



HAL
open science

Conditionnement pharmacologique par la ciclosporine A dans l'ischémie-reperfusion rénale

Sandrine Lemoine

► **To cite this version:**

Sandrine Lemoine. Conditionnement pharmacologique par la ciclosporine A dans l'ischémie-reperfusion rénale. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10339 . tel-01437301

HAL Id: tel-01437301

<https://theses.hal.science/tel-01437301>

Submitted on 17 Jan 2017

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.

N° d'ordre 339-2014

Année 2014

Conditionnement pharmacologique par la ciclosporine A dans l'ischémie-reperfusion rénale

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

L'ECOLE DOCTORALE EDISS

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement

Le 16 décembre 2014

Par

Sandrine LEMOINE

Directeur de thèse : Pr Laurent Juillard

JURY

Professeur Marie Essig
Professeur Eric Fontaine
Professeur Thierry Hauet
Professeur Laurent Juillard
Professeur Maurice Laville
Professeur Michel Ovize

Université de Limoges
Université de Grenoble
Université de Poitiers
Université de Lyon
Université de Lyon
Université de Lyon

Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Directeur
Examineur
Examineur

N° d'ordre

Année 2014

Conditionnement pharmacologique par la ciclosporine A dans l'ischémie-reperfusion rénale

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

L'ECOLE DOCTORALE EDISS

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement

Le 16 décembre 2014

Par

Sandrine LEMOINE

Directeur de thèse : Pr Laurent Juillard

JURY

Professeur Marie Essig
Professeur Eric Fontaine
Professeur Thierry Hauet
Professeur Laurent Juillard
Professeur Maurice Laville
Professeur Michel Ovize

Université de Limoges
Université de Grenoble
Université de Poitiers
Université de Lyon
Université de Lyon
Université de Lyon

Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Directeur
Examineur
Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

Vice-président du Conseil Scientifique

M. Alain HELLEU

Directeur Général des Services

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d’Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme Caroline FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. Jean-Claude PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y. VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Ce travail a été réalisé au sein de :

L'Unité de Recherche INSERM U1060 - CarMeN - (Pr. Hubert Vidal)

Equipe 5 "Cardioprotection" (Pr. Michel Ovize) Université Claude Bernard Lyon 1
8 Avenue Rockefeller 69008 Lyon

Sous la direction **du Professeur Laurent JUILLARD**

Au professeur Laurent Juillard.

Laurent, je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée dans la réalisation de ce projet. Sois certain de ma profonde gratitude pour tous les conseils avisés et du soutien que tu m'as apporté. J'espère pouvoir rester travailler à tes côtés pendant encore de longues années.

Au professeur Michel Ovize, merci pour votre accueil dans ce laboratoire il y a maintenant 5 ans. Merci pour votre confiance et vos conseils. Grâce à vous, nous avons osé injecter 10 mg/kg de ciclosporine à nos souris !

Aux Professeurs Marie Essig, Eric Fontaine et Thierry Hauet, qui ont accepté malgré leurs multiples obligations de nous accorder le temps nécessaire à l'expertise de ce travail. Je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Au Professeur Maurice Laville, merci d'avoir accepté de juger ce travail et de votre soutien au cours de ces dernières années.

Au Professeur Hubert Vidal, merci de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire CARMEN.

A l'ensemble des membres du laboratoire CARMEN 1060 pour leur accueil et leur bonne humeur: Murielle, René, Claire, Delphine, Lionel, Bruno, Elisabeth, Noëlle, Abdallah, Marie Christine, Fabien, Sylvie, Camille, Lucille, Yves, Ribal, Joseph, Christophe, Martin, Vincent.

Particulièrement,

Merci à Lionel pour ces heures de psychothérapie au bloc opératoire

Merci à Bruno pour ton oreille attentive

Et surtout merci à vous 2 pour votre disponibilité

Merci à Murielle pour son rôle de maman

Merci à Claire et Delphine, vous êtes toujours là quand on a besoin de vous, surtout quand les westerns disparaissent de leur membrane...Je vais suivre ton conseil, Claire, je vais me faire plaisir !

Merci à Rania pour ta bonne humeur et ton aide qui ont été précieuses

Merci à Abdallah, pour sa sincérité et ses conseils avisés

Merci à Marie Christine pour son aide technique

Mais aussi à ceux qui sont partis du laboratoire

A Maryline, merci de m'avoir guidée dans le laboratoire, et montré toutes ces si belles techniques de Western Blot...

A Geoffrey, merci pour ton aide durant mes mesures de respiration

A Elise, merci pour ta bonne humeur perpétuelle ! J'espère que nous continuerons à collaborer...

A l'ensemble de l'équipe du pavillon P

Merci à Deborah, ma « co-chef », qui m'a permise d'aller si souvent au laboratoire.

Merci à Emilie, qui sait toujours être positive et a toujours un mot de réconfort.

Merci à Anne, qui me donne toujours le sentiment d'appartenir à l'équipe.

Merci à Fitsum, de m'avoir guidée vers Laurent et du modèle qu'elle représente pour nous tous.

A Justine merci pour ton soutien dans les moments difficiles,

A Caroline, pour notre amitié si ancienne,

A Julie, merci d'avoir été la première à être là,

A ma belle famille, Moumoute, Geoffroy, Hélène, Magalie, Matthieu et le nouveau venu,
Antoine,

A Marine et Fanny,

Parce que votre amitié m'est précieuse,

Parce que je sais que vous veillez sur moi,

Marine, pour ta bonne humeur si réconfortante

Fanny, notre courbe sinusoïde inverse me permet d'y croire,

Vous êtes de vraies amies.

A mes parents,

A qui je dois tout,

Qui me soutiennent dans mes choix, qui sont toujours présents aux moments cruciaux,

Merci

A Lambert,

Malgré toutes ces difficultés traversées, tu es encore là,

Pour tous ces voyages déjà faits et surtout à faire,

Pour tous ces projets à venir,

Avec tout mon amour,

A Mathis et Rafael,

Parce que vos éclats de rire me donnent le courage de mes ambitions,

Je vous aime « le plus fort du monde »,

Liste des publications en rapport avec la thématique de ce travail expérimental

Post-conditioning with cyclosporine reduces early renal dysfunction by inhibiting mitochondrial permeability transition.

Sandrine Lemoine^{1,2}, Bruno Pillot¹, Nicolas Rognant¹, Lionel Augeul¹, Maud Rayberin⁵, Annie Varennes⁴, Maurice Laville^{1,6}, Michel Ovize^{1,3}, Laurent Juillard^{1,2}.

Accepté dans transplantation, proof en attente.

Heat Shock protein 70 modulates the mitochondrial permeability transition in preconditioning with increased dose of cyclosporine A in renal ischemia reperfusion.

Sandrine Lemoine^{1,2}, Bruno Pillot¹, Lionel Augeul¹, Maud Rayberin⁵, Annie Varennes⁴, Michel Ovize^{1,3}, Laurent Juillard^{1,2}.

A soumettre.

Liste des communications scientifiques dans des congrès en rapport avec la thématique de ce travail expérimental

Communications orales

2012. Société de Néphrologie, Genève.

S. Lemoine, Nicolas Rognant, Fitsum guebregziabher, Lionel Augeul, Maurice Laville, Michel Ovize, Laurent Juillard. Mitochondrial Protection with Pre- and Postconditioning during Renal Ischemia-Reperfusion.

2013. Néphropédies, Lyon

Protection dans l'ischémie reperfusion rénale.

Communications affichées

2011. Journée de l'hypertension, Paris.

Sandrine Lemoine, Lionel Augeul, Nicolas Rognant, Michel Ovize, Laurent Juillard.

Modèle murin d'ischémie-reperfusion rénale.

2012. American society of nephrology. San Diego.

S. Lemoine, Nicolas Rognant, Fitsum guebregziabher, Lionel Augeul, Maurice Laville, Michel Ovize, Laurent Juillard.

Pré et post-conditionnement à la ciclosporine A dans l'ischémie-reperfusion rénale

2013. Société de Physiologie, Angers

2013. Société de néphrologie, Nantes.

S. Lemoine, Nicolas Rognant, Fitsum guebregziabher, Lionel Augeul, Maurice Laville, Michel Ovize, Laurent Juillard.

Rôle du pore de transition de perméabilité dans l'ischémie-reperfusion rénale.

2014. Société de Physiologie, Poitiers

2014. Société de néphrologie, Saint Etienne.

Mécanismes de protection par la ciclosporine dans l'ischémie reperfusion rénale : rôle de l'HSP70.

