by immunostaining with an anti-HA antibody (Merck Millipore, Saint Quentin-en-Yvelines) and RT-PCR for the expression of the human PTHrP isoforms. The expression of PTH1R was verified by RT-PCR and Western blot. PTHrP-transfected MC were used within 4 passages after transfection.

Real time RT-PCR

Total RNA was extracted from MC using the RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Five μg of total RNA were reverse transcribed in a reaction buffer (Life Technologies) with non-specific primer p(dT)15 (Roche Diagnostics, Meylan, France), at 37°C for 1 h. Quantitative real-time PCR reaction was performed with the "LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green[®] kit (Roche Diagnostics). The sense and antisense

primers are given in Table 1. Each sample was analyzed 3 times and quantified with the analysis software for LightCycler (Roche Diagnostics).

Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) flow cytometry

For the evaluation of proliferating cells, MC were seeded in 25 cm² flasks with DMEM+20% FBS. At 60-70% of confluence, cells were serum-deprived for 24 h in order to render them quiescent. Medium was then changed for DMEM+20% FBS or DMEM+0.1% BSA. Some groups were treated with PTHrP(1-36) (1, 10 or 100 nM daily treatment; NeoMPS, Illkirch, France) or with platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB, 10 ng/ml; Sigma-Aldrich). Studies were also performed on control and PTHrP-excised MC^{CreloxP}, and on the MC stably transfected by the PTHrP constructs. Cells proliferation was analyzed over three days by FACS. Briefly, cells were harvested, washed with PBS, fixed and permeabilized by 70% ethanol for 1 h at 4°C. Cells were then washed again with PBS, treated with RNase (50 µg/ml) for 1 h at 37°C, stained with propidium iodide (1 mg/ml, Sigma-Aldrich) for 10 min and filtered through a 60-µm nylon mesh (Merck Millipore) before analysis using FACSort flow cytometer (BD Biosciences, Pont de Claix, France). The fraction of proliferating cells (cells in phase S+G2/M) was determined using FCS express software (DeNovo Software, Los Angeles, CA). All experiments were performed at least three times in triplicate.

For the evaluation of apoptotic cells, MC were seeded in 25 cm² flasks and rendered quiescent as above. Medium was then changed for DMEM+20% FBS or DMEM+0.1% BSA in order to induce apoptosis for 1 or 2 days. Here again, PTHrP-excised and PTHrP-transfected MC were used, and some groups were treated with exogenous PTHrP(1-36) (1-100 nM). FACS analysis of apoptotic cells was performed on both floating and adherent cells as described previously (28). Briefly, cells were harvested, stained with Annexin V-FITC (Roche Diagnostics) and propidium iodide (5 µg/ml, Sigma-Aldrich) in a dark chamber at 4°C for 10 min and fixed in 1% formol before analysis using FACSort flow cytometer (BD Biosciences). The fraction of viable and apoptotic cells was determined using FCS express software (DeNovo Software). All experiments were performed at least three times in triplicate.

Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation

MC were seeded in 96-well plate (20,000 cells/ml), grown for 24 h before being rendered quiescent in serum-deprived medium for the next 24 h. The medium was then changed for DMEM+20% FBS or DMEM+0.1% BSA for the following days (1-3 days). Some groups were treated with PTHrP(1-36) (100 nM), PDGF-BB (10 ng/ml) or the corresponding vehicle. In an other study, MC deleted of endogenous PTHrP expression (PTHrP-excised MC^{CreloxP}) were synchronized before being exposed for 24 h to conditioned medium obtained from both pcDNA3- and PTHrP- Δ SP-transfected MC. BrdU incorporation studies were performed according to the protocol of the manufacturer (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)

For the evaluation of apoptotic cells by TUNEL, MC were seeded on glass slides (Lab-Tek II®), maintained 24 h in DMEM+20% FBS and synchronized for 24 h in DMEM+0.1% BSA. Apoptosis was induced by serum-deprivation, changing the medium for DMEM+0.1% BSA with or without treatments: PTHrP(1-36)(100 nM), PKA inhibitor (H89, 1 μM, Sigma-Aldrich), PI3-K inhibitor (LY294002, 20 μM, Sigma-Aldrich) or PKC inhibitor (Gö6983, 5 μM, Sigma-Aldrich), alone or in combination as indicated in the appropriate Figures. Treatments with the inhibitors began 1 h before the addition of PTHrP(1-36). Apoptotic cells were detected by the commercial “In situ cell death detection” kit (Roche Diagnostics) following the manufacturer’s specifications. Nuclei were stained by HOE 33342. Cells were subsequently analyzed by fluorescence-microscopy (Nikon Eclipse E800) using NIS-elements program. At least 10 successive images were taken in each condition. The percent of apoptotic cells was calculated with the help of ImageJ program (NIH, USA).

Direct cyclic AMP measurements

MC were seeded in 25 cm² flasks. After 24-h growth, they were made quiescent by serum-deprivation for 24 h. Cells were pretreated for 15 min by 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX 200 μM, Sigma-Aldrich) and sometimes by the PTH1R antagonist, (Asn¹⁰,Leu¹¹,D-Trp¹²)-PTHrP(7-34) amide (100 nM, Bachem, Weil-am-Rhein, Germany). Cells were then exposed for 15 min to PTHrP(1-36) (1-300 nM), PTH(1-34) (100 nM, NeoMPS), forskolin (10 μM, Sigma-Aldrich) or isoproterenol (100 nM, Sigma-Aldrich). The reaction was stopped by aspiration of the incubation medium, followed by the addition of 0.5 ml of 0.1 M HCl supplemented with 1% Triton-X100 for cell lysis during 20 min at 37°C. The lysed cells were scrapped and samples were centrifuged at 1300 x g for 10 min at 4°C. Cyclic AMP concentrations were determined in the supernatants and in the incubation media, using a “Direct enzyme immunoassay” kit (Assay Designs, Euromedex, Souffelweyersheim, France). Protein concentration was determined in each sample by the Lowry method (29). Total cAMP levels were expressed as pmol/mg of protein.

Western blot

MC proteins were extracted at 4°C with the lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40) supplemented with 0.5% proteases and phosphatases inhibitors (Sigma-Aldrich). The supernatants were collected after centrifugation at 12000 x g at 4°C for 5 min. Protein concentration was determined by the Lowry method (29). Protein expression was analyzed by Western blot using the semi-dry iBlot (Life Technologies). The primary antibodies used were as follows: anti-HA (1/6000, Roche Diagnostics), anti-Akt (1/200, Santa Cruz), anti-phospho(Thr308)-Akt (1/200, Santa Cruz), anti-phospho(S473)-Akt (1/500, Cell Signaling), anti-p27^{Kip1} (1/500, Epitomics, CliniSciences, Nanterre, France), anti-c-Myc (1/5000, Sigma Aldrich), anti-E2F1 (1/200, Santa Cruz), anti-PTH1R (1/200, Santa Cruz) and anti-glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) (1/1000, Merck Millipore). The appropriate horseradish peroxylase-conjugated secondary antibody was used. Chimioluminescence was detected (Immobilon Western kit, Merck Millipore) and visualized (Fusion Fx7, Viber Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Statistical analysis was performed when appropriate using Student's *t* test, one-way or two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Statistics were run with SigmaStat® (SPSS Inc, Chicago, USA). Differences with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Exogenous PTHrP(1-36) has no effect on MC proliferation

The effect of PTHrP(1-36) has been first studied on MC^{B16}. Quiescent cells were exposed to DMEM+20% FBS or DMEM+0.1% BSA at D0, before FACS analysis over three days (Fig. 2A). In presence of serum, more than 30% of MC were proliferating, a percent which decreased to 10% in serum-deprived cells. In the later cells, daily PTHrP treatment (100 nM) did not modify the proliferation level. However, PDGF-BB, a known mitogen for MC (10 ng/ml, added only on D0), increased MC proliferation at D1 before its effects faded later. In order to see if PTHrP(1-36) may conversely reduce MC proliferation, PTHrP(1-36) was added daily to MC grown in serum-supplemented media. Here again, no change in cell proliferation was observed (Fig. 2B).

MC proliferation was also assessed by BrdU incorporation in serum-deprived media in presence of incrementing PTHrP(1-36) concentrations (1 to 100 nM) (Fig. 2C) or with PDGF-BB (Fig. 2D). Here again, PTHrP showed no effect on cell proliferation all over the three-day experiment, while PDGF-BB increased BrdU incorporation ($P < 0.001$).

Excision of PTHrP gene in MCCreloxP reduces MC proliferation

We verified PTHrP gene-excision in terms of DNA, mRNA and protein (Fig. 3). PTHrP gene deletion was stable over 5 weeks (Fig. 3A, 3B), resulted in 90-99% decrease in PTHrP mRNA (Fig. 3C) and absence of PTHrP protein in all the cells (Fig. 3D). PTH1R expression was maintained although at a lower level (Fig. 3E).

To determine whether endogenous PTHrP has any effect on MC proliferation, PTHrP-excised MC^{CreloxP} were compared to control cells by FACS analysis (Fig. 4A) and BrdU incorporation (Fig. 4B). Results showed a decrease in MC proliferation in PTHrP-deleted cells even in presence of serum ($P < 0.001$). Serum withdrawal reduced MC proliferation of about 30% in control MC^{CreloxP} and 50% in PTHrP-deleted cells ($P < 0.001$). Finally, the addition of exogenous PTHrP(1-36) had no impact on cell proliferation, whether tested on control or PTHrP-excised cells. These observations suggest that endogenous PTHrP significantly regulates MC proliferation but not through PTH1R activation.

PTHrP increases MC proliferation through intracrine pathway, via c-Myc, E2F1 and p27Kip1

PTHrP has been shown to induce proliferation through the intracrine pathway in VSMC (12). To further investigate whether a similar effect is responsible of PTHrP-mediated proliferation in MC, cells were stably transfected with HA-tagged PTHrP-WT, Δ NLS or Δ SP. HA-immunostaining as expected, showed only cytoplasmic localization of PTHrP- Δ NLS, while PTHrP-WT and PTHrP- Δ SP were seen in both nuclei and cytoplasm (supplemental Fig. 3). The transfected cells expressed high levels of the human PTHrP forms, at least 50 fold higher than the mouse endogenous isoform, and had no effect on PTH1R expression (supplemental Fig. 4).

BrdU incorporation analysis on D1 (Fig. 5A) showed that MC transfected with either PTHrP-WT or PTHrP- Δ SP proliferated more than those transfected with PTHrP- Δ NLS or empty plasmid (pcDNA3). This was particularly clear in absence of serum ($P < 0.001$). Moreover, the increase in proliferation rate was similar in PTHrP-WT and PTHrP- Δ SP transfected cells while, on the other hand, proliferation was not different between PTHrP- Δ NLS and pcDNA3-transfected cells. These findings indicate that only intracrine PTHrP is mitogenic.

Next, to gain more insight into the possible mechanisms involved in the intracrine effects of PTHrP, we showed that conditioned medium from PTHrP- Δ SP transfected MC did not increase BrdU incorporation in cells deleted from endogenous PTHrP (Fig. 5B). This result excludes that some mitogenic factors were released into the medium by PTHrP- Δ SP overexpression. It has been described that nuclear PTHrP induces VSMC proliferation by enhancing c-Myc expression that targets p27^{Kip1} to proteosomal degradation (30). Similar pathways seem to be induced in MC (Fig. 5C). Indeed, c-Myc expression was enhanced in MC overexpressing PTHrP-WT or PTHrP- Δ SP, and decreased after knockdown of PTHrP in MC. One principal cell-cycle transcription factor, E2F1, displayed the same profile. Conversely, p27^{Kip1} expression was decreased in MC overexpressing PTHrP-WT and enhanced in PTHrP deleted MC.

PTHrP is a survival factor for MC

MC apoptosis was tested in control and PTHrP-deleted MC^{CreloxP} at D2, by FACS (Fig. 6A) and TUNEL analysis (Fig. 6B). Serum deprivation increased the number of apoptotic MC, and this increase was more important in MC after PTHrP knockdown ($P < 0.01$). No difference was seen between control and PTHrP-excised cells in presence of serum. Exogenous PTHrP(1-36) rescued MC by reducing apoptosis in both control and PTHrP-deleted cells (Fig. 6A and 6B), and this effect was dose-dependent (Fig. 6C).

To further verify the pathway through which PTHrP elicits cell survival, quiescent MC stably transfected with one of the PTHrP constructs (WT, Δ NLS, Δ SP) or the empty vector were analyzed by FACS after 24 h of serum deprivation. The results showed that overexpression of any of the three PTHrP forms conferred resistance to apoptosis, particularly with PTHrP-WT (39%, $P < 0.001$) and PTHrP- Δ NLS (31%, $P < 0.001$), and less with PTHrP- Δ SP (8.4%, $P < 0.05$) (Fig. 6D). Altogether, these data indicate that PTHrP contributes to MC survival mainly by the auto/paracrine pathway.

cAMP/PKA and PI3-K/Akt pathways are involved in PTHrP-induced MC survival

PTH1R activation by PTHrP was classically associated with the cAMP/PKA pathway. This is also the case in MC. PTHrP induced a dose-dependent accumulation of cAMP (Fig. 7A), a response shared with PTH(1-34), forskolin and isoproterenol. PTHrP(1-36)-induced accumulation of cAMP was selectively decreased by the PTH1R antagonist, (Asn¹⁰,Leu¹¹,D-Trp¹²)PTHrP(7-34) amide. PTHrP has also been shown to promote cell survival through PI3-K/Akt activation in renal carcinoma cells, and renal fibroblasts and epithelial cells (17, 22). On MC, PTHrP(1-36) induced time-dependent phosphorylation of Akt at both Thr308 and Ser473 as shown by Western blot (Fig. 7B), and confirmed for Ser473 by immunostaining (supplemental Fig. 5).

To see if PTHrP(1-36) effect on MC survival is associated with the activation of cAMP/PKA or Akt phosphorylation, we used serum-deprived PTHrP-excised MC^{CreloxP}, a situation where MC apoptosis is maximum. A 24-hour cell exposure to PTHrP(1-36) reduced apoptosis analysed by TUNEL, a response that was reversed by inhibitors of PKA (H89, 1 μ M) or PI3-K (LY249002, 20 μ M) (Fig. 7C). Otherwise, an inhibitor of PKC (Gö6983, 5 μ M) decreased basal apoptosis of MC by itself, and was unable to block PTHrP-induced response. These data highlight the critical role of the PI3-K/Akt and cAMP/PKA pathways in PTHrP-induced MC survival.

DISCUSSION

PTHrP is a locally active cytokine with well-known effects on proliferation and apoptosis in different cell types through distinct intracrine and/or paracrine pathways. PTHrP was found to be upregulated in MC after protein overload in mouse, as well as in human and experimental diabetic nephropathies (19, 23, 31). Here we explored the effects of intracrine and paracrine PTHrP on the two aforementioned processes on mouse MC in primary culture. Our results show that intracrine PTHrP enhances MC proliferation while paracrine PTHrP exerts a major antiapoptotic effect.

We first analysed the effect of PTHrP(1-36) on the proliferation of MC prepared from C57BL/6 mice kidneys. Treatment with PTHrP(1-36) did not elicit any mitogenic effect on MC, whatever the dose used (1 to 100 nM, once or daily treatment) or the time point considered (1 to 3 days). In contrast, MC responded to PDGF-BB by an increase in proliferation. This result with PTHrP(1-36) differs from those previously reported by Soifer et al.(20) and Bosch et al.(24) on rat and human MC respectively, in which PTH1R activation by PTHrP(1-36) increased MC proliferation. In a recent study, Ortega et al.(32) also found that PTHrP(1-36) exerted a short-lasting proliferative effect of human MC (24 h), which ended with MC hypertrophy. As in mouse MC, PTHrP(1-36) stimulated cAMP accumulation in human MC (24), while its signaling pathway has not been identified in rat MC. However, cAMP accumulation was described to be anti-mitogenic in these cells (33-35). We therefore searched for any anti-proliferative effect of PTHrP on MC and again found none. We think

that the contrast between our results and those of the studies on human and rat MC may be related to species discrepancies or differences in the population doubling times.

Next, we wanted to see if endogenous PTHrP exerts any effect on MC proliferation. For this purpose, we used MC obtained from CreloxP transgenic mice that allowed conditional PTHrP gene-excision by 4-OH-Tam treatment in cells expressing α SMA (25, 26). This was feasible because MC in culture express this protein. One important observation is that the deletion of endogenous PTHrP in MC reduced their proliferation even in serum-supplemented media. Attempts to restore MC proliferation by the addition of exogenous PTHrP(1-36) were again unsuccessful. It is worth mentioning that PTHrP gene-excision slightly decreased PTH1R protein but a functional PTH1R was still present as shown by the effects of paracrine PTHrP on survival. This inferred that other PTHrP fragment and/or pathway accounted for the proliferative effect. In fact, post-translational modifications of PTHrP through proteolytic cleavage may generate different secreted fragments of PTHrP such as PTHrP(67-86), PTHrP(38-64), PTHrP(38-94) in the midregion or PTHrP(107-139) in the C-terminal tail (36). Among these, PTHrP(67-86) and PTHrP(107-139) have been shown to inhibit breast cancer cells proliferation through yet-unknown receptor(s) (37), and PTHrP(38-64) increases epithelial alveolar pulmonary cells proliferation (38). Also, PTHrP(38-94) was shown to inhibit breast cancer cells proliferation through nuclear translocation (39). We did not directly investigate the impact of these fragments on MC proliferation. However, the transfection of MC with PTHrP- Δ NLS did not show any effect on mitogenesis. Indeed, PTHrP- Δ NLS is truncated between 88-91 and 102-106, which means that fragments like PTHrP(67-86), (38-64) and (107-139) may exist, only a fragment containing a NLS, PTHrP(38-94), will be modified. Thus, the absence of any effect on proliferation in MC overexpressing PTHrP- Δ NLS excludes a probable role of these fragments on our cells.

Otherwise, PTHrP acting through intracrine pathway has been shown to increase proliferation in VSMC (12, 13), or prostate and colon cancer cells (40, 41). The overexpression of PTHrP-WT or PTHrP- Δ SP elicited a mitogenic effect on MC. The absence of difference in the induction of proliferation in cells overexpressing PTHrP-WT or PTHrP- Δ SP, together with PTHrP- Δ NLS lacking any mitotic effect, indicate that only intracrine PTHrP was responsible of the MC mitogenesis. In addition, the absence of mitogenic effect on PTHrP-deleted MC exposed to conditioned media from MC transfected with PTHrP- Δ SP suggests that PTHrP-induced proliferation is related to a direct intracellular effect of PTHrP but not to the release of other mitogenic factors in the medium. We next showed that PTHrP deletion increased p27^{Kip1} protein level, and PTHrP-WT overexpression decreased it. p27^{Kip1} is a well-known inhibitor of cell cycle, and MC mitogens such as PDGF-BB and basic fibroblast growth factor (bFGF) diminish p27^{Kip1} expression in MC (42). Nuclear PTHrP has also been shown to target p27^{Kip1} to proteasomal degradation in VSMC (13, 30). In addition, transfection of MC with PTHrP-WT or PTHrP- Δ SP increased c-Myc and E2F1 protein levels, while PTHrP deletion reduced them. E2F1 is required for cell cycle progression and was found, as well as the proto-oncogen c-Myc, to be upregulated in proliferating MC *in vitro* and *in vivo* (43, 44). Intracrine PTHrP-induced expression of c-Myc was also associated with VSMC proliferation

(30). p27^{Kip1} level seemed normal in MC transfected with PTHrP- Δ SP. These cells showed particularly high levels of c-Myc and E2F1 which may exert opposite regulations on p27^{Kip1} expression (45-47).

MC apoptosis characterizes the initial event of experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. However, apoptosis is also seen in advanced stages when excessive MC proliferation occurs (48). In this study, we report an anti-apoptotic function of PTHrP in MC and, at our best knowledge, this has not been described previously. Our results show that PTHrP-gene deletion increased the number of apoptotic cells subsequent to serum withdrawal, while the treatment with PTHrP(1-36) or the overexpression of PTHrP (WT,- Δ NLS,- Δ SP) reduced it. Survival response was particularly marked in cells transfected with PTHrP-WT or PTHrP- Δ NLS, suggesting that PTHrP mainly acted through the auto/paracrine pathway. This was confirmed by the rescue of apoptotic PTHrP-deleted MC through exogenous PTHrP(1-36) treatment. These results are in accordance with results seen in other cell types. PTHrP was shown to protect renal fibroblasts, tubuloepithelial cells, pancreatic β -cells and renal carcinoma cells against apoptosis principally through the auto/paracrine pathway (49-51). The nuclear translocation of PTHrP was also associated with enhanced chondrocyte survival after serum deprivation (16).

We next examined the signaling pathways that mediate the anti-apoptotic effects of PTHrP in MC. The stimulation of the PTH1R has been classically associated to adenylyl cyclase and PKA activation (52). The PTH1R can also bind to NHERF1 and NHERF2 and recruit PLC β , leading to PKC activation (53). Our results show that the activation of the PTH1R by PTHrP elicits a large increase in cAMP. Interestingly, we also found that PTHrP activates Akt in MC through the phosphorylation of both Thr308 and Ser473. The PI3-K/Akt signaling is a key pathway involved in cell survival (54, 55). Our group reported previously in renal carcinoma cells that Akt activation was responsible of PTHrP-induced cell survival (17). Here, we show that inhibition of both the PI3-K/Akt and cAMP/PKA pathways, but not PKC, reversed the anti-apoptotic effects of PTHrP in MC. These results are in agreement with other studies (49, 56). The complete reversion of PTHrP-induced survival in MC through the inhibition of either PKA or Akt suggests that these two factors may work in concert to activate or inhibit the same downstream signaling pathway. Possible targets are for example NF κ B, Bad and GSK-3 β , which may be differentially phosphorylated by each PKA and Akt. They contribute to MC survival in response to PDGF and insulin (57, 58), but many other candidates also exist. Further studies are needed to clarify this point.

We noticed that PKC inhibition solely diminished MC apoptosis but did not reverse the response to PTHrP. In fact, interaction between PTH1R and NHERF1/2 has been shown to be necessary for PKC activation (53). In this respect, we found that NHERF1 and NHERF2 were expressed in our cells, but surprisingly NHERF1 was localized to the nucleus (supplemental Fig. 6). Multiple co-immunoprecipitation analysis did not show any interaction between PTH1R and NHERF1 or NHERF2 (M. Hochane, personal data), and colocalization was not found by immunostaining (supplemental Fig. 6).

In conclusion, this study reveals the complexity of PTHrP signaling in MC. PTHrP is a mitogenic and a survival factor through intracrine and paracrine pathways, respectively. PTHrP shares many effects with PDGF, increasing proliferation and survival, and stimulating Akt phosphorylation. Given the prominent role of these processes in the progression of glomerulonephritis, PTHrP may be a potential actor in this pathology. Further studies are needed to evaluate the role of PTHrP in this context *in vivo*. The clinical relevance of PTHrP should also be considered through analysis of PTHrP expression in human samples of glomerulonephritis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), the University of Strasbourg, and by the French Ministry of Higher Education. This work is part of the PhD thesis of M.H., and M.B. is a Research Director from CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique). The authors thank Andrew Karaplis (McGillUniversity, Montréal) for the gift of PTHrP^{L2/L2} mice, and Daniel Metzger (IGBMC, Strasbourg) for the generation of the α SMA-Cre-ER^{T2}/PTHrP^{L2/L2} mice. The authors also gratefully acknowledge the expertise of Jochen Barths for the FACS analysis and Stéphanie Mathé for secretarial assistance.

REFERENCES

1. **de Zubiria Salgado A, Herrera-Diaz C** 2012 Lupus nephritis: an overview of recent findings. *Autoimmune Dis* 2012:849684
2. **Ott U, Aschoff A, Pocock J, Funfstuck R, Jirikowski G, Stein G, Wolf G** 2007 DNA fragmentation in chronic glomerulonephritis: an immunohistological analysis. *Nephron Clin Pract* 105:c18-28
3. **Liu L, Qiu W, Wang H, Li Y, Zhou J, Xia M, Shan K, Pang R, Zhou Y, Zhao D, Wang Y** 2012 Sublytic C5b-9 complexes induce apoptosis of glomerular mesangial cells in rats with Thy-1 nephritis through role of interferon regulatory factor-1-dependent caspase 8 activation. *J Biol Chem* 287:16410-16423
4. **Bagchus WM, Jeunink MF, Elema JD** 1990 The mesangium in anti-Thy-1 nephritis. Influx of macrophages, mesangial cell hypercellularity, and macromolecular accumulation. *Am J Pathol* 137:215-223
5. **Baker AJ, Mooney A, Hughes J, Lombardi D, Johnson RJ, Savill J** 1994 Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest* 94:2105-2116
6. **Kashihara N, Sugiyama H, Makino H** 1999 Mechanisms for induction of apoptosis and glomerular disease. *Nephrol Dial Transplant* 14 Suppl 1:52-54
7. **Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall RE, Hammonds RG, Moseley JM, Diefenbach-Jagger H, Rodda CP, Kemp BE, Rodriguez H, Chen EY, et al.** 1987 A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* 237:893-896
8. **Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Broadus AE, Stewart AF** 1996 Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 76:127-173
9. **Eto M, Akishita M, Ishikawa M, Kozaki K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Ako J, Sugimoto N, Nagano K, Sudoh N, Toba K, Ouchi Y** 1998 Cytokine-induced expression of parathyroid hormone-related peptide in cultured human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 249:339-343
10. **Funk JL, Cordaro LA, Wei H, Benjamin JB, Yocum DE** 1998 Synovium as a source of increased amino-terminal parathyroid hormone-related protein expression in rheumatoid arthritis. A possible role for locally produced parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 101:1362-1371
11. **Funk JL** 2001 A role for parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of inflammatory/autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* 1:1101-1121
12. **Massfelder T, Dann P, Wu TL, Vasavada R, Helwig JJ, Stewart AF** 1997 Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:13630-13635
13. **Fiaschi-Taesch N, Sicari BM, Ubriani K, Bigatel T, Takane KK, Cozar-Castellano I, Bisello A, Law B, Stewart AF** 2006 Cellular mechanism through which parathyroid hormone-related protein induces proliferation in arterial smooth muscle cells: definition of an arterial smooth muscle PTHrP/p27kip1 pathway. *Circ Res* 99:933-942

14. **Guthalu Kondegowda N, Joshi-Gokhale S, Harb G, Williams K, Zhang XY, Takane KK, Zhang P, Scott DK, Stewart AF, Garcia-Ocana A, Vasavada RC** 2010 Parathyroid hormone-related protein enhances human ss-cell proliferation and function with associated induction of cyclin-dependent kinase 2 and cyclin E expression. *Diabetes* 59:3131-3138
15. **Garcia-Ocana A, De Miguel F, Penaranda C, Albar JP, Sarasa JL, Esbrit P** 1995 Parathyroid hormone-related protein is an autocrine modulator of rabbit proximal tubule cell growth. *J Bone Miner Res* 10:1875-1884
16. **Henderson JE, Amizuka N, Warshawsky H, Biasotto D, Lanske BM, Goltzman D, Karaplis AC** 1995 Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. *Mol Cell Biol* 15:4064-4075
17. **Agouni A, Sourbier C, Danilin S, Rothhut S, Lindner V, Jacqmin D, Helwig JJ, Lang H, Massfelder T** 2007 Parathyroid hormone-related protein induces cell survival in human renal cell carcinoma through the PI3K Akt pathway: evidence for a critical role for integrin-linked kinase and nuclear factor kappa B. *Carcinogenesis* 28:1893-1901
18. **Bhatia V, Mula RV, Weigel NL, Falzon M** 2009 Parathyroid hormone-related protein regulates cell survival pathways *via* integrin alpha6beta4-mediated activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Mol Cancer Res* 7:1119-1131
19. **Izquierdo A, Lopez-Luna P, Ortega A, Romero M, Guitierrez-Tarres MA, Arribas I, Alvarez MJ, Esbrit P, Bosch RJ** 2006 The parathyroid hormone-related protein system and diabetic nephropathy outcome in streptozotocin-induced diabetes. *Kidney Int* 69:2171-2177
20. **Soifer NE, Van Why SK, Ganz MB, Kashgarian M, Siegel NJ, Stewart AF** 1993 Expression of parathyroid hormone-related protein in the rat glomerulus and tubule during recovery from renal ischemia. *J Clin Invest* 92:2850-2857
21. **Santos S, Bosch RJ, Ortega A, Largo R, Fernandez-Agullo T, Gazapo R, Egido J, Esbrit P** 2001 Up-regulation of parathyroid hormone-related protein in folic acid-induced acute renal failure. *Kidney Int* 60:982-995
22. **Ortega A, Ramila D, Izquierdo A, Gonzalez L, Barat A, Gazapo R, Bosch RJ, Esbrit P** 2005 Role of the renin-angiotensin system on the parathyroid hormone-related protein overexpression induced by nephrotoxic acute renal failure in the rat. *J Am Soc Nephrol* 16:939-949
23. **Largo R, Gomez-Garre D, Santos S, Penaranda C, Blanco J, Esbrit P, Egido J** 1999 Renal expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in a rat model of tubulointerstitial damage. *Kidney Int* 55:82-90
24. **Bosch RJ, Rojo-Linares P, Torrecillas-Casamayor G, Iglesias-Cruz MC, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M** 1999 Effects of parathyroid hormone-related protein on human mesangial cells in culture. *Am J Physiol* 277:E990-995
25. **Wendling O, Bornert JM, Chambon P, Metzger D** 2009 Efficient temporally-controlled targeted mutagenesis in smooth muscle cells of the adult mouse. *Genesis* 47:14-18
26. **He B, Deckelbaum RA, Miao D, Lipman ML, Pollak M, Goltzman D, Karaplis AC** 2001 Tissue-specific targeting of the pthrp gene: the generation of mice with floxed alleles. *Endocrinology* 142:2070-2077
27. **de Miguel F, Fiaschi-Taesch N, Lopez-Talavera JC, Takane KK, Massfelder T, Helwig JJ, Stewart AF** 2001 The C-terminal region of PTHrP, in addition to the nuclear localization signal, is

- essential for the intracrine stimulation of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 142:4096-4105
28. **Dormoy V, Beraud C, Lindner V, Thomas L, Coquard C, Barthelmebs M, Jacquemin D, Lang H, Massfelder T** 2010 LIM-class homeobox gene *Lim1*, a novel oncogene in human renal cell carcinoma. *Oncogene* 30:1753-1763
 29. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
 30. **Sicari BM, Troxell R, Salim F, Tanwir M, Takane KK, Fiaschi-Taesch N** 2012 *c-myc* and *skp2* coordinate p27 degradation, vascular smooth muscle proliferation, and neointima formation induced by the parathyroid hormone-related protein. *Endocrinology* 153:861-872
 31. **Ortega A, Romero M, Izquierdo A, Troyano N, Arce Y, Ardura JA, Arenas MI, Bover J, Esbrit P, Bosch RJ** 2012 Parathyroid hormone-related protein is a hypertrophy factor for human mesangial cells: Implications for diabetic nephropathy. *J Cell Physiol* 227:1980-1987
 32. **Ortega A, Romero M, Izquierdo A, Troyano N, Arce Y, Ardura JA, Arenas MI, Bover J, Esbrit P, Bosch RJ** Parathyroid hormone-related protein is a hypertrophy factor for human mesangial cells: Implications for diabetic nephropathy. *J Cell Physiol* 227:1980-1987
 33. **Ito C, Yamamoto H, Furukawa Y, Takeda S, Akimoto T, Iimura O, Ando Y, Asano Y, Kusano E** 2004 Role of cyclins in cAMP inhibition of glomerular mesangial cell proliferation. *Clin Sci (Lond)* 107:81-87
 34. **Li X, Zarinetchi F, Schrier RW, Nemenoff RA** 1995 Inhibition of MAP kinase by prostaglandin E2 and forskolin in rat renal mesangial cells. *Am J Physiol* 269:C986-991
 35. **Chini EN, Choi E, Grande JP, Burnett JC, Dousa TP** 1995 Adrenomedullin suppresses mitogenesis in rat mesangial cells *via* cAMP pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 215:868-873
 36. **Wu TL, Vasavada RC, Yang K, Massfelder T, Ganz M, Abbas SK, Care AD, Stewart AF** 1996 Structural and physiologic characterization of the mid-region secretory species of parathyroid hormone-related protein. *J Biol Chem* 271:24371-24381
 37. **Luparello C, Burtis WJ, Raue F, Birch MA, Gallagher JA** 1995 Parathyroid hormone-related peptide and 8701-BC breast cancer cell growth and invasion *in vitro*: evidence for growth-inhibiting and invasion-promoting effects. *Mol Cell Endocrinol* 111:225-232
 38. **Hastings RH, Asirvatham A, Quintana R, Sandoval R, Dutta R, Burton DW, Deftos LJ** 2002 Parathyroid hormone-related protein-(38-64) regulates lung cell proliferation after silica injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L12-21
 39. **Luparello C** 2010 Midregion PTHrP and human breast cancer cells. *ScientificWorldJournal* 10:1016-1028
 40. **Tovar Sepulveda VA, Falzon M** 2002 Parathyroid hormone-related protein enhances PC-3 prostate cancer cell growth *via* both autocrine/paracrine and intracrine pathways. *Regul Pept* 105:109-120
 41. **Bhatia V, Saini MK, Falzon M** 2009 Nuclear PTHrP targeting regulates PTHrP secretion and enhances LoVo cell growth and survival. *Regul Pept* 158:149-155
 42. **Shankland SJ, Pippin J, Flanagan M, Coats SR, Nangaku M, Gordon KL, Roberts JM, Couser WG, Johnson RJ** 1997 Mesangial cell proliferation mediated by PDGF and bFGF is determined by levels of the cyclin kinase inhibitor p27Kip1. *Kidney Int* 51:1088-1099

43. **Inoshita S, Terada Y, Nakashima O, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F** 1999 Roles of E2F1 in mesangial cell proliferation *in vitro*. *Kidney Int* 56:2085-2095
44. **Qiu LQ, Sinniah R, Hsu SI** 2004 Role of differential and cell type-specific expression of cell cycle regulatory proteins in mediating progressive glomerular injury in human IgA nephropathy. *Lab Invest* 84:1112-1125
45. **Wang C, Hou X, Mohapatra S, Ma Y, Cress WD, Pledger WJ, Chen J** 2005 Activation of p27Kip1 Expression by E2F1. A negative feedback mechanism. *J Biol Chem* 280:12339-12343
46. **Bagui TK, Cui D, Roy S, Mohapatra S, Shor AC, Ma L, Pledger WJ** 2009 Inhibition of p27Kip1 gene transcription by mitogens. *Cell Cycle* 8:115-124
47. **Iwanaga R, Komori H, Ishida S, Okamura N, Nakayama K, Nakayama KI, Ohtani K** 2006 Identification of novel E2F1 target genes regulated in cell cycle-dependent and independent manners. *Oncogene* 25:1786-1798
48. **Savill J** 1999 Regulation of glomerular cell number by apoptosis. *Kidney Int* 56:1216-1222
49. **Ortega A, Ramila D, Ardura JA, Esteban V, Ruiz-Ortega M, Barat A, Gazapo R, Bosch RJ, Esbrit P** 2006 Role of parathyroid hormone-related protein in tubulointerstitial apoptosis and fibrosis after folic acid-induced nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 17:1594-1603
50. **Cebrian A, Garcia-Ocana A, Takane KK, Sipula D, Stewart AF, Vasavada RC** 2002 Overexpression of parathyroid hormone-related protein inhibits pancreatic beta-cell death *in vivo* and *in vitro*. *Diabetes* 51:3003-3013
51. **Massfelder T, Lang H, Schordan E, Lindner V, Rothhut S, Welsch S, Simon-Assmann P, Barthelmebs M, Jacqmin D, Helwig JJ** 2004 Parathyroid hormone-related protein is an essential growth factor for human clear cell renal carcinoma and a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res* 64:180-188
52. **Musso MJ, Plante M, Judes C, Barthelmebs M, Helwig JJ** 1989 Renal vasodilatation and microvessel adenylate cyclase stimulation by synthetic parathyroid hormone-like protein fragments. *Eur J Pharmacol* 174:139-151
53. **Mahon MJ, Donowitz M, Yun CC, Segre GV** 2002 Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 2 directs parathyroid hormone 1 receptor signalling. *Nature* 417:858-861
54. **Hanada M, Feng J, Hemmings BA** 2004 Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 1697:3-16
55. **Manning BD, Cantley LC** 2007 AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-1274
56. **Hastings RH, Araiza F, Burton DW, Bedley M, Defetos LJ** 2004 Parathyroid hormone-related protein regulates apoptosis in lung cancer cells through protein kinase A. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C1616-1622
57. **Shimamura H, Terada Y, Okado T, Tanaka H, Inoshita S, Sasaki S** 2003 The PI3-kinase-Akt pathway promotes mesangial cell survival and inhibits apoptosis *in vitro* *via* NF-kappa B and Bad. *J Am Soc Nephrol* 14:1427-1434
58. **Hikomura K, Monkawa T, Petermann AT, Durvasula RV, Shankland SJ** 2002 Insulin is a potent survival factor in mesangial cells: role of the PI3-kinase/Akt pathway. *Kidney Int* 61:1312-1321

LEGENDS TO FIGURES

FIG. 1. Genomic structure of the floxed allele of PTHrP (L2) and the deleted allele (L-) after 4-OH-Tam treatment. PCR strategy using the primer pairs 920-923 and 922-923 to analyze Cre-mediated excision of exon 4.

FIG. 2. Effect of exogenous PTHrP(1-36) on MC proliferation. The effect of exogenous PTHrP(1-36) on MC proliferation has been studied on murine MC^{B16} prepared from C57BL/6 mice kidneys. (A, B) Proliferation of MC was analyzed by FACS upon three days, in presence (FBS 20%) or absence of serum (BSA 0.1%), with or without PTHrP(1-36) or PDGF-BB (n = 4-7 per group). Proliferation of MC was also assayed by BrdU incorporation in serum-deprived media after exposure to incrementing PTHrP(1-36) concentrations (1, 10 and 100 nM; n = 8) (C), or PDGF-BB (10 ng/ml) (n = 4) (D). Exogenous PTHrP(1-36) was devoid of any effect on MC proliferation. Results are shown as means \pm SEM. Tukey's test, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

FIG. 3. PTHrP gene excision in MC. MC were prepared from α SMA-Cre-ER^{T2}/PTHrP^{L2/L2} mice kidneys (MC^{CreloxP}), and treated *in vitro* by 4-OH-Tam (5 μ M) for three alternative days. (A) PCR analysis on DNA showing the amplification of the 550 bp fragment from the deleted L- allele in PTHrP-excised MC while the band of 255 bp disappeared. Myogenin (250 bp) was used as a housekeeping gene. (B) Expression of PTHrP DNA 255 bp fragment in MC^{CreloxP} as a ratio *vs* myogenin, 1 and 5 weeks after treatment with 4-OH-Tam. (C) Expression of PTHrP mRNA as a ratio *vs* 18S mRNA, 1 and 5 weeks after treatment with 4-OH-Tam. (D) Immunofluorescent staining of PTHrP in control (b) and PTHrP-excised MC^{CreloxP} (c), using a monoclonal anti-PTHrP(34-53) antibody. No PTHrP staining was observed in the MC after 4-OH-Tam treatment (excised MC^{CreloxP}), as was also the case in control MC^{CreloxP} in the absence of the primary antibody (a). (E) Effects of PTHrP knockdown on PTH1R immunoblot. Results are given as means \pm SEM, n=5. Student *t* test, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus control.

FIG. 4. MC proliferation following deletion of PTHrP. PTHrP gene was excised (Excised MC^{CreloxP}) or not (Control MC^{CreloxP}) by 4-OH-Tam treatment. MC proliferation was evaluated by FACS (A) and BrdU incorporation (B). MC were synchronized for 24 h, before proliferation was analyzed at D1 in presence (FBS 20%) or in absence of serum (BSA 0.1%). Serum-deprived MC were also treated with PTHrP(1-36) at 100 nM. PTHrP-excised MC showed significantly less proliferation than control cells even in presence of serum. Addition of exogenous PTHrP had no effect on MC proliferation. Results are given as means \pm SEM, n = 8 (FACS) and n = 4 (BrdU). Tukey's test, * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

FIG. 5. MC proliferation after transfection with various constructs of PTHrP. (A) Control MC^{CreloxP} were transfected with constructs of PTHrP devoid of its intracrine (Δ NLS) or paracrine (Δ SP) effects, as well as with the wild type form (WT) and the empty vector (pcDNA3). MC proliferation was assayed by BrdU incorporation over 24 h, in presence or absence of serum. Intracrine (PTHrP- Δ SP) but not auto/paracrine PTHrP (PTHrP- Δ NLS) is mitogenic for MC. (B) MC proliferation was also assessed by BrdU incorporation over a 24-

hour period during which the cells were exposed to conditioned medium, without FBS, obtained from MC transfected with PTHrP- Δ SP or with the empty vector. The conditioned medium from MC overexpressing a PTHrP form exclusively active by the intracrine pathway did not modify MC proliferation. Results are given as means \pm SEM, $n = 5$. Tukey's test, * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$. (C) Representative immunoblots for c-Myc, E2F1 and p27^{Kip1} of control MC^{CreloxP} and PTHrP-excised MC^{CreloxP}, as well as of MC overexpressing PTHrP-WT, PTHrP- Δ SP or the empty vector (pcDNA3). GAPDH is used as a housekeeping protein control on the same membrane.

FIG. 6. Anti-apoptotic effects of PTHrP on MC. PTHrP gene excision was induced as shown previously. MC were synchronized for 24 h and apoptosis was induced by serum-deprivation for an additional 24-hour (D1) or 48-hour period (D2). One group was treated with PTHrP(1-36) at 100 nM. Apoptosis, analyzed by both FACS (A) and TUNEL (B), was higher in PTHrP-excised MC^{CreloxP} and was partially reversed by treatment of the cells with PTHrP(1-36). (C) Incrementing PTHrP(1-36) concentrations from 1 to 100 nM ($n = 8$) showed dose-dependency. (D) Transfection of control MC^{CreloxP} with various constructs of PTHrP (WT, Δ NLS, Δ SP or empty vector) decreased MC apoptosis assessed by FACS, particularly with the WT and Δ NLS constructs, while the Δ SP one had minimal effects. PTHrP active by the auto/paracrine pathway appears as a survival factor for MC. Results are given as means \pm SEM, $n = 9$ (FACS) and $n = 3$ (TUNEL). Tukey's test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

FIG. 7. Signaling pathways activated by PTHrP and involvement in PTHrP-induced MC survival. (A) Control MC^{CreloxP} were synchronized for 24 h. After 15 min pretreatment with 200 μ M IBMX, MC were incubated for 15 min with increasing concentrations of PTHrP(1-36) (1-300 nM). Cyclic AMP was measured by enzyme immunoassay in cell lysates and culture medium. Data are expressed as pmol/mg protein and given as means \pm SEM, $n = 3$. Tukey's test, * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$. (B) Quiescent control MC^{CreloxP} were exposed or not to 100 nM PTHrP(1-36) for 5 to 15 min. Representative immunoblots for Akt phosphorylated at Thr308 or Ser473, and total Akt are shown. Experiments were repeated at least three times with similar results. (C) PTHrP-excised MC^{CreloxP} were synchronized for 24 h. Apoptosis was induced by serum-deprivation for an additional 24-hour period during which the cells were exposed to PTHrP(1-36) at 100 nM, with or without a PKC inhibitor (Gö6983, 5 μ M), a PI3-K inhibitor (LY294002, 20 μ M) or a PKA inhibitor (H89, 1 μ M). Apoptosis was analyzed by TUNEL. Data show that the PKA and PI3-K pathways contribute to PTHrP-induced MC survival. Results are given as means \pm SEM of three independent experiments. Tukey's test, * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ versus the corresponding control group; § $P < 0.05$ versus the BSA group.