S. Lemoine, B. Pillot, L. Augeul, Annie Varennes, Maud Rabeyrin, M. Ovize, L. Juillard

2014. ERA-EDTA, Amsterdam.

2014. American society of nephrology. Philadelphie.

Mechanisms of the renal protection by cyclosporine after an ischemia reperfusion : Role of HSP70.

S. Lemoine, B. Pillot, L. Augeul, M. Ovize, L. Juillard

Liste des autres articles publiés

In Chronic Kidney Disease, Serum α -Klotho is Related to Serum Bicarbonate and Proteinuria.

Hage V, Pelletier S, Dubourg L, Drai J, Cuerq C, **Lemoine S**, Hadj-Aïssa A, Laville M, Fouque D.

J Ren Nutr. 2014 Sep 3.

Evaluation of renal function in patients with cirrhosis: where are we now?

Rognant N, **Lemoine S**.

World J Gastroenterol. 2014 Mar 14;20(10):2533-41.

Accuracy of GFR estimation in obese patients.

Lemoine S, Guebre-Egziabher F, Sens F, Nguyen-Tu MS, Juillard L, Dubourg L, Hadj-Aïssa A.

Clin J Am Soc Nephrol. 2014 Apr;9(4):720-7.

Creatinine- versus cystatine C-based equations in assessing the renal function of candidates for liver transplantation with cirrhosis.

De Souza V, Hadj-Aïssa A, Dolomanova O, Rabilloud M, Rognant N, **Lemoine S**, Radenne S, Dumortier J, Chapuis-Cellier C, Beyerle F, Bon C, Iwaz J, Selistre L, Dubourg L.

Hepatology. 2014 Apr;59(4):1522-31

[Evaluation of renal oxygen content by BOLD MRI].

Rognant N, **Lemoine S**, Laville M, Juillard L.

Nephrol Ther. 2012 Jul;8(4):212-5. doi: 10.1016/j.nephro.2011.12.002. Epub 2012 Feb 1.

[Contribution of X-ray computed tomography in the evaluation of kidney performance].

Lemoine S, Rognant N, Collet-Benzaquen D, Juillard L.

Nephrol Ther. 2012 Jul;8(4):206-11. doi: 10.1016/j.nephro.2011.07.413. Epub 2011 Oct 22.

Renal perfusion: noninvasive measurement with multidetector CT versus fluorescent microspheres in a pig model.

Lemoine S, Papillard M, Belloi A, Rognant N, Fouque D, Laville M, Rouvière O, Juillard L.

Radiology. 2011 Aug;260(2):414-20. doi: 10.1148/radiol.11101317. Epub 2011 Jun 14.

Performance of the chronic kidney disease epidemiology collaboration equation to estimate glomerular filtration rate in diabetic patients.

Rognant N, **Lemoine S**, Laville M, Hadj-Aïssa A, Dubourg L.

Diabetes Care. 2011 Jun;34(6):1320-2. doi: 10.2337/dc11-0203. Epub 2011 May 3.

Validation of renal oxidative metabolism measurement by positron-emission tomography.

Juillard L, **Lemoine S**, Janier MF, Barthez PY, Bonnefoi F, Laville M.

Hypertension. 2007 Jul;50(1):242-7. Epub 2007 May 14.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	17
Liste des figures	19
Liste des tableaux	21
<u>PARTIE 1: INTRODUCTION</u>	<u>22</u>
I. L'insuffisance rénale aiguë	23
A. Définition de l'insuffisance rénale aiguë	23
B. Epidémiologie de l'insuffisance rénale aiguë	25
C. Capacité de régénération après un épisode d'IRA	27
II. Les lésions d'ischémie-reperfusion rénale	29
A. Rappel de physiologie rénale	30
1. La perfusion rénale	30
2. Hétérogénéité mitochondriale au sein du parenchyme rénal	32
B. Modifications structurales des cellules rénales	36
1. Perte de la structure des cellules épithéliales	37
2. Dysfonction de la cellule endothéliale	38
3. L'inflammation	39
C. Physiopathologie des lésions d'ischémie-reperfusion	41
1. Lésions liées à l'ischémie	41
1.1 Déficit en ATP	42
1.2 Modification de l'homéostasie calcique	43
1.3 Stress oxydant	43
2. Lésions liées à la reperfusion	44
2.1 Formation d'espèces réactives de l'oxygène	45
2.2 Dysfonction mitochondriale	45
D. Mort Cellulaire	47
1. Nécrose	47
2. Apoptose	47
3. Autophagie	50

III. Ischémie-reperfusion et mitochondries	52
A. Structure des mitochondries	52
B. Fonctions mitochondriales	53
1. Synthèse en ATP	53
2. Production d'espèces réactives d'oxygène	56
3. Homéostasie calcique	57
C. Le pore de transition de perméabilité (mPTP)	57
1. Historique	57
2. Structure moléculaire du mPTP	58
2.1 L'Adenine Nucleotide Translocator (ANT)	59
2.2 Le Voltage-dependant anion channel (VDAC)	59
2.3 Translocator protein (TPSO)	60
2.4 Cyclophiline D (Cyp-D)	60
2.5 Phosphate carrier (Pic)	63
2.6 Le Complexe I	63
2.7 F ₀ /F ₁ ATP-synthétase	64
2.8 Hexokinase	65
3. Facteurs régulateurs du mPTP	65
4. Les conséquences de l'ouverture du mPTP	68
IV. Protection rénale par conditionnement	70
A. Le conditionnement ischémique	70
1. Le pré-conditionnement ischémique	73
2. Le post-conditionnement ischémique	74
3. Mécanismes de protection	75
3.1 Les inducteurs	77
3.2 Les médiateurs	78
3.3 Les effecteurs	81
4. Applications à la clinique	84
5. Le pré et post-conditionnement ischémique à distance	85
5.1 Modalités	85
5.2 Applications cliniques	86

B. Le conditionnement pharmacologique par la ciclosporine	87
1. Pharmacologie	87
2. Mécanismes d'action	88
3. Toxicité rénale	90
4. Le conditionnement par la CsA dans le cœur	91
5. Le conditionnement par la CsA dans le rein	92
6. Rôle de l'HSP70 dans la protection cellulaire	93
6.1 Définition	93
6.2 HSP70 et ischémie-reperfusion	93
6.3 Association Hif/HSP70	97

PARTIE 2: HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL **98**

PARTIE 3: MATERIELS ET METHODES **100**

I. Le modèle animal	101
A. Ethique	101
B. Protocole chirurgical	101
C. Protocoles expérimentaux	102
1. Le Post-conditionnement	102
2. Le Pré-conditionnement	104
3. Le rôle de l'HSP70	105
4. Les souris CypD-D KO	107
II. Analyse de la fonction rénale	107
A. Biologie	107
B. Histologie	108
III. Analyse des fonctions mitochondriales	108
A. Extraction mitochondriale	108
B. mesure de la capacité de rétention calcique	109
C. Phosphorylation oxydative	111
IV. Analyse des protéines	112
A. Extraction protéique	112
B. Western Blot	113
V. Analyses statistiques	114

PARTIE 4: RESULTATS ET DISCUSSION	115
I. Le modèle animal	116
A. Le modèle chirurgical	116
B. La méthode du TTC	118
C. Impact de l'anesthésie et de la néphrectomie sur le mPTP	120
D. Effets de l'injection de la CsA sur la pression artérielle	121
E. Caractérisation des souris CypD KO	122
II. Etude n°1	124
Postconditioning with cyclosporine reduces early renal dysfunction by inhibiting mitochondrial permeability transition.	
A. Article n°1	124
B. Synthèse et discussion	154
III. Etude n°2	155
Heat Shock Protein 70 modulates the mitochondrial permeability transition pore in preconditioning for renal ischemia-reperfusion with increased dose of cyclosporine A	
A. Article n°2	155
B. Résultats complémentaires	181
C. Synthèse et discussion	194
PARTIE 5: CONCLUSION	199
PARTIE 6: BIBLIOGRAPHIE	202

Liste des abréviations

AIF	Apoptosis inducing factor
Akt	Protein kinase B
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANT	Adenine nucleotide translocator
CsA	Ciclosporine A
Cyp-D	Cyclophiline D
DAMPs	Damage-associated molecular pattern molecules
$\Delta\Psi_m$	Potentiel de membrane mitochondriale
eIF2 α	Eukaryotic translation initiation factor 2 α
ERK	Extracellular signal regulated kinase
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
HSP 70	Heat shock protein 70
IL	Interleukine
IR	Ischémie-reperfusion
IRA	Insuffisance rénale aigue
JAK	Janus kinase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MRC	Maladie rénale chronique
mPTP	Pore de transition de perméabilité mitochondrial
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NIM811	N-methyl-4-isoleucine-ciclosporine
NO	Monooxyde d'azote