Figure 1

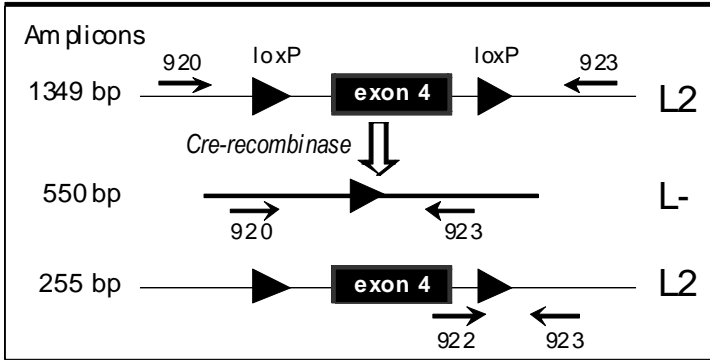


Figure 2

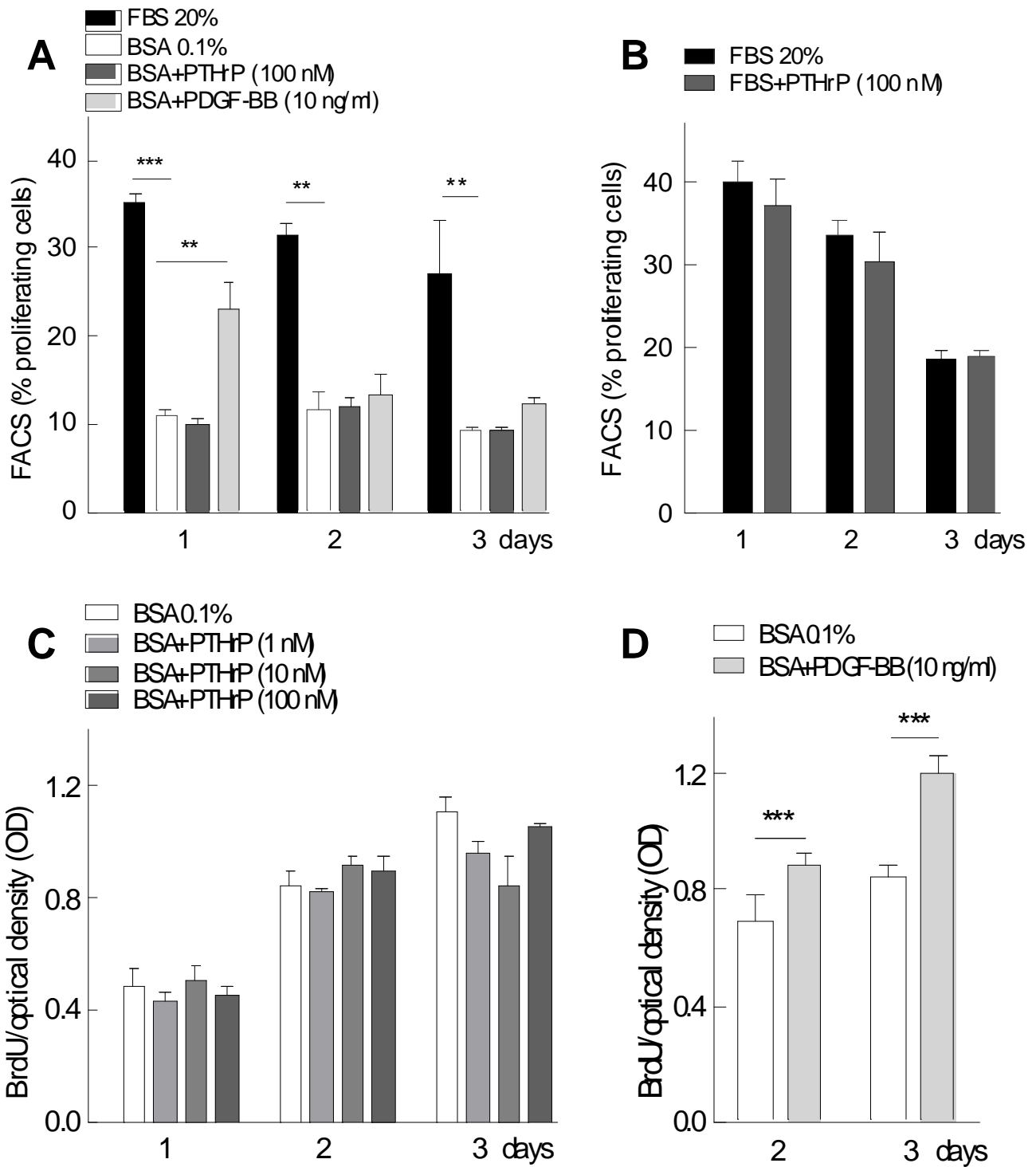


Figure 3

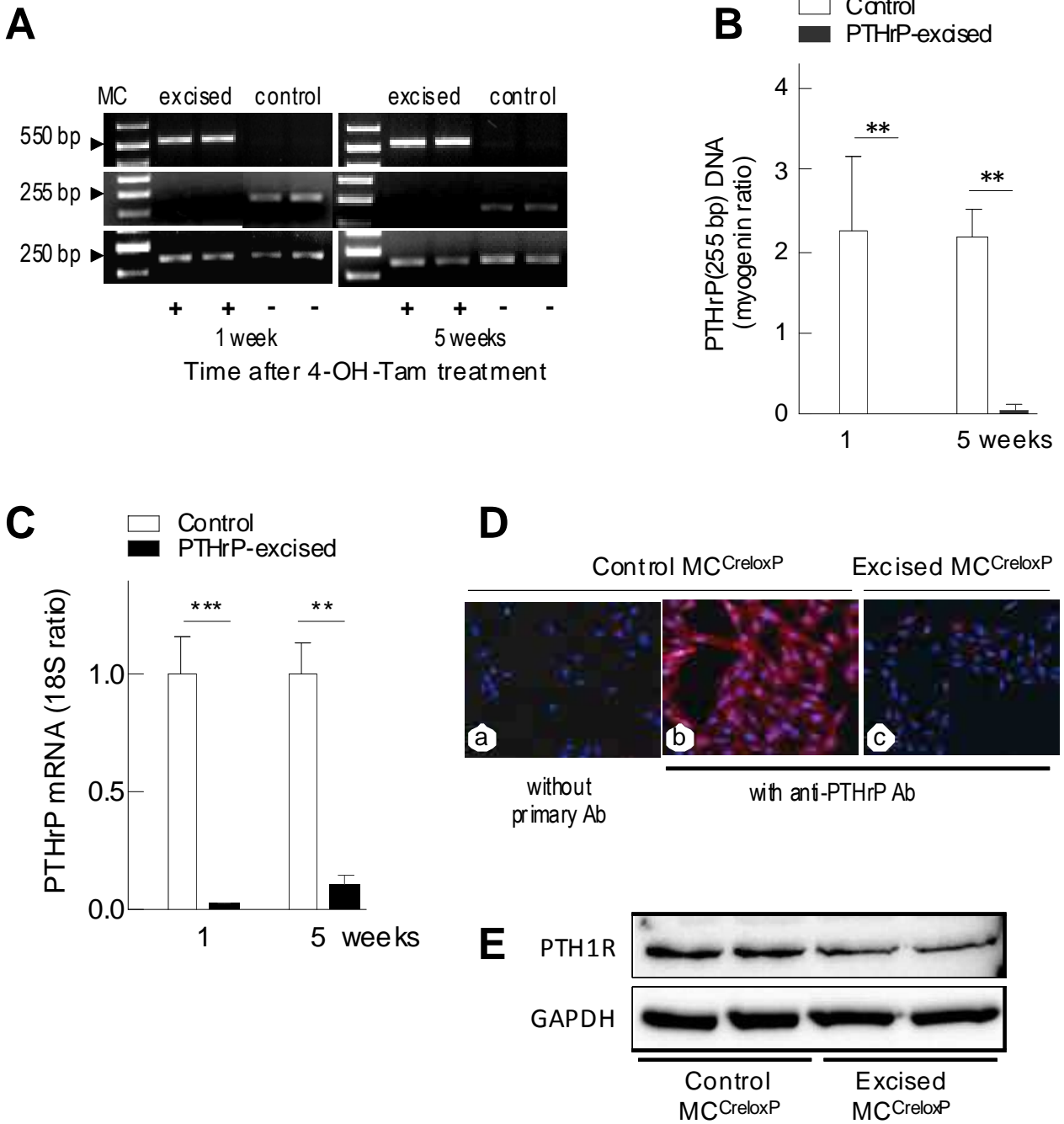


Figure 4

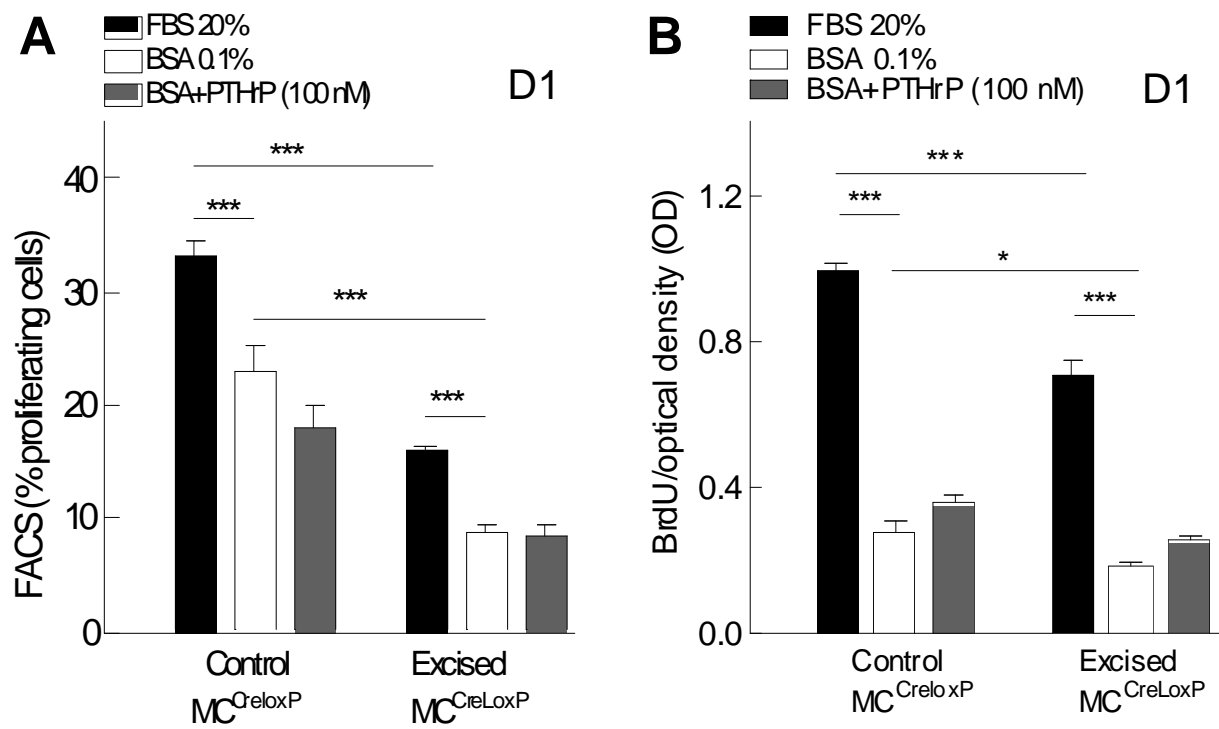


Figure 5

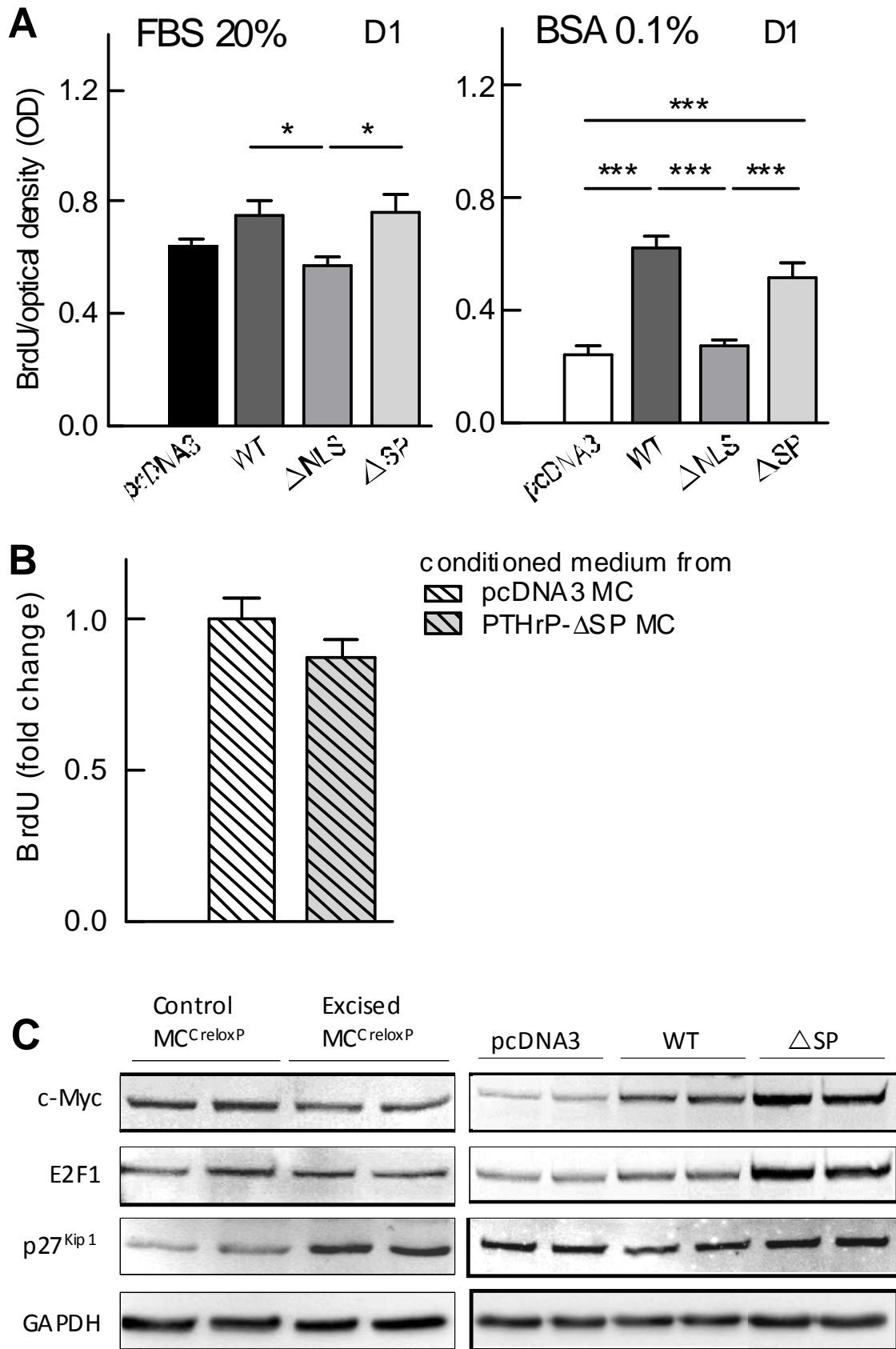


Figure 6

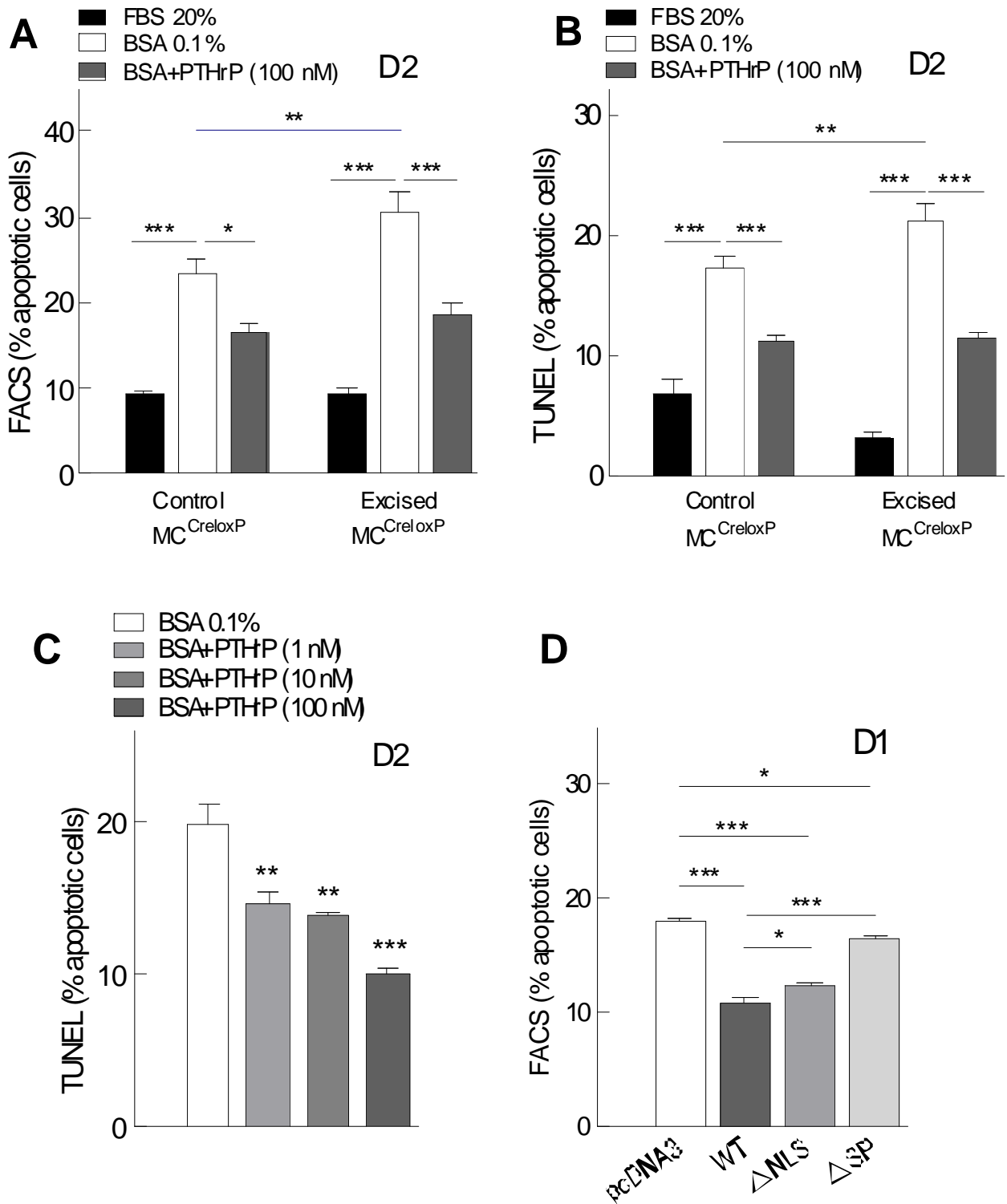
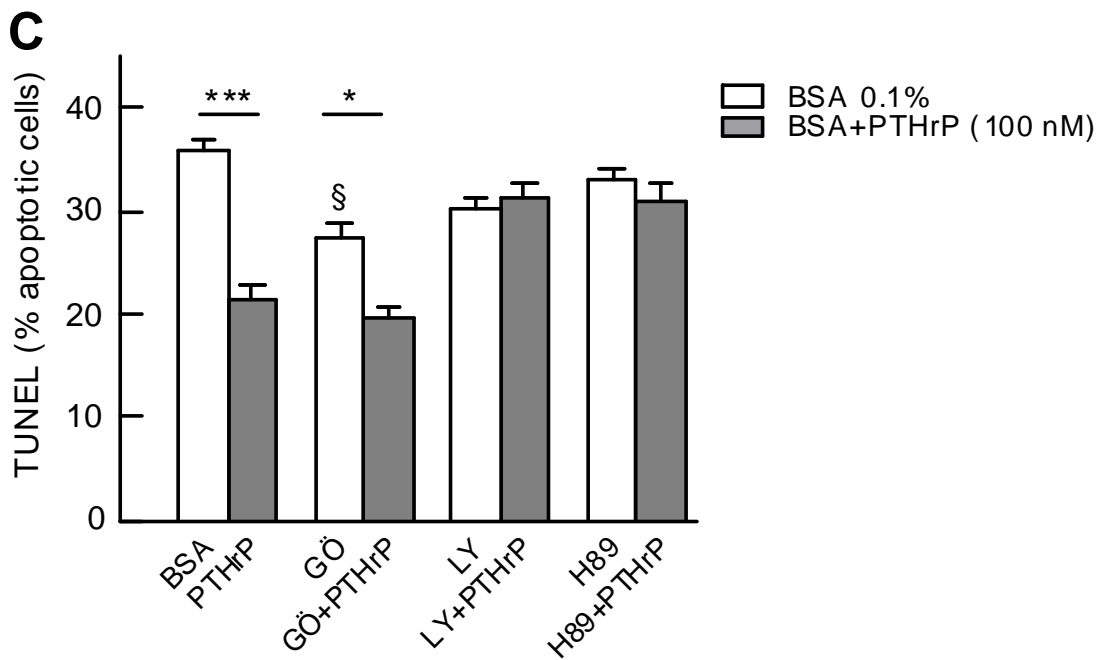
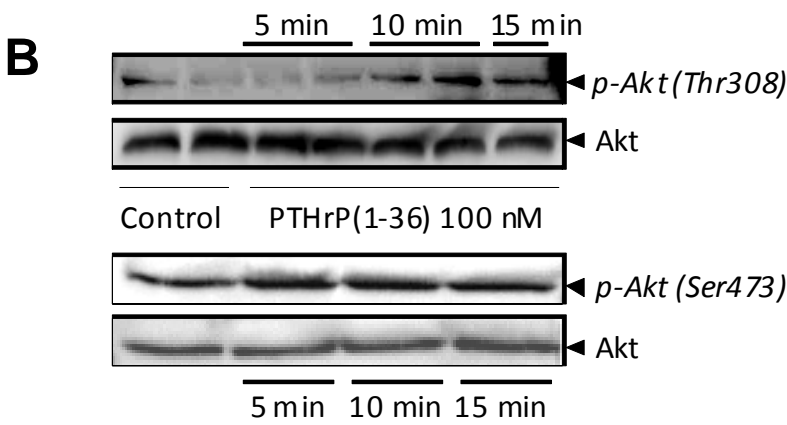
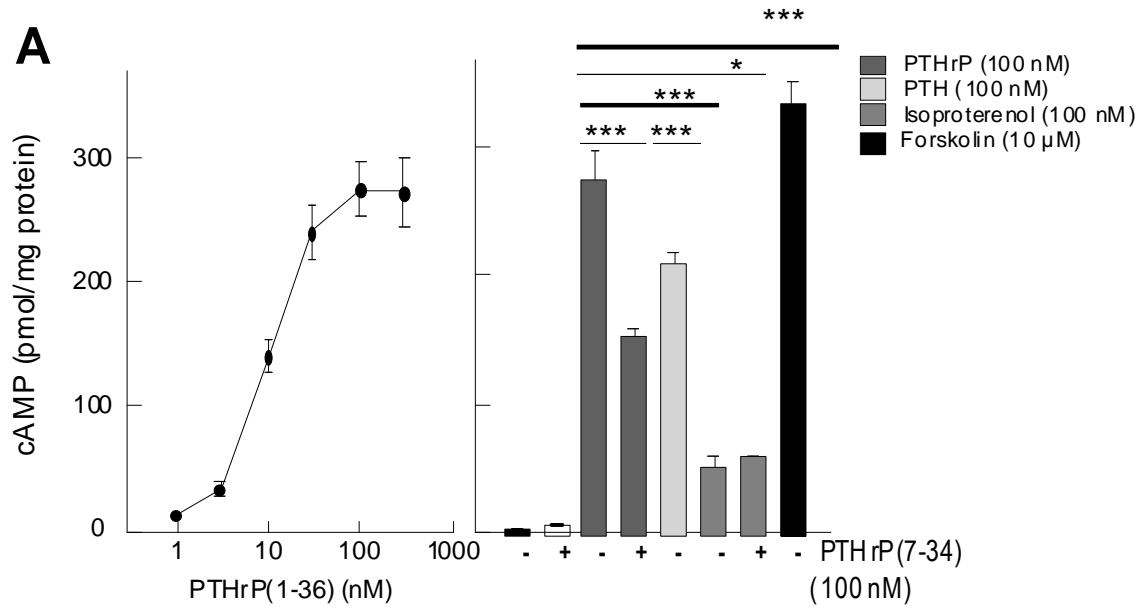
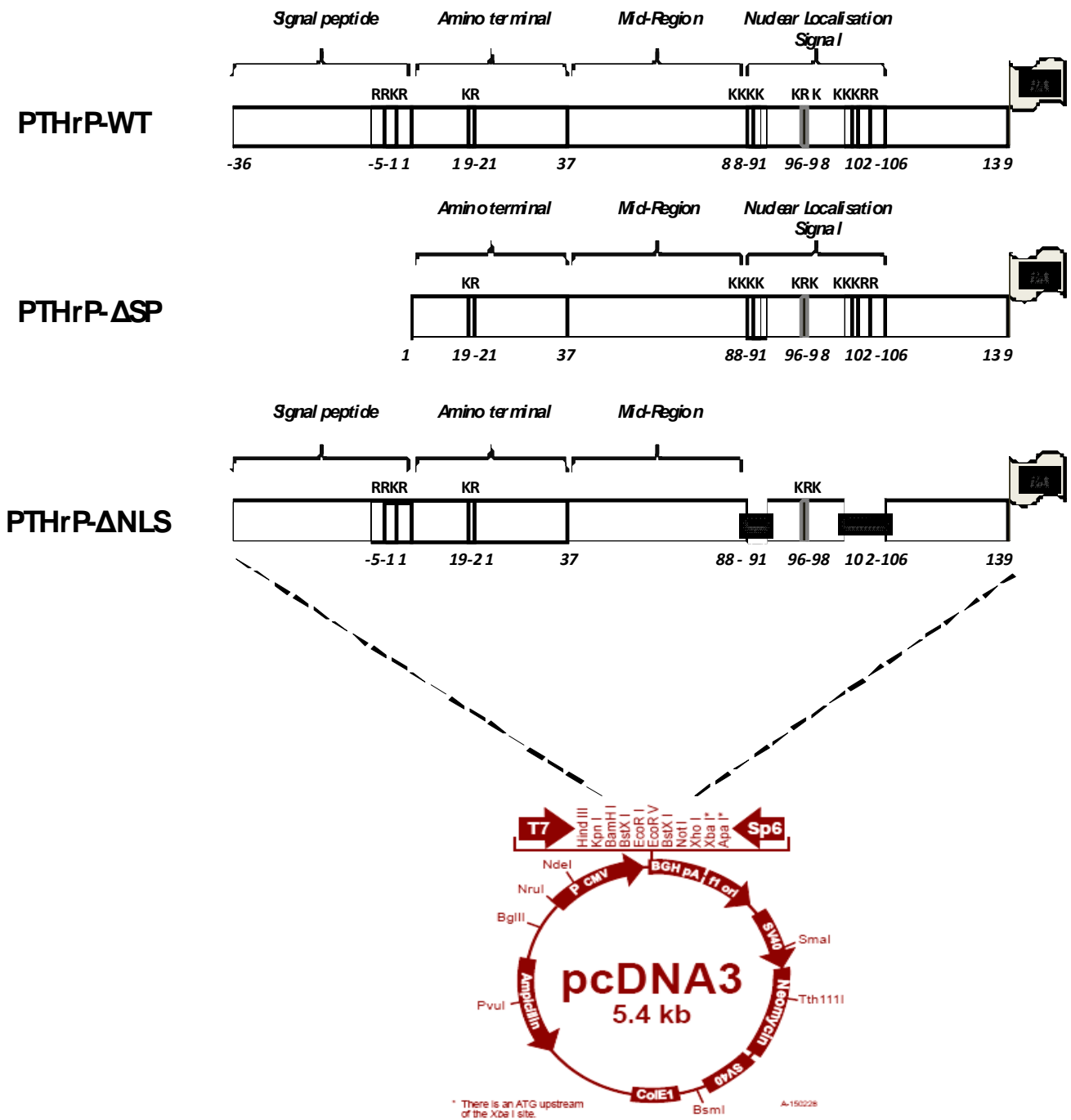
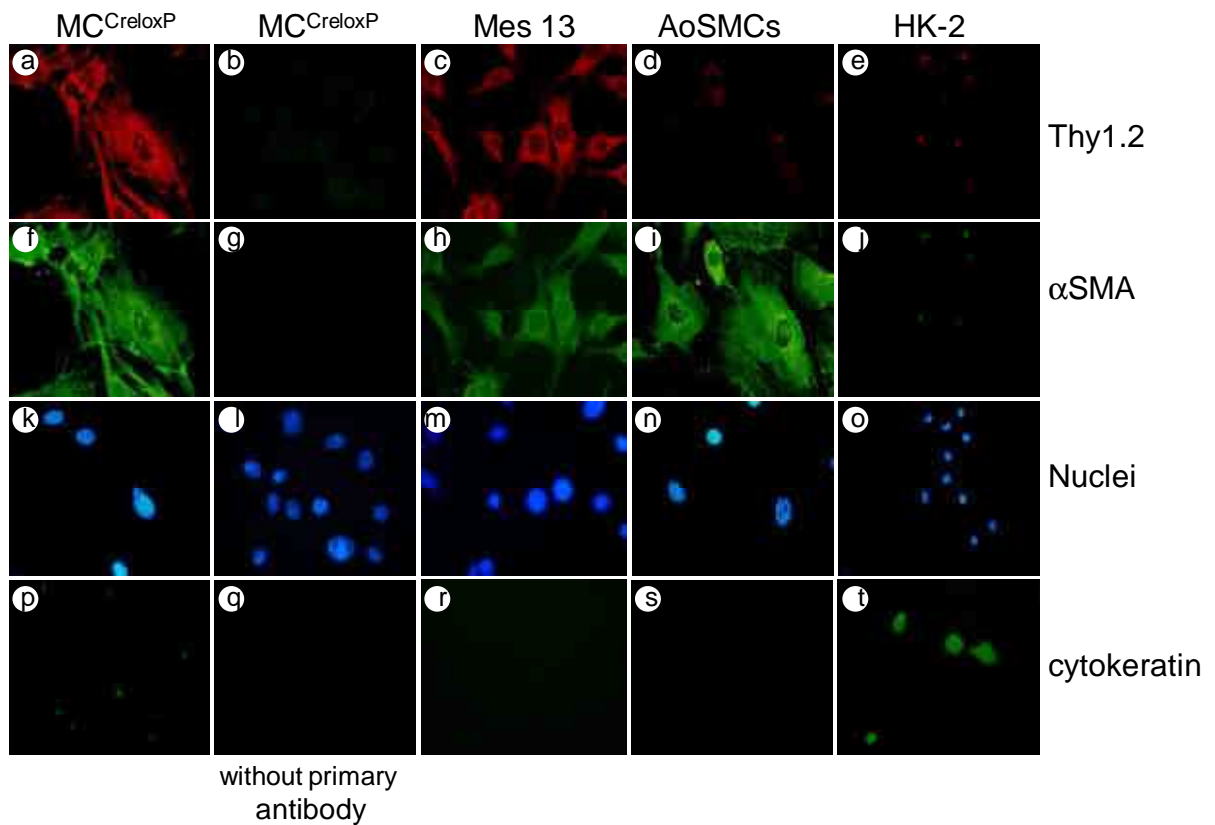


Figure 7

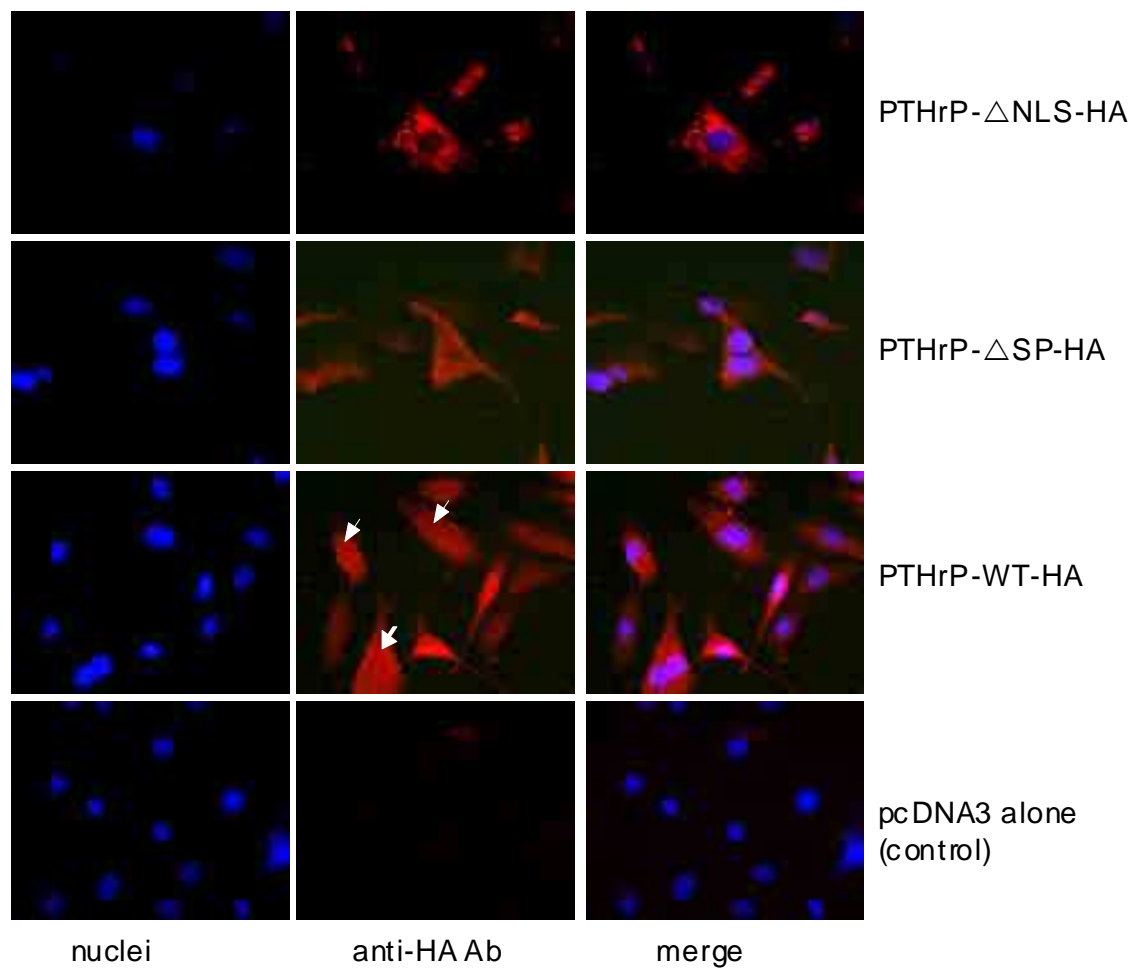




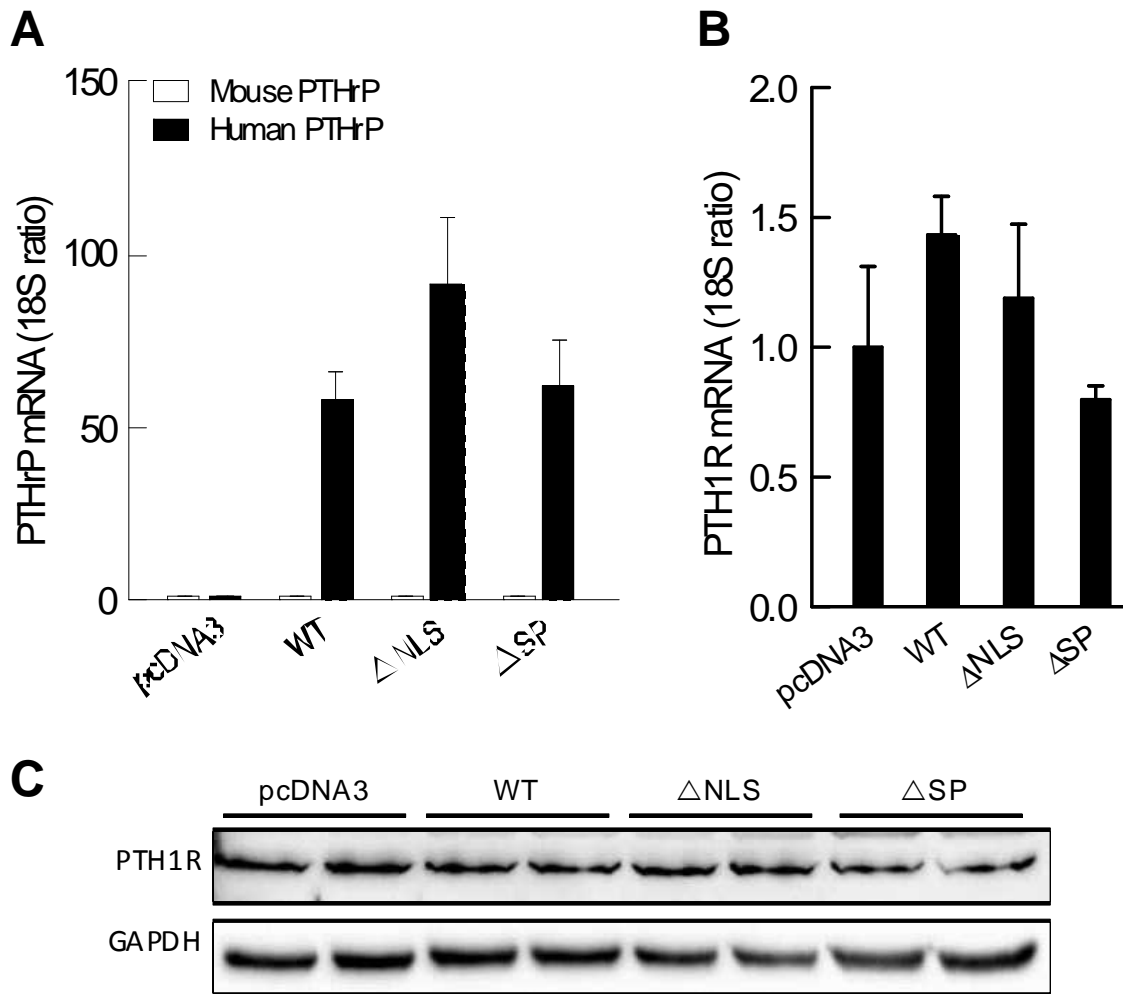
Supplemental Figure 1: Structure of the different constructs of PTHrP used for transfection with the pcDNA3 plasmid.



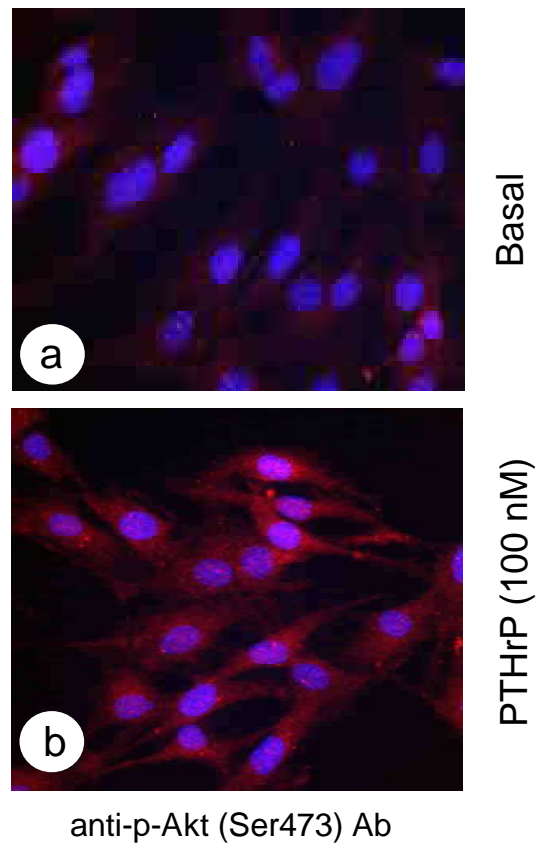
Supplemental Figure 2. MC characterization by immunostaining. MC, Mes-13 and MCCreloxP, showed specific positive staining to Thy1.2 (a, c) and α SMA (f, h) while they were negative to cytokeratin (p, r), a marker of epithelial cells. Aortic smooth muscle cells (AoSMCs) and human renal epithelial cells (HK-2) were used as positive control for α SMA (i) and cytokeratin (t) immunostaining, respectively. Initial amplification x400, except for some pictures (e, j, o, p-t) x200.



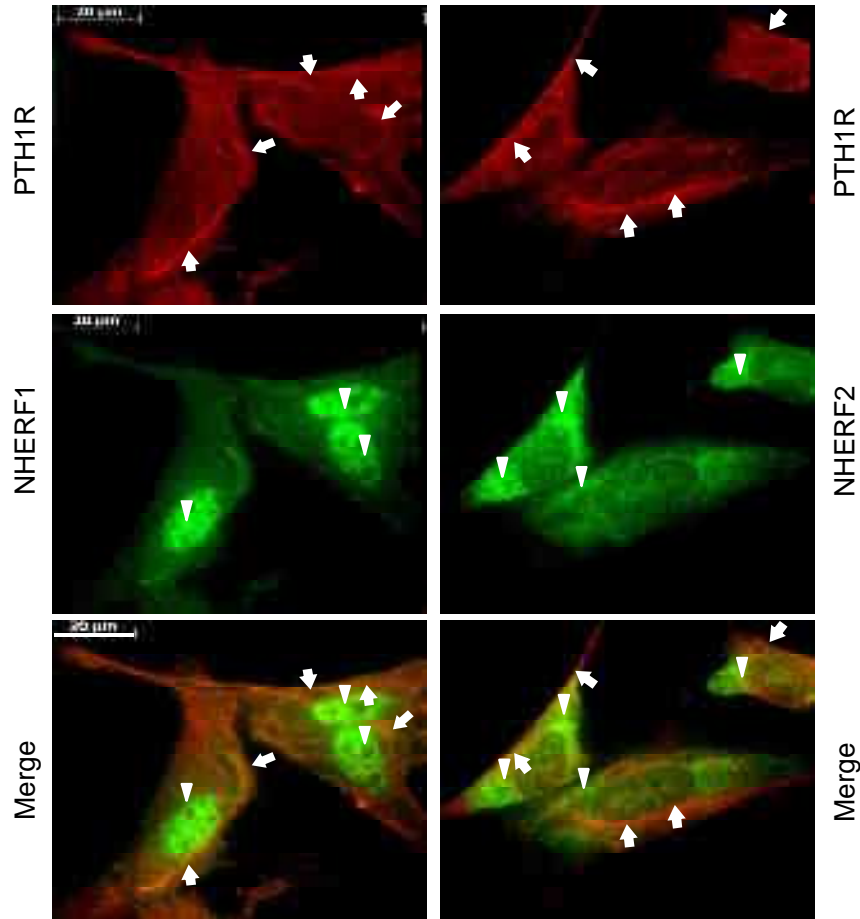
Supplemental Figure 3. Visualization by HA immunofluorescent staining of the PTHrP-HA constructs after stable transfection in MCCreloxP: PTHrP devoid of the NLS sequence (PTHrP- Δ NLS-HA) encoding for the paracrine-acting isoform, PTHrP devoid of the signal peptide (PTHrP- Δ SP-HA) acting only by the intracrine pathway, and wild type PTHrP(1-139) (PTHrP-WT-HA). MC transfected with the empty plasmid (pcDNA3) were taken as control. Anti-HA immunostaining showed that the localization of PTHrP- Δ NLS is almost exclusively cytoplasmic, with dense granules in the Golgi/secretory pathway around the nuclei. Wild type PTHrP and PTHrP- Δ SP were both present in the nuclei of all cells, whatever they were dividing or not. PTHrP-WT and PTHrP- Δ SP localized also in the cytoplasm with a granular pattern for PTHrP-WT (arrow) and a diffuse one for PTHrP- Δ SP. All the cells were positive for anti-HA, with the exception of the cells transfected with the empty plasmid (control). Initial amplification x400.



Supplemental Figure 4. RT-PCR analysis of human PTHrP and endogenous mouse PTHrP expression (A), together with PTH1R expression (B), in MC transfected with the different human PTHrP constructs, PTHrP-WT, PTHrP- Δ NLS, PTHrP- Δ SP, or with the empty plasmid (pcDNA3). PTHrP and PTH1R mRNA are expressed as a ratio vs 18S. Means \pm SEM, n=3-5. The results show that the expression of the human PTHrP forms are at least 50 fold higher than the endogenous mouse PTHrP which can therefore be considered as insignificant. The expression of PTH1R was not modified by the transfection of the different human PTHrP constructs, as observed on mRNA (B) or protein by Western blot (C).



Supplemental Figure 5: Quiescent MC were exposed to 100 nM PTHrP for 15 min. Representative fluorescent immunostaining showing the effect of PTHrP on Akt phosphorylation at Ser473.



Supplemental Figure 6: Visualization by immunofluorescent staining of the PTH1R (red) and NHERF1 or NHERF2 (green). Results show that both NHERF1 and NHERF2 are expressed in MC, with NHERF1 staining restricted to nuclei and dense staining of NHERF2 in the cytoplasm. No colocalisation of NHERF1 or NHERF2 staining (arrow heads) with that of PTH1R (arrows) was observed.

Chapitre 4

“Parathyroid hormone-related protein modulates cytokines and chemokines expression in mesangial cells and blunts apoptosis by enhancing Cox-2 expression”

Mazène Hochane et al.

(Manuscrit en préparation)

Parathyroidhormone-related protein modulates cytokines and chemokines expression in mesangial cells and blunts apoptosis by enhancing Cox-2 expression

Mazène Hochane^{1,2}, Denis Raison^{1,2}, Catherine Coquard^{1,2}, Claire Béraud^{1,2}, Audrey Bethry^{1,2}, Sabrina Danilin^{1,2}, Thierry Massfelder^{1,2}, Jean-Jacques Helwig^{1,2}, Mariette Barthelmebs^{1,2}

¹INSERM, U682, Equipe Cancer du rein et Physiopathologie rénale, Faculté de Médecine, F-67085 Strasbourg, France;

²Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France;

Running headline: PTHrP modulates inflammatory processes

(38 characters)

Word count:

Abstract: (max 250 words) 218

Manuscript: (max 3000 words) 3044

Corresponding authors :

Mazène Hochane, INSERM U682, Equipe Cancer du rein et Physiopathologie rénale, Faculté de Médecine, 11 rue Humann, F-67085 Strasbourg, France

Phone: 333.68.85.34.53; Fax: 333.68.85.34.59. E-mail: alicante81@yahoo.com

Dr Mariette Barthelmebs, INSERM U682, Equipe Cancer du rein et Physiopathologie rénale, Faculté de Médecine, 11 rue Humann, F-67085 Strasbourg, France

Phone: 333.68.85.34.60; Fax: 333.68.85.34.59. E-mail: barthelm@unistra.fr

ABSTRACT

Mesangial cell (MC) injury is a prominent feature in glomerulonephritis. Activated MC secrete inflammatory mediators which induce cell apoptosis. Parathyroid hormone-related protein is a locally active cytokine that enhances cell survival and is upregulated by pro-inflammatory factors in many cell types. The aim of this study on murine MC in primary culture, was to analyze the regulation of PTHrP expression by inflammatory cytokines, and to evaluate whether PTHrP itself acts as a pro-inflammatory and/or survival factor on MC. Our results showed that IL-1 β (10 ng/mL) and TNF- α (10 ng/mL) rapidly and transiently upregulated PTHrP expression in MC. The effects of IL-1 β were both transcriptional and post-transcriptional, with stabilization of the PTHrP mRNA by HuR. Proteome Profiler Array analysis showed that PTHrP itself elicited the release of cytokines within 2 hours, mainly IL-17 (4-fold increase), IL-16, IL-6 and IL-1 α . PTHrP also stimulated sustained expression (2-4 h) of chemokines, mainly RANTES/CCL5 and MIP-2/CXCL2 (8-fold increase), TARC/CCL17, I-TAC/CXCL11, MIP-1 β /CCL4 and MCP-1/CCL2. Moreover, PTHrP markedly enhanced Cox-2 expression in terms of mRNA (over 20-fold) and proteins through the activation of NF κ B pathway, and induced MC survival *via* the Cox-2 products. Finally, PTHrP overexpression in MC blunted the apoptotic effects of IL-1 β and TNF- α . Altogether, these findings suggest that PTHrP might function both as a booster for inflammatory processes and as a negative feedback loop preserving MC survival.

INTRODUCTION

Mesangial proliferative glomerulonephritis is characterized by an initial inflammatory response with immune cell influx, and expression of cytokines and growth factors (Sethi and Fervenza). Disease starts with mesangial cells (MC) injury leading to mesangial transformation into myofibroblast-like cells. Activated MC express α -smooth muscle actin (α SMA), upregulate multiple inflammatory mediators like the inducible cyclooxygenase-2 (Cox-2) and release many cytokines/chemokines (Anders et al., 2003). Mesangiolytic followed by MC migration, proliferation and matrix expansion can also occur. Apoptosis is the major mechanism of mesangiolytic (Bagchus et al., 1990). Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) are prominent inflammatory mediators that have been implicated in the initiation and evolution of renal inflammation (Kluth and Rees, 1996). Both factors can be produced by, and activate MC and further induce leukocytes infiltration through the induction of chemokine expression and release. TNF- α produced locally or by infiltrating leucocytes is also an important pro-apoptotic factor of MC (Hsu et al., 1996).

The parathyroid hormone-related protein (PTHrP) is an ubiquitously expressed protein with cytokine-like properties. PTHrP has been found to be upregulated in many inflammatory conditions where it contributed to local injury (Funk, 2001). IL-1 β and TNF- α induced PTHrP expression in endothelial cells and synovial fibroblasts (Eto et al., 1998; Ferguson et al., 1995; Funk et al., 1998). In the later cells, PTHrP led to IL-6 upregulation (Funk et al., 1998). In vascular smooth muscle cells (VSMC), PTHrP induced MCP-1 expression through the activation of its membranous receptor PTH1R (Martin-Ventura et al., 2003). PTHrP is also released by lymphocytes where it is able to stop DNA synthesis and lymphocytes proliferation (Adachi et al., 1990). When septic shock was induced in mice by a sublethal endotoxin injection, PTHrP was rapidly upregulated in all organs, with its most important levels found in the kidneys (Funk, 2001). The neutralization of PTHrP improved animal's survival suggesting a pivotal role of PTHrP in inflammatory process (Funk, 2001).

PTHrP was upregulated in MC in rat in a model of protein overload and in diabetic nephropathies in rats and humans (Izquierdo et al., 2006; Largo et al., 1999; Ortega et al., 2012). We have previously shown that PTHrP exerts anti-apoptotic effects on mouse MC in culture when added exogenously or when overexpressed in the cells (Hochane et al., 2010). However, whether inflammatory factors, like IL-1 β and TNF- α , can regulate PTHrP expression in MC is presently not known. In addition, the contribution of PTHrP in MC inflammation, characterized by the secretion of cytokines/chemokines or the expression of other inflammatory mediators like Cox-2 has still not been addressed.

The aim of this study was to analyze the regulation of PTHrP expression by inflammatory cytokines in MC, and to evaluate whether PTHrP itself acts as a pro-inflammatory factor on MC. Our results show that both IL-1 β and TNF- α upregulate PTHrP expression in MC. PTHrP itself elicits the release of cytokines and chemokines and enhances the expression of Cox-2 by activating the NF κ B pathway. PTHrP induces MC survival *via* Cox-2 products, and is able to modulate cytokine-induced MC apoptosis.

RESULTS

IL-1 β and TNF- α induce overexpression of PTHrP in MC

Serum-starved MC were exposed to IL-1 β (10 ng/ml) for 8 h (Figure 1A). This treatment induced a rapid (within the first hour), marked (18-fold at 2 h) and transient increase in PTHrP mRNA. The kinetic of this response was comparable to IL-1 β -induced overexpression of the inducible Cox-2 (supplementary Figure S1A). Under the same experimental conditions, the treatment of MC with TNF- α (10 ng/ml) induced a time-dependent increase in PTHrP transcripts, which peaked at a higher level (72-fold at 4 h) and remained elevated over 24 h (26-fold) (Figure 1B). PTHrP-induced overexpression was confirmed in term of protein by immunocytochemistry (Figure 1C). PTHrP specific immunostaining was scarce in control MC, while all cells expressed high level of the protein 24 h after treatment with the cytokines. IL-1 β had no effect on PTH1R expression in MC both at mRNA and protein level (Supplementary Figure S1C and S1D).

We next aimed to investigate whether the effects of IL-1 β on PTHrP mRNA were transcriptional. When MC were pretreated with actinomycin D (Act D), IL-1 β -induced overexpression of PTHrP mRNA was completely abolished (Figure 1D). Post-transcriptional mechanisms involving mRNA stabilization by HuR have previously been reported for PTHrP (Danilin et al., 2010). To address this possibility, MC were treated or not with IL-1 β for 30 min before being transcriptionally arrested by Act D (time 0). PTHrP mRNA decreased by half within 30 min in control cells, but the decreased was weakened in IL-1 β treated cells (Figure 1E). To assess whether HuR is involved in this response, HuR was immunoprecipitated in lysates from MC treated or not by IL-1 β . High levels of PTHrP mRNA were present in the HuR precipitates after IL-1 β treatment (Figure 1F). The formation of HuR-mRNA complexes was visualized by the translocation of HuR immunostaining from the nuclei to the cytoplasm after cytokine treatment (supplemental Figure S2).

PTHrP elicits the release of cytokines and chemokines on MC

In order to explore whether PTHrP itself acts as a pro-inflammatory cytokine on MC, we used proteome Profiler Arrays (coated specifically with antibodies for mouse cytokines and chemokines) on MC treated (or not) with PTHrP(1-36) (100 nM) for 2 and 4 h. The histogram (Figure 2) documents results after 2 h stimulation with PTHrP compared to control. The corresponding histogram for the 4 h results is given in supplementary Figure S3. Data showed that the basal level of expression of cytokines/chemokines was highly variable, the levels of IL-1ra and TIMP-1 being 1000-fold higher than that of IL-1 β , MIP-2 and RANTES for example (note that results are presented on a log scale). The effects of PTHrP were best represented by the fold change *vs* the control group at each time point (Figure 3). It appeared that PTHrP increased the expression of many factors (over 1.5-fold change), with two different profiles. In the first set, the increase in most pronounced after a 2 h stimulation with PTHrP and decreased at 4 h, with prominent effects on different interleukins, IL-17, IL-16, IL-6, IL-1a, IL-4, IL-10, IFN γ , sICAM, G-CSF and GM-CSF (Figure 3A). In a second set,

PTHrP induced persistent increase in chemokines, the major changes concerning RANTES and MIP-2, but also TARC, I-TAC and MCP-1 (Figure 3B). The increase in MCP-1 protein (1.7-fold at 2 h) was preceded by an early increase in MCP-1 mRNA (2-fold at 30 min) (Figure 4A).

PTHrP enhances expression of Cox-2 in MC by the NFκB pathway

Next, we examined the expression of inducible Cox-2 which is commonly induced by inflammatory cytokines. Our results showed a major increase in Cox-2 expression following PTHrP treatment, with a 25-fold increase in Cox-2 mRNA (0.5 to 2 h), and an increase in Cox-2 protein which persisted over 8 h (Figure 4B and 4C). In parallel, PTHrP had no effect on thromboxane A synthase (TxA-S) mRNA, and minimally affected inducible prostaglandin E2 synthase 1 (PGE2-S1) (supplementary Figure S4A). Minimal and transient overexpression (2-fold at 30 min) of growth factors (VEGF and PDGF) was also found after exposure of MC to PTHrP (supplementary Figure S4B). However, PTHrP induced its own expression in an important and prolong manner (6-fold at 2 h) (Figure 4D), but did not change the mRNA expression of its receptor, PTH1R (supplementary Figure S4B).

To further explore how PTHrP induces overexpression of Cox-2, we analyzed the effects of PTHrP on the NFκB pathway. In MC, PTHrP(1-36) (100 nM) markedly enhanced, within 10 min, phosphorylation of the p65 subunit of NFκB (Figure 5A) and induced translocation of phosphorylated p65 to the nuclei (Figure 5B). Furthermore, PTHrP-induced increase in Cox-2 mRNA expression was abolished in the presence of BAY 11-7085, an inhibitor of IKKβ (Figure 5C). Similarly, BAY 11-7085 abolished PTHrP-induced upregulation of self-expression. These results suggest that overexpression of PTHrP, like that of Cox-2, by PTHrP needs an intact canonical NFκB pathway. We recently showed that PTHrP activated the cAMP/PKA pathway in MC, as well as the PI3-K/Akt ones (Hochane et al., 2012). The inhibition of these pathways by selective inhibitors of PKA (H89) and PI3-K (LY294002) abolished PTHrP-induced upregulation of Cox-2 (Figure 5D). Altogether, our results indicate that PTHrP enhances Cox-2 expression by activating both the cAMP/PKA and the PI3-K/Akt pathways which might converge on a common effector, NFκB.

Cox-2 is involved in PTHrP-induced survival of MC

We reported previously that PTHrP is a survival factor for MC (Hochane et al., 2010) and that NFκB pathway is essential for survival of renal cell carcinoma cell (Soubrier et al., 2007). We tested therefore whether Cox-2, a NFκB target gene, is involved in PTHrP-induced MC survival. For this study, we used MC with a high apoptotic level as seen in quiescent PTHrP excised MC^{CreloxP} subjected to 24 h serum starvation (Hochane et al., 2010). In these cells, treatment with exogenous PTHrP(1-36) (100 nM) reduced the number of apoptotic cells from $37.3 \pm 1.4\%$ to $23.1 \pm 1.3\%$ ($P < 0.001$) and this response was abolished in the presence of NS389, a specific Cox-2 inhibitor (Figure 6A). Exogenous PGE₂ however was not able to mimic the effects of PTHrP on the same cells. Altogether, these results are consistent with the involvement of a Cox-2 product, other than PGE₂, in the survival effect of PTHrP.

PTHrP modulates IL-1 β and TNF- α induced apoptosis in MC

Treatment with either IL-1 β or TNF- α for 24 h increased the apoptosis induced by serum starvation in control MC^{CreloxP} (Figure 6B) and in pcDNA3 (empty vector) transfected cells (Figure 6C). Deletion in endogenous PTHrP (excised MC^{CreloxP}) enhanced the number of apoptotic cells under control conditions and in response to IL-1 β or TNF- α (two way ANOVA, cell factor $P < 0.001$). However, we did not find any significant interaction (cell x treatment factors), thus excluding potentiation of the apoptotic responses in PTHrP deleted cells (Figure 6B). On the other hand, in MC overexpressing PTHrP-WT after stable transfection, not only was basal level of apoptosis reduced, but the responses to both IL-1 β and TNF- α were also damped (cell x treatment interaction, $P < 0.001$) (Figure 6C). These results show that endogenous PTHrP is able to modulate IL-1 β and TNF- α -induced apoptosis in MC.

DISCUSSION

MC injury is a prominent feature in many glomerular diseases. MC secrete inflammatory mediators that induce leukocyte infiltration and activation at the site of the injury, and further enhance the local production of cytokines and chemokines (Anders et al., 2003). An overexpression of PTHrP was reported in multiple inflammatory conditions (Funk, 2001), including renal tissues in both glomerular and tubulointerstitial compartments (Izquierdo et al., 2006; Largo et al., 1999). In this study, we show that both IL-1 β and TNF- α elicit a time-dependent overexpression of PTHrP in mouse MC in primary culture. TNF- α -induced response was sustained over 24 h in terms of PTHrP mRNA and proteins. The response elicited by IL-1 β peaked after 2 h and was normalized after 8 h in terms of mRNA, but PTHrP protein was still present after 24 h. This suggested a sustained translation of PTHrP mRNA. Indeed, our results indicate that IL-1 β not only enhanced transcription of PTHrP mRNA, but also prolonged the stability of the transcript. Such an effect has been previously reported for IL-1 β on other target genes like Cox-2, particularly through modulation of HuR shuttling from nucleus to cytoplasm (Cok et al., 2003). HuR selectively binds to AU-rich elements of the 3'-untranslated region (3'UTR) of short-lived target mRNAs and delay their degradation (Brennan and Steitz, 2001). HuR was found previously to stabilize PTHrP mRNA through binding to its 3'UTR in renal carcinoma cells (Danilin et al., 2010). Here, we show that IL-1 β treatment of MC caused HuR shuttling from nuclei to cytoplasm. Additionally, PTHrP-mRNA successfully co-immunoprecipitated with HuR protein in treated MC but not in control cells. Altogether, these results suggest that IL-1 β stimulation increases binding of HuR to PTHrP mRNA, which facilitates PTHrP mRNA export from the nucleus and increases its half-life, therefore contributing to PTHrP upregulation.

Treatment of MC with PTHrP(1-36) also induced the expression of a panel of cytokines and chemokines. Among the cytokines, the most important increases (> 2-fold over control cell) was observed for IL-17, IL-16, IL-6 and IL-1 α , while other factors (IL-4, IL-10, IFN γ , sICAM, G-CSF and GM-CSF) were upregulated but to a lesser extent. It is noteworthy that these increases were short lasting, with peaks 2 h after PTHrP treatment, and no residual

effect after 4 h. Some of these cytokines like IL-17 and IL-16 were never shown before to be expressed in MC. IL-17 was mainly expressed in immune cells, particularly Th17 lymphocytes ((Pappu et al., 2011). IL-17 interacts with an ubiquitous receptor (IL-17R1) and synergistically triggers pro-inflammatory responses. IL-4 and IL-10 exert anti-inflammatory effects and are thought to activate macrophages of type M2c implicated in apoptotic cells uptake and injury resolution (Anders and Ryu, 2011). Rather than the transient expression of the aforementioned cytokines, PTHrP induced a more sustained expression of chemokines like RANTES/CCL5, MIP-2/CXCL2, TARC/CCL17, I-TAC/CXCL11, MIP-1 β /CCL4 and MCP-1/CCL2. These chemokines coordinate leukocyte migration toward the sites of inflammation (Segerer and Alpers, 2003). Our results indicate that PTHrP is capable of eliciting an important and rapid inflammatory response in MC through the upregulation of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines. These findings are in line with previous studies reporting PTHrP-induced MCP-1, RANTES and IL-6 overexpression on VSMC and cortical epithelial cells in culture (Martin-Ventura et al., 2003; Ramila et al., 2008).

We further looked if PTHrP was able to induce other inflammatory mediators in MC. The kinetic study of PTHrP on MC showed a rapid overexpression of Cox-2 mRNA that was stable over 2 hours, while the protein was still upregulated 8 h post-treatment. iNOS was also overexpressed by PTHrP but to a lesser extent. Cox-2 and many of the cytokines/chemokines induced by PTHrP have been reported as target genes of NF κ B (Guijarro and Egido, 2001). We looked whether PTHrP was capable of activating this signaling pathway in MC. Here, we show that PTHrP triggers NF κ B activation, with rapid translocation of the p65/RelA subunit from the cytoplasm to nuclei associated with p65 phosphorylation. Moreover, PTHrP-induced upregulation of Cox-2 was blocked by an inhibitor of I κ B kinase (IKK), and by PKA and PI3-K inhibition. These findings suggest that PTHrP activates the canonical NF κ B pathway, and that both cAMP/PKA and PI3-K/Akt pathways contribute to the upstream cascade stimulated after PTH1R activation. NF κ B activation by PTHrP has been previously shown to be involved in MCP-1 upregulation in VSMC and epithelial cells (Martin-Ventura et al., 2003; Ramila et al., 2008), and in IL-6 overexpression in osteoblastic cells (Guillen et al., 2002).

PTHrP induced its own overexpression in MC, with a kinetic similar to that of Cox-2, and this response was abrogated by the I κ B kinase inhibitor. Sequence analysis of the PTHrP P2 promoter has previously revealed the presence of NF κ B binding sites, and PTHrP was constitutively expressed in T-cell lymphoma through P2 promoter transactivation by p50/c-Rel, an effect inhibited with BAY 11-7085 (Nadella et al., 2007). TNF- α and IL-1 β are potent stimuli for NF κ B activation (Hsu et al., 1996; Stylianou et al., 1992), and they operate similarly in MC (Chang et al., 2006). It is thus probable that the increase of PTHrP expression induced by both TNF- α and IL-1 β in our murine MC occurs through the same pathway.

We have recently shown that PTHrP promotes survival of MC in primary culture after serum deprivation (Hochane et al., 2010). The present study corroborates this finding. Indeed, exogenous PTHrP(1-36) reversed apoptosis in MC, maximally enhanced by serum deprivation and endogenous PTHrP knockdown. Moreover, we showed that Cox-2 was an essential actor in this effect of PTHrP because a selective Cox-2 inhibitor reversed PTHrP-

induced survival. Of interest, Cox-2 overexpression induced by either adenoviral-mediated delivery of the Cox-2 gene (AdCox-2) or treatment with interleukin-1 β was previously shown to prevent apoptotic features in MC (Ishaque et al., 2003). PGE₂ and PGI₂ were the major prostaglandin metabolites in AdCox-2 cells. The treatment of MC with PTHrP resulted in a transient upregulation of the inducible PGE₂ synthase 1 isoform. However, PGE₂ did not mimic the anti-apoptotic effect of PTHrP in our hands, suggesting the implication of other prostaglandins. This point needs further studies.