NTA	Nécrose tubulaire aigüe
Pi	Phosphate inorganique
PI3K	Phosphatidyl inositol 3 kinase
PostCI	Postconditionnement ischémique
Postcond-CsA	Postconditionnement à la ciclosporine
PréCI	Préconditionnement ischémique
Précond-CsA	Préconditionnement à la CsA
RCI	Respiratory control index
RISK	Reperfusion injury salvage kinase
RIFLE	Risk, Injru, Failure, Loss, End Stage
ROS	Reactive oxygen species (Espèces réactives d'oxygènes)
SAFE	Survival activating factor enhancement
TLR	Toll Like Receptor
TNF α	Tumor necrosis factor α
TPSO	Translocator protein
ULK-1	Unc-51-like kinase 1
UPR	unfolded protein response
VDAC	Voltage-dependant anion channel

Liste des Figures

Figure 1	Mortalité et progression de la maladie rénale chronique après IRA.	14
Figure 2	Hypothèses de réparation cellulaire après une IRA.	16
Figure 3	Néphron normal et vascularisation rénale.	19
Figure 4	Différents types de mitochondries suivant les cellules tubulaires.	22
Figure 5	Modifications structurales des cellules tubulaires rénales après IR.	23
Figure 6	Mécanismes de la réponse innées dans l'IR	28
Figure 7	Lésions due à l'ischémie-reperfusion.	29
Figure 8	Lésions liées à la reperfusion .	33
Figure 9	Voies de mort cellulaire	35
Figure 10	Régulation de l'autophagie.	38
Figure 11	Chaîne respiratoire mitochondriale.	43
Figure 12	Modèle hypothétique du mPTP.	45
Figure 13	Conséquences de l'ouverture du mPTP durant l'ischémie-reperfusion.	55
Figure 14	Résumé des principales voies impliquées par le PréCI et le PostCI.	58
Figure 15	Voies de signalisations activées dans le conditionnement	62
Figure 16	Inhibition du mPTP par la ciclosporine A.	75
Figure 17	Mécanismes possibles d'action de l'HSP70 dans l'IR rénale.	80
Figure 18	Protocole expérimental réalisé pour l'étude du Postconditionnement.	89
Figure 19	Protocole expérimental réalisé pour l'étude du PréConditionnement	91
Figure 20	Protocole expérimental réalisé pour l'étude du rôle de l'HSP70	92
Figure 21	Exemple de mesure de Capacité de Rétention Mitochondriale.	96

Figure 22	Exemple d'un enregistrement de respiration mitochondriale.	98
Figure 23	Validation du modèle animal d'IR chez la souris.	102
Figure 24	Exemple de la Méthode du TTC appliquée au rein.	105
Figure 25	Impact de la néphrectomie et de l'anesthésie sur la CRC.	106
Figure 26	Mesures de pressions artérielles après injection de CsA.	108
Figure 27	Concentration intra cellulaire rénale de la CsA au début de l'ischémie.	162
Figure 28	Taux de créatinine et score histologique entre les groupes à 3 mg/kg de CsA injectée 1h ou 10 min avant l'ischémie.	163
Figure 29	Capacité de rétention calcique en fonction du temps d'injection de la CsA.	165
Figure 30	Comparaison de la fonction rénale entre le pré-conditionnement par la CsA, le post conditionnement par la csA et le PostCI.	168
Figure 31	Comparaison de le CRC entre le préconditionnement par la CsA, le post conditionnement par la csA et le PostCI.	169
Figure 32	Taux de créatinine plasmatique et score histologique au cours de l'IR des souris CypD-KO.	170
Figure 33	Comparaison de la mesure de la capacité de rétention calcique entre les souris sham C57BL6 et cypD KO dans le rein.	171
Figure 34	Comparaison de la mesure de la capacité de rétention calcique entre les souris ischémique C57BL6 et cypD KO et les souris protégées par la CsA dans le rein.	172
Figure 35	Comparaison de la mesure de la capacité de rétention calcique entre les souris ischémique C57BL6 et cypD KO et les souris protégées par la CsA dans le rein avec ou sans CsA dans la cuve.	173
Figure 36	Schéma récapitulatif des résultats expérimentaux	178

Liste des tableaux

Tableau 1	Définition de l'insuffisance rénale aigue.	12
Tableau 2	Liste des publications traitant de l'IR et l'HSP70.	82
Tableau 3	Effets de l'injection de CsA sur la pression artérielle.	107
Tableau 4	Caractéristiques biologiques des souris cypD ^{-/-} .	109
Tableau 5	Phosphorylation oxydative dans le groupe CsA injecté 1h avant.	166
Tableau 6	Phosphorylation oxydative dans le groupe cypD-KO.	174

Partie I

INTRODUCTION

I. L'Insuffisance rénale aigüe

A. Définition

L'insuffisance rénale aigüe (IRA) est couramment définie par un déclin rapide de la fonction rénale. L'IRA conduit à une rétention hydro-sodée, une accumulation de déchets du catabolisme azoté, ainsi qu'à des troubles hydro-électrolytiques (hyperkaliémie et acidose métabolique) nécessitant parfois le recours à la dialyse.

Selon les recommandations internationales (1) et européennes (2), le diagnostic d'une insuffisance rénale aigüe se définit par une augmentation de la créatinine ($> 26,5 \mu\text{mol/L}$ en 48h ou $>$ à 1,5 fois la créatinine de base en 7 jours) et/ou par une diminution du débit urinaire. Les KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) ont établi une définition de l'IRA en 2012 (1), fusionnant les classifications proposées antérieurement, notamment le RIFLE (Risk, Injury and Failure) (3) et les critères d'AKIN (Acute Kidney Injury Network) (4). La sévérité de l'IRA est classée en 3 stades, décrit dans le tableau 1

Stade	Créatinine	Débit urinaire
Stade 1	Augmentation de la créatinine 1,5-1,9 fois la créatinine de base et/ou Augmentation de la créatinine de plus de 0,3 mg/dL (26,5 µmol/L)	Débit urinaire < 0,5 mL/kg/h durant une période de 6 à 12 heures
Stade 2	Augmentation de la créatinine 2-2,9 fois la créatinine de base	Débit urinaire < 0,5 mL/kg/h durant 2 périodes de 6 heures
Stade 3	Augmentation de la créatinine > 3 fois la créatinine de base ou Augmentation > 4 mg/dL (> 355µmol/L) ou Initiation d'une épuration extra rénale	Débit urinaire < 0,3 mL/kg/h sur une durée supérieure à 24 heures Ou Anurie pendant plus de 12 h

Tableau 1: Définition de l'insuffisance rénale aigüe, d'après les KDIGO (1).

B. Epidémiologie de l'insuffisance rénale aigüe

Il existe une grande variabilité dans l'incidence de l'IRA dans la littérature liée d'une part aux différentes définitions utilisées pour caractériser l'IRA mais également aux situations cliniques dans lesquelles elle peut apparaître (population générale, patients hospitalisés ou patients en réanimation) ainsi qu'à la disparité des comorbidités des patients. Ali *et al.* retrouvent une incidence de 2147 cas par million d'habitants et par an en utilisant les critères de RIFLE dans une population écossaise de 523290 habitants (5). Dans une population de patients hospitalisés, la fréquence de l'IRA est estimée à 15 % (6). Dans une population plus spécifique de patients hospitalisés en réanimation, Bagshaw *et al.* ont montré une incidence de 36,1% de l'IRA chez 120123 patients sur une durée de 5 ans (7).

Les conséquences de l'IRA sont nombreuses: augmentation de la mortalité intra-hospitalière et de la mortalité à long terme, persistance d'une maladie rénale chronique, dépendance vis à vis de la dialyse, et augmentation des coûts en terme de santé publique. Bagshaw *et al.* estiment la mortalité intrahospitalière des patients de réanimation à 33% pour les IRA de stade 3 (7). La mortalité à long terme est également augmentée chez des patients ayant eu un épisode d'IRA comparée à celle d'une population contrôle (8) (Figure 1A). Le risque de développer une maladie rénale chronique (MRC) est plus élevé après un épisode d'IRA, même réversible (6) (Figure 1B). En effet, une étude danoise publiée en 2013 montre un risque de 6,2 fois d'avoir une insuffisance rénale terminale dans les 5 ans après un épisode d'IRA (9). Une méta-analyse publiée en 2009 montrait un risque relatif de développer une MRC et de décès à long terme nettement supérieure dans le groupe de patients avec IRA (10). Palevski *et al.* ont montré que parmi les patients ayant eu une IRA sévère, 25% étaient

toujours dépendants d'une épuration extra rénale 60 jours après leur sortie de réanimation (11) et Uchino *et al.* ont montré que 13% des patients nécessitaient encore une dialyse à la sortie de réanimation (12). Bien que l'IRA soit de nature réversible, il persiste souvent, même après normalisation de la fonction rénale, des dommages sub-cliniques et extra rénaux pouvant entraîner un risque de progression vers l'insuffisance rénale terminale (6,13). Les conséquences de l'IRA entraînent également une augmentation des coûts de santé liés aux séquelles de l'IRA (14).

C. Capacité de régénération après un épisode d'IRA

Le rein a une capacité de régénérer dans les 6 à 8 semaines suivant un épisode d'IRA. Cependant il arrive que la récupération rénale soit incomplète et que persiste une MRC après un épisode d'IRA (15).

Les cellules tubulaires proximales se divisent lentement. Ce faible renouvellement se modifie quand le rein a subi une agression ischémique (16). La première phase de réparation est en effet une prolifération des cellules épithéliales tubulaires proximales, dont l'origine reste controversée. Beaucoup d'auteurs s'accordent sur le fait que ces cellules se situent au sein du tubule proximal. Cependant deux hypothèses s'opposent sur la nature de ces cellules (figure 2): Certains suggèrent que des cellules souches pourraient être dispersées le long de l'épithélium tubulaire proximal, exprimant des marqueurs tels que le CD24, CD133, KIM-1 (Kidney injury marker -1) et la Vimentine. Après une agression ischémique, ces cellules prolifèreraient et se différencieraient en cellules tubulaires épithéliales (17). Cependant cette hypothèse est actuellement remise en cause (18). En effet, d'autres auteurs proposent que quelques cellules épithéliales déjà différenciées se dédifférencieraient lors d'une agression pour proliférer, exprimant des marqueurs transitoires de cellules souches (le CD24, CD133, KIM-1 et la Vimentine). Dans un second temps, ces cellules se différencieraient de nouveau en cellules épithéliales (19).

Cependant, si l'IRA est trop sévère, ce processus de réparation serait incomplet. En conséquence apparaissent une atrophie tubulaire, une inflammation et une hypoxie chronique, conduisant à une prolifération de fibroblastes et à des dépôts excessifs dans la matrice extracellulaire, entraînant fibrose rénale et donc la MRC (20).

La survenue d'une IRA a donc des conséquences en termes de santé publique, tant sur les coûts financiers que sur la morbi-mortalité. Ces résultats montrent l'importance de pouvoir proposer des thérapeutiques afin de diminuer les risques de survenue d'une IRA et leurs conséquences.

II. Les lésions d'ischémie-reperfusion rénale

L'ischémie rénale est le résultat d'une privation généralisée ou localisée d'oxygène entraînant une inadéquation entre l'apport et la demande en oxygène. Par suite de ce déséquilibre, les cellules épithéliales tubulaires subissent des dommages pouvant conduire à la nécrose tubulaire aigüe (NTA), qui malgré son nom, correspond à une mort cellulaire par apoptose et/ou par nécrose. L'IRA d'origine ischémique représente 80-90% des étiologies de l'IRA dont les causes cliniques sont multiples (21): La transplantation rénale est un exemple d'ischémie-reperfusion rénale, mais il existe de nombreux autres exemples tels que

l'hypoperfusion rénale liée à un pontage coronarien, le remplacement valvulaire, les chirurgies aortiques, incluant la cure d'anévrisme de l'aorte abdominale et l'arrêt cardiaque. La physiologie même de la vascularisation rénale explique la sensibilité des cellules à l'IR.

A. Rappel de physiologie rénale

1. La perfusion rénale

Chez l'homme, au repos, le débit sanguin rénal total représente environ 20% du débit cardiaque (environ 1L/min), soit une perfusion estimée autour de 420 ml/min/100g, perfusion bien plus importante que le coeur (84 ml/min/100g), le foie (58 ml/min/100g) ou encore le cerveau (54 ml/min/100g). De ce débit sanguin important (1L/min), seulement une faible quantité d'urine est formée (1-2 L/24h). Cette perfusion très élevée permet au rein d'assurer les fonctions d'épuration et de régulation hydro-minérale de l'organisme. Toutes modifications du débit sanguin rénal reposent sur une adaptation des résistances vasculaires. C'est l'artériole afférente, avec l'artère interlobulaire, qui constitue l'essentiel des résistances pré-glomérulaires, responsables d'une chute de pression intra vasculaire. La résistance artériolaire efférente est responsable d'une deuxième chute de pression entre le capillaire glomérulaire et le capillaire post glomérulaire. Afin de maintenir un débit sanguin rénal constant, il existe un phénomène d'autorégulation du débit sanguin rénal pour des variations de pression artérielle moyenne entre 80 et 140 mmHg, dépendant essentiellement des adaptations des résistances artériolaires post et surtout pré-glomérulaires. Un mécanisme myogénique ainsi qu'un rétrocontrôle tubulo-glomérulaire par la macula densa permet ce système d'autorégulation.

La distribution de la perfusion est très hétérogène au sein même du parenchyme rénal (22) entre cortex et médullaire (23). Une des fonctions primordiales de la médullaire rénale est d'assurer la concentration adéquate de l'urine, fonction nécessitant le maintien d'un gradient de concentration cortico-papillaire, d'environ 50 mOsm/kg dans le cortex

superficiel, jusqu'à 1200 mOsm/kg dans la médullaire la plus profonde (Figure 3). Ce gradient est maintenu par deux mécanismes : un débit sanguin médullaire bas et une réabsorption active de sodium le long de la branche ascendante large de l'anse de Henlé, nécessitant une consommation importante d'énergie. En réponse à ces besoins énergétiques, les reins consomment environ 10% de l'oxygène total de l'organisme, alors qu'ils ne représentent que 1% du poids corporel.

2. Hétérogénéité mitochondriale au sein du parenchyme rénal.

Il existe une corrélation directe entre la réabsorption rénale de sodium et la consommation d'oxygène (Figure 4). En conditions physiologiques, 80% de la consommation en oxygène du rein est liée à l'activité de la Na/K⁺ATPase des cellules tubulaires. Le rein génère 95% de son ATP par phosphorylation oxydative. Ainsi les segments tubulaires composés d'un nombre important de pompes Na⁺/K⁺/ATPase contiennent la plus grande densité de mitochondries. Selon les cellules, le nombre et l'aspect des mitochondries diffèrent, de même que leurs activités enzymatiques.

- Au niveau du tube proximal :

Les cellules sont étroites et hautes, riches en mitochondries et en organites intra-cellulaires. De nombreuses villosités sont situées à leur pôle apical constituant la bordure en brosse. Ces cellules ont une capacité glycolytique très diminuée et sont incapables de maintenir une concentration d'ATP suffisante en cas d'IR (25,26). Dans le cytoplasme du pôle basal, les mitochondries sont longues et nombreuses. Elles forment des files plus ou moins parallèles, enchâssées entre les invaginations de la membrane plasmique. Le nombre important de

mitochondries est lié au besoin énergétique important de ces cellules qui réabsorbent une grande quantité de sodium grâce à la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$. En effet, ces pompes consomment 50% de l'ATP synthétisé.

- Au niveau du segment grêle de l'anse de Henlé

Les cellules tubulaires sont dépourvues de bordure en brosse et comportent peu de mitochondrie. Elles ont un rapport intime avec les vasa recta irriguant la médullaire et avec les plexus capillaires périlitubulaires et le canal collecteur.

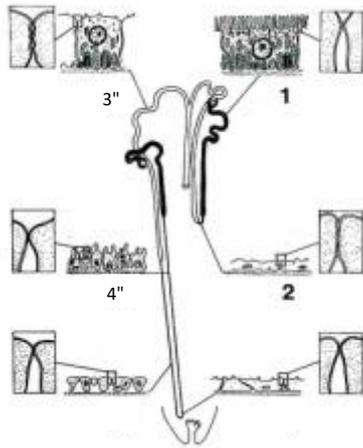
- Au niveau du tube contourné distal :

Dans la macula densa, la polarité des cellules est inversée avec des organites intracellulaires groupés au pôle basal de la cellule. Dans le tube contourné distal, les cellules tubulaires sont cuboïdes avec une bordure en brosse. Le pôle basal est strié perpendiculairement par de longues mitochondries insérées au niveau des invaginations de la membrane plasmique, en regard des transports actifs de sodium notamment.

- Au niveau du tube collecteur :

La cellule tubulaire contient quelques microvillosités mais peu de mitochondries. Ces cellules sont capables d'une glycolyse anaérobie, et peuvent maintenir une concentration d'ATP d'environ 60 % même quand la phosphorylation oxydative est inhibée (27).