TNF- α and IL-1 β are secreted by infiltrating macrophages and glomerular cells in glomerulonephritis, where apoptosis plays a role in the resolution of mesangial hypercellularity (Baker et al., 1994). Both TNF- α and IL-1 α were shown *in vitro* to induce apoptosis of MC (Bohler et al., 2000), and IL-1 α activates the same receptor as IL-1 β . The ability of TNF- α to induce apoptosis is an intensively studied area of research. Cox-2 overexpression in MC opposed TNF- α -induced apoptosis (Ishaque et al., 2003; Sugiyama et al., 1999). We therefore wondered whether endogenous overexpression of PTHrP in MC was able to modulate IL-1 β or TNF- α -induced apoptosis. Indeed, when PTHrP expression was enhanced in MC by stable transfection with human PTHrP-WT, we observed that the apoptotic responses to both cytokines became clearly blunted. However, when MC were deleted of PTHrP, basal apoptosis was increased but the additional apoptotic responses induced by IL-1 β or TNF- α remained unchanged. These results suggest that a high level of endogenous PTHrP overexpression is needed for the blunting of the cytokines-induced apoptosis. These levels might be present, when exposed to the cytokines, in PTHrP-WT-transfected MC, but not in control cells, or not all over the day. Another possibility lies in the deregulation of PTH1R. A downregulation of this receptor has previously been reported on other cells (Funk et al., 1995; Katz et al., 1992). In our study, we did not find any change in the PTH1R expression in MC following treatment with IL-1 β . The effects of TNF- α on this parameter have not been looked for up to now.

In conclusion, we have shown in the present study that PTHrP is overexpressed in murine MC when exposed to pro-inflammatory cytokines, IL-1 β or TNF- α . PTHrP itself acted as an inflammatory cytokine, enhancing the expression of interleukins (mainly IL-17, IL-16, IL-6 and IL-1 α), chemokines (mainly RANTES/CCL5, MIP-2/CXCL2, TARC/CCL17, I-TAC/CXCL11, MIP-1 β /CCL4 and MCP-1/CCL2) and Cox-2. PTHrP activated the NF κ B pathway and appeared as a survival factor for MC *via* the Cox-2 metabolites. Finally, PTHrP overexpression in MC blunted the apoptotic effects of IL-1 β and TNF- α . Altogether, these findings suggest that PTHrP might function both as a booster for inflammatory processes and as a negative feedback loop preserving MC survival.

CONCISE METHODS

Mesangial cell culture

MC in primary culture were derived from glomeruli isolated from C57BL/6 mice (Janvier, Le Genest Saint Isle). Briefly, kidneys from 6-week old mice were subjected to sequential sieving (125, 71 and 53 μ m) and sedimentation for extraction of glomeruli which were set and

cultured in DMEM (Life Technologies, Saint Aubin, France) enriched with 30% foetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin, Life Technologies). MC outgrew from the glomeruli in about 1 week. Cells were further grown for 1 week in DMEM with high D-valine content (2.5 mg/ml, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier) for the elimination of fibroblasts. They had the expected characteristics of MC, with positive immunostaining for anti-Thy1.2 and anti- α SMA, and negative one for a marker of epithelial cells, anti-pancytokeratin. MC were then maintained in DMEM supplemented with 20% FBS and 1% antibiotics at 37° C in a 10% CO₂ atmosphere. MC were used between passage 4 and 16. Before any study, MC were synchronized for 24 h in serum-free media supplemented with 0.1% bovine serum albumin (BSA), and cells were maintained in serum-free media during the treatments, IL-1 β (10 ng/ml, BioVendor, Euromedex, Souffelweyersheim, France), TNF- α (10 ng/ml, Sigma-Aldrich), PTHrP(1-36) (100 nM, NeoMPS, Illkirch, France) or solvent (control).

Some studies were also done on MC obtained from homozygous PTHrP-floxed (PTHrP^{L2/L2}) mice (He et al., 2001) crossmated with α SMA-Cre-ER^{T2(tg/0)} mice (Wendling et al., 2009). The corresponding MC (CM^{CreloxP}) were then used to knockdown endogenous expression of PTHrP, by treating the cells for three alternative days with 4-OH-Tam (5 μ M, Sigma-Aldrich). Control and PTHrP-excised MC were used within 4 passages after excision.

MC were also transfected with a plasmid (2 μ g) encoding for a human PTHrP(1-139) construct (de Miguel et al., 2001; Massfelder et al., 1997) (wild type PTHrP or PTHrP-WT) or with the empty plasmid vector (pcDNA3) as control. Transfection was performed with Lipofectamine 2000[®] (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Stably transfected cells were selected by geneticin treatment (G418, 300 μ g/ml, Life Technologies). PTHrP-WT transfected MC expressed high levels of hPTHrP (at least 50-fold higher than the mouse endogenous level).

Real-time quantitative reverse transcription-PCR analysis

Total RNA was extracted from MC using the RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Five μ g of total RNA were reverse transcribed in a reaction buffer (Life Technologies) and non-specific primer p(dT)15 (Roche Diagnostics, Meylan, France), at 37°C for 1 h. Quantitative real-time PCR reaction was performed with the "LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green[®] kit (Roche Diagnostics). The sense and antisense primers are given in table 1. Each sample was analyzed 3 times and quantified with the analysis software for LightCycler (Roche Diagnostics). Results are expressed as normalized ratios vs 18S mRNA, the value of which is set at 1 for the control groups.

To evaluate the effects of IL-1 β on PTHrP transcription, MC were pretreated (15 min) with Act D (5 μ g/ml, Sigma-Aldrich). To evaluate the effects of IL-1 β on mRNA stability, Act D treatment was given 30 min after exposure of MC to the cytokine. To evaluate the effects of PTHrP on Cox-2 mRNA after blockade of specific pathways, MC were treated 1 h before addition of PTHrP with inhibitors for IKK β (BAY 11-7085, 10 μ M, Merck Millipore,

Molsheim, France), PKA (H89, 1 μ M, Sigma Aldrich), or PI3-K (LY294002, 20 μ M, Sigma Aldrich).

HuR-PTHrP mRNA complex pull-down assay

MC were seeded in 75 cm² flasks, synchronized and treated for 1 h with IL-1 β or solvent. Pull down assay was performed according to the procedure published elsewhere.(Peritz et al., 2006) Briefly, cells were lysed using PLB buffer (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1mM dithiothreitol, 2 mM vanadyl-ribonuclease, 100 U/ml RNase Out, 0.05% NP-40 and 25 μ l/ml of protease inhibitors cocktail, in RNase free water). Lysates containing proteins and RNA were precleared using 20 μ l of protein A/G plus-Agarose beads/0.5 mg cell protein (Santa Cruz, TebuBio, Le Perray-en-Yvelines, France). Beads were discarded and supernatants incubated with either mouse monoclonal anti-HuR antibody (2 μ g/0.5 mg protein, Santa Cruz) or corresponding IgG1 (internal control) overnight at 4°C over rollers. Fifty μ l of beads/0.5 mg protein were added for further 4 h incubation at 4°C. After centrifugation (5 min at 3,000g), beads were incubated for 30 min at 50°C in a shaking water bath with 100 μ l PLB buffer supplemented with 0.1% SDS and 30 μ g/ml proteinase K. RNA was extracted by the use of phenol-chloroform-isoamyl alcohol mixture, further purified using RNeasy Microkit (Qiagen)], and processed as described in RT-PCR methods to quantify PTHrP mRNA.

Western blot

MC proteins were extracted at 4°C with the lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40) supplemented with 0.5% proteases and phosphatases inhibitors (Sigma-Aldrich). The supernatants were collected after centrifugation at 12000 x g at 4°C for 5 min. Protein concentration was determined by the Lowry method.(Lowry et al., 1951) Protein expression was analyzed by Western blot using the semi-dry iBlot (Life Technologies). The primary antibodies used were as follows: anti-PTH1R (1/200, Santa Cruz), anti-Cox-2 (1/200, Santa Cruz), anti-NF κ B p65-phospho(S536) (1/200, Santa Cruz), anti-NF κ B p65 (1/200, Santa Cruz). Protein gel loading was visualized on each membrane with an anti-glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) antibody (1/1000, Merck Millipore). The appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was used. Chemiluminescence was detected (Immobilon Western kit, Merck Millipore) and visualized (Fusion Fx7, Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

Fluorescent immunocytochemistry

Cells plated in glass chamber slides (Lab-Tek II[®], Nalge Nunc, Rochester, USA) were serum-depleted and treated with IL-1 β , TNF- α , PTHrP(1-36) or solvent. Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS) for 15 min, washed with PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in 1 mM glycine-PBS for 10 min. After blocking with 3% BSA in PBS for 40 min, cells were incubated for 1 h at room temperature with the specific primary antibodies diluted in blocking buffer, and then for 1 h in the dark with the appropriate Alexa-conjugated IgG secondary antibodies (Life Technologies). Nuclei were

stained by bisBenzimide H 33342 (HOE 33342, Sigma-Aldrich). After final washes, slides were mounted with Moviol and visualized by fluorescence-microscopy (Nikon Eclipse E800) using NIS-elements program. The following antibodies were used: monoclonal mouse anti-PTHrP(34-53) (PTH2E211, 1/100, IGBMC, Illkirch, France), rabbit polyclonal anti-NFκB p65-phospho(S536) (1/100, Abcam, Paris, France), and mouse monoclonal anti-HuR (1/100, Santa Cruz).

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)

For the evaluation of apoptotic cells by TUNEL, MC were seeded on glass slides (Lab-Tek II[®]), maintained 24 h in DMEM+20% FBS and synchronized for 24 h in DMEM+0.1% BSA. Apoptosis was induced by serum-deprivation for a further 24-h period, with or without the following treatments: IL-1β (10 ng/ml), TNF-α (10 ng/ml), PTHrP(1-36) (100 nM), prostaglandin E₂ (PGE₂, 1 μM, Cayman, Interchim, Montluçon, France), Cox-2 inhibitor (NS389, 10 μM, Sigma-Aldrich) as indicated in the appropriate Figures. Apoptotic cells were detected by the commercial “In situ cell death detection” kit (Roche Diagnostics) following the manufacturer’s specifications. Nuclei were stained by HOE 33342. Cells were subsequently analyzed by fluorescence-microscopy (Nikon Eclipse E800) using NIS-elements program. At least 10 successive images were taken in each condition. The percent of apoptotic cells was calculated with the help of ImageJ program (NIH, USA).

Proteome array analysis

The proteome Profiler Arrays (Mouse cytokine Array Panel A) were used according to the manufacturer’s protocol (R&D systems, Lille, France). MC were seeded in 75 cm² flasks and grown up to 80% confluence. Cells were then treated for 2 or 4 h with PTHrP(1-36) (100 nM). The cells were lysed and lysate was added to the membrane array, and incubated overnight with the detection antibody cocktail. After washing, secondary antibody (streptavidin-horseradish peroxidase, 1/2000 dilution) was added and protein signals were detected by enhanced chemiluminescence. Analysis was done on total cell lysates. Duplicate signal spots on the array were quantified using Bio1D software (Vilber Lourmat). Results are expressed as the average pixel density for each cytokine, after background signal subtraction (determined from the negative control spots on the array).

Statistical analysis

Results are expressed as means ± SEM. Statistical analysis was performed when appropriate using Student’s *t* test, one-way or two-way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparison test. Statistics were run with SigmaStat[®] (Jandel Scientific). Differences with *P* < 0.05 were considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), the University of Strasbourg, and by the French Ministry of Higher Education. This work is part of the PhD thesis of M.H. M.B. is a Research Director from CNRS (Centre

National de la Recherche Scientifique). The authors thank Andrew Karaplis (McGill University, Montréal) for the gift of PTHrP^{L2/L2} mice, Daniel Metzger (IGBMC, Strasbourg) for the generation of the α SMA-Cre-ER^{T2}/PTHrP^{L2/L2} mice, and Dr P Esbrit (Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain) for the gift of rabbit C13 antiserum.. The authors also gratefully acknowledge the secretarial assistance of Stéphanie Mathé.

DISCLOSURES

The authors have no disclosure statement.

Table 1: Nucleotide sequences of the primers used for real-time RT-PCR

	Primer Sequence 5' to 3'	
	Forward	Reverse
PTHrP	CAGCCGAAATCAGAGCTACC	CTCCTGTTCTCTGCGTTTCC
PTH1R	GGGCACAAGAAGTGGATCAT	GGCCATGAAGACGGTGTAGT
Cox-2	CCGTGCTGCTCTGTCTTAAC	TTGGGAACCCTTCTTTGTTC
MCP-1	TTC CTC CAC CAC CAT GCA G	CCA GCC GGC AAC TGT GA
iNOS	CAG CTG GGC TGT ACA AAC C	CAT TGG AAG TGA AGC GTT T
VEGF	CAG GCT GCT GTA ACG ATG AA	GCA TTC ACA TCT GCT GTG CT
PDGF	GGA GCA CAG ACT GGA GGA	GTC GAG GAG CAG ACT GGA
PGE2 synthase 1	GAG TTT TCA CGT TCC GGT GT	GGT AGG CTG TCA GCT CAA GG
TxA synthase	AGG TGC TGG GAC AAC GTA TC	GCC TCT GCT GTG AAC CTT TC
18S	CATGGCCGTTCTTAGTTGGT	CGCTGAGCCAGTCAGTGTAG

REFERENCES

- Adachi, N., Yamaguchi, K., Miyake, Y., Honda, S., Nagasaki, K., Akiyama, Y., Adachi, I., and Abe, K. (1990). Parathyroid hormone-related protein is a possible autocrine growth inhibitor for lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 166, 1088-1094.
- Anders, H.J., and Ryu, M. (2011). Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int* 80, 915-925.
- Anders, H.J., Vielhauer, V., and Schlondorff, D. (2003). Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int* 63, 401-415.
- Bagchus, W.M., Jeunink, M.F., and Elema, J.D. (1990). The mesangium in anti-Thy-1 nephritis. Influx of macrophages, mesangial cell hypercellularity, and macromolecular accumulation. *Am J Pathol* 137, 215-223.
- Baker, A.J., Mooney, A., Hughes, J., Lombardi, D., Johnson, R.J., and Savill, J. (1994). Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest* 94, 2105-2116.
- Bohler, T., Waiser, J., Hepburn, H., Gaedeke, J., Lehmann, C., Hambach, P., Budde, K., and Neumayer, H.H. (2000). TNF-alpha and IL-1alpha induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers. *Cytokine* 12, 986-991.
- Brennan, C.M., and Steitz, J.A. (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58, 266-277.
- Chang, J.W., Kim, C.S., Kim, S.B., Park, S.K., Park, J.S., and Lee, S.K. (2006). Proinflammatory cytokine-induced NF-kappaB activation in human mesangial cells is mediated through intracellular calcium but not ROS: effects of silymarin. *Nephron Exp Nephrol* 103, e156-165.
- Cok, S.J., Acton, S.J., and Morrison, A.R. (2003). The proximal region of the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 is recognized by a multimeric protein complex containing HuR, TIA-1, TIAR, and the heterogeneous nuclear ribonucleoproteinU. *J Biol Chem* 278, 36157-36162.
- Danilin, S., Sourbier, C., Thomas, L., Lindner, V., Rothhut, S., Dormoy, V., Helwig, J.J., Jacqmin, D., Lang, H., and Massfelder, T. (2010). Role of the RNA-binding protein HuR in human renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 31, 1018-1026.
- de Miguel, F., Fiaschi-Taesch, N., Lopez-Talavera, J.C., Takane, K.K., Massfelder, T., Helwig, J.J., and Stewart, A.F. (2001). The C-terminal region of PTHrP, in addition to the nuclear localization signal, is essential for the intracrine stimulation of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 142, 4096-4105.
- Eto, M., Akishita, M., Ishikawa, M., Kozaki, K., Yoshizumi, M., Hashimoto, M., Ako, J., Sugimoto, N., Nagano, K., Sudoh, N., *et al.* (1998). Cytokine-induced expression of parathyroid hormone-related peptide in cultured human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 339-343.
- Ferguson, J.E., 2nd, Seaner, R.M., Bruns, D.E., and Bruns, M.E. (1995). Interleukin-1 beta and interleukin-4 increase parathyroid hormone-related protein secretion by human umbilical vein endothelial cells in culture. *Am J Obstet Gynecol* 173, 448-455; discussion 455-446.

- Funk, J.L. (2001). A role for parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of inflammatory/autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* 1, 1101-1121.
- Funk, J.L., Cordaro, L.A., Wei, H., Benjamin, J.B., and Yocum, D.E. (1998). Synovium as a source of increased amino-terminal parathyroid hormone-related protein expression in rheumatoid arthritis. A possible role for locally produced parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 101, 1362-1371.
- Funk, J.L., Lausier, J., Moser, A.H., Shigenaga, J.K., Huling, S., Nissenson, R.A., Strewler, G.J., Grunfeld, C., and Feingold, K.R. (1995). Endotoxin induces parathyroid hormone-related protein gene expression in splenic stromal and smooth muscle cells, not in splenic lymphocytes. *Endocrinology* 136, 3412-3421.
- Guijarro, C., and Egido, J. (2001). Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int* 59, 415-424.
- Guillen, C., Martinez, P., de Gortazar, A.R., Martinez, M.E., and Esbrit, P. (2002). Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein increase interleukin-6 by nuclear factor-kappa B activation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 277, 28109-28117.
- He, B., Deckelbaum, R.A., Miao, D., Lipman, M.L., Pollak, M., Goltzman, D., and Karaplis, A.C. (2001). Tissue-specific targeting of the pthrp gene: the generation of mice with floxed alleles. *Endocrinology* 142, 2070-2077.
- Hochane, M., Raison, D., Coquard, C., Moulin, B., Imhoff, O., Massfelder, T., Metzger, D., Helwig, J.J., and Barthelmebs, M. (2010). La PTHrP, un facteur de prolifération et de survie des cellules mésangiales en culture. *Néphrol & Thérap* 6, 474 (abstract BR003).
- Hochane, M., Raison, D., Coquard, C., Massfelder, T., Moulin, B., and Barthelmebs, M. (2012). La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) est un facteur de survie des cellules mésangiales exposées à des cytokines pro-inflammatoires. *Néphrol & Thérap* 7, sous presse (abstract).
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G., and Goeddel, D.V. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299-308.
- Ishaque, A., Dunn, M.J., and Sorokin, A. (2003). Cyclooxygenase-2 inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in renal glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* 278, 10629-10640.
- Izquierdo, A., Lopez-Luna, P., Ortega, A., Romero, M., Guitierrez-Tarres, M.A., Arribas, I., Alvarez, M.J., Esbrit, P., and Bosch, R.J. (2006). The parathyroid hormone-related protein system and diabetic nephropathy outcome in streptozotocin-induced diabetes. *Kidney Int* 69, 2171-2177.
- Katz, M.S., Gutierrez, G.E., Mundy, G.R., Hymer, T.K., Caulfield, M.P., and McKee, R.L. (1992). Tumor necrosis factor and interleukin 1 inhibit parathyroid hormone-responsive adenylate cyclase in clonal osteoblast-like cells by down-regulating parathyroid hormone receptors. *J Cell Physiol* 153, 206-213.
- Kluth, D.C., and Rees, A.J. (1996). Inhibiting inflammatory cytokines. *Semin Nephrol* 16, 576-582.
- Largo, R., Gomez-Garre, D., Santos, S., Penaranda, C., Blanco, J., Esbrit, P., and Egido, J. (1999). Renal expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in a rat model of tubulointerstitial damage. *Kidney Int* 55, 82-90.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* *193*, 265-275.
- Martin-Ventura, J.L., Ortego, M., Esbrit, P., Hernandez-Presa, M.A., Ortega, L., and Egido, J. (2003). Possible role of parathyroid hormone-related protein as a proinflammatory cytokine in atherosclerosis. *Stroke* *34*, 1783-1789.
- Massfelder, T., Dann, P., Wu, T.L., Vasavada, R., Helwig, J.J., and Stewart, A.F. (1997). Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 13630-13635.
- Nadella, M.V., Dirksen, W.P., Nadella, K.S., Shu, S., Cheng, A.S., Morgenstern, J.A., Richard, V., Fernandez, S.A., Huang, T.H., Guttridge, D., *et al.* (2007). Transcriptional regulation of parathyroid hormone-related protein promoter P2 by NF-kappaB in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia* *21*, 1752-1762.
- Ortega, A., Romero, M., Izquierdo, A., Troyano, N., Arce, Y., Ardura, J.A., Arenas, M.I., Bover, J., Esbrit, P., and Bosch, R.J. (2012). Parathyroid hormone-related protein is a hypertrophy factor for human mesangial cells: Implications for diabetic nephropathy. *J Cell Physiol* *227*, 1980-1987.
- Pappu, R., Ramirez-Carrozzi, V., and Sambandam, A. (2011). The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases. *Immunology* *134*, 8-16.
- Peritz, T., Zeng, F., Kannanayakal, T.J., Kilk, K., Eiriksdottir, E., Langel, U., and Eberwine, J. (2006). Immunoprecipitation of mRNA-protein complexes. *Nat Protoc* *1*, 577-580.
- Ramila, D., Ardura, J.A., Esteban, V., Ortega, A., Ruiz-Ortega, M., Bosch, R.J., and Esbrit, P. (2008). Parathyroid hormone-related protein promotes inflammation in the kidney with an obstructed ureter. *Kidney Int* *73*, 835-847.
- Seegerer, S., and Alpers, C.E. (2003). Chemokines and chemokine receptors in renal pathology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* *12*, 243-249.
- Sethi, S., and Fervenza, F.C. Membranoproliferative glomerulonephritis: pathogenetic heterogeneity and proposal for a new classification. *Semin Nephrol* *31*, 341-348.
- Sourbier, C., Danilin, S., Lindner, V., Steger, J., Rothhut, S., Meyer, N., Jacqmin, D., Helwig, J.J., Lang, H., and Massfelder, T. (2007). Targeting the nuclear factor-kappaB rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* *67*, 11668-11676.
- Stylianou, E., O'Neill, L.A., Rawlinson, L., Edbrooke, M.R., Woo, P., and Saklatvala, J. (1992). Interleukin 1 induces NF-kappa B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes. *J Biol Chem* *267*, 15836-15841.
- Sugiyama, H., Savill, J.S., Kitamura, M., Zhao, L., and Stylianou, E. (1999). Selective sensitization to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by blockade of NF-kappaB in primary glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* *274*, 19532-19537.
- Wendling, O., Bornert, J.M., Chambon, P., and Metzger, D. (2009). Efficient temporally-controlled targeted mutagenesis in smooth muscle cells of the adult mouse. *Genesis* *47*, 14-18.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Effects of IL-1 β and TNF- α on PTHrP expression in MC. Kinetics of the PTHrP mRNA expression over the 8 hours following exposure of the MC to IL-1 β (10 ng/ml) (A), or over the 24 hours following TNF- α (10 ng/ml) (B). PTHrP mRNA was expressed as a normalized ratio to 18S mRNA. (C) Representative immunostaining of PTHrP in MC exposed to IL-1 β or TNF- α (10 ng/ml) for 24 hours. Merged pictures with PTHrP (red) and nuclei (blue) are given. Both cytokines enhanced PTHrP protein expression (b, d) when compared to control cells (c). (D) Act D pretreatment (5 μ g/ml, 15 min before IL-1 β) abolished the increase in PTHrP mRNA expression induced by IL-1 β . (E) The addition of Act D 30 min after IL-1 β showed enhanced stability of PTHrP mRNA after IL-1 β treatment. (F) Pull-down assay was used to analyze the interaction of HuR with PTHrP mRNA. HuR was immunoprecipitated and PTHrP mRNA amplified by RT-PCR. PTHrP mRNA-HuR complex was increased after IL-1 β treatment. PTHrP mRNA was not detected when immunoprecipitation was performed with control IgG1 (not shown). Results are shown as means \pm SEM (n = 3-6 per group). Statistical analysis by *t*-test or ANOVA followed by Tukey's test vs control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Figure 2. Effects of PTHrP (100 nM) on cytokines and chemokines expression in MC. Total protein extracts of either untreated MC (control) or MC treated with 100 nM PTHrP for 2 hours were analyzed on proteome profiler arrays specific for mouse cytokines. The array signal was analyzed using Bio1D software. Histogram shows quantitative analysis of the pixel density obtained by software analysis. Values represent the mean of duplicate signals spots for each protein (log scale).

Figure 3. Relative changes in cytokines/chemokines levels after treatment of MC with 100 nM PTHrP for 2 or 4 h. Relative fold change for a given protein represents the comparison of the average pixel density signals from PTHrP-treated vs control MC on corresponding arrays for each time. A value of 1 corresponds to no change. Values higher than 1.5 were considered as important.

Figure 4. Effects of PTHrP on MCP-1, Cox-2 and PTHrP expression in MC. Kinetics of the effects of PTHrP (100 nM) on mRNA expression by RT-PCR for MCP-1 (A), Cox-2 (B) and PTHrP (D). Results are given as means \pm SEM (n = 3). Statistical analysis by ANOVA and Tukey's test, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs time-related control. (C) Representative immunoblots for Cox-2 protein expression in MC after 4 or 8 h treatment with PTHrP(1-36) (100 nM) compared with control MC. GAPDH is used as a housekeeping protein control on the same membrane. Experiments were repeated at least three times with similar results.

Figure 5: PTHrP-induced activation of the NF- κ B pathway contributes to Cox-2 upregulation. (A) Quiescent MC were exposed to 100 nM PTHrP for 10 min. Western blot shows the rapid increase (within 10 min) in p65 phosphorylation on Ser536 after treatment of MC with PTHrP(1-36). (B) Representative fluorescent immunostaining showing PTHrP(1-36)-induced translocation of the activated p65 subunit (phosphorylated on Ser536) from the cytoplasm to the nuclei. (C) Expression of Cox-2 mRNA by RT-PCR after treatment of MC

for 1 h with PTHrP(1-36), with or without pretreatment with an IKK β inhibitor (BAY 11-7085, 10 μ M). Results show that PTHrP-induced increase in Cox-2 expression is abolished in the presence of BAY 11-7085. (D) Expression of Cox-2 mRNA by RT-PCR after treatment of MC for 1 h with PTHrP(1-36), with or without pretreatment with inhibitors of PKA (H89, 10 μ M) or PI3-K (LY294002, 20 μ M). Results are shown as means \pm SEM (n = 5-10 per group). Statistical analysis by ANOVA and Tukey's test, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.001$ vs PTHrP-treated group without inhibitor.

Figure 6. Effects of PTHrP on MC apoptosis. (A) Synchronized MC were serum-deprived for 24 h and treated with PTHrP(1-36) or PGE₂. Results show that PTHrP, but not PGE₂, induced MC survival, and that this response was suppressed by pretreatment with a Cox-2 inhibitor (NS389, 10 μ M). (B, C) The effects of PTHrP on MC apoptosis induced by IL-1 β or TNF- α were analyzed by TUNEL in quiescent MC by serum-deprivation for a 24-hour period, with or without addition of the cytokines (IL-1 β or TNF- α , 10 ng/ml) by TUNEL. (B) Effects of IL-1 β and TNF- α on apoptosis in control MC^{CreloxP} and PTHrP-excised MC^{CreloxP}. MC were prepared from α SMA-Cre-ER^{T2}/PTHrP^{L2/L2} mice kidneys (MC^{CreloxP}), and treated *in vitro* by 4-OH-Tam (5 μ M) for endogenous PTHrP knockdown. (C) Effects of IL-1 β and TNF- α on apoptosis in MC overexpressing wild type PTHrP (PTHrP-WT) or the empty plasmid (pcDNA3). PTHrP deletion enhanced the basal and cytokine-induced MC apoptosis, while PTHrP overexpression markedly damped the apoptotic responses. Results are given as means \pm SEM (n = 3). Statistical analysis by ANOVA and Tukey's test, * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.001$ vs the corresponding group in control MC^{CreloxP} or

Figure 1

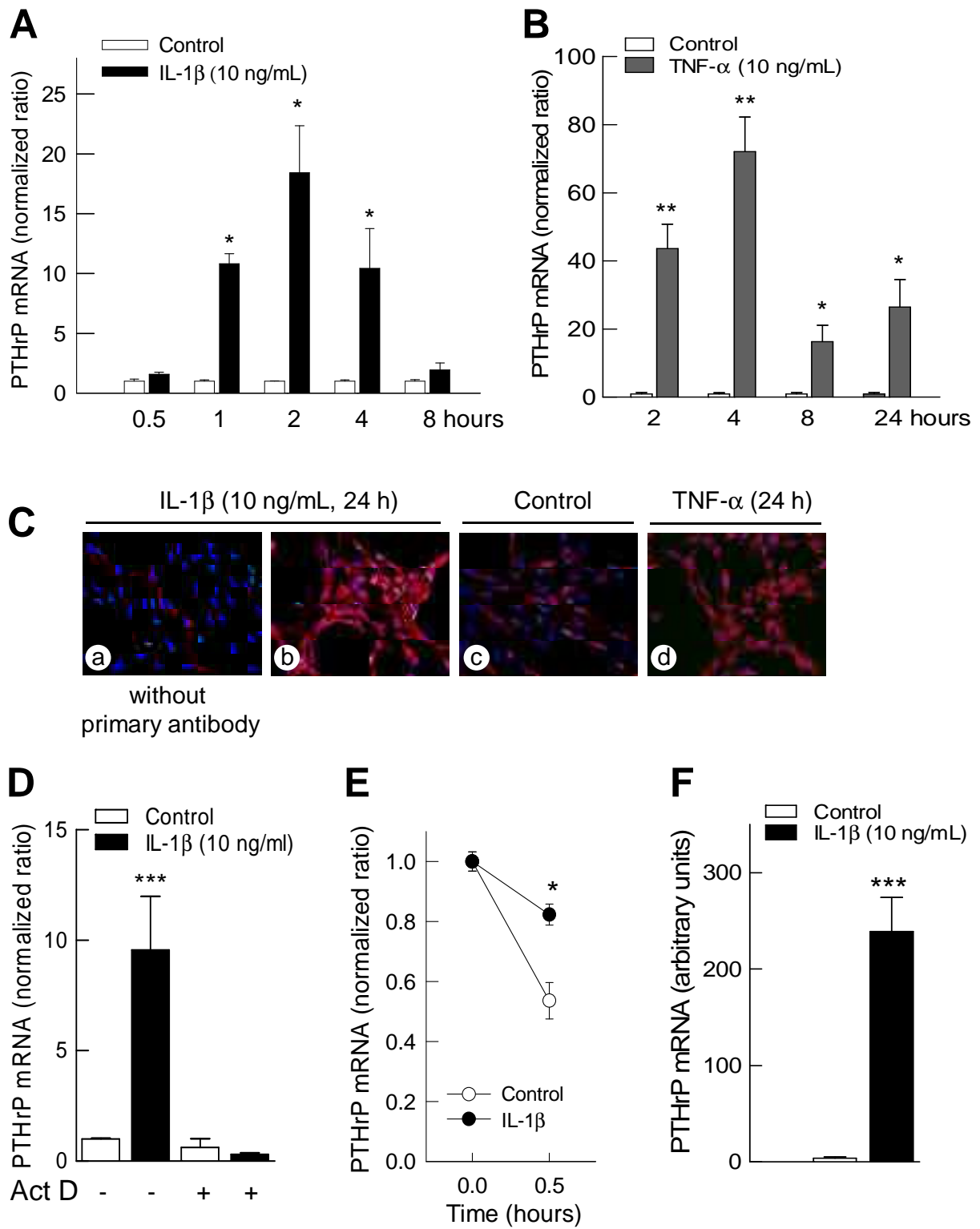


Figure 2

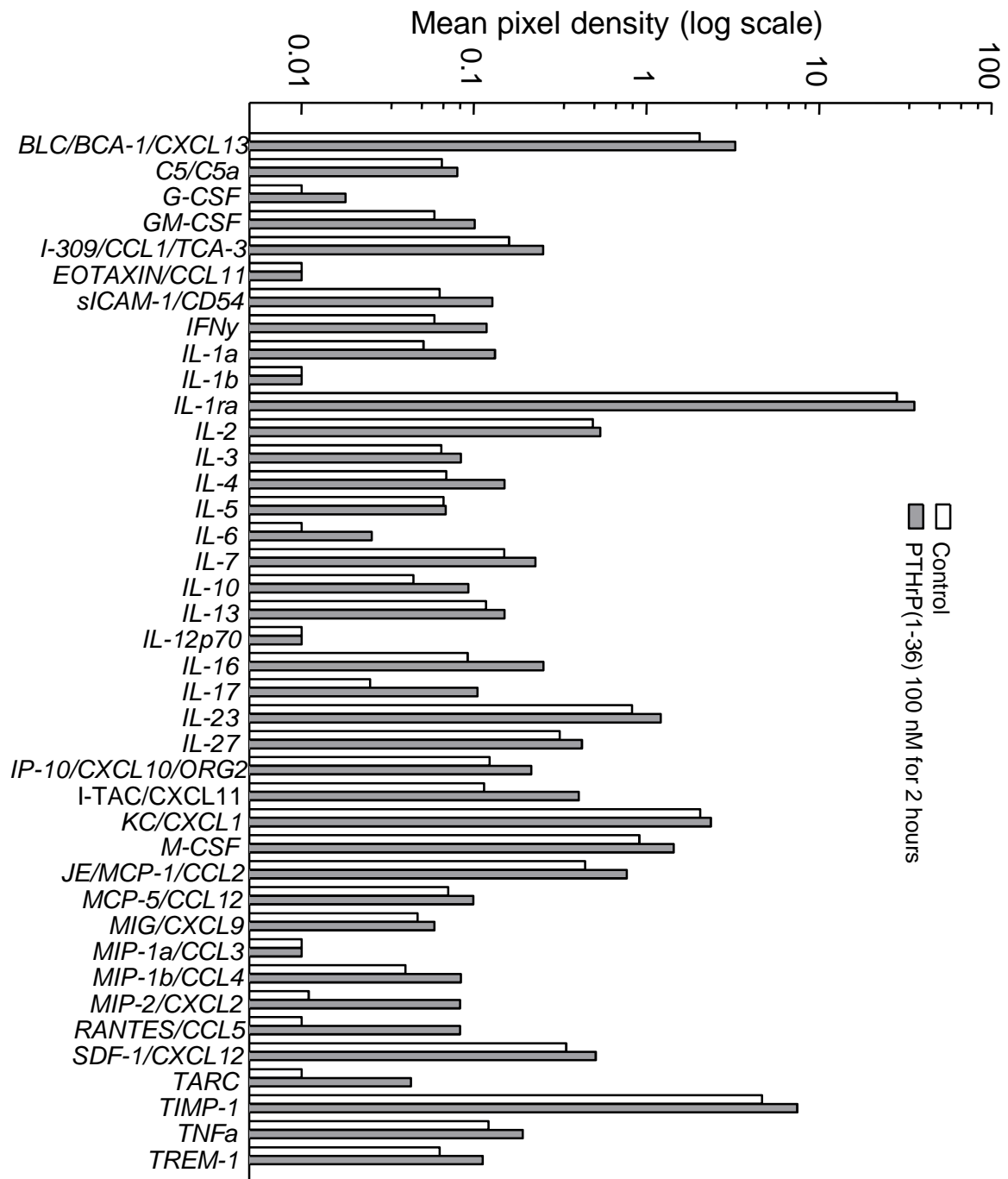
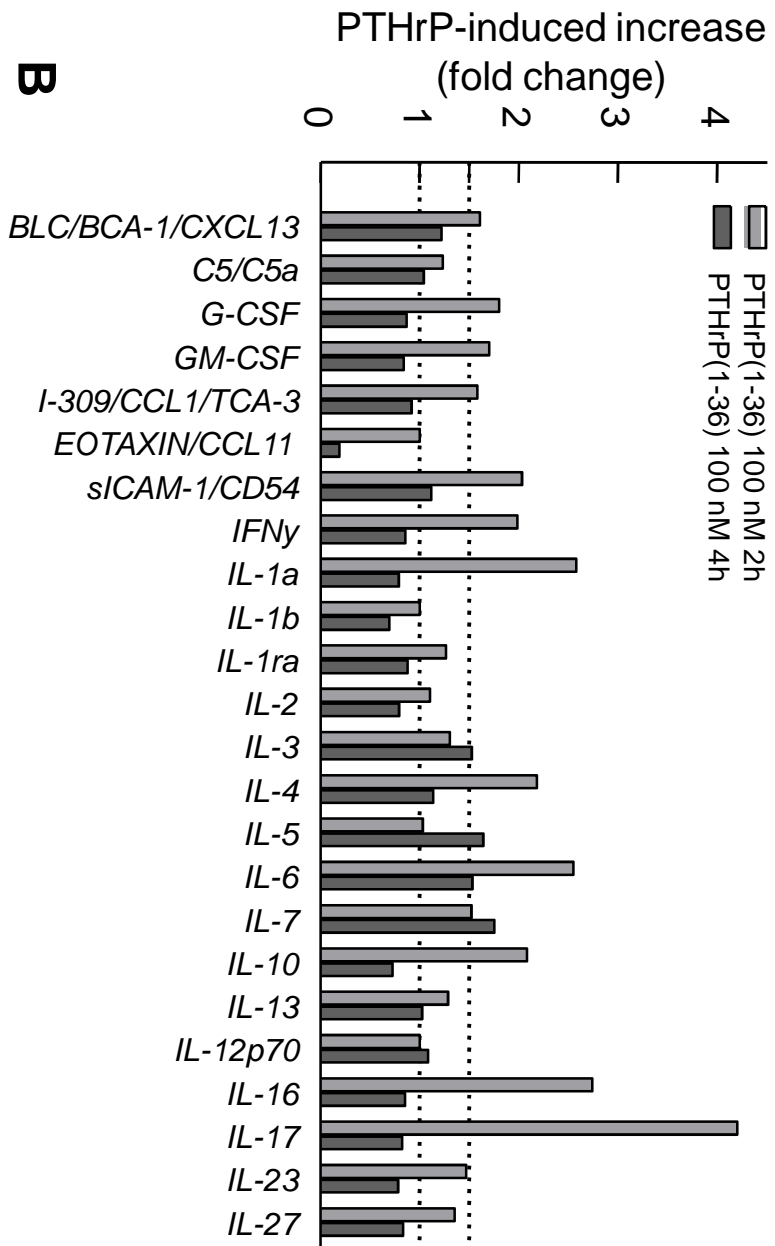


Figure 3

A



B

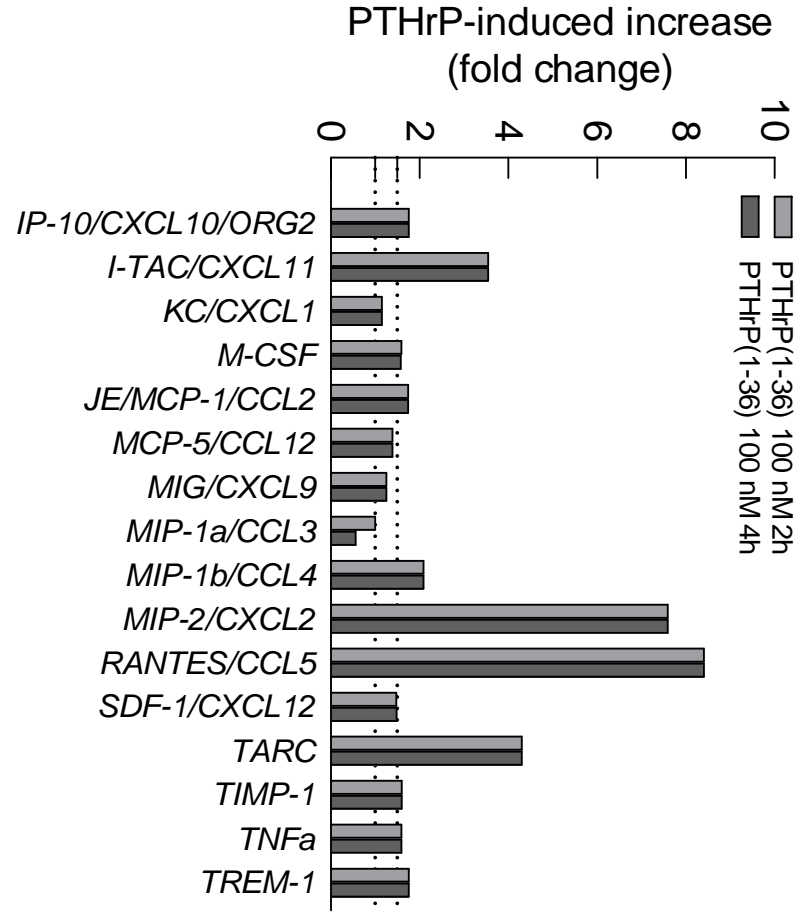


Figure 4

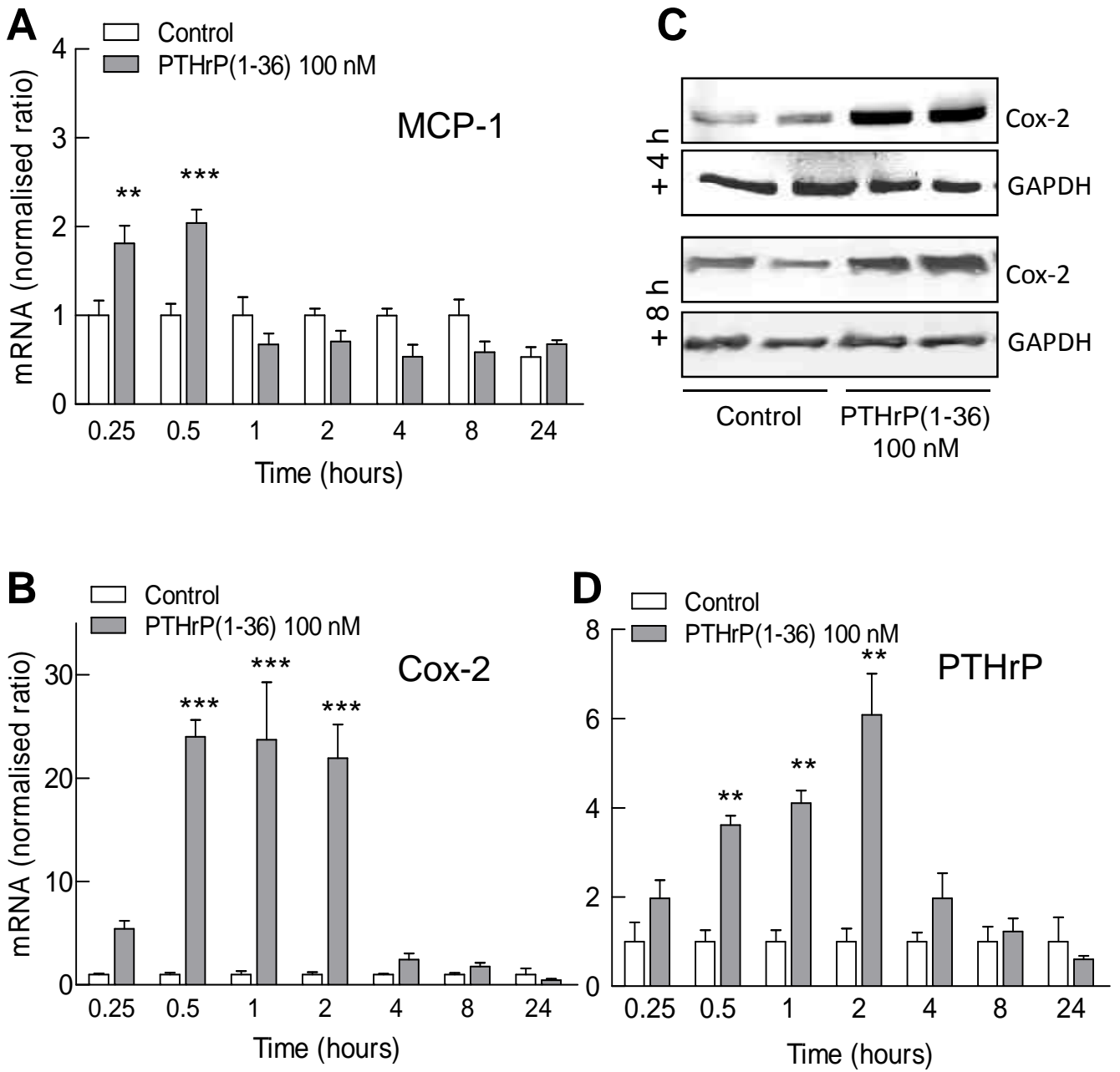


Figure 5

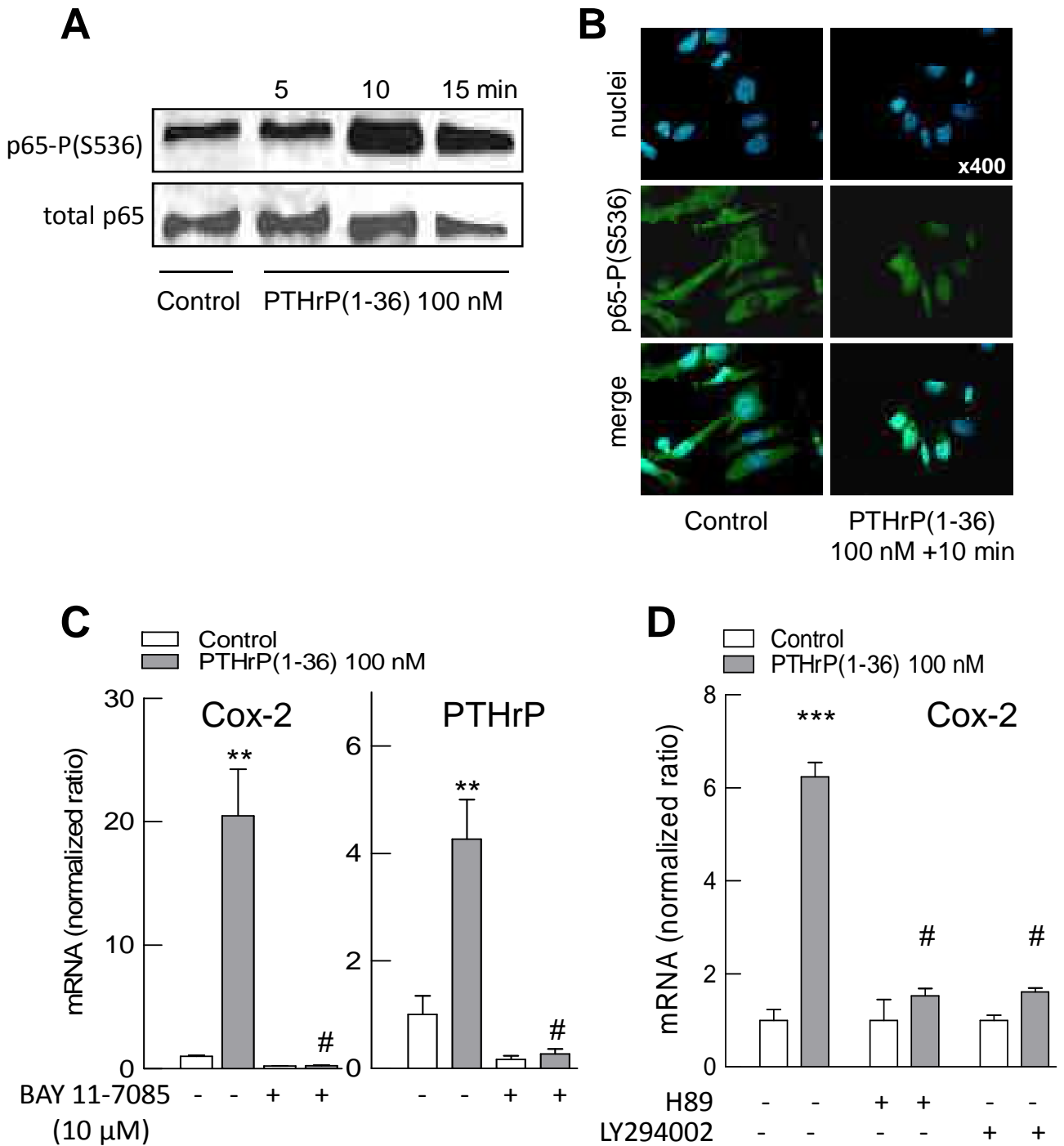
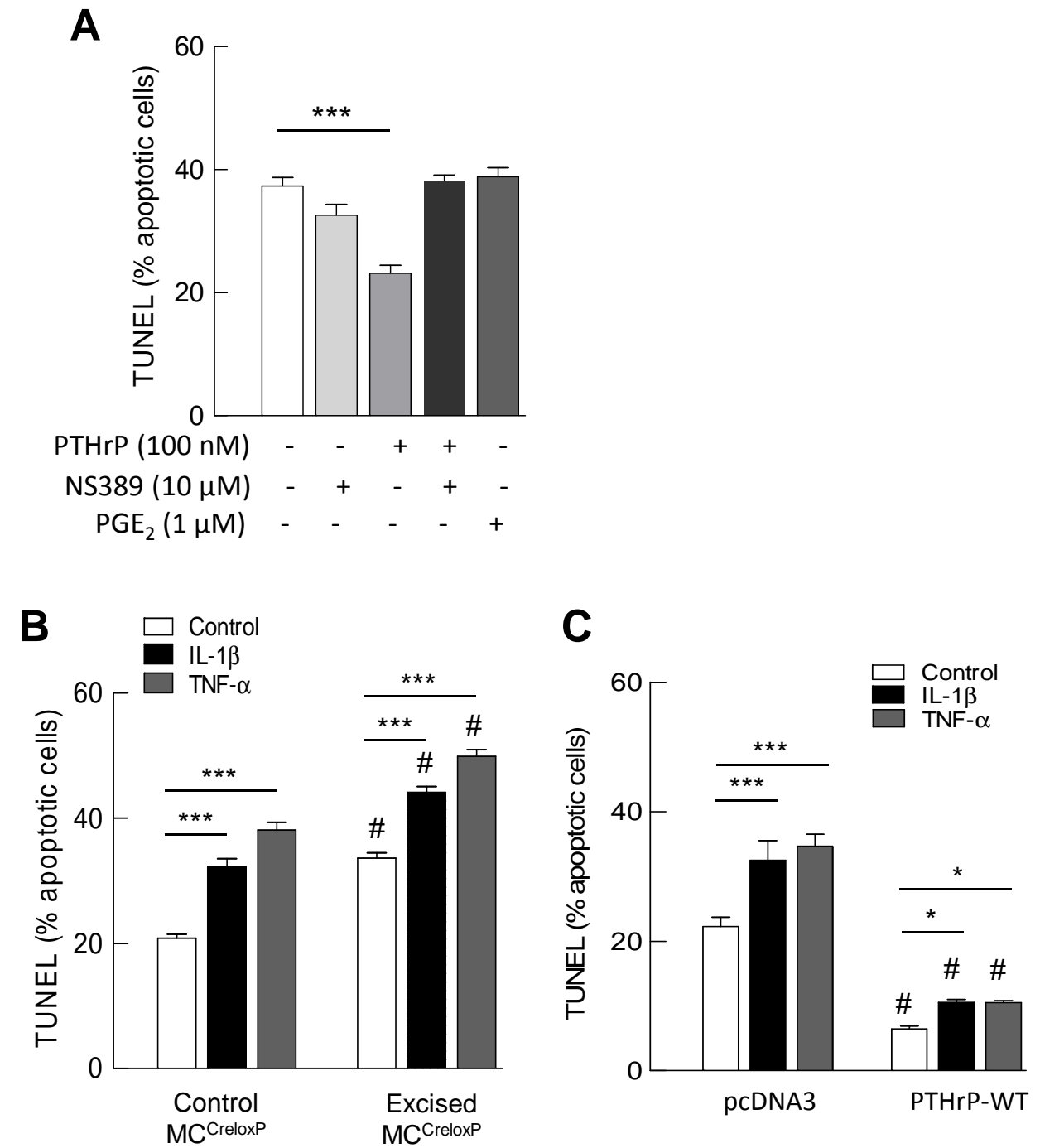
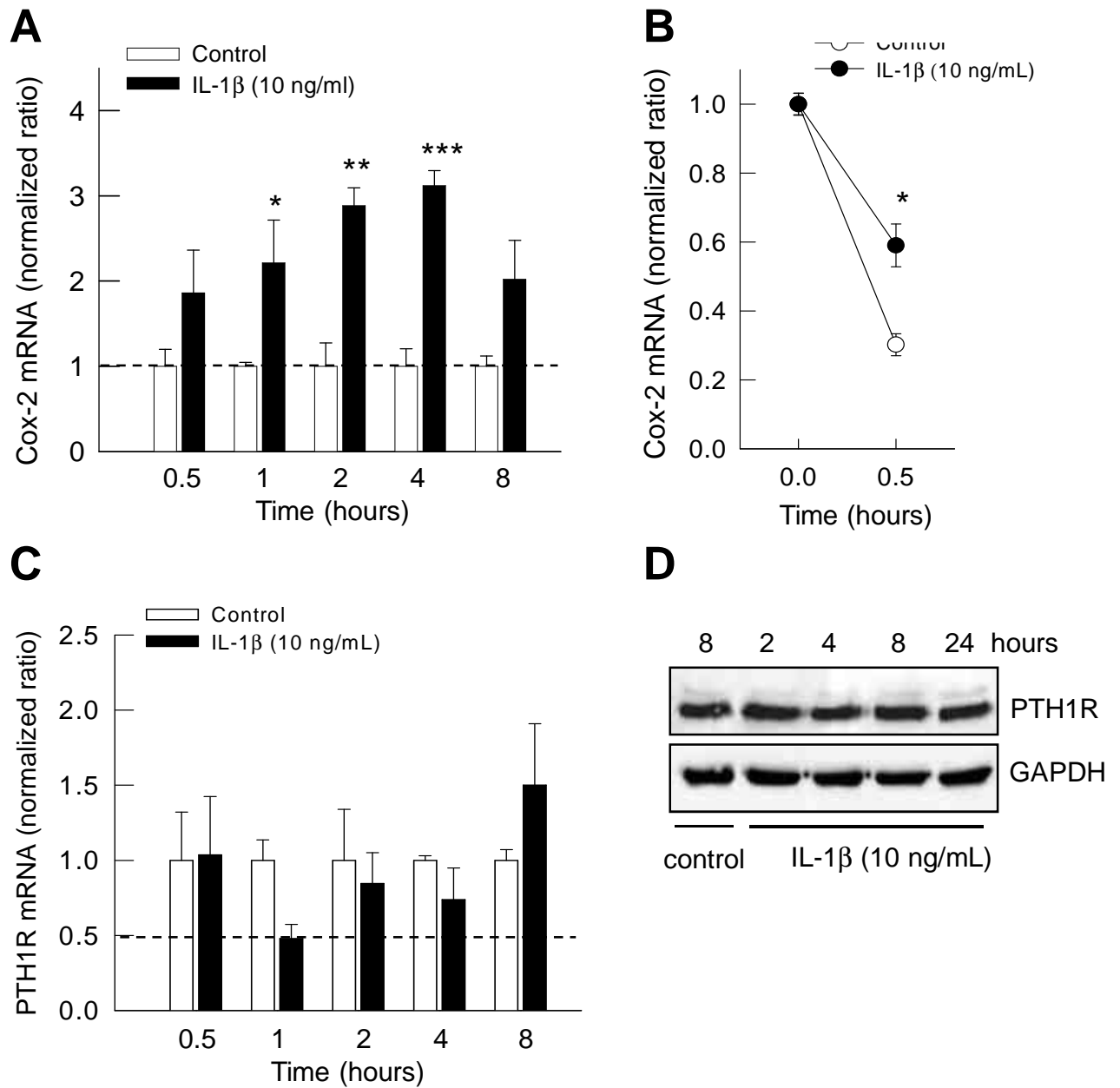
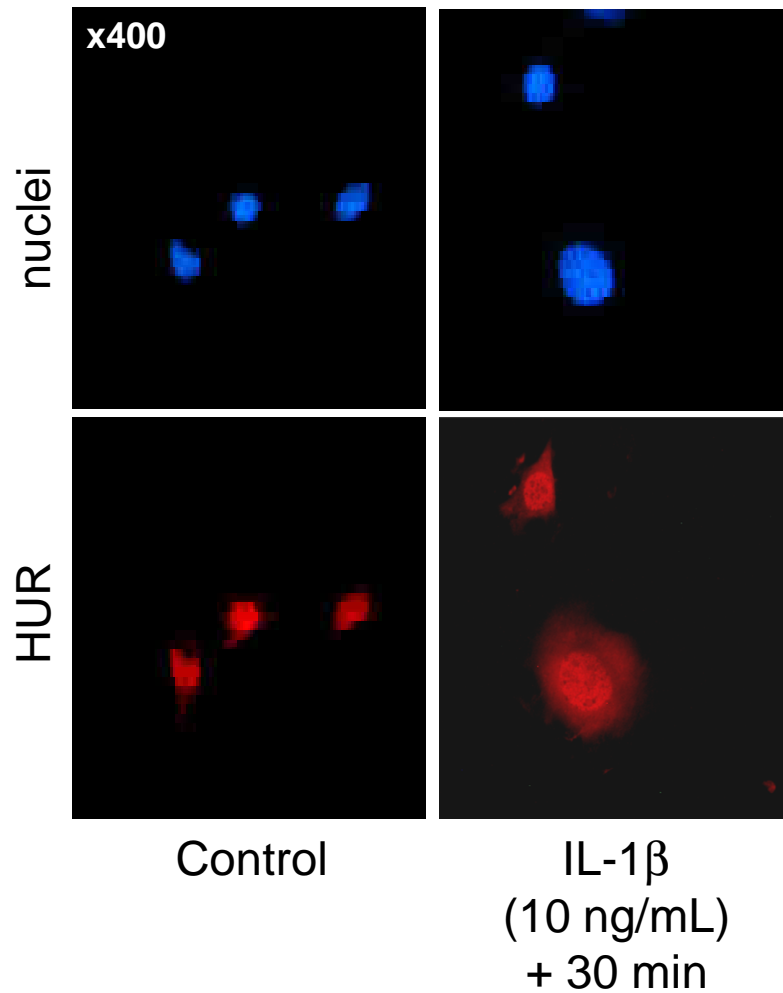