A. [?]



B. [?]

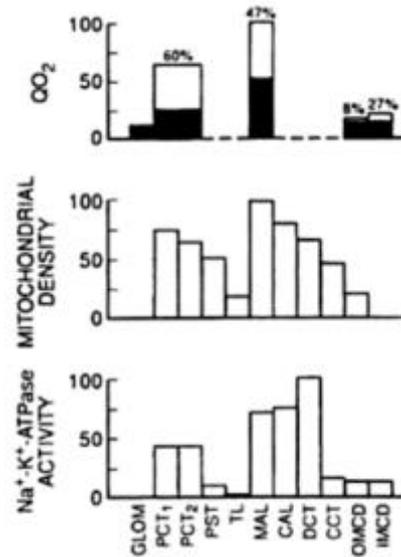


Figure 4: A. Différents types de mitochondries suivant les cellules tubulaires. Les mitochondries du tube proximal (1) et les cellules du tube distal (3) sont riches en mitochondries contrairement aux cellules de l'anse de Henlé (2) ou du tube collecteur (4). Les différences dans le métabolisme des cellules rénales montrent bien l'hétérogénéité de ces cellules. B. Comparaison de la distribution relative en oxygène en fonction des différents segments des tubules rénaux, de la densité mitochondriale et de l'activité de la Na⁺/K⁺/ATPase.

De cette hétérogénéité résulte donc une sensibilité différente à l'hypoxie (28). Dans la plupart des modèles animaux, le tubule proximal est considéré comme étant le plus sensible à l'ischémie. Les modifications morphologiques les plus rapides sont observées dans les

segments S3 du tube proximal dès les premières heures de la reperfusion. En effet, dès les 10 premières minutes d'une occlusion d'une artère rénale, les capacités glycolytiques de la cellule tubulaire proximale diminuent et la concentration en ATP chute de 20%. Les cellules de la médulla interne, quant à elle, possèdent une plus grande capacité à utiliser un mécanisme glycolytique plutôt qu'oxydatif quand la fonction mitochondriale est limitée par la privation en oxygène (27).

B. Modifications structurales des cellules rénales.

L'IR entraîne des modifications structurales au niveau de plusieurs types cellulaires du parenchyme rénal (cellules épithéliales et cellules endothéliales), décrites ci-dessous et résumées dans la figure 5.

1. Perte de la structure des cellules épithéliales

1.1 Modification apicale de la cellule tubulaire

La déplétion en ATP entraîne une déstructuration et une redistribution des filaments d'actine au niveau apical conduisant à la perte de la bordure en brosse des cellules épithéliales (29), favorisant l'obstruction tubulaire (30) et aggravant la diminution du débit de filtration glomérulaire. Cette perte de la bordure en brosse apparaît dès les 15 premières minutes de reperfusion. La désorganisation du cytosquelette du bord apical entraîne également la perte des jonctions serrées (ou tight junctions) et des jonctions adhérentes. La diminution de l'expression, la redistribution ou l'aggrégation de ces jonctions ont été montrées dans des modèles animaux et humains (31).

1.2 Modification basolatérale de la cellule tubulaire

L'ischémie entraîne également une accumulation cytoplasmique de la pompe $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (32). La cellule tubulaire perd ainsi sa polarité en lien avec la diminution de la

réabsorption du sodium, induisant une vasoconstriction pré-glomérulaire par rétrocontrôle tubulo-glomérulaire, et participant ainsi à la diminution du débit de filtration glomérulaire (33). Par ailleurs, l'ischémie entraîne une redistribution des intégrines sur la membrane apicale et donc un détachement des cellules de leur membrane basale.

2. Dysfonction de la cellule endothéliale

Les cellules endothéliales et musculaires lisses de la microcirculation rénale jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de l'IRA, notamment dans le maintien d'une vasoconstriction artérielle excessive (24). Le débit sanguin de la médullaire externe est particulièrement touché par cette vasoconstriction et est réduit de manière disproportionnée (34). Les artérioles ayant subi une ischémie se vasoconstrictent davantage en réponse à l'endothéline-1 et l'angiotensin II (35) mais diminuent également leur réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine, la bradikinine et le NO (36). Cette vasoconstriction est amplifiée par la diminution de synthèse du NO et par l'infiltration de cytokines vasoactives (TNF α , IL1 β , IL6, IL12, IL15) (37). Ces cytokines vasoactives sont sécrétées en réponse à une augmentation de l'interaction endothélium-leucocytes due à l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion (Sélectines, intégrines, superfamille des immunoglobulines) sur les cellules endothéliales endommagées. Il existe également une augmentation des récepteurs de ces cytokines sur les leucocytes activés. Le rôle de ces molécules d'adhésion a été mis en évidence par la protection des souris KO pour ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecul-1) lors d'une IR (38). Cette interaction entraîne une activation et une transmigration des leucocytes, une production de cytokines et un état pro-inflammatoire. Il en résulte ainsi une perte du glycocalyx, une déstructuration du cytosquelette, une perte de contact avec les cellules endothéliales et une altération de la matrice périvasculaire. Ces interactions aggravent également davantage l'obstruction tubulaire favorisée par la perte de la bordure en brosse des cellules épithéliales. Toutes ces anomalies conduisent à une augmentation de la perméabilité vasculaire et à un œdème interstitiel (39,40). Le rétrocontrôle tubulo-glomérulaire participe à la vasoconstriction de l'artère afférente en réponse à une augmentation de sodium au niveau de

la macula densa, par défaut de réabsorption de ce dernier au niveau du tubule proximal (33).

Dans les suites d'une agression ischémique, le nombre d'artéioles décroît également par diminution des facteurs angiogéniques tels que le VEGF, et la surproduction d'inhibiteurs de l'angiogénèse (41). Ces altérations de l'angiogénèse entraînent une hypoxie chronique et favorisent la fibrose interstitielle.

3. L'inflammation

L'immunité innée est un système ancestral responsable de la première ligne de défense contre les agressions extérieures. La réponse immunitaire innée est la plus rapide, comprenant l'activation des polynucléaires neutrophiles, des monocytes, des macrophages et des cellules natural killer (NK). L'épithélium tubulaire participe de manière active à la réponse inflammatoire en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et chemotactiques. Miklos *et al.* ont étudié la concentration sérique de TNF- α et son infiltration dans le rein 2 heures après la reperfusion mettant en évidence une concentration sérique de TNF- α sérique significativement augmentée après l'IR (42).

Le système du complément et les toll-like receptors (TLRs) sont les 2 composants majeurs de la réponse inflammatoire de l'immunité innée.

3.1 *Les toll-like receptors (TLRs)*

Les TLRs sont des protéines transmembranaires hautement conservées. Les cellules épithéliales tubulaires expriment ces TLRs pendant l'ischémie (37). Des Damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs), libérées par les cellules endommagées, sont reconnues comme un signal de danger et activent ces TLRs, induisant ensuite une cascade de protéines kinases puis une synthèse de facteurs de transcriptions, tels NF- κ B. L'activation de

ces TLRs par les DAMPs initie donc la réponse pro-inflammatoire, marquée par le relargage de cytokines et chemokines (43). En réponse à ces cytokines, les neutrophiles vont s'attacher à l'endothélium et s'accumuler dans le rein, particulièrement au niveau péri-tubulaire et dans la médulla externe dès les 30 min de reperfusion. Ces neutrophiles produisent des protéases, des myéloperoxydases, des ROS et des cytokines augmentant la perméabilité vasculaire et réduisant l'intégrité des cellules tubulaires épithéliales et endothéliales (44,45). Chez la souris, la déplétion des macrophages permet de prévenir l'insuffisance rénale, montrant l'importance de ces cellules dans les lésions d'organes (46).

Par ailleurs, l'épithélium tubulaire proximal exprime les molécules d'histocompatibilité de type II, peut donc présenter l'antigène à la cellule T et exprimer des molécules de co-stimulation. Après la reconnaissance des DAMPs, les TLRs sont non seulement les inducteurs de la réponse inflammatoire mais également les médiateurs en recrutant les cellules dendritiques (Figure 6).

3.2 Le complément

Le rôle du complément dans l'IR est bien démontré chez les souris déplétées en protéines du complément (C3, C5 et C6), mettant en évidence un rôle marqué du C3 ou du complexe d'attaque membranaire (47). Les DAMPs peuvent activer la voie classique du complément mais également la voie alterne en se liant au C3. Il semble qu'il existe un lien entre l'activation du complément et les TLRs. (Figure 6)

Enfin, la réponse adaptative se fait au-delà de quelques heures à quelques jours, permettant la maturation des cellules dendritiques, l'activation et la prolifération des lymphocytes T et l'interaction lymphocytes T-lymphocytes B.