Figure 6

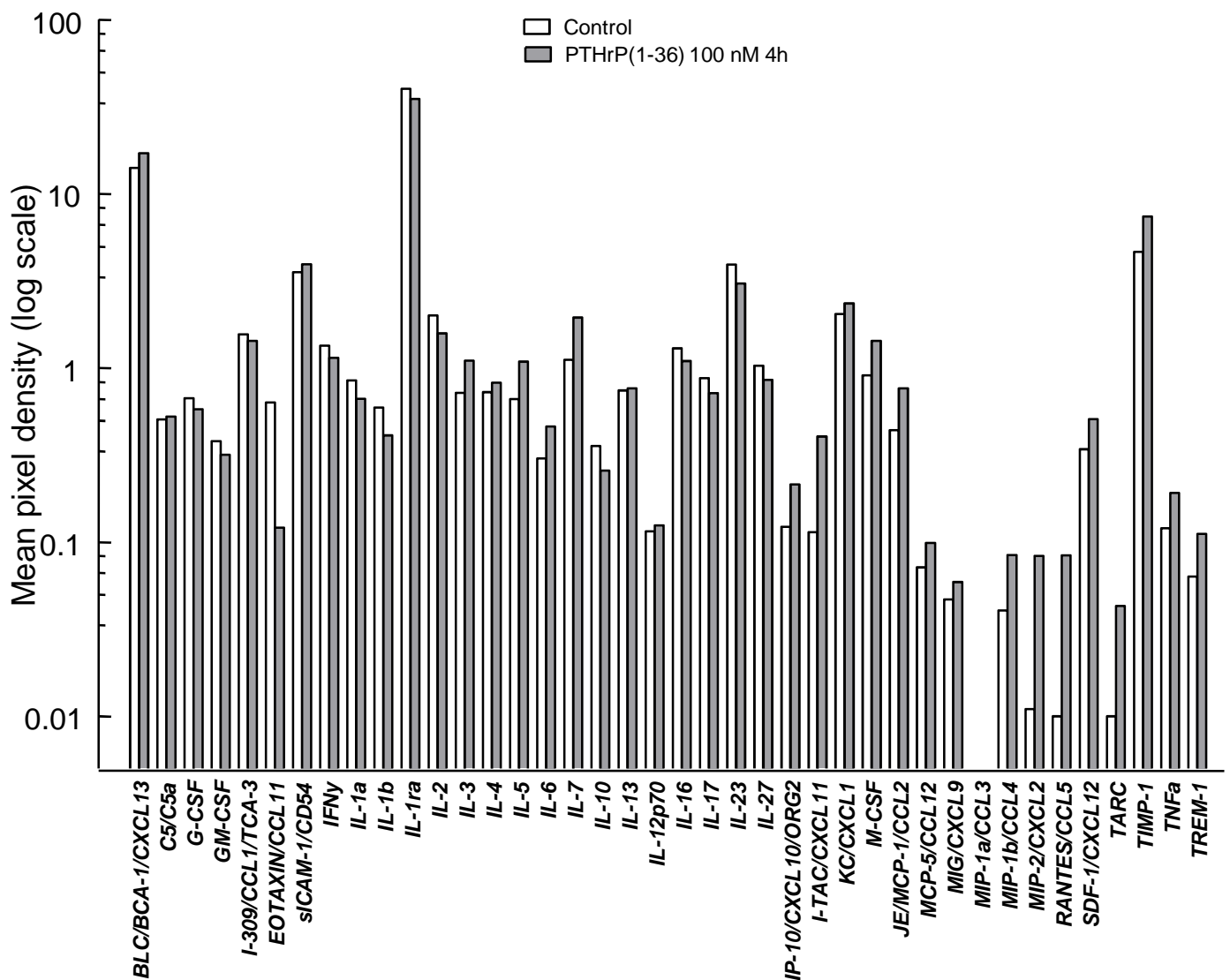




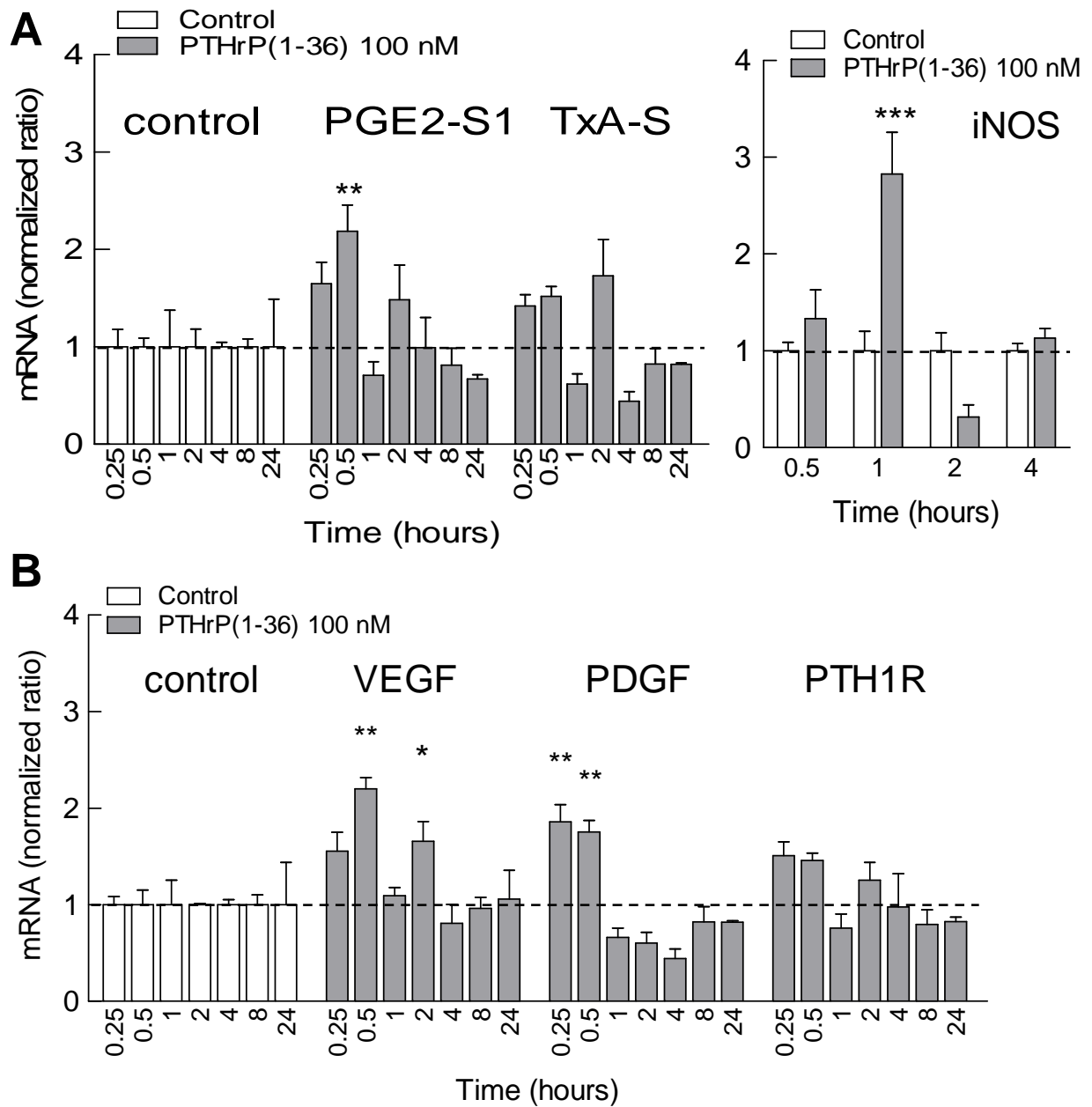
Supplementary Figure S1: (A) Kinetic analysis of Cox-2 mRNA expression over the 8 h following exposure of MC to IL-1 β (10 ng/ml). (B) IL-1 β -induced stabilization of Cox-2 mRNA when MC were treated by Act D 30 min after the cytokine. (C, D) PTH1R expression over the 8 or 24 h following IL-1 β treatment. PTH1R expression remained unchanged, both at mRNA by RT-PCR (normalized ratio vs 18S) (C), and at protein by Western blot (D). Mean \pm SEM (n=3). Statistical analysis by ANOVA followed by Tukey's test vs control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.



Supplementary Figure S2: Representative fluorescent immunostaining showing the nuclear localisation of HuR in control MC and its translocation to the cytoplasm in MC after 30 min exposure to IL-1 β (10 ng/ml). Such a translocation occurs when HuR is associated with the AU motif of mRNA and prevents mRNA degradation.



Supplementary Figure S3: Effects of PTHrP(1-36) (100 nM) on cytokines and chemokines expression in MC at 4 h post-treatment. Total protein extracts of either untreated MC (control) or MC treated with 100 nM PTHrP for 4 h were analyzed on proteome profiler arrays specific for mouse cytokines. The array signal was analyzed using Bio1D software. Histogram show quantitative analysis of the pixel density obtained by software analysis. Values are the mean of duplicate signals spots for each protein.



Supplementary Figure S4: Kinetic of the effects of 100 nM PTHrP(1-36) on the mRNA expression of various factors in MC. (A) RT-PCR analysis showed an immediate and transient increase in PGE2 synthase 1 (PGE2-S1) and iNOS, while Thromboxane A synthase (TxA-S) expression remained unchanged (B) PTHrP(1-36) also increased the mRNA expression of VEGF and PDGF but did not change the expression of its receptor (PTH1R). The mRNA levels were expressed as normalized ratios vs 18S mRNA, and ratio were set at 1 for the control groups. Results are given as means \pm SEM (n = 3). ANOVA and Tukey's test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs corresponding control..

Chapitre 5

“La PTHrP dans un modèle de glomérulonéphrite mésangioproliférative chez la souris”

Mazène Hochane et al.

(Manuscrit en préparation)

La PTHrP dans un modèle de glomérulonéphrite mésangioproliférative chez la souris

Mazène Hochane^{1,2}, Denis Raison^{1,2}, Catherine Coquard^{1,2}, Claire Béraud^{1,2}, Audrey Bethry^{1,2}, Thierry Massfelder^{1,2}, Mariette Barthelmebs^{1,2}

¹*INSERM, U682, Equipe Cancer du rein et Physiopathologie rénale, Faculté de Médecine, F-67085 Strasbourg, France ;*

²*Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France.*

RESUME

Dans les cellules mésangiales (CM) *in vitro*, la PTHrP apparaît comme un acteur multifonctionnel. Surexprimée par les cytokines, elle induit elle-même la sécrétion de cytokines et chimiokines. Elle est aussi un facteur de croissance et de survie des CM. Dans cette étude, nous avons cherché à vérifier si la PTHrP était surexprimée dans le glomérule dans un contexte pathologique associant inflammation/apoptose et prolifération des CM, puis, dans un deuxième temps, de cerner son rôle en bloquant ses effets dans le modèle expérimental animal choisi.

Nous avons choisi le modèle de glomérulonéphrite mésangio-proliférative induit par le venin de serpent Habu (HSV) *Trimeresurus flavoviridis*. Nous avons retrouvé les caractéristiques décrites dans la littérature, en terme de mésangiolyse, prolifération et inflammation. Les résultats que nous présentons sont préliminaires et ne concernent que l'expression de la PTHrP dans le modèle. Au 1^{er} jour après l'injection du venin, la PTHrP était surexprimée dans les glomérules lésés (immunohistochimie), avec probablement une localisation intranucléaire. Cette surexpression était aussi présente à J1 dans les glomérules isolés à partir de reins de souris traitées par le venin (ARNm). Enfin, sur des CM en culture, le venin majorait directement l'expression de la PTHrP.

INTRODUCTION

L'ensemble des travaux que nous avons réalisés sur les cellules mésangiales (CM) en culture primaire m'a permis de mieux comprendre la complexité des effets de la PTHrP dans ces cellules. Elle apparaît comme un facteur intégré au contexte inflammatoire, surexprimé par les cytokines et induisant elle-même la sécrétion des cytokines et chimiokines, formant ainsi une boucle d'amplification des processus. Mais, en activant la voie de NF κ B et de la Cox-2, elle est aussi un facteur de survie des CM pondérant les effets pro-apoptotiques du TNF- α et de IL-1 β . Enfin, par la voie intracrine, elle est un facteur de croissance des CM.

Il était important dès lors de vérifier si la PTHrP était surexprimée dans le glomérule dans un contexte pathologique associant inflammation, apoptose et prolifération des CM, puis, dans un deuxième temps, de cerner son rôle en bloquant ses effets dans le modèle expérimental animal choisi. Nous avons choisi le modèle induit par le venin de serpent Habu (HSV) *Trimeresurus flavoviridis* comme modèle de glomérulonéphrite mésangioproliférative. C'est l'un des modèles chez la souris ayant les caractéristiques souhaitées, le modèle par injection d'anticorps anti-Thy1.1, largement utilisé chez le rat, n'étant pas réalisable chez la souris. Les deux modèles se ressemblent mais la mésangiolyse, c'est-à-dire la destruction de l'architecture du mésangium, est maximale au 1^{er} jour post-injection de HSV, alors qu'elle culmine au 6^{ème} jour dans le modèle anti-Thy1.1 (Dimmler et al., 2003). La cinétique des événements initiaux impliqués dans le modèle HSV a été bien décrite (Cattell and Bradfield, 1977). Un agrégat de plaquettes se forme dans les capillaires glomérulaires (10 min), avec perte des cellules endothéliales et digestion de la matrice mésangiale (premières heures) et formation de lésions focales de mésangiolyse (24h) (Cattell and Bradfield, 1977; Haas et al., 2007; Kitamura et al., 1995). Les plaquettes, puis les CM elles-mêmes, sont une source de PDGF impliqué dans la prolifération des CM à partir de J1 (Barnes and Abboud, 1993), ainsi que probablement l'endothéline-1 qui est aussi surexprimée au même moment (Dimmler et al., 2003). La prolifération des cellules glomérulaires est maximale de J5 à J7, alors que l'apoptose culmine à J14 (Nakao et al., 1998). Le VEGF est surexprimé à partir de J3 dans les podocytes (Haas et al., 2007). La restauration des cellules endothéliales est rapide et va de pair avec la néoformation de capillaires (Kitamura et al., 1995). Un traitement des souris par le VEGF₁₆₅ accélère d'ailleurs les processus de réparation dans le modèle de glomérulonéphrite par HSV (Masuda et al., 2001b). La nature inflammatoire de la pathologie a été démontrée par l'expression de MCP-1, IL-6 et TNF- α , dès la 8^{ème} heure, avec un pic à

48h (Kubo et al., 2002). L'infiltration en neutrophiles polynucléaires et en monocytes/macrophages a également été décrite (J1-J7) (Kubo et al., 2002; Nakao et al., 1998). Deux interleukines, IL-6 et IL-12, souvent impliquées dans les glomérulonéphrites, ne jouent cependant aucun rôle dans ce modèle comme le montrent des études sur des souris *knockout* pour ces facteurs (Eitner et al., 1997; Vieira Neto et al., 2009).

Le HSV a une composition complexe. Le venin est riche en différents isoenzymes de la phospholipase A2, une enzyme clé dans la synthèse de médiateurs de l'inflammation (Chijiwa et al., 2000), et en diverses métalloprotéases qui sont hémorragiques, induisent l'apoptose des cellules endothéliales (Masuda et al., 2001a; Wu et al., 2001) ou encore dégradent la matrice extracellulaire du mésangium. Le venin peut aussi induire l'apoptose en induisant un stress oxydatif *via* les ROS comme cela a été montré sur des cellules cancéreuses (Sun et al., 2003). Une seule étude a été réalisée *in vitro* pour évaluer un effet direct du venin sur les CM de rat (Kubo et al., 2002). Les auteurs montrent que le venin diminue la viabilité des CM à une concentration de 1000 ng/mL, mais augmente leur prolifération et l'expression de MCP-1 à 100 ng/mL.

L'objectif de cette étude était 1) de vérifier si la PTHrP était surexprimée dans le glomérule dans le modèle HSV, puis 2) d'évaluer si la PTHrP jouait un rôle dans l'évolution de la pathologie. Les résultats que nous présentons ici sont préliminaires. Ils ne concernent que le premier point. Les travaux sur le second point sont en cours.

RESULTATS

Caractéristiques de la glomérulonéphrite induite par le HSV

À la dose of 3 mg/kg injectée à nos souris C57BL/6, une mésangiolyse focale a été observée dans environ 30% des glomérules des reins des souris traitées par le HSV, alors que les reins des souris contrôles en étaient totalement dépourvus. La mésangiolyse était particulièrement marquée le 1^{er} jour après l'injection de venin, puis déclinait dès le 3^{ème} jour post-injection comme le montrent les images en coloration hématoxyline/éosine (Figure 1). Comme attendu, les cellules mésangiales sont activées, ré-expriment α SMA et sont dans un état de prolifération comme le montre le marquage au Ki67 (Figure 1). Dans les glomérules des reins des souris contrôles, les cellules mésangiales sont quiescentes et n'expriment pas α SMA.

Surexpression de la PTHrP dans la glomérulonéphrite induite par le HSV

L'immunomarquage par fluorescence de la PTHrP était très faible, sinon absent, dans les glomérules des reins contrôles. Par contre, comme attendu, les tubules entourant les glomérules sont bien marqués, qu'il s'agisse de tubules proximaux ou distaux (Figure 1). Après l'injection du venin, un marquage intense de la PTHrP est observé immédiatement, dès le 1^{er} jour, dans les glomérules lésés. Ce marquage est amoindri au 3^{ème} jour. Toutes les cellules du flocculus glomérulaire semblent exprimer la PTHrP. Un co-marquage sera nécessaire pour confirmer l'expression non seulement dans les cellules mésangiales, mais aussi les podocytes et les cellules endothéliales. De manière intéressante, il semble qu'un marquage intense soit présent dans certains noyaux (Figure 1). Cependant nos images en microscopie à fluorescence n'ont pas été faites en microscopie confocale, et vu l'épaisseur des coupes (7 µm), il est difficile de conclure. Ce point mérite d'être documenté davantage puisque la PTHrP exerce ses effets mitogéniques en agissant par la voie intracrine.

Surexpression de la PTHrP dans les glomérules isolés de souris traitées par le HSV

Sur les glomérules préparés à partir des reins de souris injectées avec le venin, la majoration de l'expression de la PTHrP a été confirmée en terme d'ARNm au 1^{er} jour post-injection (Figure 2). Cette surexpression revient à la normale dès le 3^{ème} jour et reste basse au 7^{ème} jour post-injection. L'expression du récepteur de la PTHrP/PTH, le R-PTH1, est majorée de même à J1, se normalise à J3, mais est à nouveau élevée au 7^{ème} jour post-injection. C'est le seul paramètre, avec le TGF-β1, sur lequel nous avons observé cette évolution biphasique.

Nos résultats sur les glomérules confirment l'activation des cellules mésangiales par l'augmentation de l'expression de αSMA, et l'implication de processus inflammatoires par la surexpression d'une chimiokine, MCP-1, et l'induction de l'expression de la Cox-2. Nous avons aussi trouvé une augmentation de l'expression du PDGF (ARNm), avec une cinétique comparable à celle de la PTHrP (majoration précoce à J1), mais la surexpression du VEGF n'atteignait pas la significativité. Le TGF-β1 était surexprimé (ARNm) à J1 puis aussi plus tardivement à J7.

Effet direct du HSV sur les cellules mésangiales en culture

Afin de mieux évaluer un éventuel lien direct entre le venin et la PTHrP, nous avons évalué les effets du venin directement sur des cellules mésangiales de souris en culture primaire.

Lorsque les cellules ont été exposées à HSV (200 ng/mL), une surexpression de la PTHrP (ARNm) a été observée dès la 2^{ème} heure, suivie d'une surexpression après 24 h (Figure 3A). Dans les mêmes conditions expérimentales, l'expression du PDGF (ARNm) était aussi majorée dès la 2^{ème} heure de contact avec le venin (Figure 3A). Nous n'avons pas analysé d'autres facteurs pour le moment sur ce modèle.

Puisque le HSV induit l'apoptose de certaines cellules et que nous avons montré par ailleurs que la PTHrP était un facteur de survie, nous avons évalué les effets du venin sur l'apoptose des cellules mésangiales par TUNEL. Sur des cellules mésangiales contrôles, l'exposition au venin pendant 24h n'induit pas d'apoptose à la dose que nous avons testée (Figure 3B). Cependant, sur des cellules mésangiales délétées en PTHrP endogène (CM^{CreloxP} excisées, par traitement au 4-OH-Tam), non seulement le niveau basal des cellules apoptotiques était majoré par l'absence de PTHrP, mais un effet pro-apoptotique du venin était révélé (ANOVA, interaction significative cellule x traitement, $P < 0.001$). Ces résultats suggèrent que la PTHrP endogène protège les cellules mésangiales d'un effet pro-apoptotique du HSV.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

Etude *in vivo* : glomérulonéphrite mésangioproliférative induite par le HSV

Dans cette étude, nous avons pu reproduire de manière satisfaisante le modèle de glomérulonéphrite mésangioproliférative induite par le HSV chez la souris. En effet, nous avons observé histologiquement la mésangiolyse précoce à J1, associée à des signes d'activation des CM dont témoigne l'expression de α SMA (sur les coupes, et en ARNm dans les glomérules isolés). Une prolifération des cellules glomérulaires a également pu être observée dès J1 et à J3 par le marquage anti-Ki67, et des marqueurs de l'inflammation étaient majorés (MCP-1 et Cox-2). Nous n'avons pas vu à J3 d'hypercellularité glomérulaire, mais les prélèvements obtenus à J7 n'ont pas encore été analysés. Nous n'avons pas cherché non plus à vérifier l'infiltration en leucocytes puisque, pour ce faire, il vaudrait probablement mieux ne pas « laver » les reins au moment de leur prélèvement.

Il faut noter que les cinétiques décrites dans la littérature ne sont pas toujours exactement les mêmes selon les équipes. Cette variabilité des réponses, nous l'avons expérimentée dans le choix de la dose de venin. En effet, de nombreux travaux sur les souris C57BL/6 utilisent une dose de 5 mg/kg par voie intraveineuse. A cette dose, et également à la dose de 4 mg/kg, toutes nos souris sont mortes. L'origine de notre venin (fourni par Latoxan à Valence, seul

fournisseur français) peut en être la cause, tout comme l'injection par voie jugulaire (généralement l'injection est faite dans la veine caudale), ou une injection plus ou moins rapide.

Sur ce modèle HSV, le résultat le plus intéressant que nous ayons obtenu était la surexpression de la PTHrP dans les glomérules lésés. Cette surexpression était particulièrement importante à J1, puis régressait à J3. Ce profil était en accord avec nos résultats sur les glomérules isolés de souris HSV, avec une majoration de l'ARNm de la PTHrP exclusivement à J1. Sur les glomérules, la cinétique d'expression du PDGF et de VEGF (en ARNm), deux facteurs de croissance qui ont été impliqués dans cette pathologie (Barnes and Abboud, 1993; Haas et al., 2007), était comparable à celle de la PTHrP. Il sera intéressant, dans une future étude, de rajouter des animaux sacrifiés à J2 qui semble être le point d'acmé de l'expression du PDGF-A (Barnes and Abboud, 1993) et peut-être aussi de la PTHrP. A partir de J7, les CM prolifèrent généralement moins (Nakao et al., 1998), un effet auquel pourrait participer le TGF- β 1 dont l'expression est majorée à J7 dans notre étude. Le TGF- β 1 induit en effet un arrêt du cycle cellulaire et favorise l'hypertrophie mésangiale (Ortega et al., 2012). A partir de J7 apparaissent aussi des processus d'apoptose qui permettent de réduire l'hypercellularité mésangiale. C'est un effet dans lequel la PTHrP pourrait intervenir, compte tenu de nos résultats *in vitro* sur les CM. Nous n'avons cependant pas observé de surexpression de la PTHrP à J7, du moins en terme d'ARNm. De manière intéressante, l'expression du R-PTH1 semble majorée à J7, et nous savons que la PTHrP exerce ses effets anti-apoptotiques majoritairement par la voie autocrine/paracrine.

Nos résultats actuels ne nous permettent pas de déterminer dans quel type de cellule la PTHrP est surexprimée. Pour cela, des co-marquages seront nécessaires, les CM étant déterminées par un marquage positif avec des anticorps anti-desmine, anti-Thy1.2 ou anti- α SMA, les podocytes par un anticorps anti-néphrine, les cellules épithéliales par un anticorps anti-cytokératine, les cellules endothéliales par un anticorps anti-facteur VIII et les monocytes/macrophages par un anticorps anti-ED1. A la vue de nos résultats actuels, il semblerait que PTHrP soit surexprimée dans toutes les cellules glomérulaires.

Une autre observation très intéressante est la localisation probable de la PTHrP dans le noyau de certaines cellules, ce qui nous concerne directement puisque la PTHrP exerce ses effets mitogéniques sur les CM par voie intracrine. Là encore, il nous faudra améliorer nos outils d'imagerie et recourir à la microscopie confocale comme déjà évoqué ci-dessus.

Etude *in vitro* : effets du HSV sur les cellules mésangiales

Notre étude est la seconde de toute la littérature à évaluer les effets directs de HSV sur les CM en culture. La concentration de venin que nous avons testée (200 ng/ml) est bien inférieure à la concentration altérant la viabilité des cellules (Kubo et al., 2002). Nous observons une majoration de l'expression de la PTHrP 2h après l'exposition des CM au HSV. L'expression du PDGF était également augmentée, ce qui n'a pas été décrit jusqu'à présent. Ces effets sont liés à une action directe du venin sur les CM, mais le mécanisme peut en être complexe. Il pourrait impliquer la synthèse de prostaglandines puisque le venin est riche en la PLA₂(Chijiwa et al., 2000), un stress oxydatif *via* les ROS (Sun et al., 2003), ou encore l'activation de la voie NFκB et/ou la synthèse de cytokines majorant secondairement l'expression de la PTHrP.

Perspectives : Etude *in vivo* sur le modèle HSV avec neutralisation des effets de la PTHrP

Pour répondre à la question de savoir si la PTHrP joue un rôle dans l'évolution de la glomérulonéphrite induite par le HSV, une seconde étude sera réalisée où les animaux seront traités pendant la durée de l'étude par un anticorps monoclonal de souris anti-PTHrP(34-53) (IGBMC, Illkirch) neutralisant la PTHrP endogène, ou par un IgG non immun de souris (groupe contrôle). Pour le traitement par l'anticorps anti-PTHrP(34-53), une dose de 120 µg/souris/jour par voie intra-péritonéale a donné précédemment de bons résultats dans un modèle de fibrose rénale induite par l'obstruction unilatérale de l'uretère chez la souris (Denis Raison, résultats personnels). Il est clair que ces traitements ne pourront interférer qu'avec les effets autocrine/paracrine de la PTHrP, c'est-à-dire avec ses effets anti-apoptotiques et sa contribution à l'inflammation. Nous n'avons pas d'outil actuellement pour contrer les effets intracrine de la PTHrP impliqués dans la prolifération. Les souris CreLox pour la PTHrP, où il est possible d'invalider l'expression de la PTHrP dans les cellules exprimant αSMA, et c'est le cas des CM activées, ne nous paraissent pas souhaitables. En effet, l'invalidation de la PTHrP y conduit à des modifications majeures sur les fonctions rénales (baisse du débit sanguin rénal et de la filtration glomérulaire), ce qui en soit, aggraverait la pathologie. Une solution serait de pouvoir cibler directement les CM pour y surexprimer une PTHrP-ΔNLS, inactive par voie intracrine. Ceci pourrait se faire avec des liposomes ciblant directement les CM, comme cela a été décrit récemment chez la souris, en couplant les liposomes à un anticorps dirigé contre l'intégrine α8 exprimée à la surface des CM (Scindia et al., 2008)

Pour évaluer avec précision les effets de la PTHrP, nous aurons besoin de pouvoir quantifier différents paramètres sur lesquels elle est susceptible d'agir en fonction de nos résultats *in vivo* :

- la prolifération des cellules glomérulaires (nombre de cellules en prolifération / glomérule) par marquage Ki67, ou par une technique au BrdU (injection de BrdU dans les heures précédant le sacrifice) ;
- le nombre de cellules en apoptose par glomérule, par marquage TUNEL sur les coupes de tissus ;
- l'inflammation locale, tant en nombre de cellules infiltrées, monocytes/macrophages (marquage ED1 ou F4/80), lymphocytes T (marquage CD3), qu'en terme d'expression de RANTES/CCL5, MIP-2/CXCL2, MCP-1/CCL2, IL-17 et Cox-2 (ARNm et/ou protéines sur les glomérules isolés) ;
- l'histologie des glomérules sera importante pour juger visuellement des effets ;
- enfin, un prélèvement d'urine sera fait avant le sacrifice des animaux, ainsi qu'un prélèvement de sang lors du sacrifice ; nous pourrons ainsi évaluer la protéinurie et la créatininémie, deux marqueurs de glomérules pathologiques.

Cette étude devrait nous renseigner si la PTHrP contribue à l'évolution de la glomérulo-néphrite mésangioproliférative dont le modèle induit par le HSV reproduit les caractéristiques.

REFERENCES

- Barnes, J.L., and Abboud, H.E. (1993). Temporal expression of autocrine growth factors corresponds to morphological features of mesangial proliferation in Habu snake venom-induced glomerulonephritis. *Am J Pathol* 143, 1366-1376.
- Cattell, V., and Bradfield, J.W. (1977). Focal mesangial proliferative glomerulonephritis in the rat caused by habu snake venom. A morphologic study. *Am J Pathol* 87, 511-524.
- Chijiwa, T., Deshimaru, M., Nobuhisa, I., Nakai, M., Ogawa, T., Oda, N., Nakashima, K., Fukumaki, Y., Shimohigashi, Y., Hattori, S., *et al.* (2000). Regional evolution of venom-gland phospholipase A2 isoenzymes of *Trimeresurus flavoviridis* snakes in the southwestern islands of Japan. *Biochem J* 347, 491-499.
- Dimmler, A., Haas, C.S., Cho, S., Hattler, M., Forster, C., Peters, H., Schocklmann, H.O., and Amann, K. (2003). Laser capture microdissection and real-time PCR for analysis of glomerular endothelin-1 gene expression in mesangiolytic rat anti-Thy 1.1 and murine Habu Snake Venom glomerulonephritis. *Diagn Mol Pathol* 12, 108-117.
- Eitner, F., Westerhuis, R., Burg, M., Weinhold, B., Grone, H.J., Ostendorf, T., Ruther, U., Koch, K.M., Rees, A.J., and Floege, J. (1997). Role of interleukin-6 in mediating mesangial cell proliferation and matrix production *in vivo*. *Kidney Int* 51, 69-78.
- Haas, C.S., Campean, V., Kuhlmann, A., Dimmler, A., Reulbach, U., Forster, C., Aigner, T., Acker, T., Plate, K., and Amann, K. (2007). Analysis of glomerular VEGF mRNA and protein expression in murine mesangioproliferative glomerulonephritis. *Virchows Arch* 450, 81-92.
- Kitamura, H., Sugisaki, Y., and Yamanaka, N. (1995). Endothelial regeneration during the repair process following Habu-snake venom induced glomerular injury. *Virchows Arch* 427, 195-204.
- Kubo, A., Iwano, M., Kobayashi, Y., Kyoda, Y., Isumi, Y., Maruyama, N., Samejima, K., Dohi, Y., Minamino, N., and Yonemasu, K. (2002). *In vitro* effects of Habu snake venom on cultured mesangial cells. *Nephron* 92, 665-672.
- Masuda, S., Hayashi, H., Atoda, H., Morita, T., and Araki, S. (2001a). Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. *Eur J Biochem* 268, 3339-3345.
- Masuda, Y., Shimizu, A., Mori, T., Ishiwata, T., Kitamura, H., Ohashi, R., Ishizaki, M., Asano, G., Sugisaki, Y., and Yamanaka, N. (2001b). Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am J Pathol* 159, 599-608.
- Nakao, N., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Ike, F., and Kusakabe, M. (1998). Tenascin-C promotes healing of Habu-snake venom-induced glomerulonephritis: studies in knockout congenic mice and in culture. *Am J Pathol* 152, 1237-1245.
- Ortega, A., Romero, M., Izquierdo, A., Troyano, N., Arce, Y., Ardura, J.A., Arenas, M.I., Bover, J., Esbrit, P., and Bosch, R.J. (2012). Parathyroid hormone-related protein is a

hypertrophy factor for human mesangial cells: Implications for diabetic nephropathy. *J Cell Physiol* 227, 1980-1987.

Scindia, Y., Deshmukh, U., Thimmalapura, P.R., and Bagavant, H. (2008). Anti-alpha8 integrin immunoliposomes in glomeruli of lupus-susceptible mice: a novel system for delivery of therapeutic agents to the renal glomerulus in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 58, 3884-3891.

Sun, L.K., Yoshii, Y., Hyodo, A., Tsurushima, H., Saito, A., Harakuni, T., Li, Y.P., Kariya, K., Nozaki, M., and Morine, N. (2003). Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. *Toxicol In vitro* 17, 169-177.

Vieira Neto, O.M., Russo, E.M., Costa, R.S., Coimbra, T.M., and Dantas, M. (2009). Effect of the absence of interleukin-12 on mesangial proliferative glomerulonephritis induced by habu snake venom. *Ren Fail* 31, 964-970.

Wu, W.B., Chang, S.C., Liao, M.Y., and Huang, T.F. (2001). Purification, molecular cloning and mechanism of action of graminelysin I, a snake-venom-derived metalloproteinase that induces apoptosis of human endothelial cells. *Biochem J* 357, 719-728.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1. Glomérulonéphrite induite par le HSV chez la souris et expression de la PTHrP. Une mésangiolyse focale apparaît rapidement après injection intraveineuse de HSV (4 mg/kg) chez la souris. La mésangiolyse est plus marquée à J1 puis régresse à J3 après l'injection du venin comme le montre les images après marquage hématoxiline/éosine (HE). Les cellules mésangiales restantes après mésangiolyse sont marquées positivement à α SMA et au Ki67 (flèches). Les glomérules des reins de souris contrôles présentent une faible expression de la PTHrP, mais l'immunomarquage en fluorescence de la PTHrP augmente immédiatement après induction de la pathologie par le HSV. A J1, le marquage de la PTHrP était observé dans certains noyaux de cellules (flèches).

Figure 2. Expression de la PTHrP dans les glomérules isolés de souris traitées par le HSV. Les glomérules ont été isolés à partir de reins de souris comme décrit dans Matériel et Méthodes. Une étude cinétique a été réalisée, comparant des souris contrôles aux souris traitées par HSV (de J1 à J7 post-traitement). L'expression de divers facteurs (PTHrP, R-PTH1, PDGF, VEGF, TGF- β 1, MCP-1, Cox-2 et α SMA) a été analysée par RT-PCR. Les résultats (moyenne \pm ESM, n=3) sont donnés en rapport normalisé par l'expression de l'ARNm de 18S sur les mêmes échantillons, une valeur de 1 étant ensuite attribuée au groupe contrôle. Les résultats ont été analysés par ANOVA avec localisation des différences entre groupes par un test de Tukey. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs groupe contrôle.

Figure 3. Etudes du HSV sur des cellules mésangiales en culture primaire. (A) Les cellules mésangiales ont été exposées au HSV (200 ng/mL) pendant 2, 4, 6 ou 24 h avant d'en extraire l'ARN total. L'expression de la PTHrP et du PDGF a été analysée par RT-PCR. Les résultats (moyenne \pm ESM, n=3) sont donnés en rapport normalisé par l'expression de l'ARNm de 18S sur les mêmes échantillons, une valeur de 1 étant ensuite attribuée au groupe contrôle. Les résultats ont été analysés par ANOVA à deux facteurs, avec localisation des différences entre groupes par un test de Tukey. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs groupe contrôle. (B) Les effets du HSV ont été évalués sur l'apoptose des cellules mésangiales par TUNEL. Des cellules normales (Control CM^{CreloxP}) et des cellules délétées en PTHrP endogène (Excised CM^{CreloxP}) ont été utilisées. Les résultats sont présentés en moyenne \pm ESM (n=6) et ont été analysés par ANOVA à deux facteurs, avec localisation des différences entre groupes par un test de Tukey. *** $P < 0.001$ vs groupe contrôle ; # $P < 0.001$ vs le groupe correspondant dans les cellules normales (Control CM^{CreloxP}).

Figure 1

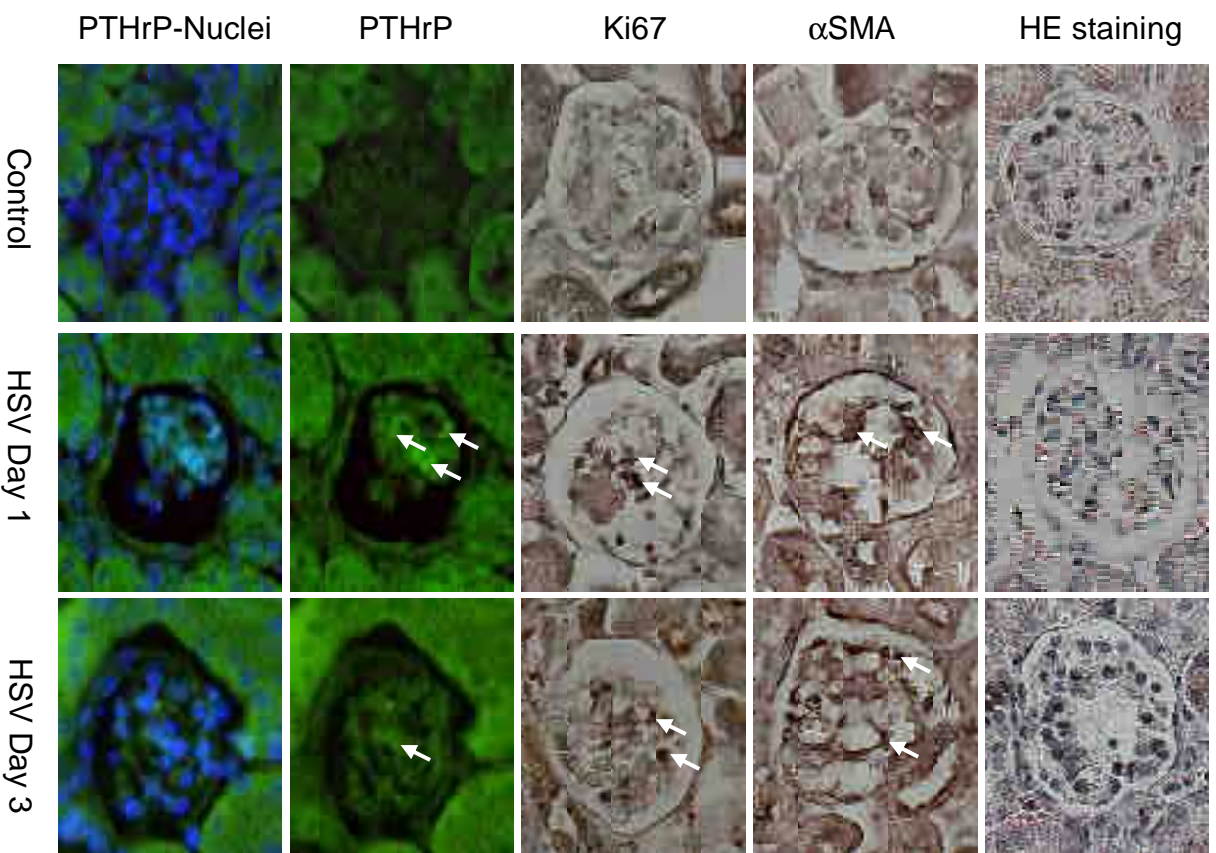


Figure 2

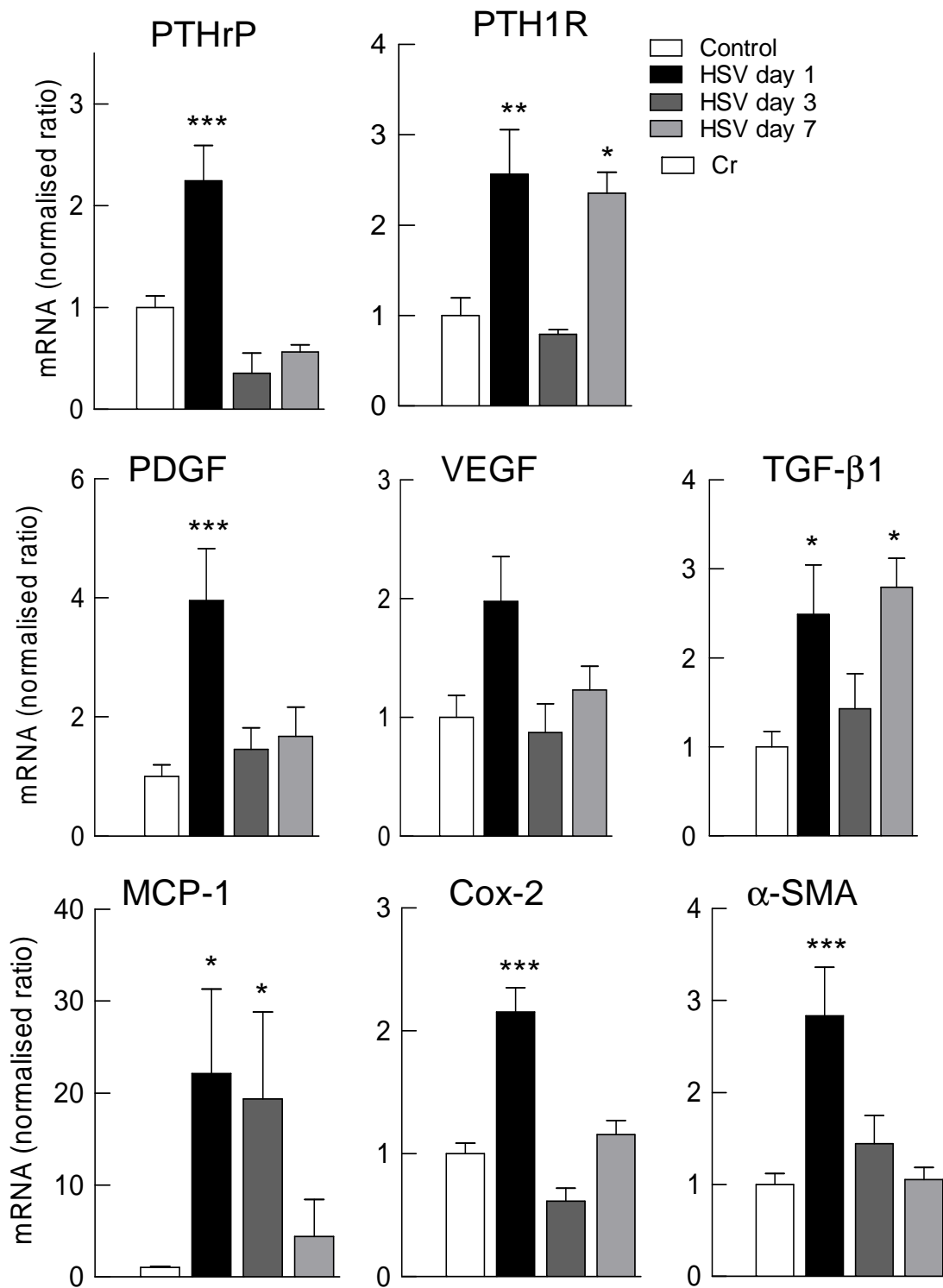
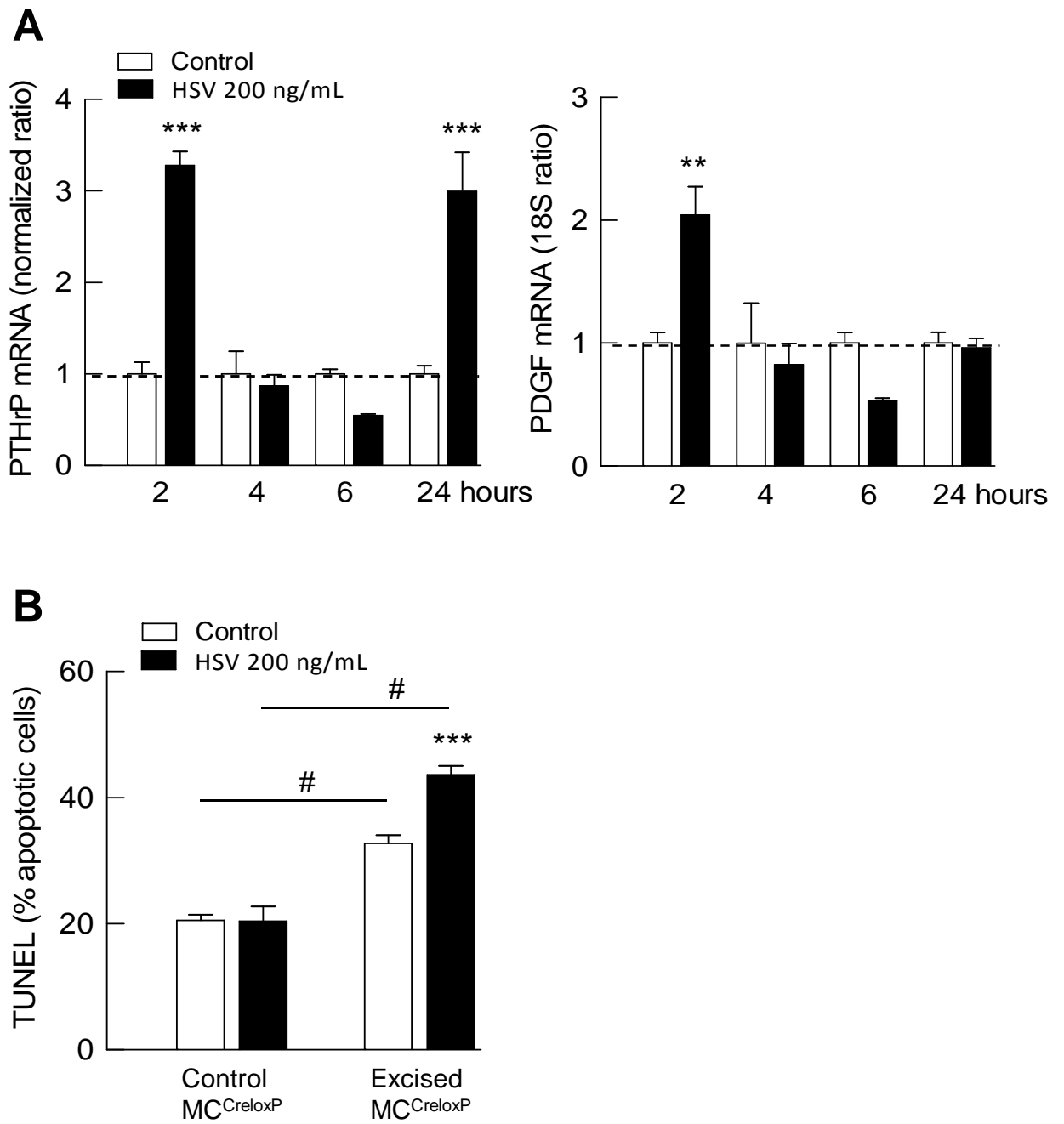


Figure 3



Chapitre 6

Discussion générale et Conclusion

Discussion générale des résultats

Je vais parcourir, dans un premier temps, mes résultats comme si chaque partie était une réponse possible à une question que je me suis posée. Dans un second temps, je replacerai les résultats dans le contexte plus généralisé de la physiopathologie glomérulaire.

Toute histoire a un début...

Tout a commencé par des études sur les effets de la PTHrP sur la densité cellulaire des CM au cours du stage de master 2 d'un collègue. Dans cette étude, les CM ont été évaluées dans deux conditions expérimentales : d'une part en présence de sérum, d'autre part en son absence. Elles étaient par ailleurs traitées ou non par la PTHrP(1-36), le fragment N-terminal de la PTHrP qui est l'agoniste habituellement utilisé dans les études pour activer le R-PTH1. Le comptage des cellules a révélé que la PTHrP(1-36) n'avait pas d'effet sur la densité cellulaire lorsque les CM étaient supplémentées en sérum. En l'absence de sérum et des facteurs de croissance qu'il contient, la densité cellulaire baissait rapidement de près de 50%, mais les CM traitées par la PTHrP(1-36) résistaient mieux à cette privation de sérum (**Figure 6.1**). L'étude a été réitérée avec des concentrations croissantes de PTHrP(1-36) et a montré un effet concentration-dépendant. La privation de sérum est une condition expérimentale très utilisée et utile pour étudier l'effet spécifique d'un facteur sur la fonction des cellules, à l'abri des interférences des facteurs de croissance présents dans le sérum. C'est aussi par la privation de sérum qu'on rend les cellules quiescentes et qu'on les synchronise afin d'étudier les effets d'un facteur sur leur prolifération. Enfin, la privation de sérum enclenche l'apoptose intrinsèque dans une cellule qui ne reçoit plus de signaux de survie.

Les résultats obtenus avec la PTHrP(1-36), majorant la densité cellulaire des CM privées de sérum, pouvait s'expliquer par deux effets, soit un effet mitogène, soit un effet anti-apoptotique. Dans la première partie de mon travail de recherche j'ai essayé de décortiquer ces deux aspects, successivement.

La PTHrP un facteur de croissance des CM ?

Nous avons commencé par évaluer les effets de la PTHrP(1-36) sur la prolifération des CM dans les mêmes conditions, i.e. en l'absence de sérum. Un effet mitogène de la PTHrP(1-36) avait déjà été décrit dans deux études, sur des CM humaines et de rat, en utilisant une technique mesurant l'incorporation de H³-thymidine dans le noyau (Bosch et al., 1999; Soifer et al., 1993). Sur nos CM de souris cependant, la PTHrP(1-36) n'avait aucun effet sur la prolifération, et ceci en utilisant deux approches expérimentales, l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux et l'incorporation de BrdU dans le noyau. Dans les mêmes conditions expérimentales, le PDGF-B (10 ng/mL), un mitogène puissant et reconnu des CM, majorait bien leur prolifération, excluant un problème méthodologique. Nous avons aussi vérifié que nos cellules exprimaient bien le R-PTH1, cible de la PTHrP(1-36). Ce récepteur était fonctionnel comme le montrent nos études sur l'accumulation d'AMPc.

Un récepteur couplé à l'AMPc/PKA n'est généralement pas associé à un effet mitogène, mais il pourrait être couplé simultanément à d'autres voies de signalisation, ce qui est effectivement le cas pour le R-PTH1 comme nous le verrons plus loin. Quoi qu'il en soit, comme le R-PTH1 *via* la voie de l'AMPc/PKA avait été impliqué dans un effet anti-mitotique sur les CMLV (Massfelder et al., 1997),

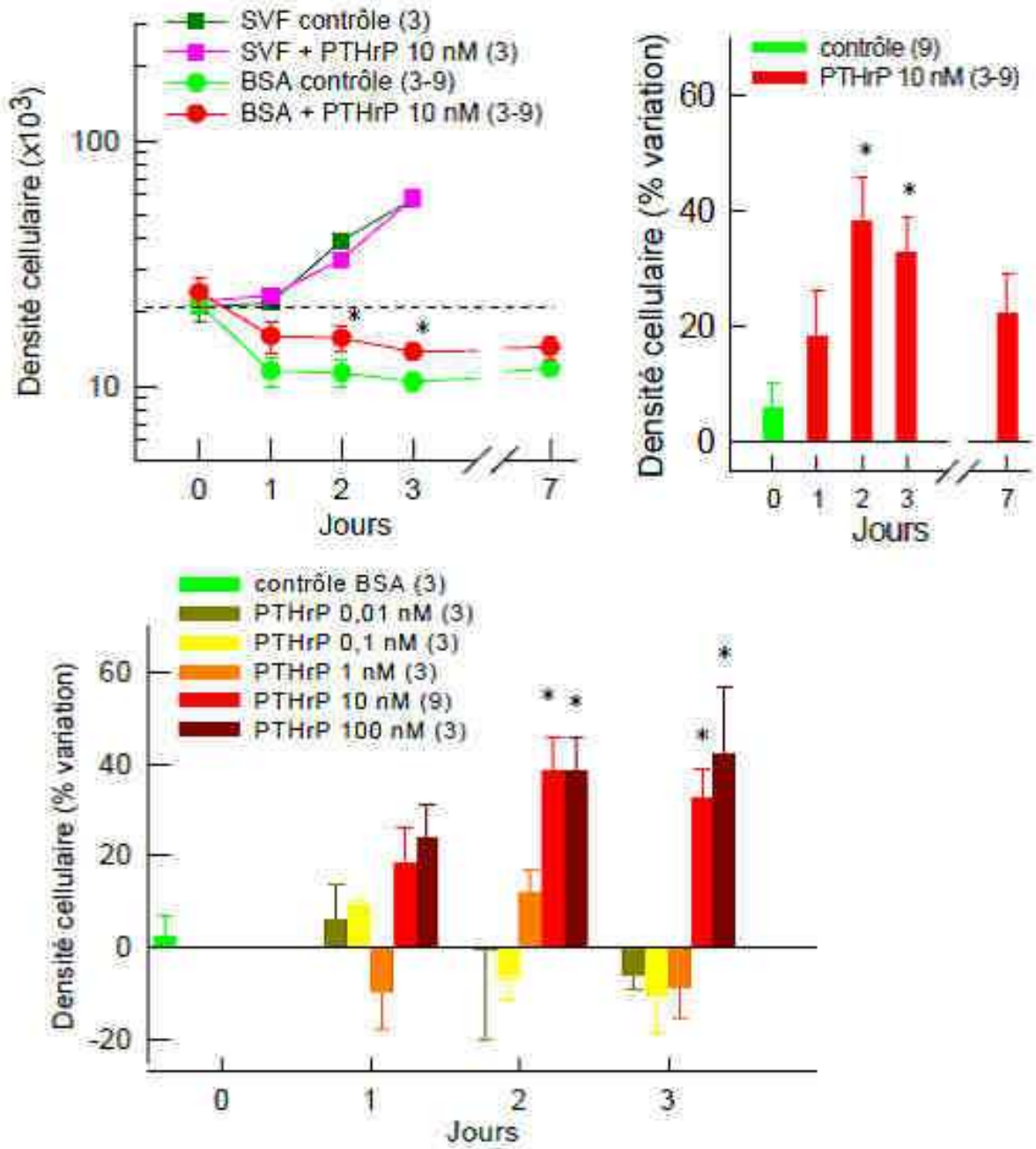


Figure 6.1. Effet de la PTHrP(1-36) sur la densité cellulaire. Etude sur des cellules mésangiales cultivées en présence ou en absence de sérum, exposées à diverses concentrations de PTHrP(1-36) (0,01 à 100 nM). * $P < 0,05$ vs groupe contrôle.

Résultats obtenus par Olivier Imhoff

nous avons aussi exploré cette possibilité. Pour ce faire, les CM étaient cultivées en présence de sérum pour induire leur prolifération. Mais, là encore, la PTHrP(1-36) était inactive. Dans une étude comparable sur les CMLV (Massfelder et al., 1997), la PTHrP s'était avérée mitogène par un effet intracrine.

Nous avons donc poursuivi cette étude afin de rechercher si la PTHrP endogène, notamment par des effets intracrines, pouvait affecter la prolifération mésangiale.

Quels outils pour analyser les effets de la PTHrP endogène et intracrine ?

Les mêmes outils seront utilisés pour analyser les effets de la PTHrP sur la prolifération et l'apoptose des CM.

La première approche expérimentale visait à abroger l'expression endogène de la PTHrP dans les CM. Nous avons mis à profit l'existence dans le laboratoire de souris transgéniques porteuses d'un système CreLoxP pour la PTHrP, permettant l'excision contrôlée du gène de la PTHrP, spécifiquement dans les cellules exprimant l' α SMA *via* un traitement par le tamoxifène. Les CM en culture expriment α SMA, qui est même l'un des marqueurs utilisés dans leur caractérisation en culture. Le tamoxifène est métabolisé par le foie en 4-OH-tamoxifène (4-OH-TAM), son métabolite actif. Nous avons donc préparé des CM en culture primaire à partir de ces souris transgéniques. Un traitement *in vitro* par le 4-OH-TAM (3 jours, puis culture des CM sans 4-OH-TAM) a permis d'obtenir des CM délétées en PTHrP endogène à 95 et 99% (ARNm, protéine), avec une excision stable (contrôlée sur l'ADN) pendant 5 semaines. Une excision de la PTHrP par cette méthode permettait d'éviter les transfections transitoires par des siRNA qui perdent leur efficacité relativement rapidement et permettent rarement une abrogation aussi efficace.

La seconde approche expérimentale était basée sur la surexpression de différentes formes de la PTHrP, actives par voie autocrine/paracrine ou intracrine. Ces transfections reproduisaient artificiellement *in vitro*, des conditions *in vivo* où l'expression de la PTHrP pouvait être majorée dans les CM. Cette approche devait aussi nous renseigner sur le mode d'action de la PTHrP. Nous avons en effet réalisé des transfections stables avec des plasmides exprimant trois formes de la PTHrP : la PTHrP-WT native ou PTHrP(1-139), la PTHrP- Δ SP qui est délétée de sa partie peptide signal et ne peut plus être dirigée vers les voies sécrétoires, elle agit uniquement par voie intracrine, et la PTHrP- Δ NLS qui est délétée des deux parties NLS et est incapable d'accéder au noyau, elle agit exclusivement par la voie autocrine. La transfection par le plasmide vide (pcDNA3) servait de contrôle. Nous souhaitions réaliser ces transfections sur des CM délétées en PTHrP endogène, mais cela n'a pas été possible car ces cellules proliféraient moins bien et supportaient mal le stress additionnel d'une transfection. Les transfections ont donc été réalisées sur des CM exprimant toujours leur niveau basal de PTHrP murine auquel venait se rajouter la surexpression d'une forme spécifique de PTHrP humaine. Nous avons vérifié que cette surexpression était de l'ordre d'un facteur 50 par rapport à la PTHrP murine endogène, donc suffisamment importante pour considérer cette dernière comme négligeable.

La PTHrP endogène est mitogène sur les CM

Le résultat majeur obtenu sur les CM délétées en PTHrP endogène était la baisse, même en présence de sérum, de leur taux de prolifération, parfois à un stade proche de celui des CM quiescentes non

excisées. Cette baisse était tout aussi importante sur des CM privées de sérum. *Ces résultats indiquent clairement que la PTHrP endogène joue un rôle dans la prolifération des CM.* Nous avons été surpris de constater que la délétion en PTHrP affectait la prolifération de CM même en présence de sérum, dont on connaît la richesse en facteurs de croissance multiples. Le sérum a été rapporté comme induisant l'expression de la PTHrP endogène sur les CMLV (Hongo et al., 1991), les kératinocytes (Allinson and Drucker, 1992) et dans l'ostéosarcome (Falzon, 1996). Nous avons retrouvé le même effet sur les CM (Olivier Imhoff, résultats personnels). *En présence de sérum, une condition physiologique, la PTHrP endogène participe donc activement à l'homéostasie mésangiale.*

En revanche, comme dans les études précédentes, le traitement par la PTHrP(1-36) exogène était sans effet. Nous avons vérifié l'expression du R-PTH1 sur les CM excisées en PTHrP. L'expression de ce récepteur était quelque peu abaissée, mais pas au point d'abolir les réponses de la PTHrP via le R-PTH1. Nos études ultérieures sur l'apoptose le confirmeront. *L'ensemble de ces résultats suggère ainsi que l'effet mitogène de la PTHrP pourrait passer, non par la voie autocrine/paracrine, mais par la voie intracrine.*

La PTHrP endogène est mitogène sur les CM par la voie intracrine

Des travaux antérieurs sur les CMLV avaient montré que la PTHrP majorait la prolifération des cellules par la voie intracrine nucléaire (Massfelder et al., 1997). Nous avons examiné cette possibilité sur les CM. Une transfection stable avec la PTHrP-WT ou la PTHrP- Δ SP a effectivement conduit à majorer la prolifération des CM, alors que la transfection des cellules avec la PTHrP- Δ NLS n'avait aucun effet, de même que la transfection avec le plasmide vide. Ces effets étaient particulièrement marqués dans les CM cultivées en absence de sérum. Cette observation pourrait être liée à l'induction de l'expression de la PTHrP endogène de souris par le sérum (voir ci-dessus), amoindrissant ainsi les différences avec les formes humaines surexprimées par transfection. Nous avons aussi vérifié que les effets mitogène après transfection avec la PTHrP- Δ SP, n'étaient pas liés à la sécrétion dans le milieu de culture d'un quelconque facteur mitogène. Pour ce faire, le milieu conditionné de CM transfectées avec la PTHrP- Δ SP a été testé sur des CM excisées en PTHrP endogène. Ce milieu conditionné était dépourvu d'activité sur la prolifération cellulaire. *L'ensemble de ces résultats démontre que la PTHrP exerce un rôle mitogène dans les CM, que cet effet passe exclusivement par la voie intracrine et qu'il relève d'un effet direct intracellulaire de la PTHrP.*

Quels sont les acteurs de cette pièce ?

La PTHrP a été capable de manipuler les acteurs du cycle cellulaire dans les CMLV (Fiaschi-Taesch et al., 2006) et dans d'autres cellules comme les cellules β pancréatiques (Guthalu Kondegowda et al., 2010). Nos résultats montrent dans les CM, que la surexpression de la PTHrP augmente l'expression du facteur de transcription **E2F1** et **c-Myc** alors qu'elle diminue celle de **p27^{KIP1}**. Ces réponses sont en miroir avec les modifications vues après abrogation de la PTHrP endogène dans les CM excisées. La diminution de p27^{KIP1} est présente uniquement dans les CM transfectées avec la PTHrP-WT mais ne semblait pas être nécessaire à l'effet mitogène dans les CM transfectées par la forme de PTHrP active par voie intracrine (PTHrP- Δ SP). Dans ces cellules, la surexpression de c-Myc et E2F1 était particulièrement importante. Ceci pourrait expliquer l'absence d'effet sur p27^{KIP1}, puisque ces deux facteurs sont connus pour exercer une régulation inverse sur l'expression de p27^{KIP1} (Bagui et al., 2009; Iwanaga et al., 2006; Wang et al., 2005). Dans le cas de la PTHrP-WT, nous ne pouvons pas

formellement exclure qu'en agissant aussi par la voie autocrine/paracrine, elle ne phosphoryle Akt (comme nous le montrerons plus loin), qui est capable d'activer skp-2 et d'augmenter la dégradation de p27^{KIP1} (Blain et al., 2003). Akt peut aussi phosphoryler directement p27^{KIP1}, ce qui l'inactive du fait de sa séquestration dans le cytoplasme (Hanada et al., 2004).

Un rôle pour les PTHrP intermédiaires et C-terminale ?

Le rôle des parties intermédiaires et C-terminale de la PTHrP n'a pas été évalué directement dans notre étude. Les résultats obtenus en transfectant les CM avec la PTHrP- Δ NLS sont par contre intéressants à analyser dans ce contexte. En effet, la PTHrP- Δ NLS est tronquée des deux séquences 88-91 et 102-106. Parmi les fragments dont on sait qu'ils peuvent être sécrétés, les fragments intermédiaires, PTHrP(38-64) et PTHrP(67-86), et le fragment C-terminal, PTHrP(107-139), sont préservés dans la PTHrP- Δ NLS. Seul le fragment (38-94) est tronqué. Puisque la surexpression de la PTHrP- Δ NLS ne modifie pas la prolifération des CM, nous pouvons exclure un effet passant par ces fragments.

Les fragments intermédiaires de la PTHrP sont parfois spéculatifs. Leur existence a été suggérée initialement du fait de la présence de nombreux sites multibasiques susceptibles d'être clivés par les pro-hormone convertases. En effet, théoriquement, il est possible d'avoir 92 peptides issus des différents clivages des sites multibasiques (Hastings, 2004; Orloff et al., 1994). Dans la plupart des études sur le sujet, les auteurs utilisent des protéines synthétiques de tailles variables. Toutefois, il est clair que des fragments existent réellement puisqu'ils ont été dosés dans la circulation de patients développant une HHM (Burtis et al., 1994). Quelques fragments ont été purifiés par chromatographie (Wu et al., 1996b). Il s'agit des PTHrP(38-94), PTHrP(38-95) et probablement PTHrP(38-101). D'autres fragments ont été caractérisés par leur activité fonctionnelle particulière. Ainsi, la PTHrP (67-86) a des effets sur le calcium intracellulaire (Orloff et al., 1996). Les PTHrP(67-86) et PTHrP(107-139) diminuent la prolifération des cellules du cancer du sein, en interagissant avec un ou plusieurs récepteurs toujours inconnus (Luparello et al., 1995), alors que la PTHrP(38-94) inhibe cette prolifération par la voie intracrine (Luparello, 2010). La PTHrP(38-64) augmente par contre la prolifération des cellules pulmonaires alvéolaires alors que la PTHrP(1-34) la réduit (Hastings et al., 2002; Hastings et al., 1997). Les données disponibles sur les fragments intermédiaires restent très fragmentaires.

Un effet de la PTHrP exogène sur l'apoptose ?

Dans l'étude sur la densité des CM mentionnée plus haut, la PTHrP(1-36) s'opposait au déclin du nombre de CM, sans exercer, comme nous l'avons montré, un effet mitogène. L'effet de la PTHrP(1-36) pouvait donc être lié à un effet anti-apoptotique de la protéine. Nous avons abordé ce problème en utilisant deux méthodes d'évaluation de l'apoptose, d'une part par la cytométrie de flux après marquage des phosphatidylsérines par l'Annexin-V, d'autre part par un marquage TUNEL des noyaux. Les phosphatidylsérines basculent du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique dans l'apoptose précoce. Le marquage TUNEL reconnaît des fragments d'ADN altérés, un signe plus tardif. *Nos résultats montrent que la PTHrP(1-36) exogène s'oppose à l'apoptose induite par la privation de sérum et cet effet était dose-dépendant.*

La PTHrP endogène, un facteur de survie des CM ?

Le pourcentage de cellules apoptotiques était majoré davantage après privation de sérum sur des CM dont le gène de la PTHrP avait été excisé par rapport à des cellules non excisées. Ce pourcentage a été réduit et ramené à un même niveau par le traitement des CM avec la PTHrP(1-36), que les cellules soient excisées ou non en PTHrP. En présence de sérum, le pourcentage de cellules apoptotiques est faible, à peine 10%, et l'excision en PTHrP endogène n'a aucune incidence. De nombreux facteurs de croissance présents dans le sérum sont probablement capables de contrer l'effet apoptotique lié à la délétion en PTHrP. *Ces données expérimentales plaident clairement en faveur d'un rôle de la PTHrP, exprimée de manière basale dans les CM en culture, sur la survie des cellules. Par cet effet, la PTHrP s'oppose partiellement à l'apoptose intrinsèque induite par la privation de sérum.*

Un effet anti-apoptotique de la PTHrP(1-36) a été largement décrit sur de nombreux types cellulaires comme je l'ai rappelé dans la partie bibliographique de l'introduction de cette thèse (**Tableau 1.6**). C'est même l'effet sur lequel la littérature est la plus cohérente quelque soit le type cellulaire, bien que les voies impliquées puissent être différentes.

Quelle part pour la PTHrP intracrine ?

Il est intéressant de noter que la surexpression des trois formes de la PTHrP utilisées dans cette étude a permis de contrer l'apoptose induite par la privation de sérum. Les niveaux de protection cependant étaient très différents. La transfection avec la PTHrP- Δ NLS autocrine/paracrine réduisait l'apoptose de 30%, la transfection avec la PTHrP- Δ SP intracrine la réduisait de 10%, alors que la transfection avec la PTHrP-WT combinant les deux voies, la réduisait de 40%. *Ces résultats suggèrent que la PTHrP est un facteur de survie des CM par ses deux voies d'action, mais que l'effet majeur passe par la PTHrP paracrine activant son récepteur.*

Un effet de la PTHrP sur la survie des cellules, mettant en jeu la voie intracrine, a été décrit auparavant sur divers types cellulaires (**Tableau 1.6**). L'étude de Henderson et collaborateurs (Henderson et al., 1995) sur les chondrocytes a d'ailleurs été la première étude décrivant une fonction pour la PTHrP intracrine.

Quelles voies de signalisation pour la PTHrP paracrine dans la survie des CM ?

La PTHrP(1-36) active la voie AMPc/PKA de manière spécifique en agissant sur son récepteur R-PTH1, puisque cet effet est absent en présence d'un antagoniste du récepteur. L'activation est dose-dépendante et semble plafonner à une concentration de 100 nM qui est aussi la concentration qui donne l'effet vasodilatateur maximal sur le rein isolé perfusé (Musso et al., 1989). C'est cette concentration que j'ai le plus souvent utilisée pour évaluer les effets de la PTHrP paracrine.

La PTHrP active également la voie PI3-K/Akt, une voie impliquée dans la survie des cellules, et mise en jeu par divers facteurs de croissance comme le PDGF-B et l'IGF-I. Toutefois, la voie PI3-K/Akt a aussi été impliquée dans la prolifération cellulaire, mais la PTHrP(1-36) n'induisait pas d'effet mitogène sur les CM. Une explication possible pourrait être que l'activation par la PTHrP de deux voies concurrentes se solde par un effet nul. Ainsi, l'accumulation d'AMPc dans les CM diminuerait

leur prolifération (Chini et al., 1995; Ito et al., 2004; Li et al., 1995), un effet annulé pour la PTHrP activant son récepteur par la mise en jeu de la voie PI3-K/Akt qui favorise la prolifération (Manning and Cantley, 2007). De nombreux facteurs de croissance dont les récepteurs sont des récepteurs à tyrosine kinase (EGF, PDGF, IGF, insuline) activent la voie PI3-K/Akt et majorent ainsi la prolifération cellulaire.

Sur les CM, l'inhibition spécifique de l'une ou de l'autre des deux voies, AMPc/PKA ou PI3-K/Akt, a complètement aboli l'effet anti-apoptotique de la PTHrP. *Il est donc probable que ces deux voies convergent sur une même cible finale.*

Les principales cibles de la voie PI3-K/Akt impliquées dans la survie des cellules sont : i) Bad, qui est phosphorylé (Ser 136) et inactivé; ii) FOXO, un facteur de transcription également phosphorylé et inactivé, diminuant ainsi l'expression de BIM, pro-apoptotique ; iii) GSK-3 β (*Glycogen-Synthase Kinase-3 β*), phosphorylée et inactivée, favorisant des facteurs de survie de la famille Bcl-2 ; iv) IKK, dont la phosphorylation conduira à l'activation de la voie NF κ B (Manning and Cantley, 2007). L'activation de cette voie, avec implication de NF κ B et de Bad, est d'ailleurs responsable de l'effet anti-apoptotique du PDGF et de l'IGF-I sur les CM (Hiromura et al., 2002a; Shimamura et al., 2003).

Pour la voie AMPc/PKA, les cibles qui peuvent conduire à la survie des cellules sont : i) Bad, phosphorylé (Ser 155) et inactivé, ii) GSK-3 β , phosphorylée et inactivée (Yusta et al., 2002); iii) la voie NF κ B. Sur des CM de rat, la forskoline *via* la PKA et l'activation de la voie NF κ B, majorait l'expression d'inhibiteurs de l'apoptose (IAP) s'opposant ainsi à l'activité des caspases (Manderscheid et al., 2002).

L'ensemble de ces données montre que ces deux voies de survie ont des cibles communes, notamment NF κ B, Bad et GSK-3 β .

Pourquoi s'intéresser à NHERF1 et NHERF2 ?

NHERF1 et NHERF2 sont des protéines adaptatrices interagissant avec la partie C-terminale cytoplasmique du R-PTH1. Il a été décrit que l'expression de l'une de ces deux protéines (ou des deux) conduit à la bifurcation de la voie de signalisation activée par la PTHrP(1-36), la voie de AMPc/PKA étant affaiblie et la voie PLC β /PKC devenant prédominante. Les protéines NHERF, par des interactions protéine-protéine à la fois avec le R-PTH1 et la PLC β , serviraient à rapprocher et activer la PLC β par le R-PTH1.

Jusqu'à ce jour, l'expression des deux protéines NHERF1 et NHERF2 n'a pas été décrite dans les CM. C'est pourquoi, lorsque nous nous sommes intéressés aux voies de signalisations couplées au R-PTH1 dans les CM, nous avons recherché leur expression. Par immunofluorescence, nous avons trouvé que les deux protéines NHERF1 et NHERF2 étaient présentes dans les CM, et de manière étrange, la localisation de NHERF1 était nucléaire.

Compte tenu de l'importance du signal AMPc que nous avons observé en réponse à la PTHrP(1-36), une signalisation par PKC était improbable. D'un autre côté, nous avons pu montrer sur les CM que la PTHrP induisait la phosphorylation de Akt sur la thréonine 308 par la PDK1, puis sur la sérine 473 par la PDK2, les deux phosphorylations étant nécessaires pour une activation complète de Akt. On ignore quel est le lien entre le R-PTH1 et les PDK1/2. Or NHERF2 contient un domaine PIF (*PDK1 Interaction Fragment*) qui permet son interaction avec la PDK1 et renforce son activité (Chun et al., 2002).

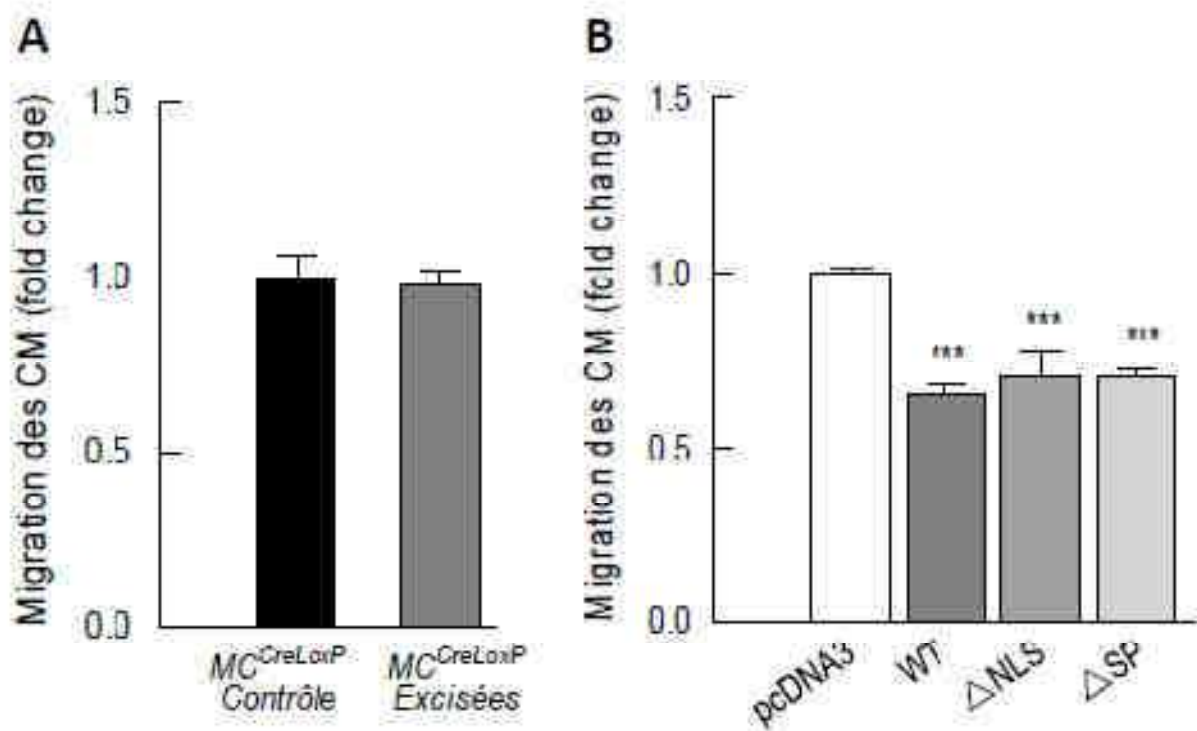


Figure 6.2. Effets de la PTHrP sur la migration des CM. La migration des CM quiescentes a été testée par la méthode de la chambre de Boyden. Le test a été effectué sur des MC^{CreLoxP} contrôle et délétées en PTHrP (A), mais aussi sur les CM surexprimant l'une ou l'autre des formes de la PTHrP (WT, ΔNLS, ΔSP ou le vecteur vide, pcDNA3) (B). La délétion de la PTHrP endogène dans les CM n'a pas d'incidence sur leur migration, alors que la PTHrP surexprimée réduit la migration des CM, quelle que soit sa forme active. Résultats représentés en moyennes ± ESM, n = 6. ANOVA suivi par un test de Tukey, *** P < 0.001 versus pcDNA3 du groupe contrôle.

Dans notre travail, nous avons réalisé de multiples expériences de co-immunoprécipitation/Western blot afin de caractériser une interaction possible entre le R-PTH1 et NHERF1 ou NHERF2. La précipitation du R-PTH1 n'a jamais entraîné la co-immunoprécipitation d'une des protéines NHERF, excluant ainsi une interaction. Finalement, l'analyse par microscopie confocale a révélé des localisations distinctes du R-PTH1 et des protéines NHERF1/2, avec en particulier une présence clairement nucléaire de NHERF1 qui n'avait pas été décrite auparavant. *Nos résultats sur les CM montrent que les protéines NHERF1/2 peuvent être présentes dans une cellule sans interagir obligatoirement avec le R-PTH1 exprimé sur la membrane plasmique.*

La PTHrP retient les CM sur place...!

Les CM ne migrent pas dans les conditions physiologiques. Dans les modèles expérimentaux de mésangiolyse, les CM prennent la route de la région juxtaglomérulaire vers la région mésangiale, afin de repeupler le glomérule (Hugo et al., 1997). L'absence de la PTHrP endogène dans les CM excisées ne modifie pas leur migration. En revanche, lorsque la PTHrP est surexprimée, et quelle que soit la forme surexprimée, elle diminue la migration des CM (**Figure 6.2**). Ce résultat va de pair avec celui obtenu sur des CMLV exposées à la PTHrP(1-36) (Ishikawa et al., 1998) ou sur des CM en présence de facteurs stimulant l'AMPc (Kohno et al., 1996). *Ceci est en faveur d'une stabilisation des CM leur permettant de proliférer sur place.* La migration basale des CM en culture était d'ailleurs très faible, comparativement aux lignées tumorales dont dispose le laboratoire et étudiées dans les mêmes conditions expérimentales.

Comment est régulée l'expression de la PTHrP dans les CM ?

Les travaux antérieurs de notre laboratoire et d'autres équipes ont montré, à l'aide de marquages immunocytochimiques sur des reins de lapin, de souris ou des reins humains, que la PTHrP n'était pas exprimée dans les CM en condition physiologique normale (Massfelder et al., 1996; Soifer et al., 1993; Yang et al., 1997). Néanmoins, une expression de la PTHrP était présente dans les CM dans diverses pathologies glomérulaires, comme dans la néphropathie diabétique chez l'homme (Ortega et al., 2011), mais aussi dans des modèles expérimentaux d'atteinte rénale, après une surcharge protéique, la perfusion d'AngII ou l'induction d'un diabète (Izquierdo et al., 2006; Largo et al., 1999; Lorenzo et al., 2002).

Dans les pathologies touchant le glomérule, les CM reçoivent de multiples signaux agressifs qui mènent à leur activation. Ces signaux sont complexes. Ils incluent l'expression de cytokines inflammatoires *in situ* par les cellules glomérulaires elles-mêmes, ou par les leucocytes infiltrés vers ce lieu désormais « suspect ». Parmi les facteurs proinflammatoires, le TNF- α et l'IL-1 β sont les plus puissants. Les récepteurs de ces deux cytokines sont présents sur les CM, et leur activation conduit à un panel de réponses mésangiales, incluant la transformation myofibroblastique des cellules, leur prolifération et/ou leur apoptose, et la sécrétion d'autres acteurs de l'inflammation.

Nos résultats précédents placent la PTHrP au cœur de deux réactions mésangiales typiques : la prolifération et l'apoptose. Nous nous sommes donc demandé si l'expression de la PTHrP pouvait être stimulée par ces deux cytokines. Nos résultats montrent que IL-1 β et le TNF- α induisent tous les deux une surexpression massive de la PTHrP en terme d'ARNm, sur une courte durée pour l'IL-1 β et jusqu'à 24h pour le TNF- α . Malgré la surexpression rapide et transitoire, culminant à 2h, des transcrits de la PTHrP après IL-1 β , la protéine étaient toujours majorée après 24h. IL-1 β est un

Cellule mésangiale

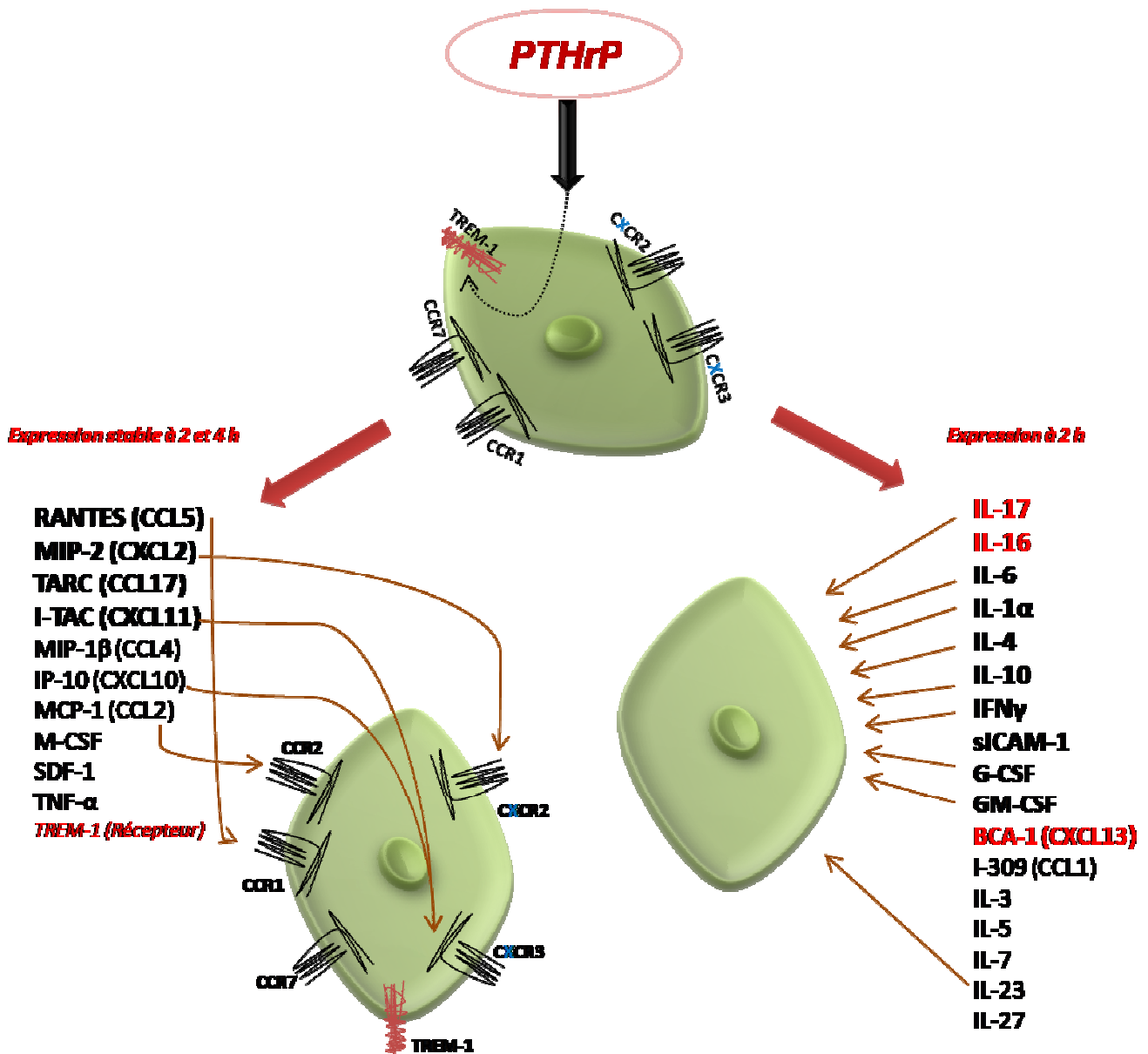


Figure 6.3: Cytokines et chimiokines exprimées par les cellules mésangiales en réponse à la PTHrP. La PTHrP *via* l'activation du R-PTH1 induit l'expression de nombreuses cytokines et chimiokines. La cellule mésangiale exprime des récepteurs de certaines chimiokines qui peuvent donc exercer des effets propres sur la CM, autres que leurs effets chimiotactiques. En revanche, ces autres effets directs sur les CM sont peu connus. Les facteurs les plus exprimés en réponse à la PTHrP sont indiqués **en gras**, ceux qui n'ont pas été rapportés auparavant dans les CM sont en rouge. Les cytokines dont les récepteurs sont connus à la surface de la CM, sont indiquées par une flèche.

facteur qui emploie des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels pour moduler sa propre expression et celle de ses gènes cibles. Il en est ainsi pour la Cox-2 dont les transcrits sont stabilisés en réponse à IL-1 β *via* la protéine HuR (Cok et al., 2003). Nous montrons que la PTHrP est une cible des mêmes mécanismes de stabilisation. La surexpression de la PTHrP induite par IL-1 β sur les CM relevait à la fois d'un effet transcriptionnel et de la stabilisation de son ARNm par la protéine HuR mobilisée par IL-1 β . Cette stabilisation a probablement conduit à une traduction prolongée de l'ARNm et une persistance de la protéine même après 24h. Notre laboratoire a montré précédemment que la protéine HuR stabilise l'ARNm de la PTHrP *in vitro* et *in vivo* dans le carcinome rénal à cellules claires, en se liant à sa partie 3'UTR (Danilin et al., 2009). L'expression rapide de la PTHrP par les deux cytokines renforce le caractère « cytokine-like » de la PTHrP.

La PTHrP, une cytokine...induisant l'expression d'autres cytokines et chimiokines ?

Les CM sont capables de sécréter des cytokines qui vont, durant l'inflammation, induire l'expression d'autres cytokines et chimiokines nécessaires à l'amplification du signal, et au recrutement des leucocytes (Anders et al., 2003b). Nos résultats montrent que la PTHrP activant son récepteur est également capable de stimuler la surexpression d'un panel de cytokines et chimiokines avec une cinétique rapide. Nous avons classé ces facteurs par rapport à leur profil d'expression après 2h et 4h d'exposition à la PTHrP. De multiples **cytokines** ont été majorées rapidement à 2h comme IL-17, IL-16, IL-6 et IL-1 α pour lesquelles la surexpression était importante, et les IL-4, IL-10, IFN γ , sICAM, G-CSF et GM-CSF qui étaient surexprimées à un moindre degré. La stimulation de l'expression de ces cytokines était très transitoire puisque leur expression revenait à la normale en 4h. Les **chimiokines**, en revanche, comme RANTES/CCL5, MIP-2/CXCL2, TARC/CCL17, I-TAC/CXCL11, MIP-1 β /CCL4 et MCP-1/CCL2, non seulement étaient majorées mais leurs taux d'expression persistaient à 4h. Les CM expriment les récepteurs de la plupart des cytokines induites (IL-17, IL-1 α , IL-6, IL-4, IL-10, IL-23, G-CSF et GM-CSF) ainsi que les récepteurs de chimiokines CCR1, CCR2, CXCR2 et CXCR3. Deux points sont à souligner : tout d'abord, on peut noter une variabilité considérable dans le niveau d'expression basale (groupe contrôle) de ces différentes cytokines et chimiokines, et en second lieu, l'expression des chimiokines paraît plus prolongée dans le temps que celle des cytokines. Cette expression multiforme pourrait être liée à une particularité des CM au sein du glomérule, leur permettant de répondre à une chimiokine par l'expression d'autres chimiokines par un mécanisme de rétrocontrôle établissant une boucle d'amplification (Luo et al., 1999). *Les résultats que nous avons obtenus avec la PTHrP sur les CM placent cette protéine dans ce schéma d'amplification.*

Certaines des cytokines dont l'expression est amplifiée par la PTHrP ont des effets sur les CM elles-mêmes (**Figure 6.3**). **IL-17** est un facteur identifié dans les lymphocytes T auxiliaires de type Th17 et qui les caractérise. Ces cellules de l'immunité sont parmi les plus virulentes ; elles ont été découvertes en 2005 (Langrish et al., 2005). L'axe Th17/IL-17 constitue un domaine de recherche nouveau et prometteur qui a bouleversé en quelque sorte l'interprétation du processus immunitaire basé précédemment sur la binarité Th1/Th2 (Steinman, 2007). Il y a six formes d'IL-17, la forme détectée dans nos cellules (IL-17A) est la forme la plus étudiée. Dans le rein, elle est exprimée par les cellules épithéliales des reins des patients transplantés et son expression a été corrélée avec le rejet du greffon (Loverre et al., 2011) mais les données sur sa réelle implication dans le rejet ne sont pas toujours cohérentes (Yapici et al., 2011). IL-17 peut activer des récepteurs exprimés dans les CM, IL-

17RA et IL-RC (il y a un 3^{ème} récepteur IL-17RB dont l'expression sur les CM n'a pour l'instant pas été recherchée). Elle induit l'expression d'autres chimiokines telles que MCP-1, RANTES et MIP-1 α *via* les voies ERK1/2 et p38/MAPK (Iyoda et al., 2010). Il y a très peu d'études sur le rôle de IL-17 dans la glomérulonéphrite et son expression par les CM n'avait pas été rapportée auparavant. L'expression de la cytokine **IL-16** n'a pas davantage été décrite précédemment dans les CM, et elle est très peu étudiée dans le rein. IL-16 est une cytokine chimiotactique produite par les leucocytes et les fibroblastes, elle favorise l'infiltration des lymphocytes T dans les sites de l'inflammation. Sa sécrétion nécessite un clivage par la caspase-3, une des caspases exécutrices dans l'apoptose ; elle peut être transférée dans le noyau mais son rôle n'y est pas encore bien connu (Cruikshank et al., 2000). Une seule étude a récemment rapporté l'expression d'IL-16 dans le rein, où elle est exprimée dans les glomérules et les tubules proximaux et distaux. La neutralisation d'IL-16 par un anticorps a diminué l'atteinte tubulaire induite dans un modèle d'ischémie/reperfusion (Wang et al., 2008b). **IL-6** est une cytokine ambivalente, pro- et anti-inflammatoire. Elle est induite dans la phase aiguë de l'inflammation où elle stimule les hépatocytes à synthétiser et sécréter la protéine réactive C caractéristique de cette phase (Naka et al., 2002). IL-6 semble induire la prolifération des CM et la synthèse de chimiokines. Dans le rein, IL-6 est produite précocement et participe à la lésion rénale en activant l'infiltration de neutrophiles et de macrophages, qui libéreront le TNF- α . Mais en interagissant par la suite avec son récepteur soluble sIL-6R, elle contribuerait à la résolution de l'atteinte rénale *via* un mécanisme de « trans-signalisation » qui n'est pas encore bien élucidé (Nechemia-Arbely et al., 2008).

D'autres cytokines, en revanche, ont déjà été décrites dans les CM, comme **IL-4** et **IL-10**. Ce sont des cytokines anti-inflammatoires favorisant la différenciation des macrophages en sous-type M2c, responsable de la phagocytose des corps apoptotiques et impliqués dans la résolution de l'inflammation (Anders and Ryu, 2011).

Dans notre étude, la PTHrP a aussi induit l'expression de chimiokines, facteurs impliqués dans la migration des cellules immunitaires mais exerçant aussi des actions locales sur les cellules exprimant leur récepteurs. **RANTES** est la chimiokine la plus exprimée en réponse à la PTHrP. Son récepteur CXCR2 est présent sur les CM. Elle n'a pas d'effet sur la prolifération, la migration ou l'apoptose des CM, mais pourrait avoir un rôle autre sur ces cellules, en dehors de sa capacité du recrutement des cellules immunitaires (Wornle et al., 2004). **TARC/CCL17** est une chimiokine peu étudiée, c'est un agent chimiotactique spécifique des Th2 (Imai et al., 1997b). Aucune donnée n'existe actuellement quant à son expression au niveau rénal. **MIP-2** est un attractant des neutrophiles, son expression dans les CM est induite par le NO, mais ses effets sur les CM sont inconnus (Walpen et al., 2001).

*L'activation de ces nombreuses cytokines/chimiokines par l'exposition des CM à la PTHrP place clairement la PTHrP au sein du processus inflammatoire local, où elle est probablement capable de participer à l'amplification/résolution de l'inflammation. Ceci reste bien sûr à être démontré. L'expression de ces facteurs non seulement activerait les CM elles-mêmes, mais pourrait aussi contribuer à attirer des cellules de l'immunité (neutrophiles, macrophage et même lymphocytes). Ces facteurs agirait également sur les cellules glomérulaires voisines, d'autant plus que les CM n'expriment qu'un nombre limité de récepteurs aux chimiokines (Tableau 1.4) par rapport aux podocytes ou aux cellules endothéliales qui en expriment d'autres. L'effet final lié à chacun de ces facteurs reste à être déterminé dans de futures études, ainsi que leur participation *in vivo* à l'inflammation glomérulaire.*

La PTHrP anti-apoptotique ? ...ça dépend...!

La PTHrP augmentait la survie des CM lorsqu'elle était surexprimée dans ces cellules et que l'apoptose était induite par déplétion en sérum. Nous nous sommes demandés si la PTHrP était également en mesure de contrer l'apoptose induite par IL-1 β et le TNF- α , i.e. lorsque il y a inflammation locale. L'exposition des CM au TNF- α conduit à leur apoptose par l'activation de la voie extrinsèque. IL-1 α est aussi un facteur pro-apoptotique des CM (Bohler et al., 2000). IL-1 β n'avait pas été étudiée dans ce contexte, mais IL-1 α et IL-1 β activent le même récepteur IL-1RI, et nos résultats montrent que IL-1 β augmente également l'apoptose des CM en culture. Dans notre travail, l'excision du gène de la PTHrP majore l'apoptose des CM induite par la privation de sérum. L'ajout de TNF- α ou d'IL-1 β a augmenté le pourcentage de cellules apoptotiques, rajoutant l'apoptose par voie extrinsèque à une apoptose par voie intrinsèque. Cependant, sur les CM délétées en PTHrP endogène, l'absence de PTHrP n'a pas eu d'effet potentialisateur sur ces réponses. En revanche, lorsque les CM surexprimaient la PTHrP-WT, non seulement l'apoptose induite par la privation de sérum était réduite, mais aussi celle induite par le TNF- α et IL-1 β .

La divergence entre ces deux résultats peut avoir plusieurs origines. 1) Il semble qu'une surexpression très importante de la PTHrP soit nécessaire pour contrer l'apoptose extrinsèque induite par ces cytokines. Les deux cytokines augmentent l'expression de la PTHrP dans les CM, mais cette augmentation pourrait être beaucoup plus importante dans les CM transfectées. En effet, le TNF- α et IL-1 β pourraient alors majorer non seulement l'expression de la PTHrP endogène murine, mais aussi celle de la PTHrP humaine transfectée. La PTHrP serait massivement exprimée. 2) Une autre explication pourrait être liée à la cinétique rapide de l'expression de la PTHrP en réponse aux cytokines qui ne couvrirait qu'imparfaitement tout le nyctémère. 3) Enfin une dernière explication relève d'une éventuelle altération de l'expression du R-PTH1 par le TNF- α . Nous n'avons pas vu de modification dans cette expression après traitement par IL-1 β , mais nous n'avons pas encore évalué ce paramètre en réponse au TNF- α . Une modification de l'expression du R-PTH1 a déjà été décrite en réponse au TNF- α et à IL-1 β dans des situations inflammatoires dans d'autres types cellulaires (Funk et al., 1995; Katz et al., 1992). Dans la plupart des études, la PTHrP s'opposait à une apoptose intrinsèque (souvent induite par la privation de sérum) et elle y était très efficace comme facteur de survie. Elle n'a pas été étudiée dans un contexte d'apoptose extrinsèque sur des cellules autres que cancéreuses.

La PTHrP, source d'autres facteurs impliqués dans l'inflammation ?

Dans notre travail, la PTHrP augmente non seulement l'expression de cytokines et chimiokines, elle augmente aussi l'expression de la **Cox-2**, la forme inductible de la cyclo-oxygénase. Elle majore également les expressions (ARNm) de la NO synthase inductible (**iNOS**), de **MCP-1**, du **VEGF** et du **PDGF**. L'augmentation des quatre derniers facteurs a lieu une ½ h à 1h après l'exposition des CM à la PTHrP(1-36), mais le niveau des réponses est faible par rapport à l'induction de l'expression de la Cox-2 (x20 à ½ h et jusqu'à 2h). La PTHrP, agissant sur son récepteur, a aussi induit **sa propre expression** en terme d'ARNm, rapidement et transitoirement, mais de manière assez importante (x6 à 2h). Toutefois, la Cox-2 était le facteur le plus majoré, c'est pourquoi nous avons concentré notre attention sur cette enzyme. La Cox est l'enzyme qui constitue l'étape limitant dans la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. La Cox-2 est inductible et est surexprimée dans de multiples conditions inflammatoires dans le glomérule rénal, où elle n'est pas exprimée de manière

constitutive comme cela semble être le cas dans d'autres structures rénales (la macula densa et la branche corticale ascendante de l'anse de Henlé) (Cheng et al., 2009; Hao and Breyer, 2008; Sheu et al., 2005). La majoration de l'expression de la Cox-2 a été confirmée en terme de protéine, 4h et 8h après l'exposition des CM à la PTHrP.

Nous avons vu précédemment que la PTHrP activait les deux voies AMPc/PKA et PI3-K/Akt sur les CM. Nous nous sommes interrogés sur la voie de signalisation mise en jeu dans l'induction de l'expression de la Cox-2 par la PTHrP. Nos résultats montrent que les deux voies sont impliquées, puisque l'inhibition de l'une ou de l'autre suffisait pour abroger la surexpression de la Cox-2 par la PTHrP. On peut cependant remarquer que la majorité des facteurs induits par la PTHrP sont des cibles connues du facteur de transcription NFκB, également activé par le TNF-α et IL-1β (Hsu et al., 1996; Stylianou et al., 1992). Nos données expérimentales confirment l'implication de NFκB puisque son inhibition abolit les effets de la PTHrP sur l'expression de la Cox-2 mais aussi sur sa propre expression (ARNm). L'activation de la voie du NFκB en réponse à l'activation du R-PTH1 par la PTHrP a été confirmée par la mise en évidence de la phosphorylation de la sous-unité p65 et de sa translocation nucléaire. La Cox-2 est une cible transcriptionnelle directe de NFκB (Kiritoshi et al., 2003), et le promoteur P2 du gène de la PTHrP contient un site de liaison du NFκB (Nadella et al., 2007).

Quel rôle pour la Cox-2 surexprimée par la PTHrP ?

Nous avons montré précédemment que la PTHrP était un facteur de survie des CM essentiellement en agissant par la voie autocrine/paracrine. Nous nous sommes demandé si la Cox-2 pouvait contribuer à cet effet. Un rôle anti-apoptotique de la Cox-2 avait été auparavant rapporté dans les CM exposées au TNF-α, où une surexpression de la Cox-2 par transfection adénovirale augmentait la survie des cellules, et cet effet était lié à la synthèse de PGE₂ et de PGI₂ (Ishaque et al., 2003). Dans notre étude, l'inhibition spécifique de la Cox-2 induite par la PTHrP a aboli l'effet anti-apoptotique de la PTHrP(1-36) sur les CM privées de sérum. L'expression de la PGE₂ synthase-1 microsomale inductible (ARNm) a été légèrement augmentée par la PTHrP(1-36), mais la PGE₂, testée dans les mêmes conditions que la PTHrP, ne modifiait pas la survie des CM. *Ceci indique qu'un ou plusieurs métabolites dérivés de l'activité de la Cox-2, à l'exclusion de la PGE₂, soit responsable de l'effet anti-apoptotique de la PTHrP.*

Nous avons constaté précédemment que l'inhibition de l'une ou de l'autre des voies de signalisation de la PTHrP (AMPc/PKA ou PI3-K/Akt) reversait complètement l'effet de la PTHrP sur la survie, suggérant que ces deux voies activaient une cible distale commune. Nous montrons maintenant que l'inhibition de l'une ou de l'autre des deux voies abroge l'expression de la Cox-2 induite par la PTHrP, faisant de la Cox-2 un élément clé pour comprendre comment la PTHrP exerce son action anti-apoptotique par la voie autocrine/paracrine dans les CM. De plus, la transcription du gène de la Cox-2 était également abolie par l'inhibition de NFκB. L'ensemble de ces données suggère que les deux voies (AMPc/PKA ou PI3-K/Akt) auraient NFκB pour cible commune, puis la Cox-2 comme effecteur principal.

Mais qu'en est-il dans la vraie vie...in vivo...?

Le modèle de glomérulonéphrite mésangioproliférative induite par le venin du serpent Habu (HSV, *Habu Snake Venom*) reproduit rapidement une atteinte mésangiale caractérisée par une

mésangiolyse rapide, une inflammation locale et une prolifération cicatrisante des CM. Nous avons choisi de travailler avec ce modèle sur la base des trois aspects fondamentaux que nous avons documentés dans notre travail pour les effets de la PTHrP sur les CM, à savoir la prolifération, la survie et l'inflammation.

Tout d'abord, nous avons cherché à savoir si le système PTHrP/R-PTH1 était surexprimé dans ce modèle à la suite de l'atteinte glomérulaire. Nos résultats montrent que les transcrits de la PTHrP et de son récepteur sont majorés dans les glomérules isolés préparés à partir de reins de souris traitées par le HSV. Cette majoration était présente au 1^{er} jour post-injection pour la PTHrP, et à J1 et J7 pour le R-PTH1. À J1, l'atteinte glomérulaire se caractérise par une atteinte endothéliale et une mésangiolyse importantes, avec l'activation des CM restantes, évaluée par l'expression de α SMA, et leur prolifération observée par marquage au Ki67. A ce stade, la protéine de la PTHrP a été visualisée par immunohistofluorescence dans toutes les cellules glomérulaires des glomérules touchés. De plus, une localisation nucléaire de la PTHrP a pu être observée. Nous n'avons pas pu avoir pour l'instant de co-marquage correct avec la desmine, afin de voir si la PTHrP avait une localisation nucléaire particulièrement dans les CM. Néanmoins, quelle que soit la cellule exprimant la PTHrP (podocyte, endothéliale ou mésangiale), il est probable que la PTHrP sécrétée puisse agir sur les cellules voisines, dont les CM et y induire sa propre expression par voie autocrine/paracrine, comme c'était le cas *in vitro*. La PTHrP pourrait donc avoir **un rôle anti-apoptotique** et s'opposant à la mésangiolyse tout en soutenant une prolifération des CM restantes. Cet effet protecteur de la PTHrP endogène sur un possible effet pro-apoptotique direct du venin sur les CM, nous avons pu le documenter *in vitro*, en exposant les CM directement au venin. Nous avons observé que le venin induisait l'apoptose des CM seulement quand elles étaient délétées en PTHrP endogène (CM excisées). Au même moment, la surexpression de la PTHrP suggère également l'induction de cytokines/chimiokines, de la Cox-2 et d'autres facteurs qui pourraient amplifier l'inflammation locale en faisant appel aux cellules immunitaires. Ceci, toutefois, reste à être confirmé par une autre étude, en y incluant un traitement par anticorps neutralisant la PTHrP sécrétée dans l'espace intercellulaire. Cette démarche permettra d'annihiler les effets de la PTHrP passant par la voie autocrine/paracrine, donc son effet amplificateur de l'inflammation, mais aussi ses effets sur la survie des cellules. Ce traitement par contre est critiquable puisqu'il ne supprimera pas la PTHrP intracrine. Seule une démarche permettant de délivrer localement dans les CM, avec des liposomes ciblés ou des CM transformées, un traitement abolissant la PTHrP intracrine (SiRNA ou PTHrP- Δ NLS) permettra de modifier la PTHrP intracrine.