Figure 6: Mécanismes de la réponse de l'immunité innée dans l'IR. Les Damage-associated molecular patterns (DAMPs) activent les Toll-like receptors (TLR) et le complément. En réponse à leur activation, les TLRs entraînent la synthèse de cytokines et donc l'activation des polynucléaires neutrophiles. D'après Farrar *et al* (48).

C. Physiopathologie des lésions d'ischémie-reperfusion

L'importante perfusion rénale et les besoins élevés en oxygène et en ATP rendent le rein particulièrement sensible à l'ischémie.

1. Les lésions dues à l'ischémie

Les mécanismes contribuant à la physiopathologie des lésions d'ischémie reperfusion sont multifactorielles et complexes (49,50). Ils sont résumés dans la figure 7.

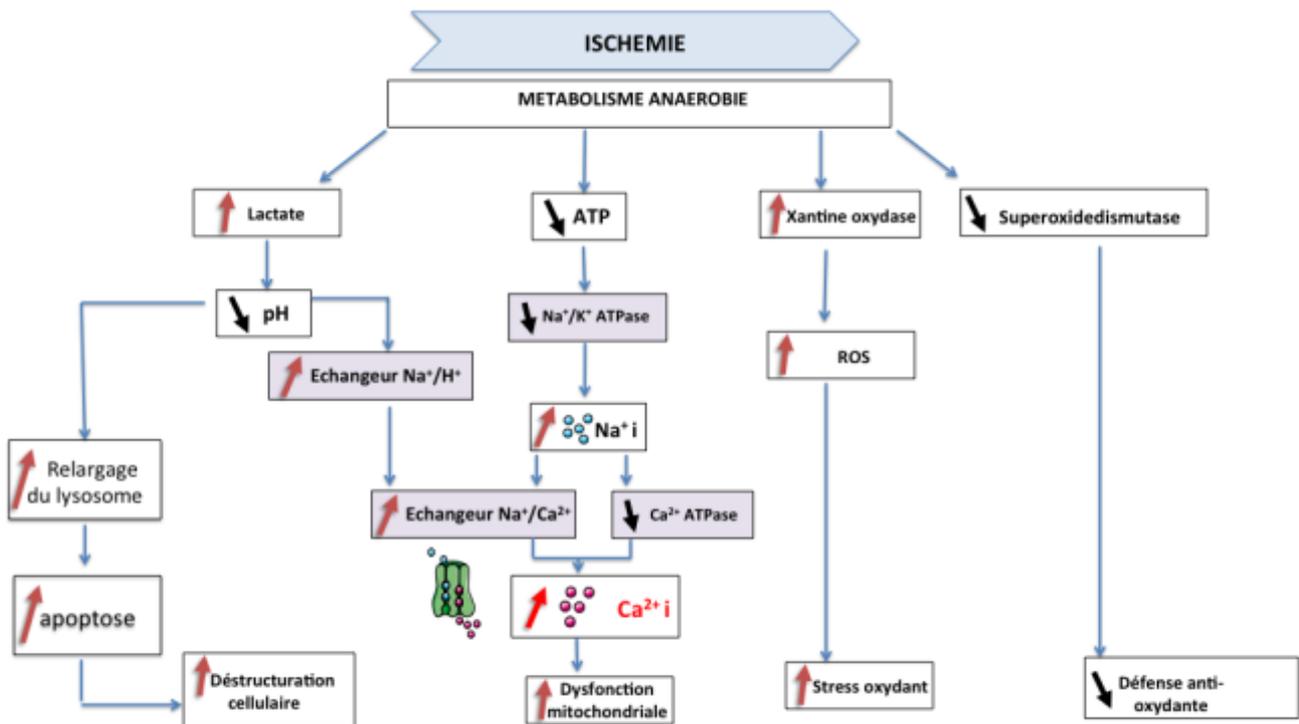


Figure 7: Lésions dues à l'ischémie reperfusion, d'après Chatauret N. *et al.* (50). La diminution du métabolisme oxydatif au cours de l'ischémie va entraîner des modifications ioniques aboutissant à une surcharge en Ca^{2+} intra-cellulaire avec pour conséquence une surcharge calcique mitochondriale. Ca^{2+} : calcium, ROS : espèces réactives en oxygène.

1.1 Déficit en ATP

Lors de l'ischémie, le métabolisme anaérobie va prédominer. Ce métabolisme anaérobie produit de manière insuffisante de l'ATP (2 molécules d'ATP pour 1 molécule de glucose) contre 36 molécules d'ATP en cas de métabolisme aérobie. Cette modification conduit à une inversion de fonctionnalité de la pompe F1-F0 ATP-synthase, hydrolysant

l'ATP à la place de la synthétiser pour maintenir le potentiel de membrane mitochondriale (51). La concentration intracellulaire d'ATP va diminuer dès les premières minutes de l'ischémie, et sera proportionnelle à la durée d'ischémie. Si l'ischémie est courte (< 15 min) la concentration d'ATP retournera rapidement aux valeurs de base. Il existe une corrélation négative entre la concentration d'ATP à 2h de reperfusion et la dysfonction rénale à 24h (52). Par ailleurs, la production d'ATP anaérobie conduit à une acidose intra cellulaire par accumulation d'acide lactique dans la cellule. Cette diminution d'ATP ainsi que la modification du pH intra-cellulaire conduit à une déstabilisation de la membrane lysosomale, inhibe les pompes ioniques, notamment la Na^+/K^+ ATPase, entraînant une entrée massive de sodium et d'eau dans la cellule (53). Afin de réguler cette variation de pH, la cellule va activer un antiport Na^+/H^+ puis entraîner une sortie des protons (54) particulièrement active au moment de la reperfusion, associée à une entrée massive de Na^+ (55).

1.2 Modification de l'homéostasie calcique

Cette accumulation intracellulaire de Na^+ va conduire à une augmentation intracellulaire de Ca^{2+} via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, qui va fonctionner en mode inverse, induisant une entrée massive de calcium dans la cellule (56). Cette augmentation est également expliquée par l'inhibition de la recapture du Ca^{2+} par le réticulum endoplasmique à cause de la déplétion en ATP.

1.1 Stress oxydant

L'accumulation de calcium mitochondrial est directement impliquée dans la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) pendant l'ischémie en favorisant la dislocation du cytochrome c de la membrane interne de la mitochondrie. La formation des ROS joue un rôle déterminant dans la genèse de l'IRA. Durant l'hypoxie de la cellule, une

faible quantité de ROS est générée. Les ROS sont des molécules qui contiennent un électron non apparié, les rendant instables et très réactifs. Ils sont capables d'extraire un électron des molécules voisines pour combler la vacance de leur orbite. Ils sont à l'origine de nombreux dommages, tant au niveau cellulaires que moléculaires, comme la fragmentation de l'ADN ainsi que l'oxydation protéique et lipidique. Les ROS sont traditionnellement considérés comme délétères. Ils sont aussi d'importants seconds messagers cellulaires et leurs effets sont variés. Ils sont impliqués dans des phénomènes de protection tel que le préconditionnement (préCI) ou postconditionnement (postCI). La mitochondrie est le site majeur de production des ROS. Au cours de la phosphorylation oxydative, une partie de l'oxygène échappe à la réduction complète en H₂O et subit une réduction mono-électronique au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire, donnant naissance à l'O₂⁻. L'oxydation du FADH₂ au niveau du complexe II produit également des ROS par un phénomène appelé flux inverse d'électrons (57,58). Il est aujourd'hui établi que l'activité des ROS a un rôle important dans les modèles d'ischémie-reperfusion (59), il est donc envisageable que les ROS puissent également influencer l'hémodynamique rénale et l'inflammation.

2 *Les lésions liées à la reperfusion*

La reperfusion est le seul moyen thérapeutique pour éviter l'aggravation de la nécrose d'un organe. Cependant cette reperfusion, bien qu'indispensable pour délivrer l'oxygène et les nutriments nécessaires au métabolisme cellulaire, est également délétère. En effet, lors de la restauration du flux sanguin rénal, la concentration en oxygène augmente rapidement.

2.1 Formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Sous des conditions physiologiques, seule une petite fraction de ROS est formée (<0,1%) due à la réduction partielle de l'anion superoxyde au niveau du complexe I et III. La superoxide dismutase (SOD) réduit rapidement l'O₂⁻ en H₂O₂ qui est librement diffusible à travers la membrane cellulaire. Lors de la normalisation du flux sanguin rénal, le pH va se corriger trop rapidement, entraînant un gradient de protons important. Le retour rapide à la normoxie, couplé à la baisse de l'ADP, va favoriser la production de ROS par une augmentation de la fuite d'électrons. A la reperfusion, l'oxygène va également favoriser l'oxydation par la xanthine oxydase de ses deux substrats accumulés pendant l'ischémie: la xanthine et l'hypoxanthine, réaction qui produit des ROS.

2.2 La dysfonction mitochondriale

Jennings *et al.* ont été les premiers à montrer l'implication de la mitochondrie dans les dommages cellulaires liés à l'IR, par altération de l'intégrité de la chaîne respiratoire mitochondriale induisant une dysfonction de la phosphorylation oxydative (60,61). L'accumulation calcique mais également les ROS vont entraîner un gonflement mitochondrial ou « swelling » (62). Ce gonflement est provoqué par une perméabilisation de la membrane interne de la mitochondrie. Cette perméabilisation contribue à l'ouverture d'un méga-pore connue sous le nom de pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP), qui joue un rôle central dans les lésions de reperfusion. Les conditions favorables à son ouverture sont la baisse de l'ATP intra-cellulaire, une accumulation mitochondriale de Ca²⁺, une surproduction de radicaux libres et une élévation de phosphate inorganique. L'ouverture de ce pore entraîne une rupture de ses membranes et un relargage de molécule

pro apoptotiques, tel que le cytochrome c. La cellule va être entraînée ensuite dans la mort cellulaire, par nécrose et/ou apoptose.

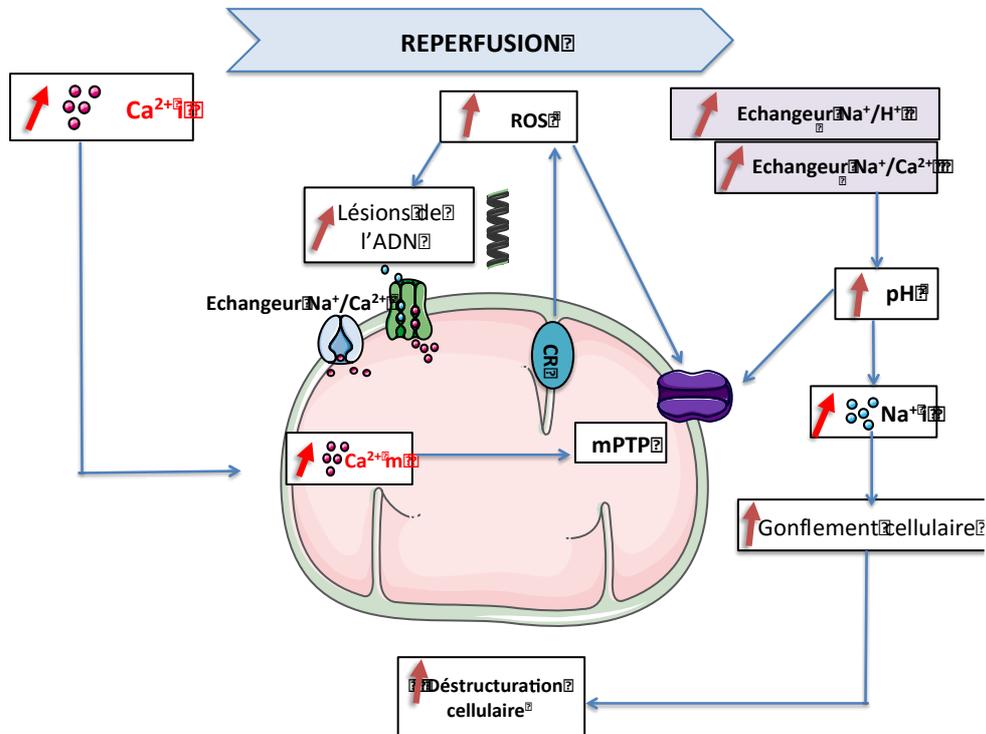


Figure 8: Lésions liées à la reperfusion.

Ca^{2+} : Calcium, ROS : Espèces réactives d'Oxygène, mPTP : Pore de transition de perméabilité mitochondriale. La surcharge calcique mitochondriale entraînant l'ouverture du mPTP

D. La mort cellulaire

Il existe plusieurs voies de signalisation de la mort cellulaire, dont l'effecteur principal est la mitochondrie.

1. Nécrose

La nécrose est directement liée à la privation en oxygène et en nutriments des cellules. Elle se distingue de l'apoptose par la rupture de l'intégrité de la membrane (63) plasmatisque. La mort cellulaire par nécrose est accompagnée d'un relargage du contenu intra-cellulaire, incluant les organelles et des protéines pro-immunogènes (les DAMPs). Des recherches récentes semblent avoir mis en évidence l'existence d'un nouveau paradigme, la nécrose régulée, dont parmi eux, le nécroptose (64). Il a été récemment montré que ce type de mort cellulaire est un processus biologique finement régulé, différent de l'apoptose, faisant intervenir les kinases RIPK1 et RIPK3 (Receptor Interacting Protein Kinases) (65). Dans le rein, l'existence du nécroptosome a été suggéré en montrant l'effet protecteur de la necrostatin-1, un inhibiteur du RIPK3 dans la voie de signalisation du nécroptosome (66,67). Son rôle a également été mis en évidence *in vitro* dans les cellules tubulaires (68).

2. L'apoptose

Jusqu'en 1970, la mort cellulaire n'était synonyme que de nécrose. L'apoptose n'a été définie que plus tard, comme une mort cellulaire programmée (69,70). Bien que les lésions d'ischémie-reperfusion à l'échelle de l'organe portent le nom de «nécrose tubulaire aigüe », il existe tout de même à la fois des lésions de nécrose et d'apoptose sur le plan histologique (71,72). Shumer *et al.* ont été les premiers à montrer l'existence de l'apoptose dans le cortex rénal de rat à la 12^{ème} heure de reperfusion (73). Elle se caractérise par des altérations

morphologiques avec condensation de la cellule et du noyau, fragmentation de l'ADN et bourgeonnement de la membrane plasmique conduisant à la formation de corps apoptotiques (74,75). L'apoptose est initiée au cours de l'ischémie mais amplifiée par la reperfusion (70). Au niveau biochimique, l'apoptose conduit à l'activation des caspases et des endonucléases (63,76). Le signal de l'apoptose provient de plusieurs voies (74) : la voie intrinsèque mitochondriale, le voie extrinsèque des récepteurs de mort et la voie du réticulum endoplasmique (Figure 9).

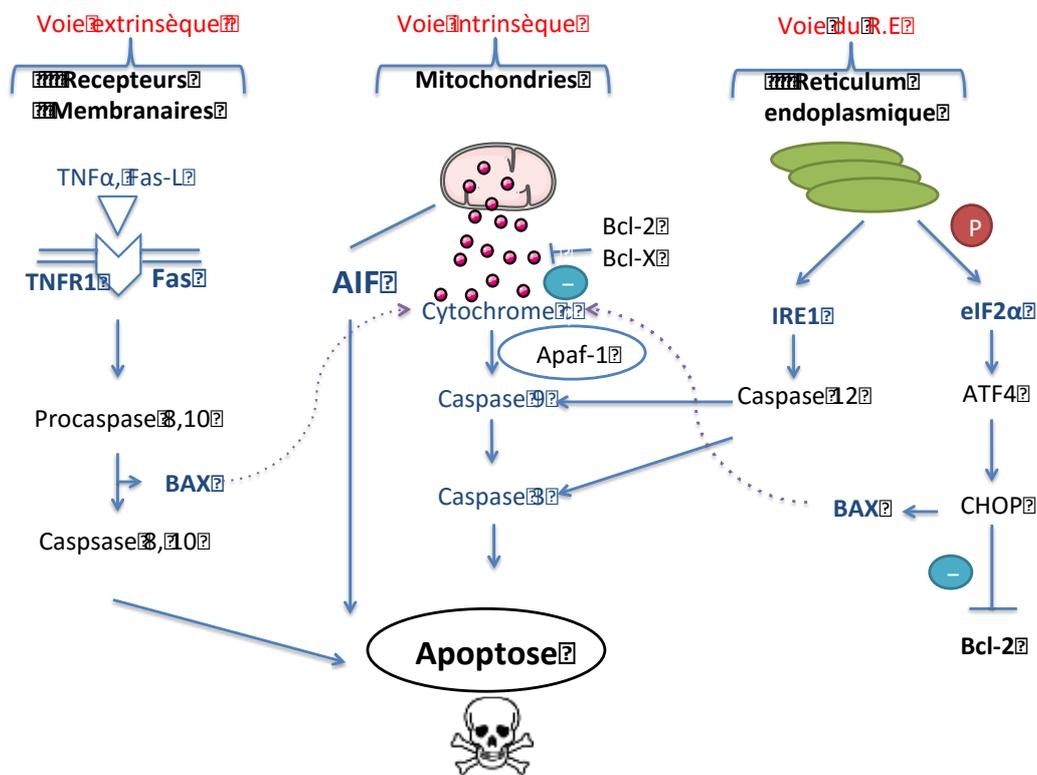


Figure 9: voie de mort cellulaire. Il existe trois voies principales d'induction de l'apoptose : la voie des récepteurs membranaires, la voie mitochondriale et la voie du réticulum endoplasmique (R.E.).