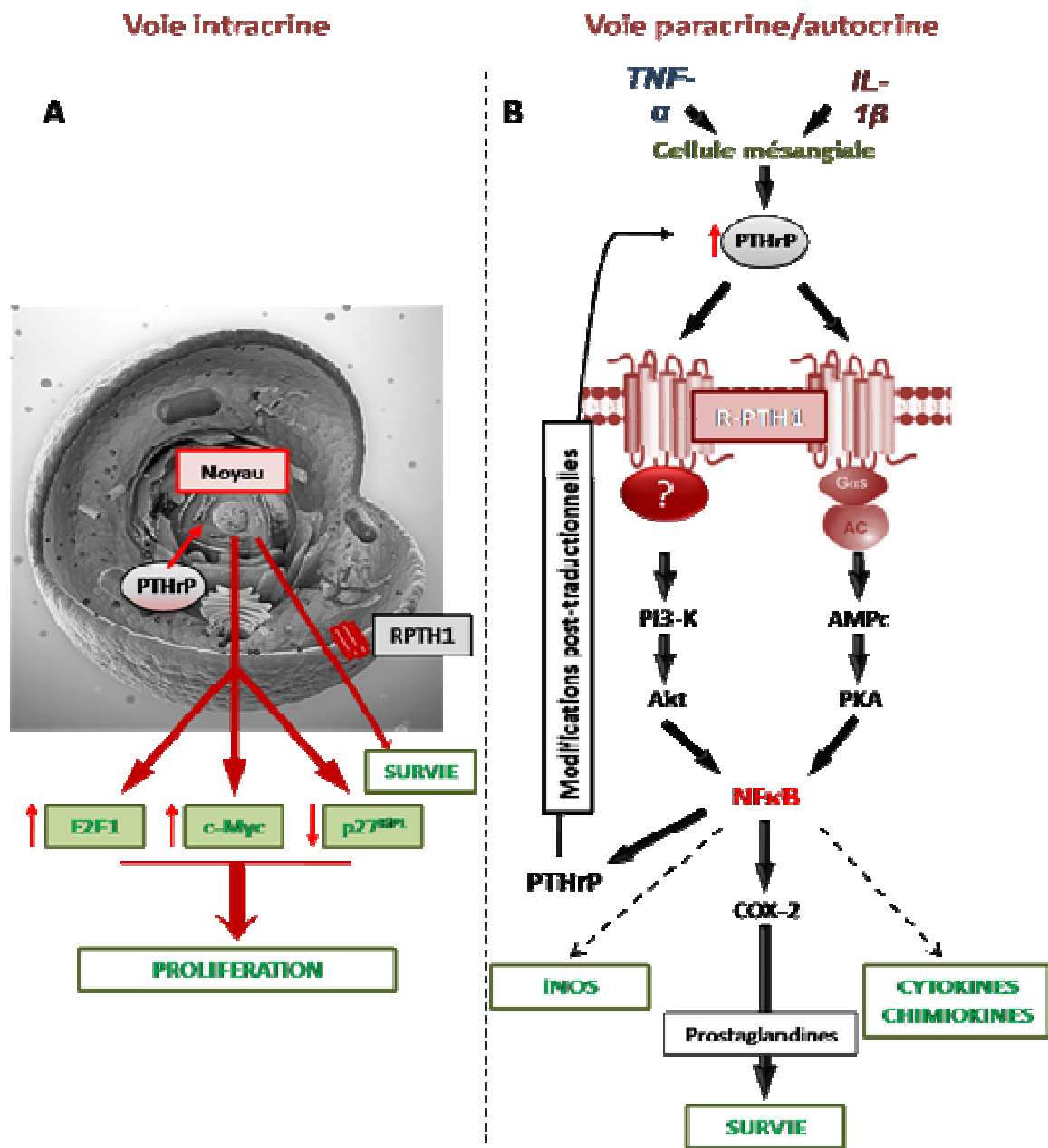


Figure 6.4: Effets de la PTHrP intracrine et paracrine/autocrine sur la prolifération, la survie et l'inflammation des cellules mésangiales. **A)** La PTHrP, *via* la voie intracrine nucléaire, induit la prolifération des CM en modulant l'expression des acteurs du cycle cellulaire; elle augmente les facteurs de transcription E2F1 et c-Myc tandis qu'elle diminue l'expression de la p27^{KIP1}. La PTHrP par cette voie augmente aussi la survie des CM. **B)** Les deux facteurs inflammatoires IL-1 β et TNF- α majorent l'expression de la PTHrP dans les CM; la PTHrP sécrétée, agissant donc sur le R-PTH1, active diverses voies de signalisation: **AMPc/PKA** et **PI3-K/Akt** conduisant mutuellement à l'activation de **NF κ B**. Cette activation conduit à la surexpression de la **COX-2**, responsable principal de l'effet anti-apoptotique de la PTHrP, majore l'expression de la **PTHrP** elle-même et induit l'expression des cytokines/chimiokines et de iNOS. La PTHrP ainsi surexprimée pourrait alors être sécrétée et amplifier ses effets sur les CM.

Analyse et Conclusions

Ce travail avait pour but de définir la place de la PTHrP dans les processus physiopathologiques initiaux des glomérulopathies comportant une atteinte mésangiale. Ces pathologies sont nombreuses, la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA, la glomérulonéphrite lupique, la néphropathie diabétique et la glomérulonéphrite membranoproliférative. Toutes ces maladies se caractérisent physiopathologiquement par une lésion mésangiale précoce dans les trois premières pathologies, et une lésion plus tardive dans la glomérulonéphrite membranoproliférative. Quelle que soit l'étiologie sous-jacente, cette atteinte s'initie par une inflammation locale mettant en jeu une myriade de cytokines et de chimiokines, qui conduisent à une activation des cellules glomérulaires résidentes et à un recrutement de cellules immunitaires. La réaction inflammatoire vise à limiter la zone lésée et à mener à bien des processus de réparation, faisant parfois des dégâts « collatéraux » qui peuvent soit être rattrapés et passer inaperçus ce qui finit par une cicatrisation spontanée, ou s'installer sournoisement et conduire tôt ou tard à un problème rénal manifeste et à l'insuffisance rénale. La PTHrP était accusée d'avoir un rôle dans l'initiation et l'amplification des mécanismes maladifs rénaux dans la néphropathie diabétique où la PTHrP est présente dans le glomérule et semble contribuer à une lésion mésangiale et podocytaire (Izquierdo et al., 2006; Ortega et al., 2011). Elle était aussi localisée dans les glomérules ou surexprimée dans les CM dans des modèles d'atteinte rénale aiguë comme après une surcharge protéique, une perfusion de l'AngII ou l'administration d'acide folique (Izquierdo et al., 2006; Largo et al., 1999; Ortega et al., 2011; Santos et al., 2001). Dans ces modèles expérimentaux, aucun traitement anti-PTHrP n'a été testé. Les seuls traitements utilisés étaient des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'AngI ou des antagonistes du récepteur AT-1 de l'AngII. Ils réduisaient l'expression de la PTHrP et amélioraient les paramètres fonctionnels rénaux.

Dans notre travail, nous avons documenté les effets de la PTHrP sur la prolifération et l'apoptose des CM. La PTHrP est un facteur de prolifération et de survie des CM en culture (**Figure 6.4**). La transposition de ces deux effets démontrés *in vitro*, dans une condition pathologique *in vivo*, n'est cependant pas évidente et doit tenir compte des circonstances physiopathologiques. La PTHrP pourrait, dans une condition de mésangiolyse, être bénéfique dans le sens où elle s'opposerait à une apoptose trop importante et conduirait à la prolifération des CM restantes, ce qui participerait probablement à accélérer la réparation et la résolution de l'atteinte. L'expression de la PTHrP à J1, dans les glomérules lésés par le venin de serpent Habu est en faveur d'une action de ce type. En revanche, en cas d'expression continue et d'installation d'une hypercellularité mésangiale, l'expression de la PTHrP serait plutôt délétère puisqu'elle contribuerait à la prolifération et s'opposerait à l'apoptose requise à ce stade pour contrebalancer l'excès de prolifération. Au final, la clé du rôle « bénéfique » ou « délétère » de la PTHrP dans une pathologie est de savoir à quel moment elle est surexprimée et dans quel contexte environnemental.

L'unité fait la force !

La PTHrP conduit à une sécrétion par les CM de multiples cytokines et chimiokines qui exercent des effets pro- et anti-inflammatoires. L'expression de nombreux facteurs dans les CM par la PTHrP, conduit probablement, par des mécanismes de rétrocontrôle et des effets sur les cellules voisines enfermées dans le même glomérule, à des phénomènes d'amplifications qu'il est impossible d'appréhender lorsqu'on travaille sur des cellules « en boîte » de culture. *In vivo*, ces processus

d'amplification sont probablement la principale force de défense. *Plus on est nombreux, plus on a de chances de gagner* ! Il n'est pas impossible que la prolifération des CM et leur activation soit également un mécanisme de défense partant de cette même devise, rassembler une armée « en intérim ». Toutefois, les nombreux facteurs sécrétés sont capables d'amplifier l'atteinte cellulaire et peuvent conduire à son aggravation. Ils peuvent exercer des actions paracrines sur les cellules voisines et les entraîner dans la pagaille inflammatoire et surtout, conduire à des atteintes permanentes. Ce cas de figure devient la réalité si le facteur responsable de l'atteinte initiale est présent en permanence, ou si les atteintes se répètent fréquemment. On peut alors concevoir que les processus de réaction/réparation finissent par être débordés et s'emballent. Dans le modèle de glomérulonéphrite mésangioproliférative induite par le venin de serpent Habu que nous avons choisi, le modèle est typiquement un modèle à rémission spontanée, en 2 à 3 semaines. Le venin étant injecté une seule fois, si la dose est sub-létale, il est probablement métabolisé, dégradé et éliminé, de sorte que l'atteinte initiale ne reste pas permanente. La réponse rénale de réparation joue alors complètement son rôle.

Le rôle de la PTHrP comme facteur pro ou anti-inflammatoire n'est donc pas encore évident. Il dépendra de plusieurs facteurs :

- i) l'importance de l'expression de la PTHrP dans le site de l'inflammation ; on peut dans ce sens probablement douter de l'existence d'une synergie associée à la présence d'un ensemble de facteurs inflammatoires agissant de concert ;
- ii) la complexité de la régulation de son expression, liée à la stabilisation de son ARNm, à la durée de vie de la protéine et aux modifications post-traductionnelles conduisant à la majoration d'un fragment au détriment d'un autre ;
- iii) la continuité de l'expression de la PTHrP, et la présence dans la cellule d'un mécanisme réprimant son expression, d'autant plus que la PTHrP induit sa propre expression.

Quoi qu'il en soit, il est important pour déterminer le rôle de la PTHrP, bénéfique ou délétère, de compléter l'étude entreprise *in vivo* et d'examiner les paramètres rénaux locaux et fonctionnels après avoir neutralisé la PTHrP produite.

La nature fait bien les choses...quoique... !

Souvent, pour interpréter un résultat scientifique, et surtout dans la recherche fondamentale, on essaie de montrer que la nature tire ses flèches sur un but qu'elle est capable de voir ; les flèches font des détours improbables, quasi « surnaturels » mais finalement font mouche. Nous aussi on y parvient parfois...je dis bien : parfois.

Mais est-ce que tout ce que la nature fait a un but ou va dans le bon sens ?

S'ils entendent cette question, Camus haussera les épaules, Sartre froncera les sourcils, Tolstoï, et fort probablement Dostoïevski aussi, me riront au nez...Moi, j'admire la certitude de Dostoïevski et de Tolstoï mais dans le doute... je me rangerai du côté de Sartre.

Chapitre 7

Références bibliographiques

- Aarts, M. M., Davidson, D., Corluka, A., Petroulakis, E., Guo, J., Bringham, F. R., Galipeau, J. and Henderson, J. E.** (2001). Parathyroid hormone-related protein promotes quiescence and survival of serum-deprived chondrocytes by inhibiting rRNA synthesis. *J Biol Chem***276**, 37934-43.
- Aarts, M. M., Levy, D., He, B., Stregger, S., Chen, T., Richard, S. and Henderson, J. E.** (1999a). Parathyroid hormone-related protein interacts with RNA. *J Biol Chem***274**, 4832-8.
- Aarts, M. M., Rix, A., Guo, J., Bringham, R. and Henderson, J. E.** (1999b). The nucleolar targeting signal (NTS) of parathyroid hormone related protein mediates endocytosis and nucleolar translocation. *J Bone Miner Res***14**, 1493-503.
- Abbott, F., Ryan, J. J., Ceska, M., Matsushima, K., Sarraf, C. E. and Rees, A. J.** (1991). Interleukin-1 beta stimulates human mesangial cells to synthesize and release interleukins-6 and -8. *Kidney Int***40**, 597-605.
- Abdel-Rahman, E. M., Saadulla, L., Reeves, W. B. and Awad, A. S.** (2012). Therapeutic modalities in diabetic nephropathy: standard and emerging approaches. *J Gen Intern Med***27**, 458-68.
- Abdel-Wahab, N., Weston, B. S., Roberts, T. and Mason, R. M.** (2002). Connective tissue growth factor and regulation of the mesangial cell cycle: role in cellular hypertrophy. *J Am Soc Nephrol***13**, 2437-45.
- Abdelhafiz, A. H., Brown, S. H., Bello, A. and El Nahas, M.** (2010). Chronic kidney disease in older people: physiology, pathology or both? *Nephron Clin Pract***116**, c19-24.
- Abe, T., Fleming, P. A., Masuya, M., Minamiguchi, H., Ebihara, Y., Drake, C. J. and Ogawaa, M.** (2005). Granulocyte/macrophage origin of glomerular mesangial cells. *Int J Hematol***82**, 115-8.
- Abrass, C. K., Peterson, C. V. and Raugi, G. J.** (1988). Phenotypic expression of collagen types in mesangial matrix of diabetic and nondiabetic rats. *Diabetes***37**, 1695-702.
- Agouni, A., Sourbier, C., Danilin, S., Rothhut, S., Lindner, V., Jacqmin, D., Helwig, J. J., Lang, H. and Massfelder, T.** (2007). Parathyroid hormone-related protein induces cell survival in human renal cell carcinoma through the PI3K Akt pathway: evidence for a critical role for integrin-linked kinase and nuclear factor kappa B. *Carcinogenesis***28**, 1893-901.
- Akca, A., Nguyen, Q., He, Z., Turkmen, K., Won Lee, D., Hernando, A. A., Altmann, C., Toker, A., Pacic, A., Ljubanovic, D. G. et al.** (2011). IL-33 exacerbates acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol***22**, 2057-67.
- Al-Lamki, R. S., Wang, J., Skepper, J. N., Thiru, S., Pober, J. S. and Bradley, J. R.** (2001). Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants. *Lab Invest***81**, 1503-15.
- Alchi, B. and Jayne, D.** (2010). Membranoproliferative glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol***25**, 1409-18.
- Allinson, E. T. and Drucker, D. J.** (1992). Parathyroid hormone-like peptide shares features with members of the early response gene family: rapid induction by serum, growth factors, and cycloheximide. *Cancer Res***52**, 3103-9.
- Alonso, V., de Gortazar, A. R., Ardura, J. A., Andrade-Zapata, I., Alvarez-Arroyo, M. V. and Esbrit, P.** (2008). Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol***217**, 717-27.
- Amiri, F., Shaw, S., Wang, X., Tang, J., Waller, J. L., Eaton, D. C. and Marrero, M. B.** (2002). Angiotensin II activation of the JAK/STAT pathway in mesangial cells is altered by high glucose. *Kidney Int***61**, 1605-16.
- Amizuka, N., Henderson, J. E., Hoshi, K., Warshawsky, H., Ozawa, H., Goltzman, D. and Karaplis, A. C.** (1996). Programmed cell death of chondrocytes and aberrant chondrogenesis in mice homozygous for parathyroid hormone-related peptide gene deletion. *Endocrinology***137**, 5055-67.
- Amizuka, N., Lee, H. S., Kwan, M. Y., Arazani, A., Warshawsky, H., Henty, G. N., Ozawa, H., White, J. H. and Goltzman, D.** (1997). Cell-specific expression of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene in kidney from kidney-specific and ubiquitous promoters. *Endocrinology***138**, 469-81.
- Amizuka, N., Warshawsky, H., Henderson, J. E., Goltzman, D. and Karaplis, A. C.** (1994). Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J Cell Biol***126**, 1611-23.
- Amling, M., Neff, L., Tanaka, S., Inoue, D., Kuida, K., Weir, E., Philbrick, W. M., Broadus, A. E. and Baron, R.** (1997). Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J Cell Biol***136**, 205-13.
- Amoura, Z., Piette, J. C., Bach, J. F. and Koutouzov, S.** (1999). The key role of nucleosomes in lupus. *Arthritis Rheum***42**, 833-43.

- Anai, T., Tomiyasu, T., Takai, N. and Miyakawa, I.** (1999). Remission of idiopathic hypoparathyroidism during lactation: a case report. *J Obstet Gynaecol Res***25**, 271-3.
- Anders, H. J., Frink, M., Linde, Y., Banas, B., Wornle, M., Cohen, C. D., Vielhauer, V., Nelson, P. J., Grone, H. J. and Schlondorff, D.** (2003a). CC chemokine ligand 5/RANTES chemokine antagonists aggravate glomerulonephritis despite reduction of glomerular leukocyte infiltration. *J Immunol***170**, 5658-66.
- Anders, H. J. and Muruve, D. A.** (2011). The inflammasomes in kidney disease. *J Am Soc Nephrol***22**, 1007-18.
- Anders, H. J. and Ryu, M.** (2011). Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int***80**, 915-25.
- Anders, H. J., Vielhauer, V., Kretzler, M., Cohen, C. D., Segerer, S., Luckow, B., Weller, L., Grone, H. J. and Schlondorff, D.** (2001). Chemokine and chemokine receptor expression during initiation and resolution of immune complex glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol***12**, 919-31.
- Anders, H. J., Vielhauer, V. and Schlondorff, D.** (2003b). Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int***63**, 401-15.
- Andersson, J., Bjork, L., Dinarello, C. A., Towbin, H. and Andersson, U.** (1992). Lipopolysaccharide induces human interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 production in the same cell. *Eur J Immunol***22**, 2617-23.
- Anjo, A. and Couturier, E.** (1975). Mesangial changes of the renal glomerulus in long-term diabetic rats. *Pathol Eur***10**, 21-7.
- Appel, G. B., Cook, H. T., Hageman, G., Jennette, J. C., Kashgarian, M., Kirschfink, M., Lambris, J. D., Lanning, L., Lutz, H. U., Meri, S. et al.** (2005). Membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease): an update. *J Am Soc Nephrol***16**, 1392-403.
- Arend, W. P., Malyak, M., Smith, M. F., Jr., Whisenand, T. D., Slack, J. L., Sims, J. E., Giri, J. G. and Dower, S. K.** (1994). Binding of IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids. *J Immunol***153**, 4766-74.
- Arner, R. J., Prabhu, K. S., Krishnan, V., Johnson, M. C. and Reddy, C. C.** (2006). Expression of myo-inositol oxygenase in tissues susceptible to diabetic complications. *Biochem Biophys Res Commun***339**, 816-20.
- Audard, V., Lang, P. and Sahali, D.** (2008). [Minimal change nephrotic syndrome : new insights into disease pathogenesis]. *Med Sci (Paris)***24**, 853-8.
- Bagchus, W. M., Jeunink, M. F. and Elema, J. D.** (1990). The mesangium in anti-Thy-1 nephritis. Influx of macrophages, mesangial cell hypercellularity, and macromolecular accumulation. *Am J Pathol***137**, 215-23.
- Bagshaw, S. M., Uchino, S., Bellomo, R., Morimatsu, H., Morgera, S., Schetz, M., Tan, I., Bouman, C., Macedo, E., Gibney, N. et al.** (2007). Septic acute kidney injury in critically ill patients: clinical characteristics and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol***2**, 431-9.
- Bagui, T. K., Cui, D., Roy, S., Mohapatra, S., Shor, A. C., Ma, L. and Pledger, W. J.** (2009). Inhibition of p27Kip1 gene transcription by mitogens. *Cell Cycle***8**, 115-24.
- Baker, A. J., Mooney, A., Hughes, J., Lombardi, D., Johnson, R. J. and Savill, J.** (1994). Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest***94**, 2105-16.
- Banas, M. C., Banas, B., Hudkins, K. L., Wietecha, T. A., Iyoda, M., Bock, E., Hauser, P., Pippin, J. W., Shankland, S. J., Smith, K. D. et al.** (2008). TLR4 links podocytes with the innate immune system to mediate glomerular injury. *J Am Soc Nephrol***19**, 704-13.
- Barisoni, L., Schnaper, H. W. and Kopp, J. B.** (2009). Advances in the biology and genetics of the podocytopathies: implications for diagnosis and therapy. *Arch Pathol Lab Med***133**, 201-16.
- Baud, L., Hagege, J., Sraer, J., Rondeau, E., Perez, J. and Ardaillou, R.** (1983). Reactive oxygen production by cultured rat glomerular mesangial cells during phagocytosis is associated with stimulation of lipooxygenase activity. *J Exp Med***158**, 1836-52.
- Baud, L., Perez, J. and Ardaillou, R.** (1986). Dexamethasone and hydrogen peroxide production by mesangial cells during phagocytosis. *Am J Physiol***250**, F596-604.
- Beck, L. H., Jr., Bonegio, R. G., Lambeau, G., Beck, D. M., Powell, D. W., Cummins, T. D., Klein, J. B. and Salant, D. J.** (2009). M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med***361**, 11-21.

- Becker, C. G.** (1972). Demonstration of actomyosin in mesangial cells of the renal glomerulus. *Am J Pathol***66**, 97-110.
- Bell, J. H., Herrera, A. H., Li, Y. and Walcheck, B.** (2007). Role of ADAM17 in the ectodomain shedding of TNF-alpha and its receptors by neutrophils and macrophages. *J Leukoc Biol***82**, 173-6.
- Berrou, J., Tostivint, I., Verrecchia, F., Berthier, C., Boulanger, E., Mauviel, A., Marti, H. P., Wautier, M. P., Wautier, J. L., Rondeau, E. et al.** (2009). Advanced glycation end products regulate extracellular matrix protein and protease expression by human glomerular mesangial cells. *Int J Mol Med***23**, 513-20.
- Bettoun, J. D., Minagawa, M., Hendy, G. N., Alpert, L. C., Goodyer, C. G., Goltzman, D. and White, J. H.** (1998). Developmental upregulation of human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene expression from conserved and human-specific promoters. *J Clin Invest***102**, 958-67.
- Bettoun, J. D., Minagawa, M., Kwan, M. Y., Lee, H. S., Yasuda, T., Hendy, G. N., Goltzman, D. and White, J. H.** (1997). Cloning and characterization of the promoter regions of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene: analysis of deoxyribonucleic acid from normal subjects and patients with pseudohypoparathyroidism type 1b. *J Clin Endocrinol Metab***82**, 1031-40.
- Bhatia, V., Kim, S. O., Aronson, J. F., Chao, C., Hellmich, M. R. and Falzon, M.** (2012). Role of parathyroid hormone-related protein in the pro-inflammatory and pro-fibrogenic response associated with acute pancreatitis. *Regul Pept***175**, 49-60.
- Bhatia, V., Mula, R. V. and Falzon, M.** (2011). 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) regulates PTHrP expression via transcriptional, post-transcriptional and post-translational pathways. *Mol Cell Endocrinol***342**, 32-40.
- Bhatia, V., Mula, R. V., Weigel, N. L. and Falzon, M.** (2009a). Parathyroid hormone-related protein regulates cell survival pathways via integrin alpha6beta4-mediated activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Mol Cancer Res***7**, 1119-31.
- Bhatia, V., Saini, M. K. and Falzon, M.** (2009b). Nuclear PTHrP targeting regulates PTHrP secretion and enhances LoVo cell growth and survival. *Regul Pept***158**, 149-55.
- Bieritz, B., Spessotto, P., Colombatti, A., Jahn, A., Prols, F. and Hartner, A.** (2003). Role of alpha8 integrin in mesangial cell adhesion, migration, and proliferation. *Kidney Int***64**, 119-27.
- Bird, J. E., Giancarli, M. R., Kurihara, T., Kowala, M. C., Valentine, M. T., Gitlitz, P. H., Pandya, D. G., French, M. H. and Durham, S. K.** (2000). Increased severity of glomerulonephritis in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *Kidney Int***57**, 129-36.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S. et al.** (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature***385**, 729-33.
- Blain, S. W., Scher, H. I., Cordon-Cardo, C. and Koff, A.** (2003). p27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell***3**, 111-5.
- Bloom, J. and Pagano, M.** (2003). Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol***13**, 41-7.
- Bohler, T., Waiser, J., Hepburn, H., Gaedeke, J., Lehmann, C., Hambach, P., Budde, K. and Neumayer, H. H.** (2000). TNF-alpha and IL-1alpha induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers. *Cytokine***12**, 986-91.
- Boor, P., Eitner, F., Cohen, C. D., Lindenmeyer, M. T., Mertens, P. R., Ostendorf, T. and Floege, J.** (2009). Patients with IgA nephropathy exhibit high systemic PDGF-DD levels. *Nephrol Dial Transplant***24**, 2755-62.
- Boor, P., Konieczny, A., Villa, L., Kunter, U., van Roeyen, C. R., LaRochelle, W. J., Smithson, G., Arrol, S., Ostendorf, T. and Floege, J.** (2007). PDGF-D inhibition by CR002 ameliorates tubulointerstitial fibrosis following experimental glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant***22**, 1323-31.
- Boor, P., van Roeyen, C. R., Kunter, U., Villa, L., Bucher, E., Hohenstein, B., Hugo, C. P., Eriksson, U., Satchell, S. C., Mathieson, P. W. et al.** (2010). PDGF-C mediates glomerular capillary repair. *Am J Pathol***177**, 58-69.
- Boraschi, D., Lucchesi, D., Hainzl, S., Leitner, M., Maier, E., Mangelberger, D., Oostingh, G. J., Pfaller, T., Pixner, C., Posselt, G. et al.** (2011). IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur Cytokine Netw***22**, 127-47.
- Bortner, C. D. and Cidlowski, J. A.** (2002). Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol***42**, 259-81.

- Borza, C. M. and Pozzi, A.** (2012). The role of cell-extracellular matrix interactions in glomerular injury. *Exp Cell Res***318**, 1001-10.
- Borza, C. M., Su, Y., Chen, X., Yu, L., Mont, S., Chetyrkin, S., Voziyan, P., Hudson, B. G., Billings, P. C., Jo, H. et al.** (2012). Inhibition of integrin alpha2beta1 ameliorates glomerular injury. *J Am Soc Nephrol***23**, 1027-38.
- Bosch, R. J., Rojo-Linares, P., Torrecillas-Casamayor, G., Iglesias-Cruz, M. C., Rodriguez-Puyol, D. and Rodriguez-Puyol, M.** (1999). Effects of parathyroid hormone-related protein on human mesangial cells in culture. *Am J Physiol***277**, E990-5.
- Botto, M., Dell'Agnola, C., Bygrave, A. E., Thompson, E. M., Cook, H. T., Petry, F., Loos, M., Pandolfi, P. P. and Walport, M. J.** (1998). Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet***19**, 56-9.
- Brabcova, I., Kotsch, K., Hribova, P., Louzecka, A., Bartosova, K., Hyklova, K., Lacha, J., Volk, H. D. and Viklicky, O.** (2007). Intrarenal gene expression of proinflammatory chemokines and cytokines in chronic proteinuric glomerulopathies. *Physiol Res***56**, 221-6.
- Brabcova, I., Tesar, V., Honsova, E., Lodererova, A., Novotna, E., Maixnerova, D., Merta, M., Burgelova, M., Hribova, P., Skibova, J. et al.** (2011). Association of advanced vasculopathy and transforming growth factor-beta1 gene expression with immunoglobulin A nephropathy progression. *Nephrol Dial Transplant***26**, 573-9.
- Breyer, M. D. and Harris, R. C.** (2001). Cyclooxygenase 2 and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens***10**, 89-98.
- Bringhurst, F. R., Juppner, H., Guo, J., Urena, P., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, H. M., Abou-Samra, A. B. and Segre, G. V.** (1993). Cloned, stably expressed parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptors activate multiple messenger signals and biological responses in LLC-PK1 kidney cells. *Endocrinology***132**, 2090-8.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X.** (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol***15**, 269-90.
- Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., Lewis, A., Ray, K., Tschopp, J. and Volpe, F.** (2000). Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol***2**, 346-51.
- Burtis, W. J., Dann, P., Gaich, G. A. and Soifer, N. E.** (1994). A high abundance midregion species of parathyroid hormone-related protein: immunological and chromatographic characterization in plasma. *J Clin Endocrinol Metab***78**, 317-22.
- Burtis, W. J., Fodero, J. P., Gaich, G., Debeysey, M. and Stewart, A. F.** (1992). Preliminary characterization of circulating amino- and carboxy-terminal fragments of parathyroid hormone-related peptide in humoral hypercalcemia of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab***75**, 1110-4.
- Burtis, W. J., Wu, T., Bunch, C., Wysolmerski, J. J., Insogna, K. L., Weir, E. C., Broadus, A. E. and Stewart, A. F.** (1987). Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem***262**, 7151-6.
- Burton, P. B., Moniz, C. and Knight, D. E.** (1990). Parathyroid hormone related peptide can function as an autocrine growth factor in human renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun***167**, 1134-8.
- Butkowski, R. J., Wieslander, J., Kleppel, M., Michael, A. F. and Fish, A. J.** (1989). Basement membrane collagen in the kidney: regional localization of novel chains related to collagen IV. *Kidney Int***35**, 1195-202.
- Camazine, S. M., Ryan, G. B., Unanue, E. R. and Karnovsky, M. J.** (1976). Isolation of phagocytic cells from the rat renal glomerulus. *Lab Invest***35**, 315-26.
- Cameron, J. S., Ogg, C. S., Turner, D. R., Weller, R. O., White, R. H., Glasgow, E. F., Peters, D. K. and Martin, A.** (1973). Mesangiocapillary glomerulonephritis and persistent hypocomplementemia. *Perspect Nephrol Hypertens***1 Pt 1**, 541-56.
- Campos, R. V., Wang, C. and Drucker, D. J.** (1992). Regulation of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) gene transcription: cell- and tissue-specific promoter utilization mediated by multiple positive and negative cis-acting DNA elements. *Mol Endocrinol***6**, 1642-52.
- Campos, R. V., Zhang, L. and Drucker, D. J.** (1994). Differential expression of RNA transcripts encoding unique carboxy-terminal sequences of human parathyroid hormone-related peptide. *Mol Endocrinol***8**, 1656-66.
- Camussi, G., Tetta, C., Bussolino, F., Turello, E., Brentjens, J., Montrucchio, G. and Andres, G.** (1990). Effect of leukocyte stimulation on rabbit immune complex glomerulonephritis. *Kidney Int***38**, 1047-55.

- Care, A. D., Abbas, S. K., Pickard, D. W., Barri, M., Drinkhill, M., Findlay, J. B., White, I. R. and Caple, I. W. (1990). Stimulation of ovine placental transport of calcium and magnesium by mid-molecule fragments of human parathyroid hormone-related protein. *Exp Physiol***75**, 605-8.
- Carpio, L., Gladu, J., Goltzman, D. and Rabbani, S. A. (2001). Induction of osteoblast differentiation indexes by PTHrP in MG-63 cells involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab***281**, E489-99.
- Cartier, J., Marivin, A., Berthelet, J. and Dubrez, L. (2012). [IAPs: a central element in the NF-kappaB activating signaling pathway]. *Med Sci (Paris)***28**, 69-75.
- Cassetta, L., Cassol, E. and Poli, G. (2011). Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal***11**, 2391-402.
- Cebrian, A., Garcia-Ocana, A., Takane, K. K., Sipula, D., Stewart, A. F. and Vasavada, R. C. (2002). Overexpression of parathyroid hormone-related protein inhibits pancreatic beta-cell death in vivo and in vitro. *Diabetes***51**, 3003-13.
- Cerda, J., Lameire, N., Eggers, P., Pannu, N., Uchino, S., Wang, H., Bagga, A. and Levin, A. (2008). Epidemiology of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol***3**, 881-6.
- Chadban, S. J., Tesch, G. H., Foti, R., Atkins, R. C. and Nikolic-Paterson, D. J. (1997). Interleukin-10 is a mesangial cell growth factor *in vitro* and in vivo. *Lab Invest***76**, 619-27.
- Chan, L. Y., Leung, J. C., Tsang, A. W., Tang, S. C. and Lai, K. N. (2005). Activation of tubular epithelial cells by mesangial-derived TNF-alpha: glomerulotubular communication in IgA nephropathy. *Kidney Int***67**, 602-12.
- Chen, T. J., Yang, Y. F., Huang, P. H., Lin, H. H. and Huang, C. C. (2009). Permanent renal loss following tumor necrosis factor alpha antagonists for arthritis. *Rheumatol Int***30**, 1077-9.
- Chen, Y. L., Huang, Y. L., Lin, N. Y., Chen, H. C., Chiu, W. C. and Chang, C. J. (2006). Differential regulation of ARE-mediated TNFalpha and IL-1beta mRNA stability by lipopolysaccharide in RAW264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun***346**, 160-8.
- Chen, Y. M., Ng, Y. Y., Lin, S. L., Chiang, W. C., Lan, H. Y. and Tsai, T. J. (2004). Pentoxifylline suppresses renal tumour necrosis factor-alpha and ameliorates experimental crescentic glomerulonephritis in rats. *Nephrol Dial Transplant***19**, 1106-15.
- Cheng, H., Fan, X., Guan, Y., Moeckel, G. W., Zent, R. and Harris, R. C. (2009). Distinct roles for basal and induced COX-2 in podocyte injury. *J Am Soc Nephrol***20**, 1953-62.
- Cheng, H., Fan, X., Moeckel, G. W. and Harris, R. C. (2011). Podocyte COX-2 exacerbates diabetic nephropathy by increasing podocyte (pro)renin receptor expression. *J Am Soc Nephrol***22**, 1240-51.
- Chini, E. N., Choi, E., Grande, J. P., Burnett, J. C. and Dousa, T. P. (1995). Adrenomedullin suppresses mitogenesis in rat mesangial cells via cAMP pathway. *Biochem Biophys Res Commun***215**, 868-73.
- Cho, M. H., Hong, E. H., Lee, T. H. and Ko, C. W. (2007). Pathophysiology of minimal change nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton)***12 Suppl 3**, S11-4.
- Chun, J., Kwon, T., Lee, E., Suh, P. G., Choi, E. J. and Sun Kang, S. (2002). The Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 2 mediates phosphorylation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun***298**, 207-15.
- Chung, A. C. and Lan, H. Y. (2011). Chemokines in renal injury. *J Am Soc Nephrol***22**, 802-9.
- Chung, S. S., Ho, E. C., Lam, K. S. and Chung, S. K. (2003). Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol***14**, S233-6.
- Clemens, T. L., Cormier, S., Eichinger, A., Endlich, K., Fiaschi-Taesch, N., Fischer, E., Friedman, P. A., Karaplis, A. C., Massfelder, T., Rossert, J. et al. (2001). Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets. *Br J Pharmacol***134**, 1113-36.
- Cok, S. J., Acton, S. J. and Morrison, A. R. (2003). The proximal region of the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 is recognized by a multimeric protein complex containing HuR, TIA-1, TIAR, and the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U. *J Biol Chem***278**, 36157-62.
- Colotta, F., Dower, S. K., Sims, J. E. and Mantovani, A. (1994). The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today***15**, 562-6.
- Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol***13**, 65-70.

- Courtoy, P. J., Kanwar, Y. S., Hynes, R. O. and Farquhar, M. G.** (1980). Fibronectin localization in the rat glomerulus. *J Cell Biol***87**, 691-6.
- Courtoy, P. J., Timpl, R. and Farquhar, M. G.** (1982). Comparative distribution of laminin, type IV collagen, and fibronectin in the rat glomerulus. *J Histochem Cytochem***30**, 874-86.
- Couser, W. G.** (2012). Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol***23**, 381-99.
- Coyne, D. W., Nickols, M., Bertrand, W. and Morrison, A. R.** (1992). Regulation of mesangial cell cyclooxygenase synthesis by cytokines and glucocorticoids. *Am J Physiol***263**, F97-102.
- Cruikshank, W. W., Kornfeld, H. and Center, D. M.** (2000). Interleukin-16. *J Leukoc Biol***67**, 757-66.
- Cruz Corchado, J. and Smith, R. J. H.** (1993). Dense Deposit Disease/Membranoproliferative Glomerulonephritis Type II.
- D'Agati, V. D., Fogo, A. B., Bruijn, J. A. and Jennette, J. C.** (2004). Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis***43**, 368-82.
- D'Agati, V. D., Kaskel, F. J. and Falk, R. J.** (2011). Focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med***365**, 2398-411.
- Damgaard, R. B. and Gyrd-Hansen, M.** (2011). Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in regulation of inflammation and innate immunity. *Discov Med***11**, 221-31.
- Daniel, C., Duffield, J., Brunner, T., Steinmann-Niggli, K., Lods, N. and Marti, H. P.** (2001). Matrix metalloproteinase inhibitors cause cell cycle arrest and apoptosis in glomerular mesangial cells. *J Pharmacol Exp Ther***297**, 57-68.
- Danilin, S., Sourbier, C., Thomas, L., Rothhut, S., Lindner, V., Helwig, J. J., Jacqmin, D., Lang, H. and Massfelder, T.** (2009). von Hippel-Lindau tumor suppressor gene-dependent mRNA stabilization of the survival factor parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma by the RNA-binding protein HuR. *Carcinogenesis***30**, 387-96.
- Daroux, M., Prevost, G., Maillard-Lefebvre, H., Gaxatte, C., D'Agati, V. D., Schmidt, A. M. and Boulanger, E.** (2010). Advanced glycation end-products: implications for diabetic and non-diabetic nephropathies. *Diabetes Metab***36**, 1-10.
- Darvill, A. M. and Ballardie, F. W.** (2006). Mesangial autoantigens in IgA nephropathy: matrix synthesis and localization. *J Lab Clin Med***147**, 301-9.
- Davis, L. K., Rodgers, B. D. and Kelley, K. M.** (2008). Angiotensin II- and glucose-stimulated extracellular matrix production: mediation by the insulin-like growth factor (IGF) axis in a murine mesangial cell line. *Endocrine***33**, 32-9.
- de Miguel, F., Fiaschi-Taesch, N., Lopez-Talavera, J. C., Takane, K. K., Massfelder, T., Helwig, J. J. and Stewart, A. F.** (2001). The C-terminal region of PTHrP, in addition to the nuclear localization signal, is essential for the intracrine stimulation of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology***142**, 4096-105.
- De Miguel, F., Martinez-Fernandez, P., Guillen, C., Valin, A., Rodrigo, A., Martinez, M. E. and Esbrit, P.** (1999). Parathyroid hormone-related protein (107-139) stimulates interleukin-6 expression in human osteoblastic cells. *J Am Soc Nephrol***10**, 796-803.
- de Zubiria Salgado, A. and Herrera-Diaz, C.** (2012). Lupus nephritis: an overview of recent findings. *Autoimmune Dis***2012**, 849684.
- Debiec, H., Guignonis, V., Mougnot, B., Haymann, J. P., Bensman, A., Deschenes, G. and Ronco, P. M.** (2003). Antenatal membranous glomerulonephritis with vascular injury induced by anti-neutral endopeptidase antibodies: toward new concepts in the pathogenesis of glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol***14 Suppl 1**, S27-32.
- Depuydt, B., van Loo, G., Vandenabeele, P. and Declercq, W.** (2005). Induction of apoptosis by TNF receptor 2 in a T-cell hybridoma is FADD dependent and blocked by caspase-8 inhibitors. *J Cell Sci***118**, 497-504.
- Dicker, F., Qwitterer, U., Winstel, R., Honold, K. and Lohse, M. J.** (1999). Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A***96**, 5476-81.
- Dillard, M. G., Tillman, R. L. and Sampson, C. C.** (1975). Lupus Nephritis. Correlations between the clinical course and presence of electron-dense deposits. *Lab Invest***32**, 261-9.

- Dinarelo, C. A.** (1998). Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci***856**, 1-11.
- Dinarelo, C. A. and Schindler, R.** (1990). Dissociation of transcription from translation of human IL-1-beta: the induction of steady state mRNA by adherence or recombinant C5a in the absence of translation. *Prog Clin Biol Res***349**, 195-204.
- Dinchuk, J. E., Car, B. D., Focht, R. J., Johnston, J. J., Jaffee, B. D., Covington, M. B., Contel, N. R., Eng, V. M., Collins, R. J., Czerniak, P. M. et al.** (1995). Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature***378**, 406-9.
- DiScipio, R. G., Daffern, P. J., Jagels, M. A., Broide, D. H. and Sriramarao, P.** (1999). A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion of rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol***162**, 1127-36.
- Dobolyi, A., Palkovits, M. and Usdin, T. B.** (2010). The TIP39-PTH2 receptor system: unique peptidergic cell groups in the brainstem and their interactions with central regulatory mechanisms. *Prog Neurobiol***90**, 29-59.
- Dube, G. K., Markowitz, G. S., Radhakrishnan, J., Appel, G. B. and D'Agati, V. D.** (2002). Minimal change disease in systemic lupus erythematosus. *Clin Nephrol***57**, 120-6.
- Duque, N., Gomez-Guerrero, C. and Egido, J.** (1997). Interaction of IgA with Fc alpha receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear factor-kappa B and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and IFN-inducible protein 10. *J Immunol***159**, 3474-82.
- Durvasula, R. V., Petermann, A. T., Hironaka, K., Blonski, M., Pippin, J., Mundel, P., Pichler, R., Griffin, S., Couser, W. G. and Shankland, S. J.** (2004). Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int***65**, 30-9.
- Durvasula, R. V. and Shankland, S. J.** (2008). Activation of a local renin angiotensin system in podocytes by glucose. *Am J Physiol Renal Physiol***294**, F830-9.
- Dyson, N.** (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev***12**, 2245-62.
- Elger, M., Drenckhahn, D., Nobiling, R., Mundel, P. and Kriz, W.** (1993). Cultured rat mesangial cells contain smooth muscle alpha-actin not found *in vivo*. *Am J Pathol***142**, 497-509.
- Endlich, K., Massfelder, T., Helwig, J. J. and Steinhausen, M.** (1995). Vascular effects of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in the split hydronephrotic rat kidney. *J Physiol***483 (Pt 2)**, 481-90.
- Endlich, N. and Endlich, K.** (2006). Stretch, tension and adhesion - adaptive mechanisms of the actin cytoskeleton in podocytes. *Eur J Cell Biol***85**, 229-34.
- Eremina, V., Cui, S., Gerber, H., Ferrara, N., Haigh, J., Nagy, A., Ema, M., Rossant, J., Jothy, S., Miner, J. H. et al.** (2006). Vascular endothelial growth factor signaling in the podocyte-endothelial compartment is required for mesangial cell migration and survival. *J Am Soc Nephrol***17**, 724-35.
- Eremina, V., Sood, M., Haigh, J., Nagy, A., Lajoie, G., Ferrara, N., Gerber, H. P., Kikkawa, Y., Miner, J. H. and Quaggin, S. E.** (2003). Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest***111**, 707-16.
- Ernandez, T. and Mayadas, T. N.** (2009). Immunoregulatory role of TNFalpha in inflammatory kidney diseases. *Kidney Int***76**, 262-76.
- Erwig, L. P., Kluth, D. C. and Rees, A. J.** (2001). Macrophages in renal inflammation. *Curr Opin Nephrol Hypertens***10**, 341-7.
- Erwig, L. P., Stewart, K. and Rees, A. J.** (2000). Macrophages from inflamed but not normal glomeruli are unresponsive to anti-inflammatory cytokines. *Am J Pathol***156**, 295-301.
- Esbrit, P., Alvarez-Arroyo, M. V., De Miguel, F., Martin, O., Martinez, M. E. and Caramelo, C.** (2000). C-terminal parathyroid hormone-related protein increases vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *J Am Soc Nephrol***11**, 1085-92.
- Everhart-Caye, M., Inzucchi, S. E., Guinness-Henry, J., Mitnick, M. A. and Stewart, A. F.** (1996). Parathyroid hormone (PTH)-related protein(1-36) is equipotent to PTH(1-34) in humans. *J Clin Endocrinol Metab***81**, 199-208.
- Faa, G., Gerosa, C., Fanni, D., Monga, G., Zaffanello, M., Van Eyken, P. and Fanos, V.** (2011). Morphogenesis and molecular mechanisms involved in human kidney development. *J Cell Physiol***227**, 1257-68.
- Falzon, M.** (1996). Serum stimulation of parathyroid hormone-related peptide gene expression in ROS 17/2.8 osteosarcoma cells through transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Endocrinology***137**, 3681-8.

- Falzon, M. and Du, P.** (2000). Enhanced growth of MCF-7 breast cancer cells overexpressing parathyroid hormone-related peptide. *Endocrinology***141**, 1882-92.
- Farquhar, M. G. and Palade, G. E.** (1962). FUNCTIONAL EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF A THIRD CELL TYPE IN THE RENAL GLOMERULUS : Phagocytosis of Filtration Residues by a Distinctive "Third" Cell. *J Cell Biol***13**, 55-87.
- Feghali, C. A. and Wright, T. M.** (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci***2**, d12-26.
- Feitoza, C. Q., Semedo, P., Goncalves, G. M., Cenedeze, M. A., Pinheiro, H. S., Dos Santos, O. F., Landgraf, R. G., Pacheco-Silva, A. and Camara, N. O.** (2009). Modulation of inflammatory response by selective inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in acute kidney injury. *Inflamm Res***59**, 167-75 abstract.
- Feld, S. M., Hirschberg, R., Artishevsky, A., Nast, C. and Adler, S. G.** (1995). Insulin-like growth factor I induces mesangial proliferation and increases mRNA and secretion of collagen. *Kidney Int***48**, 45-51.
- Fenton, A. J., Kemp, B. E., Kent, G. N., Moseley, J. M., Zheng, M. H., Rowe, D. J., Britto, J. M., Martin, T. J. and Nicholson, G. C.** (1991). A carboxyl-terminal peptide from the parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology***129**, 1762-8.
- Ferguson, J. E., 2nd, Seaner, R. M., Bruns, D. E. and Bruns, M. E.** (1995). Interleukin-1 beta and interleukin-4 increase parathyroid hormone-related protein secretion by human umbilical vein endothelial cells in culture. *Am J Obstet Gynecol***173**, 448-55; discussion 455-6.
- Fero, M. L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C. E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L. H., Broudy, V., Perlmutter, R. M. et al.** (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell***85**, 733-44.
- Fiaschi-Taesch, N., Sicari, B. M., Ubriani, K., Bigatel, T., Takane, K. K., Cozar-Castellano, I., Bisello, A., Law, B. and Stewart, A. F.** (2006). Cellular mechanism through which parathyroid hormone-related protein induces proliferation in arterial smooth muscle cells: definition of an arterial smooth muscle PTHrP/p27kip1 pathway. *Circ Res***99**, 933-42.
- Fiaschi-Taesch, N., Takane, K. K., Masters, S., Lopez-Talavera, J. C. and Stewart, A. F.** (2004). Parathyroid-hormone-related protein as a regulator of pRb and the cell cycle in arterial smooth muscle. *Circulation***110**, 177-85.
- Fish, A. J., Michael, A. F., Vernier, R. L. and Brown, D. M.** (1975). Human glomerular cells in tissue culture. *Lab Invest***33**, 330-41.
- 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.
- Floege, J., Eng, E., Lindner, V., Alpers, C. E., Young, B. A., Reidy, M. A. and Johnson, R. J.** (1992). Rat glomerular mesangial cells synthesize basic fibroblast growth factor. Release, upregulated synthesis, and mitogenicity in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Clin Invest***90**, 2362-9.
- Floege, J., Eng, E., Young, B. A. and Johnson, R. J.** (1993). Factors involved in the regulation of mesangial cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Kidney Int Suppl***39**, S47-54.
- Floege, J., Radeke, H. R. and Johnson, R. J.** (1994). Glomerular cells *in vitro* versus the glomerulus *in vivo*. *Kidney Int***45**, 360-8.
- Floege, J., Topley, N., Wessel, K., Kaefer, V., Radeke, H., Hoppe, J., Kishimoto, T. and Resch, K.** (1990). Monokines and platelet-derived growth factor modulate prostanoid production in growth arrested, human mesangial cells. *Kidney Int***37**, 859-69.
- Foo, S. S., Turner, C. J., Adams, S., Compagni, A., Aubyn, D., Kogata, N., Lindblom, P., Shani, M., Zicha, D. and Adams, R. H.** (2006). Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell***124**, 161-73.
- Frische, S.** (2011). Glomerular filtration rate in early diabetes: ongoing discussions of causes and mechanisms. *J Nephrol***24**, 537-40.
- Fukami, K., Ueda, S., Yamagishi, S., Kato, S., Inagaki, Y., Takeuchi, M., Motomiya, Y., Bucala, R., Iida, S., Tamaki, K. et al.** (2004). AGEs activate mesangial TGF-beta-Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction. *Kidney Int***66**, 2137-47.
- Funk, J. L., Cordaro, L. A., Wei, H., Benjamin, J. B. and Yocum, D. E.** (1998). Synovium as a source of increased amino-terminal parathyroid hormone-related protein expression in rheumatoid arthritis. A possible

role for locally produced parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **101**, 1362-71.

Funk, J. L., Krul, E. J., Moser, A. H., Shigenaga, J. K., Strewler, G. J., Grunfeld, C. and Feingold, K. R. (1993). Endotoxin increases parathyroid hormone-related protein mRNA levels in mouse spleen. Mediation by tumor necrosis factor. *J Clin Invest* **92**, 2546-52.

Funk, J. L., Lausier, J., Moser, A. H., Shigenaga, J. K., Huling, S., Nissenson, R. A., Strewler, G. J., Grunfeld, C. and Feingold, K. R. (1995). Endotoxin induces parathyroid hormone-related protein gene expression in splenic stromal and smooth muscle cells, not in splenic lymphocytes. *Endocrinology* **136**, 3412-21.

Funk, J. L., Moser, A. H., Grunfeld, C. and Feingold, K. R. (1997). Parathyroid hormone-related protein is induced in the adult liver during endotoxemia and stimulates the hepatic acute phase response. *Endocrinology* **138**, 2665-73.

Funk, J. L., Moser, A. H., Strewler, G. J., Feingold, K. R. and Grunfeld, C. (1996). Parathyroid hormone-related protein is induced during lethal endotoxemia and contributes to endotoxin-induced mortality in rodents. *Mol Med* **2**, 204-10.

Funk, J. L., Shigenaga, J. K., Moser, A. H., Krul, E. J., Strewler, G. J., Feingold, K. R. and Grunfeld, C. (1994). Cytokine regulation of parathyroid hormone-related protein messenger ribonucleic acid levels in mouse spleen: paradoxical effects of interferon-gamma and interleukin-4. *Endocrinology* **135**, 351-8.

Gaggar, A., Jackson, P. L., Noerager, B. D., O'Reilly, P. J., McQuaid, D. B., Rowe, S. M., Clancy, J. P. and Blalock, J. E. (2008). A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *J Immunol* **180**, 5662-9.

Gagiannis, S., Muller, M., Uhlemann, S., Koch, A., Melino, G., Krammer, P. H., Nawroth, P. P., Brune, M. and Schilling, T. (2009). Parathyroid hormone-related protein confers chemoresistance by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. *Int J Cancer* **125**, 1551-7.

Gaich, G., Orloff, J. J., Atilasoy, E. J., Burtis, W. J., Ganz, M. B. and Stewart, A. F. (1993). Amino-terminal parathyroid hormone-related protein: specific binding and cytosolic calcium responses in rat insulinoma cells. *Endocrinology* **132**, 1402-9.

Gaipi, U. S., Voll, R. E., Sheriff, A., Franz, S., Kalden, J. R. and Herrmann, M. (2005). Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* **4**, 189-94.

Garcia-Ocana, A., De Miguel, F., Penaranda, C., Albar, J. P., Sarasa, J. L. and Esbrit, P. (1995). Parathyroid hormone-related protein is an autocrine modulator of rabbit proximal tubule cell growth. *J Bone Miner Res* **10**, 1875-84.

Garcia-Ocana, A., Galbraith, S. C., Van Why, S. K., Yang, K., Golovyan, L., Dann, P., Zager, R. A., Stewart, A. F., Siegel, N. J. and Orloff, J. J. (1999). Expression and role of parathyroid hormone-related protein in human renal proximal tubule cells during recovery from ATP depletion. *J Am Soc Nephrol* **10**, 238-44.

Gariani, K., de Seigneux, S., Pechere-Bertschi, A., Philippe, J. and Martin, P. Y. (2012). [Diabetic nephropathy: an update]. *Rev Med Suisse* **8**, 473-9.

Gaur, U. and Aggarwal, B. B. (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* **66**, 1403-8.

Gessi, M., Monego, G., Lauriola, L., Maggiano, N. and Ranelletti, F. O. (2005). Parathyroid hormone-related peptide (hPTHrP) and parathyroid hormone-related peptide receptor type 1 (PTHr1) expression in human thymus. *J Histochem Cytochem* **53**, 955-62.

Ghayur, M. N., Krepinsky, J. C. and Janssen, L. J. (2008). Contractility of the Renal Glomerulus and Mesangial Cells: Lingerin Doubts and Strategies for the Future. *Med Hypotheses Res* **4**, 1-9.

Ghosh Choudhury, G., Lenin, M., Calhaun, C., Zhang, J. H. and Abboud, H. E. (2003). PDGF inactivates forkhead family transcription factor by activation of Akt in glomerular mesangial cells. *Cell Signal* **15**, 161-70.

Gillespie, M. T. and Martin, T. J. (1994). The parathyroid hormone-related protein gene and its expression. *Mol Cell Endocrinol* **100**, 143-7.

Giunti, S., Barit, D. and Cooper, M. E. (2006). Mechanisms of diabetic nephropathy: role of hypertension. *Hypertension* **48**, 519-26.

Glassock, R. J. (2008). IgA nephropathy: challenges and opportunities. *Cleve Clin J Med* **75**, 569-76.

Glassock, R. J. (2012). The pathogenesis of membranous nephropathy: evolution and revolution. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **21**, 235-42.

- Gomez-Guerrero, C., Lopez-Armada, M. J., Gonzalez, E. and Egido, J.** (1994). Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF-alpha and IL-6, and proliferation. *J Immunol***153**, 5247-55.
- Goruppi, S., Bonventre, J. V. and Kyriakis, J. M.** (2002). Signaling pathways and late-onset gene induction associated with renal mesangial cell hypertrophy. *EMBO J***21**, 5427-36.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K. et al.** (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell***83**, 793-802.
- Griffin, S. V., Pichler, R., Dittrich, M., Durvasula, R. and Shankland, S. J.** (2003). Cell cycle control in glomerular disease. *Springer Semin Immunopathol***24**, 441-57.
- Grill, V., Hillary, J., Ho, P. M., Law, F. M., MacIsaac, R. J., MacIsaac, I. A., Moseley, J. M. and Martin, T. J.** (1992). Parathyroid hormone-related protein: a possible endocrine function in lactation. *Clin Endocrinol (Oxf)***37**, 405-10.
- Gruden, G., Setti, G., Hayward, A., Sugden, D., Duggan, S., Burt, D., Buckingham, R. E., Gnudi, L. and Viberti, G.** (2005). Mechanical stretch induces monocyte chemoattractant activity via an NF-kappaB-dependent monocyte chemoattractant protein-1-mediated pathway in human mesangial cells: inhibition by rosiglitazone. *J Am Soc Nephrol***16**, 688-96.
- Guerreiro, P. M., Renfro, J. L., Power, D. M. and Canario, A. V.** (2007). The parathyroid hormone family of peptides: structure, tissue distribution, regulation, and potential functional roles in calcium and phosphate balance in fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol***292**, R679-96.
- Guillen, C., Martinez, P., de Gortazar, A. R., Martinez, M. E. and Esbrit, P.** (2002). Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein increase interleukin-6 by nuclear factor-kappa B activation in osteoblastic cells. *J Biol Chem***277**, 28109-17.
- Guo, Y. L., Kang, B., Han, J. and Williamson, J. R.** (2001). p38beta MAP kinase protects rat mesangial cells from TNF-alpha-induced apoptosis. *J Cell Biochem***82**, 556-65.
- Gupta, A., Pendyala, P., Arora, P. and Sitrin, M. D.** (2010). Development of the nephrotic syndrome during treatment of Crohn's disease with adalimumab. *J Clin Gastroenterol***45**, e30-3.
- Guthalu Kondegowda, N., Joshi-Gokhale, S., Harb, G., Williams, K., Zhang, X. Y., Takane, K. K., Zhang, P., Scott, D. K., Stewart, A. F., Garcia-Ocana, A. et al.** (2010). Parathyroid hormone-related protein enhances human ss-cell proliferation and function with associated induction of cyclin-dependent kinase 2 and cyclin E expression. *Diabetes***59**, 3131-8.
- Habener, J. F., Rosenblatt, M. and Potts, J. T., Jr.** (1984). Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol Rev***64**, 985-1053.
- Hafdi, Z., Lesavre, P., Tharaux, P. L., Bessou, G., Baruch, D. and Halbwachs-Mecarelli, L.** (1997). Role of alpha v integrins in mesangial cell adhesion to vitronectin and von Willebrand factor. *Kidney Int***51**, 1900-7.
- Hagege, J., Peraldi, M. N., Rondeau, E., Adida, C., Delarue, F., Medcalf, R., Schleuning, W. D. and Sraer, J. D.** (1992). Plasminogen activator inhibitor-1 deposition in the extracellular matrix of cultured human mesangial cells. *Am J Pathol***141**, 117-28.
- Hanada, M., Feng, J. and Hemmings, B. A.** (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta***1697**, 3-16.
- Hanratty, R., Chonchol, M., Miriam Dickinson, L., Beaty, B. L., Estacio, R. O., Mackenzie, T. D., Hurley, L. P., Linas, S. L., Steiner, J. F. and Havranek, E. P.** (2010). Incident chronic kidney disease and the rate of kidney function decline in individuals with hypertension. *Nephrol Dial Transplant***25**, 801-7.
- Hansen, K. M., Berfield, A. K., Spicer, D. and Abrass, C. K.** (1998). Rat mesangial cells express two unique isoforms of laminin which modulate mesangial cell phenotype. *Matrix Biol***17**, 117-30.
- Hao, C. M. and Breyer, M. D.** (2008). Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol***70**, 357-77.
- Hartner, A., Marek, I., Cordasic, N., Haas, C., Schocklmann, H., Hulsmann-Volkert, G., Plasa, I., Rascher, W., Hilgers, K. F. and Amann, K.** (2008). Glomerular regeneration is delayed in nephritic alpha 8-integrin-deficient mice: contribution of alpha 8-integrin to the regulation of mesangial cell apoptosis. *Am J Nephrol***28**, 168-78.
- Haseley, L. A., Hugo, C., Reidy, M. A. and Johnson, R. J.** (1999). Dissociation of mesangial cell migration and proliferation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int***56**, 964-72.

- Hastings, R. H.** (2004). Parathyroid hormone-related protein and lung biology. *Respir Physiol Neurobiol***142**, 95-113.
- Hastings, R. H., Araiza, F., Burton, D. W., Bedley, M. and Deftos, L. J.** (2004). Parathyroid hormone-related protein regulates apoptosis in lung cancer cells through protein kinase A. *Am J Physiol Cell Physiol***287**, C1616-22.
- Hastings, R. H., Araiza, F., Burton, D. W., Zhang, L., Bedley, M. and Deftos, L. J.** (2003a). Parathyroid hormone-related protein ameliorates death receptor-mediated apoptosis in lung cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol***285**, C1429-36.
- Hastings, R. H., Burton, D. W., Quintana, R. A., Biederman, E., Gujral, A. and Deftos, L. J.** (2001). Parathyroid hormone-related protein regulates the growth of orthotopic human lung tumors in athymic mice. *Cancer***92**, 1402-10.
- Hastings, R. H., Quintana, R. A., Sandoval, R., Duey, D., Rascon, Y., Burton, D. W. and Deftos, L. J.** (2003b). Proapoptotic effects of parathyroid hormone-related protein in type II pneumocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol***29**, 733-42.
- Hayakawa, K., Hiramatsu, N., Okamura, M., Yamazaki, H., Nakajima, S., Yao, J., Paton, A. W., Paton, J. C. and Kitamura, M.** (2009). Acquisition of anergy to proinflammatory cytokines in nonimmune cells through endoplasmic reticulum stress response: a mechanism for subsidence of inflammation. *J Immunol***182**, 1182-91.
- Hayakawa, K., Meng, Y., Hiramatsu, N., Kasai, A., Yamauchi, K., Yao, J. and Kitamura, M.** (2006). Priming of glomerular mesangial cells by activated macrophages causes blunted responses to proinflammatory stimuli. *J Immunol***176**, 2529-37.
- Hayden, M. S. and Ghosh, S.** (2012). NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev***26**, 203-34.
- He, B., Deckelbaum, R. A., Miao, D., Lipman, M. L., Pollak, M., Goltzman, D. and Karaplis, A. C.** (2001). Tissue-specific targeting of the pthrp gene: the generation of mice with floxed alleles. *Endocrinology***142**, 2070-7.
- Heath, J. K., Southby, J., Fukumoto, S., O'Keeffe, L. M., Martin, T. J. and Gillespie, M. T.** (1995). Epidermal growth factor-stimulated parathyroid hormone-related protein expression involves increased gene transcription and mRNA stability. *Biochem J***307 (Pt 1)**, 159-67.
- Hehlgans, T. and Pfeffer, K.** (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology***115**, 1-20.
- Henderson, J. E., Amizuka, N., Warshawsky, H., Biasotto, D., Lanske, B. M., Goltzman, D. and Karaplis, A. C.** (1995). Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. *Mol Cell Biol***15**, 4064-75.
- Hengartner, M. O.** (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature***407**, 770-6.
- Hidalgo, L. G., Sis, B., Sellares, J., Campbell, P. M., Mengel, M., Einecke, G., Chang, J. and Halloran, P. F.** (2010). NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant***10**, 1812-22.
- Hirahashi, J., Takayanagi, A., Hishikawa, K., Takase, O., Chikaraishi, A., Hayashi, M., Shimizu, N. and Saruta, T.** (2000). Overexpression of truncated I kappa B alpha potentiates TNF-alpha-induced apoptosis in mesangial cells. *Kidney Int***57**, 959-68.
- Hirumura, K., Monkawa, T., Petermann, A. T., Durvasula, R. V. and Shankland, S. J.** (2002a). Insulin is a potent survival factor in mesangial cells: role of the PI3-kinase/Akt pathway. *Kidney Int***61**, 1312-21.
- Hirumura, K., Pippin, J. W., Blonski, M. J., Roberts, J. M. and Shankland, S. J.** (2002b). The subcellular localization of cyclin dependent kinase 2 determines the fate of mesangial cells: role in apoptosis and proliferation. *Oncogene***21**, 1750-8.
- Hirumura, K., Pippin, J. W., Fero, M. L., Roberts, J. M. and Shankland, S. J.** (1999). Modulation of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *J Clin Invest***103**, 597-604.
- Hirota, K., Ahlfors, H., Duarte, J. H. and Stockinger, B.** (2012). Regulation and function of innate and adaptive interleukin-17-producing cells. *EMBO Rep***13**, 113-20.
- Hoare, S. R. and Usdin, T. B.** (2001). Molecular mechanisms of ligand recognition by parathyroid hormone 1 (PTH1) and PTH2 receptors. *Curr Pharm Des***7**, 689-713.

- Hochheiser, K., Tittel, A. and Kurts, C.** (2011). Kidney dendritic cells in acute and chronic renal disease. *Int J Exp Pathol***92**, 193-201.
- Hoey, R. P., Sanderson, C., Iddon, J., Brady, G., Bundred, N. J. and Anderson, N. G.** (2003). The parathyroid hormone-related protein receptor is expressed in breast cancer bone metastases and promotes autocrine proliferation in breast carcinoma cells. *Br J Cancer***88**, 567-73.
- Hoffman, H. M. and Wanderer, A. A.** (2010). Inflammasome and IL-1beta-mediated disorders. *Curr Allergy Asthma Rep***10**, 229-35.
- Hongo, T., Kupfer, J., Enomoto, H., Sharifi, B., Giannella-Neto, D., Forrester, J. S., Singer, F. R., Goltzman, D., Hendy, G. N., Pirola, C. et al.** (1991). Abundant expression of parathyroid hormone-related protein in primary rat aortic smooth muscle cells accompanies serum-induced proliferation. *J Clin Invest***88**, 1841-7.
- Hori, Y., Katoh, T., Hirakata, M., Joki, N., Kaname, S., Fukagawa, M., Okuda, T., Ohashi, H., Fujita, T., Miyazono, K. et al.** (1998). Anti-latent TGF-beta binding protein-1 antibody or synthetic oligopeptides inhibit extracellular matrix expression induced by stretch in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int***53**, 1616-25.
- Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G. and Goeddel, D. V.** (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell***84**, 299-308.
- Hu, Q. H., Zhang, X., Pan, Y., Li, Y. C. and Kong, L. D.** (2012). Allopurinol, quercetin and rutin ameliorate renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation in fructose-fed rats. *Biochem Pharmacol***84**, 113-25.
- Huang, J. and Siragy, H. M.** (2009). Glucose promotes the production of interleukine-1beta and cyclooxygenase-2 in mesangial cells via enhanced (Pro)renin receptor expression. *Endocrinology***150**, 5557-65.
- Hugo, C., Shankland, S. J., Bowen-Pope, D. F., Couser, W. G. and Johnson, R. J.** (1997). Extraglomerular origin of the mesangial cell after injury. A new role of the juxtaglomerular apparatus. *J Clin Invest***100**, 786-94.
- Hugo, C. P., Pichler, R. P., Schulze-Lohoff, E., Prols, F., Adler, S., Krutsch, H. C., Murphy-Ullrich, J. E., Couser, W. G., Roberts, D. D. and Johnson, R. J.** (1999). Thrombospondin peptides are potent inhibitors of mesangial and glomerular endothelial cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Kidney Int***55**, 2236-49.
- Hyink, D. P., Tucker, D. C., St John, P. L., Leardkamolkarn, V., Accavitti, M. A., Abrass, C. K. and Abrahamson, D. R.** (1996). Endogenous origin of glomerular endothelial and mesangial cells in grafts of embryonic kidneys. *Am J Physiol***270**, F886-99.
- Iitaka, K., Moriya, S., Nakamura, S., Tomonaga, K. and Sakai, T.** (2002). Long-term follow-up of type III membranoproliferative glomerulonephritis in children. *Pediatr Nephrol***17**, 373-8.
- Ikeda, K., Okazaki, R., Inoue, D., Ogata, E. and Matsumoto, T.** (1993a). Transcription of the gene for parathyroid hormone-related peptide from the human is activated through a cAMP-dependent pathway by prostaglandin E1 in HTLV-I-infected T cells. *J Biol Chem***268**, 1174-9.
- Ikeda, K., Okazaki, R., Inoue, D., Ohno, H., Ogata, E. and Matsumoto, T.** (1993b). Interleukin-2 increases production and secretion of parathyroid hormone-related peptide by human T cell leukemia virus type I-infected T cells: possible role in hypercalcemia associated with adult T cell leukemia. *Endocrinology***132**, 2551-6.
- Ikehara, K., Tada, H., Kuboki, K. and Inokuchi, T.** (2003). Role of protein kinase C-angiotensin II pathway for extracellular matrix production in cultured human mesangial cells exposed to high glucose levels. *Diabetes Res Clin Pract***59**, 25-30.
- Ikezumi, Y., Suzuki, T., Karasawa, T., Hasegawa, H., Yamada, T., Imai, N., Narita, I., Kawachi, H., Polkinghorne, K. R., Nikolic-Paterson, D. J. et al.** (2011). Identification of alternatively activated macrophages in new-onset paediatric and adult immunoglobulin A nephropathy: potential role in mesangial matrix expansion. *Histopathology***58**, 198-210.
- Imai, H., Hamai, K., Komatsuda, A., Ohtani, H. and Miura, A. B.** (1997a). IgG subclasses in patients with membranoproliferative glomerulonephritis, membranous nephropathy, and lupus nephritis. *Kidney Int***51**, 270-6.
- Imai, T., Baba, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S. and Yoshie, O.** (1997b). The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem***272**, 15036-42.
- Imasawa, T., Utsunomiya, Y., Kawamura, T., Zhong, Y., Nagasawa, R., Okabe, M., Maruyama, N., Hosoya, T. and Ohno, T.** (2001). The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol***12**, 1401-9.
- Inoshita, S., Terada, Y., Nakashima, O., Kuwahara, M., Sasaki, S. and Marumo, F.** (1999). Regulation of the G1/S transition phase in mesangial cells by E2F1. *Kidney Int***56**, 1238-41.

- Ishaque, A., Dunn, M. J. and Sorokin, A.** (2003). Cyclooxygenase-2 inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in renal glomerular mesangial cells. *J Biol Chem***278**, 10629-40.
- Ishikawa, M., Akishita, M., Kozaki, K., Toba, K., Namiki, A., Yamaguchi, T., Orimo, H. and Ouchi, Y.** (1998). Amino-terminal fragment (1-34) of parathyroid hormone-related protein inhibits migration and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis***136**, 59-66.
- Ishikawa, M., Ouchi, Y., Han, S. Z., Akishita, M., Kozaki, K., Toba, K., Namiki, A., Yamaguchi, T. and Orimo, H.** (1994). Parathyroid hormone-related protein reduces cytosolic free Ca²⁺ level and tension in rat aortic smooth muscle. *Eur J Pharmacol***269**, 311-7.
- Ishimoto, T., Shimada, M., Araya, C. E., Huskey, J., Garin, E. H. and Johnson, R. J.** (2011). Minimal change disease: a CD80 podocytopathy? *Semin Nephrol***31**, 320-5.
- Ishino, T., Kobayashi, R., Wakui, H., Fukushima, Y., Nakamoto, Y. and Miura, A. B.** (1991). Biochemical characterization of contractile proteins of rat cultured mesangial cells. *Kidney Int***39**, 1118-24.
- Issandou, M. and Darbon, J. M.** (1991). Basic fibroblast growth factor stimulates glomerular mesangial cell proliferation through a protein kinase C-independent pathway. *Growth Factors***5**, 255-64.
- Ito, C., Yamamoto, H., Furukawa, Y., Takeda, S., Akimoto, T., Iimura, O., Ando, Y., Asano, Y. and Kusano, E.** (2004). Role of cyclins in cAMP inhibition of glomerular mesangial cell proliferation. *Clin Sci (Lond)***107**, 81-7.
- Ito, T., Suzuki, A., Imai, E., Okabe, M. and Hori, M.** (2001). Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol***12**, 2625-35.
- Iwanaga, R., Komori, H., Ishida, S., Okamura, N., Nakayama, K., Nakayama, K. I. and Ohtani, K.** (2006). Identification of novel E2F1 target genes regulated in cell cycle-dependent and independent manners. *Oncogene***25**, 1786-98.
- Iyoda, M., Shibata, T., Kawaguchi, M., Hizawa, N., Yamaoka, T., Kokubu, F. and Akizawa, T.** (2010). IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF-alpha and IL-1beta. *Am J Physiol Renal Physiol***298**, F779-87.
- Izquierdo, A., Lopez-Luna, P., Ortega, A., Romero, M., Guitierrez-Tarres, M. A., Arribas, I., Alvarez, M. J., Esbrit, P. and Bosch, R. J.** (2006). The parathyroid hormone-related protein system and diabetic nephropathy outcome in streptozotocin-induced diabetes. *Kidney Int***69**, 2171-7.
- Jarrous, N. and Kaempfer, R.** (1994). Induction of human interleukin-1 gene expression by retinoic acid and its regulation at processing of precursor transcripts. *J Biol Chem***269**, 23141-9.
- Jefferson, J. A., Shankland, S. J. and Pichler, R. H.** (2008). Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney Int***74**, 22-36.
- Jiang, B., Morimoto, S., Fukuo, K., Yasuda, O., Chen, S. and Ogihara, T.** (1995). Role of parathyroid hormone-related protein in the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Miner Electrolyte Metab***21**, 157-60.
- Jiang, T., Che, Q., Lin, Y., Li, H. and Zhang, N.** (2006). Aldose reductase regulates TGF-beta1-induced production of fibronectin and type IV collagen in cultured rat mesangial cells. *Nephrology (Carlton)***11**, 105-12.
- Joun, H., Lanske, B., Karperien, M., Qian, F., Defize, L. and Abou-Samra, A.** (1997). Tissue-specific transcription start sites and alternative splicing of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptor gene: a new PTH/PTHrP receptor splice variant that lacks the signal peptide. *Endocrinology***138**, 1742-9.
- Juppner, H.** (1995). Functional properties of the PTH/PTHrP receptor. *Bone***17**, 39S-42S.
- Juppner, H.** (2000). Role of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in skeletal development. *Pediatr Nephrol***14**, 606-11.
- Kakonen, S. M., Selander, K. S., Chirgwin, J. M., Yin, J. J., Burns, S., Rankin, W. A., Grubbs, B. G., Dallas, M., Cui, Y. and Guise, T. A.** (2002). Transforming growth factor-beta stimulates parathyroid hormone-related protein and osteolytic metastases via Smad and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem***277**, 24571-8.
- Kalaaji, M., Mortensen, E., Jorgensen, L., Olsen, R. and Rekvig, O. P.** (2006). Nephritogenic lupus antibodies recognize glomerular basement membrane-associated chromatin fragments released from apoptotic intraglomerular cells. *Am J Pathol***168**, 1779-92.
- Kalinowski, L., Dobrucki, L. W. and Malinski, T.** (2001). Nitric oxide as a second messenger in parathyroid hormone-related protein signaling. *J Endocrinol***170**, 433-40.

- Kaneko, K., Nanki, T., Hosoya, T., Mizoguchi, F. and Miyasaka, N.** (2010). Etanercept-induced necrotizing crescentic glomerulonephritis in two patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol***20**, 632-6.
- Kang, B. P., Frencher, S., Reddy, V., Kessler, A., Malhotra, A. and Meggs, L. G.** (2003). High glucose promotes mesangial cell apoptosis by oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol***284**, F455-66.
- Kanwar, Y. S., Jakubowski, M. L. and Rosenzweig, L. J.** (1983). Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the glomerular basement membrane and mesangial matrix. *Eur J Cell Biol***31**, 290-5.
- Karaplis, A. C., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R. T., Tybulewicz, V. L., Kronenberg, H. M. and Mulligan, R. C.** (1994). Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev***8**, 277-89.
- Karkar, A. M., Koshino, Y., Cashman, S. J., Dash, A. C., Bonnefoy, J., Meager, A. and Rees, A. J.** (1992). Passive immunization against tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and IL-1 beta protects from LPS enhancing glomerular injury in nephrotoxic nephritis in rats. *Clin Exp Immunol***90**, 312-8.
- Katz, A., Fish, A. J., Kleppel, M. M., Hagen, S. G., Michael, A. F. and Butkowski, R. J.** (1991). Renal entactin (nidogen): isolation, characterization and tissue distribution. *Kidney Int***40**, 643-52.
- Katz, M. S., Gutierrez, G. E., Mundy, G. R., Hymer, T. K., Caulfield, M. P. and McKee, R. L.** (1992). Tumor necrosis factor and interleukin 1 inhibit parathyroid hormone-responsive adenylate cyclase in clonal osteoblast-like cells by down-regulating parathyroid hormone receptors. *J Cell Physiol***153**, 206-13.
- Kaushik, P., Rahmani, M. and Ellison, W.** (2011). Membranous glomerulonephritis with the use of etanercept in ankylosing spondylitis. *Ann Pharmacother***45**, e62.
- Kendrick, J. and Chonchol, M. B.** (2008). Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol***4**, 672-81.
- Kiffel, J., Rahimzada, Y. and Trachtman, H.** (2011). Focal segmental glomerulosclerosis and chronic kidney disease in pediatric patients. *Adv Chronic Kidney Dis***18**, 332-8.
- Kikkawa, Y., Virtanen, I. and Miner, J. H.** (2003). Mesangial cells organize the glomerular capillaries by adhering to the G domain of laminin alpha5 in the glomerular basement membrane. *J Cell Biol***161**, 187-96.
- Kiritoshi, S., Nishikawa, T., Sonoda, K., Kukidome, D., Senokuchi, T., Matsuo, T., Matsumura, T., Tokunaga, H., Brownlee, M. and Araki, E.** (2003). Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Diabetes***52**, 2570-7.
- Kitahara, T., Hiromura, K., Ikeuchi, H., Yamashita, S., Kobayashi, S., Kuroiwa, T., Kaneko, Y., Ueki, K. and Nojima, Y.** (2005). Mesangial cells stimulate differentiation of endothelial cells to form capillary-like networks in a three-dimensional culture system. *Nephrol Dial Transplant***20**, 42-9.
- Kitamura, M. and Suto, T. S.** (1997). TGF-beta and glomerulonephritis: anti-inflammatory versus pro-sclerotic actions. *Nephrol Dial Transplant***12**, 669-79.
- Kobayashi, Y., Yamamoto, K., Saïdo, T., Kawasaki, H., Oppenheim, J. J. and Matsushima, K.** (1990). Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A***87**, 5548-52.
- Kochlatyi, S., Gibbons, N. and Mattana, J.** (2002). Extracellular matrix oxidation modulates survival, NF-kappaB translocation, and MAPK activity in mesangial cells. *Exp Mol Pathol***73**, 191-7.
- Kohno, M., Yasunari, K., Yokokawa, K., Horio, T., Ikeda, M., Kano, H., Minami, M., Hanehira, T. and Yoskikawa, J.** (1996). Interaction of adrenomedullin and platelet-derived growth factor on rat mesangial cell production of endothelin. *Hypertension***27**, 663-7.
- Kontoyiannis, D. and Kollias, G.** (2000). Accelerated autoimmunity and lupus nephritis in NZB mice with an engineered heterozygous deficiency in tumor necrosis factor. *Eur J Immunol***30**, 2038-47.
- Kopple, J. D.** (2010). Obesity and chronic kidney disease. *J Ren Nutr***20**, S29-30.
- Kortge, P., Schurholz, J. and Scholl, A.** (1969). [Contribution to the mesangial cells and the visceral epithelial cells to the production of the basement-membrane of the glomerular capillaries]. *Verh Dtsch Ges Pathol***53**, 384-90.
- Kreidberg, J. A., Donovan, M. J., Goldstein, S. L., Rennke, H., Shepherd, K., Jones, R. C. and Jaenisch, R.** (1996). Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development***122**, 3537-3547.
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I. and Lu, S. D.** (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell***53**, 45-53.

- Kriz, W., Elger, M., Lemley, K. and Sakai, T.** (1990a). Structure of the glomerular mesangium: a biomechanical interpretation. *Kidney Int Suppl***30**, S2-9.
- Kriz, W., Elger, M., Lemley, K. V. and Sakai, T.** (1990b). Mesangial cell-glomerular basement membrane connections counteract glomerular capillary and mesangium expansion. *Am J Nephrol***10 Suppl 1**, 4-13.
- Kriz, W., Hackenthal, E., Nobiling, R., Sakai, T., Elger, M. and Hahnel, B.** (1994). A role for podocytes to counteract capillary wall distension. *Kidney Int***45**, 369-76.
- Krotz, F.** (2011). TNF receptor subtype 2 induction by viral dsRNA involves IP-10 and TNF-alpha in glomerular mesangial inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol***301**, F55-6.
- Kubo, A., Iwano, M., Kobayashi, Y., Kyoda, Y., Isumi, Y., Maruyama, N., Samejima, K., Dohi, Y., Minamino, N. and Yonemasu, K.** (2002). *In vitro* effects of Habu snake venom on cultured mesangial cells. *Nephron***92**, 665-72.
- Lai, K. N., Leung, J. C., Chan, L. Y., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Lai, F. M. and Tang, S. C.** (2008). Activation of podocytes by mesangial-derived TNF-alpha: glomerulo-podocytic communication in IgA nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol***294**, F945-55.
- Lai, K. N., Leung, J. C., Chan, L. Y., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Tam, K. Y., Xiao, J., Lai, F. M. and Tang, S. C.** (2009). Podocyte injury induced by mesangial-derived cytokines in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant***24**, 62-72.
- Lai, K. N., Tang, S. C., Guh, J. Y., Chuang, T. D., Lam, M. F., Chan, L. Y., Tsang, A. W. and Leung, J. C.** (2003). Polymeric IgA1 from patients with IgA nephropathy upregulates transforming growth factor-beta synthesis and signal transduction in human mesangial cells via the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol***14**, 3127-37.
- Lakkis, F. G., Baddoura, F. K., Cruet, E. N., Parekh, K. R., Fukunaga, M. and Munger, K. A.** (1996). Anti-inflammatory lymphokine mRNA expression in antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int***49**, 117-26.
- Lam, M. H., Briggs, L. J., Hu, W., Martin, T. J., Gillespie, M. T. and Jans, D. A.** (1999). Importin beta recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin alpha. *J Biol Chem***274**, 7391-8.
- Lam, M. H., Henderson, B., Gillespie, M. T. and Jans, D. A.** (2001). Dynamics of leptomycin B-sensitive nucleocytoplasmic flux of parathyroid hormone-related protein. *Traffic***2**, 812-9.
- Langenbach, R., Morham, S. G., Tian, H. F., Loftin, C. D., Ghanayem, B. I., Chulada, P. C., Mahler, J. F., Lee, C. A., Goulding, E. H., Kluckman, K. D. et al.** (1995). Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell***83**, 483-92.
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A. and Cua, D. J.** (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med***201**, 233-40.
- Largo, R., Gomez-Garre, D., Santos, S., Penaranda, C., Blanco, J., Esbrit, P. and Egido, J.** (1999). Renal expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in a rat model of tubulointerstitial damage. *Kidney Int***55**, 82-90.
- Lauer, M., Scruggs, B., Chen, S., Wassenhove-McCarthy, D. and McCarthy, K. J.** (2007). Leprecan distribution in the developing and adult kidney. *Kidney Int***72**, 82-91.
- Lee, H. S. and Song, C. Y.** (2009). Differential role of mesangial cells and podocytes in TGF-beta-induced mesangial matrix synthesis in chronic glomerular disease. *Histol Histopathol***24**, 901-8.
- Lee, K., Brown, D., Urena, P., Ardaillou, N., Ardaillou, R., Deeds, J. and Segre, G. V.** (1996). Localization of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor mRNA in kidney. *Am J Physiol***270**, F186-91.
- Lee, S., Huen, S., Nishio, H., Nishio, S., Lee, H. K., Choi, B. S., Ruhrberg, C. and Cantley, L. G.** (2011). Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol***22**, 317-26.
- Leehey, D. J., Isreb, M. A., Marcic, S., Singh, A. K. and Singh, R.** (2005). Effect of high glucose on superoxide in human mesangial cells: role of angiotensin II. *Nephron Exp Nephrol***100**, e46-53.
- Leeuwis, J. W., Nguyen, T. Q., Dendooven, A., Kok, R. J. and Goldschmeding, R.** (2010). Targeting podocyte-associated diseases. *Adv Drug Deliv Rev***62**, 1325-36.
- Lelongt, B., Legallier, B., Piedagnel, R. and Ronco, P. M.** (2001). Do matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 (gelatinases) play a role in renal development, physiology and glomerular diseases? *Curr Opin Nephrol Hypertens***10**, 7-12.

- Lens, S. M., Tesselaar, K., den Drijver, B. F., van Oers, M. H. and van Lier, R. A.** (1996). A dual role for both CD40-ligand and TNF-alpha in controlling human B cell death. *J Immunol***156**, 507-14.
- Leung, J. C., Tang, S. C., Chan, L. Y., Tsang, A. W., Lan, H. Y. and Lai, K. N.** (2003). Polymeric IgA increases the synthesis of macrophage migration inhibitory factor by human mesangial cells in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant***18**, 36-45.
- Levey, A. S. and Coresh, J.** (2011). Chronic kidney disease. *Lancet***379**, 165-80.
- Lewinska, A., Wnuk, M., Slota, E. and Bartosz, G.** (2007). Total anti-oxidant capacity of cell culture media. *Clin Exp Pharmacol Physiol***34**, 781-6.
- Li, X., Loberg, R., Liao, J., Ying, C., Snyder, L. A., Pienta, K. J. and McCauley, L. K.** (2009). A destructive cascade mediated by CCL2 facilitates prostate cancer growth in bone. *Cancer Res***69**, 1685-92.
- Li, X., Zarinetchi, F., Schrier, R. W. and Nemenoff, R. A.** (1995). Inhibition of MAP kinase by prostaglandin E2 and forskolin in rat renal mesangial cells. *Am J Physiol***269**, C986-91.
- Licht, R., Dieker, J. W., Jacobs, C. W., Tax, W. J. and Berden, J. H.** (2004). Decreased phagocytosis of apoptotic cells in diseased SLE mice. *J Autoimmun***22**, 139-45.
- Lichtnekert, J., Kulkarni, O. P., Mulay, S. R., Rupanagudi, K. V., Ryu, M., Allam, R., Vielhauer, V., Muruve, D., Lindenmeyer, M. T., Cohen, C. D. et al.** (2011). Anti-GBM glomerulonephritis involves IL-1 but is independent of NLRP3/ASC inflammasome-mediated activation of caspase-1. *PLoS One***6**, e26778.
- Lichtnekert, J., Vielhauer, V., Zecher, D., Kulkarni, O. P., Clauss, S., Segerer, S., Hornung, V., Mayadas, T. N., Beutler, B., Akira, S. et al.** (2009). Trif is not required for immune complex glomerulonephritis: dying cells activate mesangial cells via Tlr2/Myd88 rather than Tlr3/Trif. *Am J Physiol Renal Physiol***296**, F867-74.
- Lindahl, P., Hellstrom, M., Kalen, M., Karlsson, L., Pekny, M., Pekna, M., Soriano, P. and Betsholtz, C.** (1998). Paracrine PDGF-B/PDGF-Rbeta signaling controls mesangial cell development in kidney glomeruli. *Development***125**, 3313-22.
- Lippuner, K., Zehnder, H. J., Casez, J. P., Takkinen, R. and Jaeger, P.** (1996). PTH-related protein is released into the mother's bloodstream during lactation: evidence for beneficial effects on maternal calcium-phosphate metabolism. *J Bone Miner Res***11**, 1394-9.
- Liu, H., Luo, Y., Zhang, T., Zhang, Y., Wu, Q., Yuan, L., Chung, S. S., Oates, P. J. and Yang, J. Y.** (2011). Genetic deficiency of aldose reductase counteracts the development of diabetic nephropathy in C57BL/6 mice. *Diabetologia***54**, 1242-51.
- Liu, J., Marino, M. W., Wong, G., Grail, D., Dunn, A., Bettadapura, J., Slavin, A. J., Old, L. and Bernard, C. C.** (1998). TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Med***4**, 78-83.
- Liu, Z. H., Striker, G. E., Stetler-Stevenson, M., Fukushima, P., Patel, A. and Striker, L. J.** (1996). TNF-alpha and IL-1 alpha induce mannose receptors and apoptosis in glomerular mesangial but not endothelial cells. *Am J Physiol***270**, C1595-601.
- Loeffler, I., Hopfer, U., Koczan, D. and Wolf, G.** (2011). Type VIII collagen modulates TGF-beta1-induced proliferation of mesangial cells. *J Am Soc Nephrol***22**, 649-63.
- London, G., Marchais, S., Guerin, A. and Metivier, F.** (2007). [Arterial hypertension, chronic renal insufficiency and dialysis]. *Nephrol Ther***3 Suppl 3**, S156-61.
- Lorenzo, O., Ruiz-Ortega, M., Esbrit, P., Ruperez, M., Ortega, A., Santos, S., Blanco, J., Ortega, L. and Egido, J.** (2002). Angiotensin II increases parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and the type 1 PTH/PTHrP receptor in the kidney. *J Am Soc Nephrol***13**, 1595-607.
- Loverre, A., Tataranni, T., Castellano, G., Divella, C., Battaglia, M., Ditunno, P., Corcelli, M., Mangino, M., Gesualdo, L., Schena, F. P. et al.** (2011). IL-17 expression by tubular epithelial cells in renal transplant recipients with acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant***11**, 1248-59.
- Lowell, C. A. and Berton, G.** (1998). Resistance to endotoxic shock and reduced neutrophil migration in mice deficient for the Src-family kinases Hck and Fgr. *Proc Natl Acad Sci U S A***95**, 7580-4.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem***193**, 265-75.
- Lu, Y., Liu, C., Miao, X., Xu, K. and Wu, X.** (2009). Increased expression of myo-inositol oxygenase is involved in the tubulointerstitial injury of diabetic nephropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes***117**, 257-65.
- Luo, Y., Lloyd, C., Gutierrez-Ramos, J. C. and Dorf, M. E.** (1999). Chemokine amplification in mesangial cells. *J Immunol***163**, 3985-92.

- Luparello, C.** (2010). Midregion PTHrP and human breast cancer cells. *ScientificWorldJournal***10**, 1016-28.
- Luparello, C., Burtis, W. J., Raue, F., Birch, M. A. and Gallagher, J. A.** (1995). Parathyroid hormone-related peptide and 8701-BC breast cancer cell growth and invasion in vitro: evidence for growth-inhibiting and invasion-promoting effects. *Mol Cell Endocrinol***111**, 225-32.
- Luparello, C., Romanotto, R., Tipa, A., Sirchia, R., Olmo, N., Lopez de Silanes, I., Turnay, J., Lizarbe, M. A. and Stewart, A. F.** (2001). Midregion parathyroid hormone-related protein inhibits growth and invasion *in vitro* and tumorigenesis in vivo of human breast cancer cells. *J Bone Miner Res***16**, 2173-81.
- Lynn, E. G., Choy, P. C., Magil, A. and O, K.** (1997). Uptake and metabolism of lipoprotein-X in mesangial cells. *Mol Cell Biochem***175**, 187-94.
- Mace, P. D., Shirley, S. and Day, C. L.** (2010). Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins. *Cell Death Differ***17**, 46-53.
- MacEwan, D. J.** (2002). TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br J Pharmacol***135**, 855-75.
- Macisaac, R. J. and Jerums, G.** (2011). Diabetic kidney disease with and without albuminuria. *Curr Opin Nephrol Hypertens***20**, 246-57.
- MacKay, K., Striker, L. J., Elliot, S., Pinkert, C. A., Brinster, R. L. and Striker, G. E.** (1988). Glomerular epithelial, mesangial, and endothelial cell lines from transgenic mice. *Kidney Int***33**, 677-84.
- Mahon, M. J.** (2009). The parathyroid hormone 1 receptor directly binds to the FERM domain of ezrin, an interaction that supports apical receptor localization and signaling in LLC-PK1 cells. *Mol Endocrinol***23**, 1691-701.
- Mahon, M. J., Donowitz, M., Yun, C. C. and Segre, G. V.** (2002). Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 2 directs parathyroid hormone 1 receptor signalling. *Nature***417**, 858-61.
- Mahon, M. J. and Shimada, M.** (2005). Calmodulin interacts with the cytoplasmic tails of the parathyroid hormone 1 receptor and a sub-set of class b G-protein coupled receptors. *FEBS Lett***579**, 803-7.
- Maioli, E., Fortino, V., Torricelli, C., Arezzini, B. and Gardi, C.** (2002). Effect of parathyroid hormone-related protein on fibroblast proliferation and collagen metabolism in human skin. *Exp Dermatol***11**, 302-10.
- Makino, H., Sugiyama, H., Yamasaki, Y., Maeshima, Y., Wada, J. and Kashihara, N.** (2003). Glomerular cell apoptosis in human lupus nephritis. *Virchows Arch***443**, 67-77.
- Mandache, E., Gherghiceanu, M., Serafinceanu, C., Penescu, M. and Mircescu, G.** (2011). Myofibroblast involvement in tubular basement membrane remodeling in type II diabetic nephropathy. *Rom J Morphol Embryol***52**, 75-9.
- Manderscheid, M., Pereda-Fernandez, C. and Pfeilschifter, J.** (2002). Cyclic AMP increases rat inhibitor of apoptosis protein (RIAP1) mRNA in renal mesangial cells. *Kidney Int***61**, 797-803.
- Mangin, M., Ikeda, K. and Broadus, A. E.** (1990a). Structure of the mouse gene encoding parathyroid hormone-related peptide. *Gene***95**, 195-202.
- Mangin, M., Ikeda, K., Dreyer, B. E. and Broadus, A. E.** (1989). Isolation and characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. *Proc Natl Acad Sci U S A***86**, 2408-12.
- Mangin, M., Ikeda, K., Dreyer, B. E. and Broadus, A. E.** (1990b). Identification of an up-stream promoter of the human parathyroid hormone-related peptide gene. *Mol Endocrinol***4**, 851-8.
- Mangin, M., Ikeda, K., Dreyer, B. E., Milstone, L. and Broadus, A. E.** (1988a). Two distinct tumor-derived, parathyroid hormone-like peptides result from alternative ribonucleic acid splicing. *Mol Endocrinol***2**, 1049-55.
- Mangin, M., Webb, A. C., Dreyer, B. E., Posillico, J. T., Ikeda, K., Weir, E. C., Stewart, A. F., Bander, N. H., Milstone, L., Barton, D. E. et al.** (1988b). Identification of a cDNA encoding a parathyroid hormone-like peptide from a human tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A***85**, 597-601.
- Manning, B. D. and Cantley, L. C.** (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell***129**, 1261-74.
- Mantovani, A.** (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today***20**, 254-7.
- Marshall, C. B. and Shankland, S. J.** (2006). Cell cycle and glomerular disease: a minireview. *Nephron Exp Nephrol***102**, e39-48.
- Marti, H. P.** (2002). The role of matrix metalloproteinases in the activation of mesangial cells. *Transpl Immunol***9**, 97-100.

- Martin-Ventura, J. L., Ortego, M., Esbrit, P., Hernandez-Presa, M. A., Ortega, L. and Egido, J.** (2003). Possible role of parathyroid hormone-related protein as a proinflammatory cytokine in atherosclerosis. *Stroke***34**, 1783-9.
- Martinez, F. O., Helming, L. and Gordon, S.** (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol***27**, 451-83.
- Mason, R. M. and Wahab, N. A.** (2003). Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol***14**, 1358-73.
- Massfelder, T., Dann, P., Wu, T. L., Vasavada, R., Helwig, J. J. and Stewart, A. F.** (1997). Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A***94**, 13630-5.
- Massfelder, T., Lang, H., Schordan, E., Lindner, V., Rothhut, S., Welsch, S., Simon-Assmann, P., Barthelmebs, M., Jacqmin, D. and Helwig, J. J.** (2004). Parathyroid hormone-related protein is an essential growth factor for human clear cell renal carcinoma and a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res***64**, 180-8.
- Massfelder, T., Stewart, A. F., Endlich, K., Soifer, N., Judes, C. and Helwig, J. J.** (1996). Parathyroid hormone-related protein detection and interaction with NO and cyclic AMP in the renovascular system. *Kidney Int***50**, 1591-603.
- Masuda, Y., Shimizu, A., Mori, T., Ishiwata, T., Kitamura, H., Ohashi, R., Ishizaki, M., Asano, G., Sugisaki, Y. and Yamanaka, N.** (2001). Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am J Pathol***159**, 599-608.
- Masuya, M., Drake, C. J., Fleming, P. A., Reilly, C. M., Zeng, H., Hill, W. D., Martin-Studdard, A., Hess, D. C. and Ogawa, M.** (2003). Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. *Blood***101**, 2215-8.
- Mathieson, P. W.** (2007). Minimal change nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Immunopathol***29**, 415-26.
- Matsumoto, K. and Hatano, M.** (1991). Soluble immune complexes stimulate production of interleukin-1 by cultured rat glomerular mesangial cells. *Am J Nephrol***11**, 138-43.
- McCarty, M. F.** (2006). Adjuvant strategies for prevention of glomerulosclerosis. *Med Hypotheses***67**, 1277-96.
- McGrogan, A., Franssen, C. F. and de Vries, C. S.** (2010). The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. *Nephrol Dial Transplant***26**, 414-30.
- McLennan, S. V., Martell, S. K. and Yue, D. K.** (2002). Effects of mesangium glycation on matrix metalloproteinase activities: possible role in diabetic nephropathy. *Diabetes***51**, 2612-8.
- Meerovitch, K., Wing, S. and Goltzman, D.** (1997). Preproparathyroid hormone-related protein, a secreted peptide, is a substrate for the ubiquitin proteolytic system. *J Biol Chem***272**, 6706-13.
- Mei, X., Gao, C. and Cui, R.** (2001). [The role of AT1 receptor and cyclin kinase inhibitor p27 protein in angiotensin II-induced hypertrophy of mesangial cell]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi***40**, 609-12.
- Meier, M., Menne, J., Park, J. K. and Haller, H.** (2007). Nailing down PKC isoform specificity in diabetic nephropathy two's company, three's a crowd. *Nephrol Dial Transplant***22**, 2421-5.
- Merkle, M., Ribeiro, A. and Wornle, M.** (2011). TLR3-dependent regulation of cytokines in human mesangial cells: a novel role for IP-10 and TNF-alpha in hepatitis C-associated glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol***301**, F57-69.
- Metzger, D. and Chambon, P.** (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods***24**, 71-80.
- Miao, D., Su, H., He, B., Gao, J., Xia, Q., Zhu, M., Gu, Z., Goltzman, D. and Karaplis, A. C.** (2008). Severe growth retardation and early lethality in mice lacking the nuclear localization sequence and C-terminus of PTH-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A***105**, 20309-14.
- Miao, D., Tong, X. K., Chan, G. K., Panda, D., McPherson, P. S. and Goltzman, D.** (2001). Parathyroid hormone-related peptide stimulates osteogenic cell proliferation through protein kinase C activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem***276**, 32204-13.
- Mishra, R., Emancipator, S. N., Kern, T. and Simonson, M. S.** (2005). High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. *Kidney Int***67**, 82-93.
- Mogensen, C. E.** (1999). Microalbuminuria, blood pressure and diabetic renal disease: origin and development of ideas. *Diabetologia***42**, 263-85.

- Monkawa, T., Pippin, J., Yo, Y., Kopp, J. B., Alpers, C. E. and Shankland, S. J.** (2006). The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 limits murine mesangial proliferative glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol***102**, e8-18.
- Mooney, A., Jackson, K., Bacon, R., Streuli, C., Edwards, G., Bassuk, J. and Savill, J.** (1999). Type IV collagen and laminin regulate glomerular mesangial cell susceptibility to apoptosis via beta(1) integrin-mediated survival signals. *Am J Pathol***155**, 599-606.
- Mooney, A., Jobson, T., Bacon, R., Kitamura, M. and Savill, J.** (1997). Cytokines promote glomerular mesangial cell survival *in vitro* by stimulus-dependent inhibition of apoptosis. *J Immunol***159**, 3949-60.
- Moore, M. A.** (2002). Cytokine and chemokine networks influencing stem cell proliferation, differentiation, and marrow homing. *J Cell Biochem Suppl***38**, 29-38.
- Moreno-Manzano, V., Ishikawa, Y., Lucio-Cazana, J. and Kitamura, M.** (2000). Selective involvement of superoxide anion, but not downstream compounds hydrogen peroxide and peroxynitrite, in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of rat mesangial cells. *J Biol Chem***275**, 12684-91.
- Morita, T., Yamamoto, T. and Churg, J.** (1998). Mesangiolysis: an update. *Am J Kidney Dis***31**, 559-73.
- Mosley, B., Urdal, D. L., Prickett, K. S., Larsen, A., Cosman, D., Conlon, P. J., Gillis, S. and Dower, S. K.** (1987). The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J Biol Chem***262**, 2941-4.
- Mott, J. D., Khalifah, R. G., Nagase, H., Shield, C. F., 3rd, Hudson, J. K. and Hudson, B. G.** (1997). Nonenzymatic glycation of type IV collagen and matrix metalloproteinase susceptibility. *Kidney Int***52**, 1302-12.
- Murer, H., Hernando, N., Forster, I. and Biber, J.** (2003). Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol***65**, 531-42.
- Murtas, C., Bruschi, M., Carnevali, M. L., Petretto, A., Corradini, E., Prunotto, M., Candiano, G., degl'Innocenti, M. L., Ghiggeri, G. M. and Allegri, L.** (2011). In vivo characterization of renal auto-antigens involved in human auto-immune diseases: the case of membranous glomerulonephritis. *Proteomics Clin Appl***5**, 90-7.
- Musso, M. J., Plante, M., Judes, C., Barthelmebs, M. and Helwig, J. J.** (1989). Renal vasodilatation and microvessel adenylate cyclase stimulation by synthetic parathyroid hormone-like protein fragments. *Eur J Pharmacol***174**, 139-51.
- Nadella, M. V., Dirksen, W. P., Nadella, K. S., Shu, S., Cheng, A. S., Morgenstern, J. A., Richard, V., Fernandez, S. A., Huang, T. H., Guttridge, D. et al.** (2007). Transcriptional regulation of parathyroid hormone-related protein promoter P2 by NF-kappaB in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia***21**, 1752-62.
- Nagamatsu, T., Pippin, J., Schreiner, G. F. and Lefkowitz, J. B.** (1992). Paradoxical exacerbation of leukocyte-mediated glomerulonephritis with cyclooxygenase inhibition. *Am J Physiol***263**, F228-36.
- Nagasaki, K., Yamaguchi, K., Watanabe, K., Eto, S. and Abe, K.** (1991). Interleukin-4 blocks parathyroid hormone-related protein-induced hypercalcemia in vivo. *Biochem Biophys Res Commun***178**, 694-8.
- Naito, M., Shenoy, A., Aoyama, I., Koopmeiners, J. S., Komers, R., Schnaper, H. W. and Bomsztyk, K.** (2009). High ambient glucose augments angiotensin II-induced proinflammatory gene mRNA expression in human mesangial cells: effects of valsartan and simvastatin. *Am J Nephrol***30**, 99-111.
- Najafian, B. and Mauer, M.** (2009). Progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract***83**, 1-8.
- Naka, T., Nishimoto, N. and Kishimoto, T.** (2002). The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res***4 Suppl 3**, S233-42.
- Nakagawa, T., Izumino, K., Ishii, Y., Oya, T., Hamashima, T., Jie, S., Ishizawa, S., Tomoda, F., Fujimori, T., Nabeshima, Y. et al.** (2011). Roles of PDGF receptor-beta in the structure and function of postnatal kidney glomerulus. *Nephrol Dial Transplant***26**, 458-68.
- Nakai, K., Ito, C., Yumura, W., Horita, S., Nihei, H., Sugino, N. and Nagai, R.** (1995). Difference of myosin heavy chain expression between mesangial cells and vascular smooth muscles. *Nihon Jinzo Gakkai Shi***37**, 428-35.
- Nakao, N., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Ike, F. and Kusakabe, M.** (1998). Tenascin-C promotes healing of Habu-snake venom-induced glomerulonephritis: studies in knockout congenic mice and in culture. *Am J Pathol***152**, 1237-45.
- Nakazato, Y., Okada, H., Tajima, S., Hayashida, T., Kanno, Y., Suzuki, H. and Saruta, T.** (1996). Interleukin-4 modulates collagen synthesis by human mesangial cells in a type-specific manner. *Am J Physiol***270**, F447-53.

- Navarro-Gonzalez, J. F., Mora-Fernandez, C., Muros de Fuentes, M. and Garcia-Perez, J.** (2011). Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol***7**, 327-40.
- Nechemia-Arbely, Y., Barkan, D., Pizov, G., Shriki, A., Rose-John, S., Galun, E. and Axelrod, J. H.** (2008). IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol***19**, 1106-15.
- Nee, L., Tuite, N., Ryan, M. P. and McMorrow, T.** (2007). TNF-alpha and IL-1 beta-mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in human glomerular mesangial cells. *Nephron Exp Nephrol***107**, e73-86.
- Nguyen, M., He, B. and Karaplis, A.** (2001). Nuclear forms of parathyroid hormone-related peptide are translated from non-AUG start sites downstream from the initiator methionine. *Endocrinology***142**, 694-703.
- Nickols, G. A., Nickols, M. A. and Helwig, J. J.** (1990). Binding of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein to vascular smooth muscle of rabbit renal microvessels. *Endocrinology***126**, 721-7.
- Niemir, Z. I., Stein, H., Noronha, I. L., Kruger, C., Andrassy, K., Ritz, E. and Waldherr, R.** (1995). PDGF and TGF-beta contribute to the natural course of human IgA glomerulonephritis. *Kidney Int***48**, 1530-41.
- Nonaka Takahashi, S., Fujita, T., Takahashi, T., Wada, Y., Fuke, Y., Satomura, A. and Matsumoto, K.** (2008). TGF-beta1 and CTGF mRNAs are correlated with urinary protein level in IgA nephropathy. *J Nephrol***21**, 53-63.
- Nozawa, Y., Sato, A., Piao, H., Morioka, T., Narita, I. and Oite, T.** (2012). The effect of renal administration of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor or stable prostaglandin I2 analog on the progression of sclerotic glomerulonephritis in rats. *Clin Exp Nephrol***16**, 221-30 (Abstract).
- O'Neill, L. A.** (2008). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev***226**, 10-8.
- Oda, T., Yoshizawa, N., Yamakami, K., Ishida, A., Hotta, O., Suzuki, S. and Miura, S.** (2007). Significance of glomerular cell apoptosis in the resolution of acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant***22**, 740-8.
- Ohnishi, M., Hasegawa, G., Yamasaki, M., Obayashi, H., Fukui, M., Nakajima, T., Ichida, Y., Ohse, H., Mogami, S., Yoshikawa, T. et al.** (2006). Integrin-linked kinase acts as a pro-survival factor against high glucose-associated osmotic stress in human mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant***21**, 1786-93.
- Okano, K., Pirola, C. J., Wang, H. M., Forrester, J. S., Fagin, J. A. and Clemens, T. L.** (1995). Involvement of cell cycle and mitogen-activated pathways in induction of parathyroid hormone-related protein gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Endocrinology***136**, 1782-9.
- Onan, D., Allan, E. H., Quinn, J. M., Gooi, J. H., Pompolo, S., Sims, N. A., Gillespie, M. T. and Martin, T. J.** (2009). The chemokine Cxcl1 is a novel target gene of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein in committed osteoblasts. *Endocrinology***150**, 2244-53.
- Ophascharoensuk, V., Fero, M. L., Hughes, J., Roberts, J. M. and Shankland, S. J.** (1998). The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 safeguards against inflammatory injury. *Nat Med***4**, 575-80.
- Organ, M. and Norman, R. W.** Acute reversible kidney injury secondary to bilateral ureteric obstruction. *Can Urol Assoc J***5**, 392-6.
- Orloff, J. J., Ganz, M. B., Nathanson, M. H., Moyer, M. S., Kats, Y., Mitnick, M., Behal, A., Gasalla-Herraiz, J. and Isales, C. M.** (1996). A midregion parathyroid hormone-related peptide mobilizes cytosolic calcium and stimulates formation of inositol trisphosphate in a squamous carcinoma cell line. *Endocrinology***137**, 5376-85.
- Orloff, J. J., Reddy, D., de Papp, A. E., Yang, K. H., Soifer, N. E. and Stewart, A. F.** (1994). Parathyroid hormone-related protein as a prohormone: posttranslational processing and receptor interactions. *Endocr Rev***15**, 40-60.
- Orloff, J. J., Soifer, N. E., Fodero, J. P., Dann, P. and Burtis, W. J.** (1993). Accumulation of carboxy-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein in renal failure. *Kidney Int***43**, 1371-6.
- Ortega, A., Ramila, D., Ardura, J. A., Esteban, V., Ruiz-Ortega, M., Barat, A., Gazapo, R., Bosch, R. J. and Esbrit, P.** (2006). Role of parathyroid hormone-related protein in tubulointerstitial apoptosis and fibrosis after folic acid-induced nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol***17**, 1594-603.
- Ortega, A., Romero, M., Izquierdo, A., Troyano, N., Arce, Y., Ardura, J. A., Arenas, M. I., Bover, J., Esbrit, P. and Bosch, R. J.** (2011). Parathyroid hormone-related protein is a hypertrophy factor for human mesangial cells: Implications for diabetic nephropathy. *J Cell Physiol***227**, 1980-7.
- Ostendorf, T., Kunter, U., Grone, H. J., Bahlmann, F., Kawachi, H., Shimizu, F., Koch, K. M., Janjic, N. and Floege, J.** (2001). Specific antagonism of PDGF prevents renal scarring in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol***12**, 909-18.

- Ostendorf, T., van Roeyen, C. R., Peterson, J. D., Kunter, U., Eitner, F., Hamad, A. J., Chan, G., Jia, X. C., Macaluso, J., Gazit-Bornstein, G. et al.** (2003). A fully human monoclonal antibody (CR002) identifies PDGF-D as a novel mediator of mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol***14**, 2237-47.
- Ott, U., Aschoff, A., Pocock, J., Funfstuck, R., Jirikowski, G., Stein, G. and Wolf, G.** (2007). DNA fragmentation in chronic glomerulonephritis: an immunohistological analysis. *Nephron Clin Pract***105**, c18-28.
- Pabst, R. and Sterzel, R. B.** (1983). Cell renewal of glomerular cell types in normal rats. An autoradiographic analysis. *Kidney Int***24**, 626-31.
- Panzer, U., Schneider, A., Wilken, J., Thompson, D. A., Kent, S. B. and Stahl, R. A.** (1999). The chemokine receptor antagonist AOP-RANTES reduces monocyte infiltration in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int***56**, 2107-15.
- Patterson, E. K., Watson, P. H., Hodsman, A. B., Hendy, G. N., Canaff, L., Bringham, F. R., Poschwatta, C. H. and Fraher, L. J.** (2007). Expression of PTH1R constructs in LLC-PK1 cells: protein nuclear targeting is mediated by the PTH1R NLS. *Bone***41**, 603-10.
- Paust, H. J., Turner, J. E., Steinmetz, O. M., Peters, A., Heymann, F., Holscher, C., Wolf, G., Kurts, C., Mittrucker, H. W., Stahl, R. A. et al.** (2009). The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol***20**, 969-79.
- Pavenstadt, H., Kriz, W. and Kretzler, M.** (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev***83**, 253-307.
- Peritz, T., Zeng, F., Kannanayakal, T. J., Kilk, K., Eiriksdottir, E., Langel, U. and Eberwine, J.** (2006). Immunoprecipitation of mRNA-protein complexes. *Nat Protoc***1**, 577-80.
- Philbrick, W. M., Wysolmerski, J. J., Galbraith, S., Holt, E., Orloff, J. J., Yang, K. H., Vasavada, R. C., Weir, E. C., Broadus, A. E. and Stewart, A. F.** (1996). Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev***76**, 127-73.
- Pickard, B. W., Hodsman, A. B., Fraher, L. J. and Watson, P. H.** (2007). Type 1 parathyroid hormone receptor (PTH1R) nuclear trafficking: regulation of PTH1R nuclear-cytoplasmic shuttling by importin-alpha/beta and chromosomal region maintenance 1/exportin 1. *Endocrinology***148**, 2282-9.
- Pierucci, A., Simonetti, B. M., Pecci, G., Mavrikakis, G., Feriozzi, S., Cinotti, G. A., Patrignani, P., Ciabattini, G. and Patrono, C.** (1989). Improvement of renal function with selective thromboxane antagonism in lupus nephritis. *N Engl J Med***320**, 421-5.
- Plawner, L. L., Philbrick, W. M., Burtis, W. J., Broadus, A. E. and Stewart, A. F.** (1995). Cell type-specific secretion of parathyroid hormone-related protein via the regulated versus the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem***270**, 14078-84.
- Portch, P. A. and Williams, G.** (1973). Mesangial cells in membranous glomerulonephritis. *J Clin Pathol***26**, 660-71.
- Porter, G. W., Khuri, F. R. and Fu, H.** (2006). Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways. *Semin Cancer Biol***16**, 193-202.
- Praga, M. and Gonzalez, E.** Acute interstitial nephritis. *Kidney Int***77**, 956-61.
- Prols, F., Hartner, A., Schocklmann, H. O. and Sterzel, R. B.** (1999). Mesangial cells and their adhesive properties. *Exp Nephrol***7**, 137-46.
- Prunotto, M., Carnevali, M. L., Candiano, G., Murtas, C., Bruschi, M., Corradini, E., Trivelli, A., Magnasco, A., Petretto, A., Santucci, L. et al.** (2010). Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2. *J Am Soc Nephrol***21**, 507-19.
- Qian, J., Colbert, M. C., Witte, D., Kuan, C. Y., Gruenstein, E., Osinska, H., Lanske, B., Kronenberg, H. M. and Clemens, T. L.** (2003). Midgestational lethality in mice lacking the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is associated with abrupt cardiomyocyte death. *Endocrinology***144**, 1053-61.
- Qiu, L. Q., Sinniah, R. and Hsu, S. I.** (2004). Role of differential and cell type-specific expression of cell cycle regulatory proteins in mediating progressive glomerular injury in human IgA nephropathy. *Lab Invest***84**, 1112-25.
- Ramesh Prasad, G. V., Shamy, F. and Zaltzman, J. S.** (2004). Recurrence of type III membranoproliferative glomerulonephritis after renal transplantation. *Clin Nephrol***61**, 80-1.

- Ramila, D., Ardura, J. A., Esteban, V., Ortega, A., Ruiz-Ortega, M., Bosch, R. J. and Esbrit, P.** (2008). Parathyroid hormone-related protein promotes inflammation in the kidney with an obstructed ureter. *Kidney Int***73**, 835-47.
- Rankin, W., Grill, V. and Martin, T. J.** (1997). Parathyroid hormone-related protein and hypercalcemia. *Cancer***80**, 1564-71.
- Remuzzi, G., Perico, N., Macia, M. and Ruggenti, P.** (2005). The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*, S57-65.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R. A. and Dynlacht, B. D.** (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev***16**, 245-56.
- Ricono, J. M., Xu, Y. C., Arar, M., Jin, D. C., Barnes, J. L. and Abboud, H. E.** (2003). Morphological insights into the origin of glomerular endothelial and mesangial cells and their precursors. *J Histochem Cytochem***51**, 141-50.
- Riser, B. L., Cortes, P., Heilig, C., Grondin, J., Ladson-Wofford, S., Patterson, D. and Narins, R. G.** (1996). Cyclic stretching force selectively up-regulates transforming growth factor-beta isoforms in cultured rat mesangial cells. *Am J Pathol***148**, 1915-23.
- Riser, B. L., Cortes, P., Zhao, X., Bernstein, J., Dumler, F. and Narins, R. G.** (1992). Intraglomerular pressure and mesangial stretching stimulate extracellular matrix formation in the rat. *J Clin Invest***90**, 1932-43.
- Roake, J. A., Rao, A. S., Morris, P. J., Larsen, C. P., Hankins, D. F. and Austyn, J. M.** (1995). Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med***181**, 2237-47.
- Robert, B., Zhao, X. and Abrahamson, D. R.** (2000). Coexpression of neuropilin-1, Flk1, and VEGF(164) in developing and mature mouse kidney glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol***279**, F275-82.
- Robertson, T. E., Nikolic-Paterson, D. J., Hurst, L. A., Atkins, R. C. and Chadban, S. J.** (2002). IL-10 induces mesangial cell proliferation via a PDGF-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol***130**, 241-4.
- Rodan, S. B., Insogna, K. L., Vignery, A. M., Stewart, A. F., Broadus, A. E., D'Souza, S. M., Bertolini, D. R., Mundy, G. R. and Rodan, G. A.** (1983). Factors associated with humoral hypercalcemia of malignancy stimulate adenylate cyclase in osteoblastic cells. *J Clin Invest***72**, 1511-5.
- Romero, G., Sneddon, W. B., Yang, Y., Wheeler, D., Blair, H. C. and Friedman, P. A.** (2010). Parathyroid hormone receptor directly interacts with dishevelled to regulate beta-Catenin signaling and osteoclastogenesis. *J Biol Chem***285**, 14756-63.
- Ronco, P. and Debiec, H.** (2006). New insights into the pathogenesis of membranous glomerulonephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens***15**, 258-63.
- Rosen, S. and Stillman, I. E.** (2008). Acute tubular necrosis is a syndrome of physiologic and pathologic dissociation. *J Am Soc Nephrol***19**, 871-5.
- Rosin, D. L. and Okusa, M. D.** (2011). Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *J Am Soc Nephrol***22**, 416-25.
- Rubin, D. A. and Juppner, H.** (1999). Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide. *J Biol Chem***274**, 28185-90.
- Rubin, L. P., Kovacs, C. S., De Paepe, M. E., Tsai, S. W., Torday, J. S. and Kronenberg, H. M.** (2004). Arrested pulmonary alveolar cytodifferentiation and defective surfactant synthesis in mice missing the gene for parathyroid hormone-related protein. *Dev Dyn***230**, 278-89.
- Rupprecht, H. D., Schockmann, H. O. and Sterzel, R. B.** (1996). Cell-matrix interactions in the glomerular mesangium. *Kidney Int***49**, 1575-82.
- Rzymkiewicz, D., Leingang, K., Baird, N. and Morrison, A. R.** (1994). Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase gene expression in rat mesangial cells by interleukin-1 beta. *Am J Physiol***266**, F39-45.
- Sadik, C. D. and Luster, A. D.** (2011). Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation. *J Leukoc Biol***91**, 207-15.
- Sakaguchi, H. and Kawamura, S.** (1963). Electron microscopic observations of the mesangiolysis. The toxic effects of the "Habu snake" venom on the renal glomerulus. *Keio J Med***12**, 99-106.
- Saleem, M. A., Zavadil, J., Bailly, M., McGee, K., Witherden, I. R., Pavenstadt, H., Hsu, H., Sanday, J., Satchell, S. C., Lennon, R. et al.** (2008). The molecular and functional phenotype of glomerular podocytes reveals key features of contractile smooth muscle cells. *Am J Physiol Renal Physiol***295**, F959-70.

- Salvati, P., Lamberti, E., Ferrario, R., Ferrario, R. G., Scampini, G., Pugliese, F., Barsotti, P. and Patrono, C. (1995). Long-term thromboxane-synthase inhibition prolongs survival in murine lupus nephritis. *Kidney Int***47**, 1168-75.
- Santos, S., Bosch, R. J., Ortega, A., Largo, R., Fernandez-Agullo, T., Gazapo, R., Egido, J. and Esbrit, P. (2001). Up-regulation of parathyroid hormone-related protein in folic acid-induced acute renal failure. *Kidney Int***60**, 982-95.
- Sato, T., Van Dixhoorn, M. G., Prins, F. A., Mooney, A., Verhagen, N., Muizert, Y., Savill, J., Van Es, L. A. and Daha, M. R. (1999). The terminal sequence of complement plays an essential role in antibody-mediated renal cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol***10**, 1242-52.
- Sato, T., van Dixhoorn, M. G., Schroeijers, W. E., Huizinga, T. W., Reutelingsperger, C. P., van Es, L. A. and Daha, M. R. (1996). Apoptosis of cultured rat glomerular mesangial cells induced by IgG2a monoclonal anti-Thy-1 antibodies. *Kidney Int***49**, 403-12.
- Sato, T., van Dixhoorn, M. G., Schroeijers, W. E., van Es, L. A. and Daha, M. R. (1997). Efficient induction of apoptosis in cultured rat glomerular mesangial cells by dimeric monoclonal IgA anti-Thy-1 antibodies. *Kidney Int***51**, 173-81.
- Sato, V., Marques, I., Goldenstein, P., Carmo, L., Jorge, L., Titan, S., Barros, R. and Woronik, V. (2012). Lupus nephritis is more severe in children and adolescents than in older adults. *Lupus***21**, 978-83.
- Saussine, C., Massfelder, T., Parnin, F., Judes, C., Simeoni, U. and Helwig, J. J. (1993). Renin stimulating properties of parathyroid hormone-related peptide in the isolated perfused rat kidney. *Kidney Int***44**, 764-73.
- Scheinman, J. I., Fish, A. J., Brown, D. M. and Michael, A. J. (1976). Human glomerular smooth muscle (mesangial) cells in culture. *Lab Invest***34**, 150-8.
- Schindler, R., Gelfand, J. A. and Dinarello, C. A. (1990). Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL-1 itself. *Blood***76**, 1631-8.
- Schlondorff, D. (1987). The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J***1**, 272-81.
- Schlondorff, D. and Banas, B. (2009). The mesangial cell revisited: no cell is an island. *J Am Soc Nephrol***20**, 1179-87.
- Schlondorff, D., Satriano, J. A., Hagege, J., Perez, J. and Baud, L. (1984). Effect of platelet-activating factor and serum-treated zymosan on prostaglandin E2 synthesis, arachidonic acid release, and contraction of cultured rat mesangial cells. *J Clin Invest***73**, 1227-31.
- Schluter, K., Katzer, C., Frischkopf, K., Wenzel, S., Taimor, G. and Piper, H. M. (2000). Expression, release, and biological activity of parathyroid hormone-related peptide from coronary endothelial cells. *Circ Res***86**, 946-51.
- Schneider, A., Harendza, S., Zahner, G., Jocks, T., Wenzel, U., Wolf, G., Thaiss, F., Helmchen, U. and Stahl, R. A. (1999). Cyclooxygenase metabolites mediate glomerular monocyte chemoattractant protein-1 formation and monocyte recruitment in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int***55**, 430-41.
- Schocklmann, H. O., Lang, S. and Sterzel, R. B. (1999). Regulation of mesangial cell proliferation. *Kidney Int***56**, 1199-207.
- Scholz, J., Lukacs-Kornek, V., Engel, D. R., Specht, S., Kiss, E., Eitner, F., Floege, J., Groene, H. J. and Kurts, C. (2008). Renal dendritic cells stimulate IL-10 production and attenuate nephrotoxic nephritis. *J Am Soc Nephrol***19**, 527-37.
- Seitz, P. K., Zhang, R. W., Simmons, D. J. and Cooper, C. W. (1995). Effects of C-terminal parathyroid hormone-related peptide on osteoblasts. *Miner Electrolyte Metab***21**, 180-3.
- Seldin, M. F., Mattei, M. G. and Hendy, G. N. (1992). Localization of mouse parathyroid hormone-like peptide gene (Pthlh) to distal chromosome 6 using interspecific backcross mice and in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet***60**, 252-4.
- Sellers, R. S., Luchin, A. I., Richard, V., Brena, R. M., Lima, D. and Rosol, T. J. (2004). Alternative splicing of parathyroid hormone-related protein mRNA: expression and stability. *J Mol Endocrinol***33**, 227-41.
- Sethi, S. and Fervenza, F. C. (2011). Membranoproliferative glomerulonephritis: pathogenetic heterogeneity and proposal for a new classification. *Semin Nephrol***31**, 341-8.

- Sethi, S. and Fervenza, F. C.** (2012). Membranoproliferative glomerulonephritis--a new look at an old entity. *N Engl J Med***366**, 1119-31.
- Shaftel, S. S., Olschowka, J. A., Hurley, S. D., Moore, A. H. and O'Banion, M. K.** (2003). COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. *Brain Res Mol Brain Res***119**, 213-5.
- Shankland, S. J., Pippin, J., Flanagan, M., Coats, S. R., Nangaku, M., Gordon, K. L., Roberts, J. M., Couser, W. G. and Johnson, R. J.** (1997). Mesangial cell proliferation mediated by PDGF and bFGF is determined by levels of the cyclin kinase inhibitor p27Kip1. *Kidney Int***51**, 1088-99.
- Sharma, N., He, Q. and Sharma, R. P.** (2006). Amelioration of fumonisin B1 hepatotoxicity in mice by depletion of T cells with anti-Thy-1.2. *Toxicology***223**, 191-201.
- Shen, X. and Falzon, M.** (2006). PTH-related protein upregulates integrin alpha6beta4 expression and activates Akt in breast cancer cells. *Exp Cell Res***312**, 3822-34.
- Shen, X., Mula, R. V., Li, J., Weigel, N. L. and Falzon, M.** (2007). PTHrP contributes to the anti-proliferative and integrin alpha6beta4-regulating effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Steroids***72**, 930-8.
- Shen, X., Qian, L. and Falzon, M.** (2004). PTH-related protein enhances MCF-7 breast cancer cell adhesion, migration, and invasion via an intracrine pathway. *Exp Cell Res***294**, 420-33.
- Shenolikar, S., Voltz, J. W., Cunningham, R. and Weinman, E. J.** (2004). Regulation of ion transport by the NHERF family of PDZ proteins. *Physiology (Bethesda)***19**, 362-9.
- Sheu, M. L., Chao, K. F., Sung, Y. J., Lin, W. W., Lin-Shiau, S. Y. and Liu, S. H.** (2005). Activation of phosphoinositide 3-kinase in response to inflammation and nitric oxide leads to the up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and subsequent cell proliferation in mesangial cells. *Cell Signal***17**, 975-84.
- Shimamura, H., Terada, Y., Okado, T., Tanaka, H., Inoshita, S. and Sasaki, S.** (2003). The PI3-kinase-Akt pathway promotes mesangial cell survival and inhibits apoptosis *in vitro* via NF-kappa B and Bad. *J Am Soc Nephrol***14**, 1427-34.
- Shimizu, A., Higo, S., Fujita, E., Mii, A. and Kaneko, T.** (2011). Focal segmental glomerulosclerosis after renal transplantation. *Clin Transplant***25 Suppl 23**, 6-14.
- Shinkai, Y.** (1982). Experimental glomerulonephritis induced in rabbits by horseradish peroxidase. Mesangial uptake and processing of immune complexes. *Lab Invest***46**, 577-83.
- Sicari, B. M., Troxell, R., Salim, F., Tanwir, M., Takane, K. K. and Fiaschi-Taesch, N.** (2012). c-myc and skp2 coordinate p27 degradation, vascular smooth muscle proliferation, and neointima formation induced by the parathyroid hormone-related protein. *Endocrinology***153**, 861-72.
- Simonson, M. S. and Ismail-Beigi, F.** (2011). Endothelin-1 increases collagen accumulation in renal mesangial cells by stimulating a chemokine and cytokine autocrine signaling loop. *J Biol Chem***286**, 11003-8.
- Sims, J. E., Gayle, M. A., Slack, J. L., Alderson, M. R., Bird, T. A., Giri, J. G., Colotta, F., Re, F., Mantovani, A., Shanebeck, K. et al.** (1993). Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A***90**, 6155-9.
- Singh, L. P., Cheng, D. W., Kowluru, R., Levi, E. and Jiang, Y.** (2007a). Hexosamine induction of oxidative stress, hypertrophy and laminin expression in renal mesangial cells: effect of the anti-oxidant alpha-lipoic acid. *Cell Biochem Funct***25**, 537-50.
- Singh, L. P., Jiang, Y. and Cheng, D. W.** (2007b). Proteomic identification of 14-3-3zeta as an adapter for IGF-1 and Akt/GSK-3beta signaling and survival of renal mesangial cells. *Int J Biol Sci***3**, 27-39.
- Sitprija, V.** (2006). Snakebite nephropathy. *Nephrology (Carlton)***11**, 442-8.
- Smeets, B., Kuppe, C., Sicking, E. M., Fuss, A., Jirak, P., van Kuppevelt, T. H., Endlich, K., Wetzels, J. F., Grone, H. J., Floege, J. et al.** (2011). Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol***22**, 1262-74.
- Soegiarto, D. W., Kiachopoulos, S., Schipani, E., Juppner, H., Erben, R. G. and Lanske, B.** (2001). Partial rescue of PTH/PTHrP receptor knockout mice by targeted expression of the Jansen transgene. *Endocrinology***142**, 5303-10.
- Soifer, N. E., Dee, K. E., Insogna, K. L., Burtis, W. J., Matovcik, L. M., Wu, T. L., Milstone, L. M., Broadus, A. E., Philbrick, W. M. and Stewart, A. F.** (1992). Parathyroid hormone-related protein. Evidence for secretion of a novel mid-region fragment by three different cell types. *J Biol Chem***267**, 18236-43.

- Soifer, N. E., Van Why, S. K., Ganz, M. B., Kashgarian, M., Siegel, N. J. and Stewart, A. F.** (1993). Expression of parathyroid hormone-related protein in the rat glomerulus and tubule during recovery from renal ischemia. *J Clin Invest***92**, 2850-7.
- Solimando, D. A.** (2001). Overview of hypercalcemia of malignancy. *Am J Health Syst Pharm***58 Suppl 3**, S4-7.
- Sommer, M., Eismann, U., Gerth, J. and Stein, G.** (2002). Interleukin 4 co-stimulates the PDGF-BB- and bFGF-mediated proliferation of mesangial cells and myofibroblasts. *Nephron***92**, 868-80; discussion 880-2.
- Soos, T. J., Sims, T. N., Barisoni, L., Lin, K., Littman, D. R., Dustin, M. L. and Nelson, P. J.** (2006). CX3CR1+ interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney. *Kidney Int***70**, 591-6.
- Soriano, P.** (1994). Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev***8**, 1888-96.
- Sourbier, C., Lindner, V., Lang, H., Agouni, A., Schordan, E., Danilin, S., Rothhut, S., Jacqmin, D., Helwig, J. J. and Massfelder, T.** (2006). The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res***66**, 5130-42.
- Steinman, L.** (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med***13**, 139-45.
- Stevenson, F. T., Bursten, S. L., Fanton, C., Locksley, R. M. and Lovett, D. H.** (1993). The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A***90**, 7245-9.
- Stewart, A. F. and Broadus, A. E.** (1990). Clinical review 16: Parathyroid hormone-related proteins: coming of age in the 1990s. *J Clin Endocrinol Metab***71**, 1410-4.
- Stewart, A. F., Horst, R., Defetos, L. J., Cadman, E. C., Lang, R. and Broadus, A. E.** (1980). Biochemical evaluation of patients with cancer-associated hypercalcemia: evidence for humoral and nonhumoral groups. *N Engl J Med***303**, 1377-83.
- Stewart, A. F., Insogna, K. L., Goltzman, D. and Broadus, A. E.** (1983). Identification of adenylate cyclase-stimulating activity and cytochemical glucose-6-phosphate dehydrogenase-stimulating activity in extracts of tumors from patients with humoral hypercalcemia of malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A***80**, 1454-8.
- Strasser, A., O'Connor, L. and Dixit, V. M.** (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem***69**, 217-45.
- Strewler, G. J.** (2000). The parathyroid hormone-related protein. *Endocrinol Metab Clin North Am***29**, 629-45.
- Strewler, G. J., Williams, R. D. and Nissenson, R. A.** (1983). Human renal carcinoma cells produce hypercalcemia in the nude mouse and a novel protein recognized by parathyroid hormone receptors. *J Clin Invest***71**, 769-74.
- Stuart, W. D., Maeda, S., Khera, P., Fagin, J. A. and Clemens, T. L.** (2000). Parathyroid hormone-related protein induces G1 phase growth arrest of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab***279**, E60-7.
- Stylianou, E., O'Neill, L. A., Rawlinson, L., Edbrooke, M. R., Woo, P. and Saklatvala, J.** (1992). Interleukin 1 induces NF-kappa B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes. *J Biol Chem***267**, 15836-41.
- Sugiyama, H., Kashihara, N., Maeshima, Y., Okamoto, K., Kanao, K., Sekikawa, T. and Makino, H.** (1998). Regulation of survival and death of mesangial cells by extracellular matrix. *Kidney Int***54**, 1188-96.
- Sugiyama, H., Savill, J. S., Kitamura, M., Zhao, L. and Stylianou, E.** (1999). Selective sensitization to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by blockade of NF-kappaB in primary glomerular mesangial cells. *J Biol Chem***274**, 19532-7.
- Sun, C. and Mierke, D. F.** (2005). Characterization of interactions of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1 with the parathyroid hormone receptor and phospholipase C. *J Pept Res***65**, 411-7.
- Sun, L. K., Yoshii, Y., Hyodo, A., Tsurushima, H., Saito, A., Harakuni, T., Li, Y. P., Kariya, K., Nozaki, M. and Morine, N.** (2003). Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. *Toxicol In vitro* **17**, 169-77.
- Suva, L. J., Winslow, G. A., Wettenhall, R. E., Hammonds, R. G., Moseley, J. M., Diefenbach-Jagger, H., Rodda, C. P., Kemp, B. E., Rodriguez, H., Chen, E. Y. et al.** (1987). A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science***237**, 893-6.
- Tadagavadi, R. K. and Reeves, W. B.** (2009). Renal dendritic cells ameliorate nephrotoxic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol***21**, 53-63.

- Tahara, A., Tsukada, J., Tomura, Y., Yatsu, T. and Shibasaki, M.** (2011). Vasopressin regulates rat mesangial cell growth by inducing autocrine secretion of vascular endothelial growth factor. *J Physiol Sci***61**, 115-22.
- Tahara, A., Tsukada, J., Tomura, Y., Yatsu, T. and Shibasaki, M.** (2012). Effects of High Glucose on AVP-Induced Hyperplasia, Hypertrophy, and Type IV Collagen Synthesis in Cultured Rat Mesangial Cells. *Endocr Res*.
- Takeda, T.** (2003). Podocyte cytoskeleton is connected to the integral membrane protein podocalyxin through Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor 2 and ezrin. *Clin Exp Nephrol***7**, 260-9.
- Takemoto, M., He, L., Norlin, J., Patrakka, J., Xiao, Z., Petrova, T., Bondjers, C., Asp, J., Wallgard, E., Sun, Y. et al.** (2006). Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function. *EMBO J***25**, 1160-74.
- Takemura, T., Murata, Y., Hino, S., Okada, M., Yanagida, H., Ikeda, M. and Yoshioka, K.** (1999). Heparin-binding EGF-like growth factor is expressed by mesangial cells and is involved in mesangial proliferation in glomerulonephritis. *J Pathol***189**, 431-8.
- Tallquist, M. and Kazlauskas, A.** (2004). PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev***15**, 205-13.
- Talon, I., Lindner, V., Sourbier, C., Schordan, E., Rothhut, S., Barthelmebs, M., Lang, H., Helwig, J. J. and Massfelder, T.** (2006). Antitumor effect of parathyroid hormone-related protein neutralizing antibody in human renal cell carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis***27**, 73-83.
- Tashiro, K., Kodera, S., Takahashi, Y., Horikoshi, S., Shirato, I. and Tomino, Y.** (1998). Detection of apoptotic cells in glomeruli of patients with IgA nephropathy. *Nephron***79**, 21-7.
- Tazawa, H., Takahashi, S. and Zilliacus, J.** (2003). Interaction of the parathyroid hormone receptor with the 14-3-3 protein. *Biochim Biophys Acta***1620**, 32-8.
- Thiede, M. A., Strewler, G. J., Nissenson, R. A., Rosenblatt, M. and Rodan, G. A.** (1988). Human renal carcinoma expresses two messages encoding a parathyroid hormone-like peptide: evidence for the alternative splicing of a single-copy gene. *Proc Natl Acad Sci U S A***85**, 4605-9.
- Timoshanko, J. R., Kitching, A. R., Iwakura, Y., Holdsworth, S. R. and Tipping, P. G.** (2004). Contributions of IL-1beta and IL-1alpha to crescentic glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol***15**, 910-8.
- Timoshanko, J. R., Sedgwick, J. D., Holdsworth, S. R. and Tipping, P. G.** (2003). Intrinsic renal cells are the major source of tumor necrosis factor contributing to renal injury in murine crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol***14**, 1785-93.
- Tipping, P. G., Huang, X. R., Qi, M., Van, G. Y. and Tang, W. W.** (1998). Crescentic glomerulonephritis in CD4- and CD8-deficient mice. Requirement for CD4 but not CD8 cells. *Am J Pathol***152**, 1541-8.
- Tipping, P. G. and Kitching, A. R.** (2005). Glomerulonephritis, Th1 and Th2: what's new? *Clin Exp Immunol***142**, 207-15.
- Tomasoni, S., Noris, M., Zappella, S., Gotti, E., Casiraghi, F., Bonazzola, S., Benigni, A. and Remuzzi, G.** (1998). Upregulation of renal and systemic cyclooxygenase-2 in patients with active lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol***9**, 1202-12.
- Tomita, N., Morishita, R., Tomita, S., Kaneda, Y., Higaki, J., Ogihara, T. and Horiuchi, M.** (2001). Inhibition of TNF-alpha, induced cytokine and adhesion molecule. Expression in glomerular cells *in vitro* and *in vivo* by transcription factor decoy for NFkappaB. *Exp Nephrol***9**, 181-90.
- Topham, P. S., Csizmadia, V., Soler, D., Hines, D., Gerard, C. J., Salant, D. J. and Hancock, W. W.** (1999). Lack of chemokine receptor CCR1 enhances Th1 responses and glomerular injury during nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest***104**, 1549-57.
- Toribio, R. E., Brown, H. A., Novince, C. M., Marlow, B., Herson, K., Lanigan, L. G., Hildreth, B. E., 3rd, Werbeck, J. L., Shu, S. T., Lorch, G. et al.** (2010). The midregion, nuclear localization sequence, and C terminus of PTHrP regulate skeletal development, hematopoiesis, and survival in mice. *FASEB J***24**, 1947-57.
- Torrington, O., Turner, R. T., Carter, W. B., Firek, A. F., Jacobs, C. A. and Heath, H., 3rd.** (1992). Inhibition by human interleukin-1 alpha of parathyroid hormone-related peptide effects on renal calcium and phosphorus metabolism in the rat. *Endocrinology***131**, 5-13.
- Tourriere, H., Chebli, K. and Tazi, J.** (2002). mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie***84**, 821-37.
- Tovar Sepulveda, V. A. and Falzon, M.** (2002a). Parathyroid hormone-related protein enhances PC-3 prostate cancer cell growth via both autocrine/paracrine and intracrine pathways. *Regul Pept***105**, 109-20.

- Tovar Sepulveda, V. A. and Falzon, M.** (2002b). Regulation of PTH-related protein gene expression by vitamin D in PC-3 prostate cancer cells. *Mol Cell Endocrinol***190**, 115-24.
- Tovar Sepulveda, V. A., Shen, X. and Falzon, M.** (2002). Intracrine PTHrP protects against serum starvation-induced apoptosis and regulates the cell cycle in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology***143**, 596-606.
- Traebert, M., Roth, J., Biber, J., Murer, H. and Kaissling, B.** (2000). Internalization of proximal tubular type II Na-P(i) cotransporter by PTH: immunogold electron microscopy. *Am J Physiol Renal Physiol***278**, F148-54.
- Turner, M., Chantry, D., Buchan, G., Barrett, K. and Feldmann, M.** (1989). Regulation of expression of human IL-1 alpha and IL-1 beta genes. *J Immunol***143**, 3556-61.
- Uchino, S., Kellum, J. A., Bellomo, R., Doig, G. S., Morimatsu, H., Morgera, S., Schetz, M., Tan, I., Bouman, C., Macedo, E. et al.** (2005). Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA***294**, 813-8.
- Umezono, T., Toyoda, M., Kato, M., Miyauchi, M., Kimura, M., Maruyama, M., Honma, M., Yagame, M. and Suzuki, D.** (2006). Glomerular expression of CTGF, TGF-beta 1 and type IV collagen in diabetic nephropathy. *J Nephrol***19**, 751-7.
- Usdin, T. B.** (2000). The PTH2 receptor and TIP39: a new peptide-receptor system. *Trends Pharmacol Sci***21**, 128-30.
- Usdin, T. B., Bonner, T. I. and Hoare, S. R.** (2002). The parathyroid hormone 2 (PTH2) receptor. *Receptors Channels***8**, 211-8.
- Uttarwar, L., Peng, F., Wu, D., Kumar, S., Gao, B., Ingram, A. J. and Krepinsky, J. C.** (2011). HB-EGF release mediates glucose-induced activation of the epidermal growth factor receptor in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol***300**, F921-31.
- Valin, A., Guillen, C. and Esbrit, P.** (2001). C-terminal parathyroid hormone-related protein (PTHrP) (107-139) stimulates intracellular Ca(2+) through a receptor different from the type 1 PTH/PTHrP receptor in osteoblastic osteosarcoma UMR 106 cells. *Endocrinology***142**, 2752-9.
- Vallon, V. and Thomson, S. C.** (2012). Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Annu Rev Physiol***74**, 351-75.
- van der Veen, B. S., Petersen, A. H., Belperio, J. A., Satchell, S. C., Mathieson, P. W., Molema, G. and Heeringa, P.** (2009). Spatiotemporal expression of chemokines and chemokine receptors in experimental anti-myeloperoxidase antibody-mediated glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol***158**, 143-53.
- van Roeyen, C. R., Eitner, F., Boor, P., Moeller, M. J., Raffetseder, U., Hanssen, L., Bucher, E., Villa, L., Banas, M. C., Hudkins, K. L. et al.** (2011). Induction of progressive glomerulonephritis by podocyte-specific overexpression of platelet-derived growth factor-D. *Kidney Int***80**, 1292-305.
- Vasavada, R. C., Wysolmerski, J. J., Broadus, A. E. and Philbrick, W. M.** (1993). Identification and characterization of a GC-rich promoter of the human parathyroid hormone-related peptide gene. *Mol Endocrinol***7**, 273-82.
- Vaughan, M. R. and Quaggin, S. E.** (2008). How do mesangial and endothelial cells form the glomerular tuft? *J Am Soc Nephrol***19**, 24-33.
- Vidotti, D. B., Casarini, D. E., Cristovam, P. C., Leite, C. A., Schor, N. and Boim, M. A.** (2004). High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol***286**, F1039-45.
- Vielhauer, V., Stavrakis, G. and Mayadas, T. N.** (2005). Renal cell-expressed TNF receptor 2, not receptor 1, is essential for the development of glomerulonephritis. *J Clin Invest***115**, 1199-209.
- Vilardaga, J. P., Romero, G., Friedman, P. A. and Gardella, T. J.** (2010). Molecular basis of parathyroid hormone receptor signaling and trafficking: a family B GPCR paradigm. *Cell Mol Life Sci***68**, 1-13.
- Vilaysane, A., Chun, J., Seamone, M. E., Wang, W., Chin, R., Hirota, S., Li, Y., Clark, S. A., Tschopp, J., Trpkov, K. et al.** (2010). The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J Am Soc Nephrol***21**, 1732-44.
- Vinen, C. S. and Oliveira, D. B.** (2003). Acute glomerulonephritis. *Postgrad Med J***79**, 206-13; quiz 212-3.
- Wagner, D. D. and Frenette, P. S.** (2008). The vessel wall and its interactions. *Blood***111**, 5271-81.
- Wagrowska-Danilewicz, M., Danilewicz, M. and Stasikowska, O.** (2005). CC chemokines and chemokine receptors in IgA nephropathy (IgAN) and in non-IgA mesangial proliferative glomerulonephritis (MesProGN). the immunohistochemical comparative study. *Pol J Pathol***56**, 121-6.

- Walpen, S., Beck, K. F., Schaefer, L., Raslik, I., Eberhardt, W., Schaefer, R. M. and Pfeilschifter, J.** (2001). Nitric oxide induces MIP-2 transcription in rat renal mesangial cells and in a rat model of glomerulonephritis. *FASEB J*15, 571-3.
- Wan, M., Yang, C., Li, J., Wu, X., Yuan, H., Ma, H., He, X., Nie, S., Chang, C. and Cao, X.** (2008). Parathyroid hormone signaling through low-density lipoprotein-related protein 6. *Genes Dev*22, 2968-79.
- Wang, B., Ardura, J. A., Romero, G., Yang, Y., Hall, R. A. and Friedman, P. A.** (2010a). Na/H exchanger regulatory factors control parathyroid hormone receptor signaling by facilitating differential activation of G(alpha) protein subunits. *J Biol Chem*285, 26976-86.
- Wang, B., Bisello, A., Yang, Y., Romero, G. G. and Friedman, P. A.** (2007a). NHERF1 regulates parathyroid hormone receptor membrane retention without affecting recycling. *J Biol Chem*282, 36214-22.
- Wang, B., Yang, Y. and Friedman, P. A.** (2008a). Na/H exchange regulatory factor 1, a novel AKT-associating protein, regulates extracellular signal-regulated kinase signaling through a B-Raf-mediated pathway. *Mol Biol Cell*19, 1637-45.
- Wang, C., Hou, X., Mohapatra, S., Ma, Y., Cress, W. D., Pledger, W. J. and Chen, J.** (2005). Activation of p27Kip1 Expression by E2F1. A negative feedback mechanism. *J Biol Chem*280, 12339-43.
- Wang, C., Liu, X., Peng, H., Tang, Y., Tang, H., Chen, Z., Lou, T. and Zhang, H.** (2010b). Mesangial cells stimulated by immunoglobulin A1 from IgA nephropathy upregulates transforming growth factor-beta1 synthesis in podocytes via renin-angiotensin system activation. *Arch Med Res*41, 255-60.
- Wang, C., Liu, X., Tang, Y., Peng, H., Ye, Z. C., Zhang, J., Tang, H. and Lou, T.** (2012). Medium from mesangial cells incubated with aggregated IgA1 from IgA nephropathy patients reduces podocyte adhesion through activation of the renin angiotensin system. *Swiss Med Wkly*141, w13304.
- Wang, C., Liu, X., Ye, Z., Zhang, J., Tang, H., Chen, Z., Zhang, H. and Lou, T.** (2009). Mesangial medium with IgA1 from IgA nephropathy inhibits nephrin expression in mouse podocytes. *Eur J Clin Invest*39, 561-7.
- Wang, C., Pan, Y., Zhang, Q. Y., Wang, F. M. and Kong, L. D.** (2011). Quercetin and Allopurinol Ameliorate Kidney Injury in STZ-Treated Rats with Regulation of Renal NLRP3 Inflammasome Activation and Lipid Accumulation. *PLoS One*7, e38285.
- Wang, C., Peng, H., Tang, H., Liu, X., Chen, Z., Lou, T. and Yu, X.** (2007b). Serum IgA1 from IgA nephropathy patients induces apoptosis in podocytes through direct and indirect pathways. *Clin Invest Med*30, E240-9.
- Wang, S., Diao, H., Guan, Q., Cruikshank, W. W., Delovitch, T. L., Jevnikar, A. M. and Du, C.** (2008b). Decreased renal ischemia-reperfusion injury by IL-16 inactivation. *Kidney Int*73, 318-26.
- Wang, W., Zolty, E., Falk, S., Summer, S., Stearman, R., Geraci, M. and Schrier, R.** (2007c). Prostacyclin in endotoxemia-induced acute kidney injury: cyclooxygenase inhibition and renal prostacyclin synthase transgenic mice. *Am J Physiol Renal Physiol*293, F1131-6.
- Wasilewska, A., Zoch-Zwierz, W., Taranta-Janusz, K. and Kolodziejczyk, Z.** (2010). Urinary monocyte chemoattractant protein-1 excretion in children with glomerular proteinuria. *Scand J Urol Nephrol*45, 52-9.
- Wasserstein, A. G.** (1997). Membranous glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*8, 664-74.
- Watson, P. H., Fraher, L. J., Natale, B. V., Kisiel, M., Hendy, G. N. and Hodsman, A. B.** (2000). Nuclear localization of the type 1 parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor in MC3T3-E1 cells: association with serum-induced cell proliferation. *Bone*26, 221-5.
- Weening, J. J., D'Agati, V. D., Schwartz, M. M., Seshan, S. V., Alpers, C. E., Appel, G. B., Balow, J. E., Bruijn, J. A., Cook, T., Ferrario, F. et al.** (2004). The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol*15, 241-50.
- Weigert, C., Friess, U., Brodbeck, K., Haring, H. U. and Schleicher, E. D.** (2003). Glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase enzyme activity is necessary for the induction of TGF-beta1 and fibronectin expression in mesangial cells. *Diabetologia*46, 852-5.
- Weinman, E. J., Hall, R. A., Friedman, P. A., Liu-Chen, L. Y. and Shenolikar, S.** (2006). The association of NHERF adaptor proteins with G protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Physiol*68, 491-505.
- Weir, E. C., Philbrick, W. M., Amling, M., Neff, L. A., Baron, R. and Broadus, A. E.** (1996). Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*93, 10240-5.

- Weir, M. R.** (2012). Recognizing the link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Am J Manag Care* **17** Suppl **15**, S396-402.
- Werkmeister, J. R., Blomme, E. A., Weckmann, M. T., Grone, A., McCauley, L. K., Wade, A. B., O'Rourke, J., Capen, C. C. and Rosol, T. J.** (1998). Effect of transforming growth factor-beta1 on parathyroid hormone-related protein secretion and mRNA expression by normal human keratinocytes in vitro. *Endocrine* **8**, 291-9.
- Werman, A., Werman-Venkert, R., White, R., Lee, J. K., Werman, B., Krelin, Y., Voronov, E., Dinarello, C. A. and Apte, R. N.** (2004). The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2434-9.
- White, R. H.** (1973). Mesangial proliferative glomerulonephritis in childhood. *Perspect Nephrol Hypertens* **1** Pt **1**, 383-91.
- Whiteside, C. I. and Dlugosz, J. A.** (2002). Mesangial cell protein kinase C isozyme activation in the diabetic milieu. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F975-80.
- Wise, G. E.** (1998). The biology of tooth eruption. *J Dent Res* **77**, 1576-9.
- Wise, G. E., Que, B. G., Huang, H. and Lumpkin, S. J.** (2000). Enhancement of gene expression in rat dental follicle cells by parathyroid hormone-related protein. *Arch Oral Biol* **45**, 903-9.
- Wolf, G., Chen, S. and Ziyadeh, F. N.** (2005). From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes* **54**, 1626-34.
- Wolf, G., Sharma, K., Chen, Y., Ericksen, M. and Ziyadeh, F. N.** (1992). High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF-beta. *Kidney Int* **42**, 647-56.
- Wolf, G. and Ziyadeh, F. N.** (1999). Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* **56**, 393-405.
- Wolf, G. and Ziyadeh, F. N.** (2007). Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol* **106**, p26-31.
- Wolstein, J. M., Lee, D. H., Michaud, J., Buot, V., Stefanchik, B. and Plotkin, M. D.** (2010). INK4a knockout mice exhibit increased fibrosis under normal conditions and in response to unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* **299**, F1486-95.
- Wolzt, M., Schmetterer, L., Dorner, G., Zelger, G., Entlicher, J., Kapiotis, S. and Eichler, H. G.** (1997). Hemodynamic effects of parathyroid hormone-related peptide-(1-34) in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 2548-51.
- Wornle, M., Schmid, H., Merkle, M. and Banas, B.** (2004). Effects of chemokines on proliferation and apoptosis of human mesangial cells. *BMC Nephrol* **5**, 8.
- Wu, D., Chen, X., Guo, D., Hong, Q., Fu, B., Ding, R., Yu, L., Hou, K., Feng, Z., Zhang, X. et al.** (2005). Knockdown of fibronectin induces mitochondria-dependent apoptosis in rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* **16**, 646-57.
- Wu, T. H., Wu, S. C., Huang, T. P., Yu, C. L. and Tsai, C. Y.** (1996a). Increased excretion of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in urine from patients with IgA nephropathy and Schonlein-Henoch purpura. *Nephron* **74**, 79-88.
- Wu, T. L., Soifer, N. E., Burtis, W. J., Milstone, L. M. and Stewart, A. F.** (1991). Glycosylation of parathyroid hormone-related peptide secreted by human epidermal keratinocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **73**, 1002-7.
- Wu, T. L., Vasavada, R. C., Yang, K., Massfelder, T., Ganz, M., Abbas, S. K., Care, A. D. and Stewart, A. F.** (1996b). Structural and physiologic characterization of the mid-region secretory species of parathyroid hormone-related protein. *J Biol Chem* **271**, 24371-81.
- Wu, W. B., Chang, S. C., Liau, M. Y. and Huang, T. F.** (2001). Purification, molecular cloning and mechanism of action of graminelysin I, a snake-venom-derived metalloproteinase that induces apoptosis of human endothelial cells. *Biochem J* **357**, 719-28.
- Wysolmerski, J. J. and Broadus, A. E.** (1994). Hypercalcemia of malignancy: the central role of parathyroid hormone-related protein. *Annu Rev Med* **45**, 189-200.
- Wysolmerski, J. J., Philbrick, W. M., Dunbar, M. E., Lanske, B., Kronenberg, H. and Broadus, A. E.** (1998). Rescue of the parathyroid hormone-related protein knockout mouse demonstrates that parathyroid hormone-related protein is essential for mammary gland development. *Development* **125**, 1285-94.
- Xiao, H., Schreiber, A., Heeringa, P., Falk, R. J. and Jennette, J. C.** (2007). Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Pathol* **170**, 52-64.

- Yamagishi, S. and Matsui, T.** (2010). Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxid Med Cell Longev***3**, 101-8.
- Yang, L. V., Radu, C. G., Roy, M., Lee, S., McLaughlin, J., Teitell, M. A., Iruela-Arispe, M. L. and Witte, O. N.** (2007). Vascular abnormalities in mice deficient for the G protein-coupled receptor GPR4 that functions as a pH sensor. *Mol Cell Biol***27**, 1334-47.
- Yang, T., Hassan, S., Huang, Y. G., Smart, A. M., Briggs, J. P. and Schnermann, J. B.** (1997). Expression of PTHrP, PTH/PTHrP receptor, and Ca(2+)-sensing receptor mRNAs along the rat nephron. *Am J Physiol***272**, F751-8.
- Yapici, U., Kers, J., Bemelman, F. J., Roelofs, J. J., Groothoff, J. W., van der Loos, C. M., van Donselaar-van der Pant, K. A., Idu, M. M., Claessen, N., ten Berge, I. J. et al.** (2011). Interleukin-17 positive cells accumulate in renal allografts during acute rejection and are independent predictors of worse graft outcome. *Transpl Int***24**, 1008-17.
- Yasuda, T., Banville, D., Hendy, G. N. and Goltzman, D.** (1989a). Characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. Functional and evolutionary aspects. *J Biol Chem***264**, 7720-5.
- Yasuda, T., Banville, D., Rabbani, S. A., Hendy, G. N. and Goltzman, D.** (1989b). Rat parathyroid hormone-like peptide: comparison with the human homologue and expression in malignant and normal tissue. *Mol Endocrinol***3**, 518-25.
- Ye, Y., Falzon, M., Seitz, P. K. and Cooper, C. W.** (2001a). Overexpression of parathyroid hormone-related protein promotes cell growth in the rat intestinal cell line IEC-6. *Regul Pept***99**, 169-74.
- Ye, Y., Wang, C., Du, P., Falzon, M., Seitz, P. K. and Cooper, C. W.** (2001b). Overexpression of parathyroid hormone-related protein enhances apoptosis in the rat intestinal cell line, IEC-6. *Endocrinology***142**, 1906-14.
- Yokoyama, H., Wada, T., Furuichi, K., Segawa, C., Shimizu, M., Kobayashi, K., Su, S., Mukaida, N. and Matsushima, K.** (1998). Urinary levels of chemokines (MCAF/MCP-1, IL-8) reflect distinct disease activities and phases of human IgA nephropathy. *J Leukoc Biol***63**, 493-9.
- Young, B. A., Johnson, R. J., Alpers, C. E., Eng, E., Gordon, K., Floege, J., Couser, W. G. and Seidel, K.** (1995). Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int***47**, 935-44.
- Yuasa, T., Izawa, T., Kuwamura, M. and Yamate, J.** Thy-1 Expressing Mesenchymal Cells in Rat Nephrogenesis in Correlation with Cells Immunoreactive for alpha-Smooth Muscle Actin and Vimentin. *J Toxicol Pathol***23**, 1-10.
- Yusta, B., Estall, J. and Drucker, D. J.** (2002). Glucagon-like peptide-2 receptor activation engages bad and glycogen synthase kinase-3 in a protein kinase A-dependent manner and prevents apoptosis following inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem***277**, 24896-906.
- Zelmanovitz, T., Gerchman, F., Balthazar, A. P., Thomazelli, F. C., Matos, J. D. and Canani, L. H.** (2009). Diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr***1**, 10.
- Zhang, L., Bertucci, A. M., Smith, K. A., Xu, L. and Datta, S. K.** (2007). Hyperexpression of cyclooxygenase 2 in the lupus immune system and effect of cyclooxygenase 2 inhibitor diet therapy in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum***56**, 4132-41.
- Zhang, L., Nakazawa, K. and Shigematsu, H.** (2001). Participation of endothelial cells and transformed mesangial cells in remodeling of glomerular capillary loops in Thy-1 nephritis. *Pathol Int***51**, 227-39.
- Zhang, P., Jobert, A. S., Couvineau, A. and Silve, C.** (1998). A homozygous inactivating mutation in the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor causing Blomstrand chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab***83**, 3365-8.
- Zhang, Y., Huang, P., Jiang, T., Zhao, J. and Zhang, N.** (2010a). Role of aldose reductase in TGF-beta1-induced fibronectin synthesis in human mesangial cells. *Mol Biol Rep***37**, 2735-42.
- Zhang, Y., Peng, F., Gao, B., Ingram, A. J. and Krepinsky, J. C.** (2010b). Mechanical strain-induced RhoA activation requires NADPH oxidase-mediated ROS generation in caveolae. *Antioxid Redox Signal***13**, 959-73.
- Ziyadeh, F. N.** (2008). Different roles for TGF-beta and VEGF in the pathogenesis of the cardinal features of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract***82 Suppl 1**, S38-41.
- Zoja, C., Benigni, A., Noris, M., Corna, D., Casiraghi, F., Pagnoncelli, M., Rottoli, D., Abbate, M. and Remuzzi, G.** (2001). Mycophenolate mofetil combined with a cyclooxygenase-2 inhibitor ameliorates murine lupus nephritis. *Kidney Int***60**, 653-63.

COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS:

Communications

-**M Hochane** ; D Raison ; C Coquard ; T Massfelder ; B Moulin ; M Barthelmebs ; *La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) est un facteur de survie des cellules mésangiales exposées à des cytokines proinflammatoires*. 14^e Réunion Commune de la Société Francophone de Dialyse et de la Société de Néphrologie, 4-7 Octobre 2012, Genève. Communication orale. *Néphrologie et Thérapeutique*, 8(5) : 291, 2012 (abstract)

-D Raison, **M Hochane**, C Coquard, B Moulin, T Massfelder, JJ Helwig, M Barthelmebs. *Régulation de l'expression de la PTHrP dans les cellules épithéliales rénales et voies de signalisation impliquées dans ses effets sur la transdifférenciation épithélio-mésenchymateuse*. 13^e Réunion Commune de la Société Francophone de Dialyse et de la Société de Néphrologie, 4-7 Octobre 2011, Bordeaux. Communication affichée. *Néphrologie et Thérapeutique*, 7(5) : 405, 2011 (Abstract)

-D Raison, C Coquard, **M Hochane**, T Massfelder, B Moulin, D Metzger, JJ Helwig, M Barthelmebs. *Effets hémodynamiques rénaux de la délétion conditionnelle Crelox en PTHrP dans le muscle lisse*. 13^e Réunion Commune de la Société Francophone de Dialyse et de la Société de Néphrologie, 4-7 Octobre 2011, Bordeaux. Communication orale. *Néphrologie et Thérapeutique*, 7(5) : 294, 2011 (Abstract)

-**M Hochane**, D Raison, C Coquard, B Moulin, O Imhoff, T Massfelder, D Metzger, JJ Helwig, M Barthelmebs. *La PTHrP, un facteur de prolifération et de survie des cellules mésangiales en culture*. 12^e Réunion Commune de la Société Francophone de Dialyse et de la Société de Néphrologie, 28 Septembre-1^{er} Octobre 2010, Bruxelles. Communication affichée. *Néphrologie et Thérapeutique*, Vol 6(5) : 474, 2010 (Abstract)

-D Raison, **M Hochane**, C Coquard, B Moulin, T Massfelder, JJ Helwig, M Barthelmebs. *La PTHrP induit l'EMT sur les cellules épithéliales en culture*. 12^e Réunion Commune de la Société Francophone de Dialyse et de la Société de Néphrologie, 28 Septembre-1^{er} Octobre 2010, Bruxelles. Communication affichée. *Néphrologie et Thérapeutique*, 6(5) : 474, 2010 (Abstract)

-D Raison, **M Hochane**, C Coquard, B Moulin, L Marcellin, J Steger, JJ Helwig, M Barthelmebs. *La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP), une nouvelle cytokine proinflammatoire et/ou profibrotique rénale*. 11^e Réunion Commune de la Société Francophone de Dialyse et de la Société de Néphrologie, 29 Septembre-2 Octobre 2009, Toulouse. Communication orale. *Néphrologie et Thérapeutique*, Vol 5(5) : 380, 2009 (Abstract)

-**M. Hochane**, O. Chauvel, F. Plassart, D. Chaoui, J.M. Descoutures, *Use of bortezomib in the treatment of plasma cell leukaemia : Two case-reports*. 14th congress of the European Association of Hospital Pharmacists, 25 - 27 March 2009, Barcelona, Spain.

-**Hochane M**, Blanchet B, Giraudier S, Tod M, Astier A, Tulliez M, Hulin A. *Practical TDM of imatinib in chronic myeloid leukaemia*. *Fund Clin Pharmacol* 2008; 2(S436)2:89. (Abstract)

Publications

-**Mazène Hochane**, Denis Raison, Catherine Coquard, Olivier Imhoff, Thierry Massfelder, Bruno Moulin, Jean-Jacques Helwig, Mariette Barthelmebs. *Parathyroid hormone related protein is a mitogenic and a survival factor of mesangial cells: role of intracrine and paracrine pathway*. *Endocrinology* (Accepté)

-**Mazène Hochane**, Denis Raison, Catherine Coquard, Thierry Massfelder, Mariette Barthelmebs. *Parathyroid hormone-related protein modulates cytokines and chemokines expression in mesangial cells and blunts apoptosis by enhancing Cox-2 expression*. *J. Am. Soc. Nephrol* (soumis).

- **Mazène Hochane**, Denis Raison, Catherine Coquard, Claire Béraud, Audrey Bethry, Thierry Massfelder, Mariette Barthelmebs. *The parathyroid hormone related protein in a mouse model of mesangial proliferative glomerulonephritis*. (en préparation)

-Denis Raison, Catherine Coquard, **Mazène Hochane**, Jacques Steger, Thierry Massfelder, Bruno Moulin, Andrew C Karaplis, Daniel Metzger, Pierre Chambon, Jean-Jacques Helwig, Mariette Barthelmebs. *Targeted Deletion of PTHrP in Smooth Muscle Cells Alters Renal Hemodynamics but Does Not Affect Blood Pressure*. *Am. J of Physiol-Renal Physiology* (en révision).

-Denis Raison, **Mazène Hochane**, Catherine Coquard, Jacques Steger, Thierry Massfelder, Bruno Moulin, Luc Marcellin, Jean-Jacques Helwig, Mariette Barthelmebs. *The parathyroid hormone related protein, an actor of renal interstitial fibrosis*. (en préparation).

-**Mazène Hochane**, Aurélie Le Bris, Malika Abderrahmane, Jean-Michel Descoutures. *Analysis of psychotropic drugs in geriatric long-term care units of a French general hospital*. *EJHP Practice* – 17(6): 52-58, 2011