2.1 Voie intrinsèque mitochondriale

Les modifications du potentiel de membrane et la transition de perméabilité mitochondriale conduisent à la perméabilisation de la membrane interne mitochondriale. Cette perméabilisation entraîne la libération de substances pro-apoptotiques telles que l'apoptosis induction factor (AIF) et le cytochrome c venant se lier à l'apaf-1 pour activer la caspase 9. L'activation de cette voie mitochondriale a été mise en évidence au cours de la réoxygénation (77). L'activation de Bax, protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2, a été montrée comme étant une protéine clé dans la perméabilisation de la membrane dans l'IR rénale chez l'animal (78,79), mais également chez l'homme en post-transplantation (80,81).

2.2 Voie extrinsèque de l'apoptose

Cette voie est médiée par la fixation d'un ligand tel que TNF- α ou Fas-L sur son récepteur, induisant ainsi l'activation de caspase initiatrices (caspase 8 ou 10) puis des caspases effectrices (caspases 3, 6, 7) conduisant à l'apoptose (82). Cette voie extrinsèque médiée par le TNF- α et Fas-L pourrait contribuer à la perte des cellules tubulaires dans l'IRA d'origine ischémique (83).

2.3 Voie du réticulum endoplasmique

La voie du réticulum endoplasmique (RE) est également impliquée dans les phénomènes d'apoptose dans l'IR rénale, mais son rôle exact n'est pas encore complètement défini (84). Lors d'une perturbation de l'homéostasie calcique, d'un déséquilibre d'oxydo-réduction ou d'une hypoxie, il peut exister une perturbation du processus de repliement des protéines et ainsi une accumulation et une agrégation des protéines à conformation anormale au niveau du RE. Dans ces conditions, les cellules sont dites en stress du RE. Dans le but de

limiter les dommages associés au stress du RE, les cellules sont en mesure de réagir en déclenchant la signalisation *unfolded protein response* (UPR). Cette réponse a pour but de rétablir la fonction physiologique du RE en augmentant les capacités cellulaires de repliement des protéines. Toutefois, lorsque le stress du RE est trop intense ou trop prolongé, la réponse UPR peut déclencher la mort cellulaire par apoptose (85).

3. L'autophagie

A l'origine l'autophagie a été décrite comme un mécanisme cellulaire physiologique conduisant à la formation de vésicules appelées autophagosomes qui dégradent et recyclent certains organelles ou protéines endommagées. Un niveau basal d'autophagie est indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire. La figure 10 décrit les mécanismes d'activation de l'autophagie : L'AMP-activated protein kinase (AMPK) se lie à l'ULK1 (Unc-51-like kinase 1) entraînant l'activation de l'autophagie. L'interaction entre ULK1 et AMPK est inhibée par la phosphorylation de ULK1 par mTOR, une enzyme de la famille des sérines-thréonines kinases, qui régule la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la survie cellulaire, la synthèse protéique et la transcription. mTOR phosphoryle également une autre protéine activatrice de l'autophagie : Beclin-1. Cette phosphorylation de ULK1 et de Beclin-1 inhibe l'autophagie. La phosphorylation de l'AMPK par ULK1 est renforcée par un traitement par rapamycine, un inhibiteur de mTOR et à l'inverse cette interaction est supprimée par la phosphorylation de ULK1 par mTOR.

Même si un niveau basal d'autophagie est nécessaire, elle peut être également néfaste dans certaines conditions et en particulier dans l'IR. En effet, lors d'une hypoxie prolongée avec ré-oxygénation, le phénomène d'autophagie peut conduire à l'autodigestion d'organites essentiels et donc à la mort cellulaire (86). Au cours de l'ischémie, l'autophagie serait induite par l'activation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK), reflétant la diminution d'ATP

intracellulaire et au cours de la reperfusion, Beclin-1 serait fortement exprimée (87).

Cependant, Pallet *et al.* ont montré que certains stimulateurs de l'autophagie, telle la rapamycine, aggravent de manière paradoxale les lésions d'ischémie-reperfusion, en inhibant la croissance cellulaire (88). Dans le rein, il semble exister un temps d'ischémie limite au delà duquel l'autophagie devient délétère. Les travaux de deux équipes suggèrent qu'une ischémie de 40 min serait le timing au delà duquel l'autophagie semble délétère. L'effet protecteur ou lésionnel de l'autophagie pourrait également dépendre du degré de son activation (89).

III. Ischémie-reperfusion et mitochondries

Les lésions cellulaires développées dans le chapitre précédent (page 21), sont liées au dysfonctionnement mitochondrial induit par l'ischémie-reperfusion.

A. Structure des mitochondries

La théorie endosymbiotique propose que la mitochondrie soit née lorsque deux bactéries, une archéobactérie anaérobie d'une part, et une protobactérie aérobie d'autre part, ont fusionné pour donner un eucaryote primitif duquel tous les eucaryotes actuels dérivent. Une telle hypothèse est née suite à la mise en évidence, il y a plus de 50 ans, d'un ADN mitochondrial différent de l'ADN nucléaire d'une part, et d'une structure membranaire particulière, puisque dédoublée, d'autre part. La mitochondrie est présente dans la majorité des cellules eucaryotes. Elle fournit l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule, en produisant de l'ATP. A côté de ce rôle énergétique, elle participe également à d'autres fonctions métaboliques comme la synthèse des stéroïdes ou la régulation du cycle de l'urée.

Au cours d'une agression cellulaire comme l'IR, la mitochondrie peut se détourner de son rôle physiologique pour orienter la mort de la cellule vers la nécrose ou l'apoptose par l'intermédiaire du phénomène de transition de perméabilité.

La structure d'une mitochondrie se définit par

- *une membrane externe*, composée de 40 % de lipides et 60 % de protéines. Elle se caractérise par une grande perméabilité aux ions et aux petites molécules.
- *Une membrane interne*, formant de nombreuses invaginations nommées crêtes mitochondriales. Cette membrane, constituée en majorité de protéines (80%) et de lipides (20%), est imperméable aux ions. Au sein de cette membrane sont enchâssés les complexes de la chaîne respiratoire.
- *L'espace intermembranaire*
- *La matrice mitochondriale* qui contient les enzymes du métabolisme énergétiques (synthèse des acides gras, cycle de Krebs, β -oxydation des acides gras).

B. Fonctions mitochondriales

Les mitochondries sont des organites cytoplasmiques qui fournissent à la cellule l'énergie (synthèse d'ATP). Les autres rôles physiologiques de la mitochondrie sont la production de ROS, l'oxydation des acides gras, la conduction des signaux calciques, le crosstalk avec les autres organelles, les événements de fission et de fusion, et l'orientation vers la mort cellulaire (90). Au cours d'une agression cellulaire comme l'ischémie-reperfusion, la mitochondrie peut orienter la vie de la cellule par l'ouverture d'un pore non spécifique nommé le pore de transition de perméabilité. Elle adapte également sa morphologie par fission et fusion et régule la production d'ATP.

1. Synthèse d'ATP

L'oxydation des nutriments permet de fournir l'énergie nécessaire à la cellule sous la forme d'une liaison anhydride (riche en énergie) par phosphorylation de l'ADP en ATP. C'est la transformation de cet ATP en ADP qui permettra de fournir de l'énergie à la molécule cible d'une cellule. La synthèse d'ATP nécessite une consommation d'oxygène par la mitochondrie permettant d'oxyder les cofacteurs résultant du métabolisme du glucose, des acides gras et des acides aminés, on parle alors de respiration mitochondriale ou de phosphorylation oxydative. Cette réaction permet la formation d'ATP par l'ATP synthase située dans la membrane interne mitochondriale. Elle fait partie de la chaîne respiratoire, située également au niveau de cette membrane, utilise l'énergie fournie par l'oxydation d'équivalents réduits (NAD^+/H^+ et FADH_2) pour expulser des protons (H^+) de l'espace matriciel vers l'espace intermembranaire. Ce gradient de protons sert ensuite de source d'énergie à l'ATP synthase pour assurer la synthèse d'ATP par la phosphorylation de l'ADP.

La chaîne respiratoire mitochondriale est formée de cinq complexes protéiques structurellement indépendants (91). Ces composants peuvent être tour à tour accepteurs et donneurs d'électrons et forment ainsi une chaîne d'oxydo-réduction (Figure 11).

- le **complexe I** (NADH-ubiquinone oxydoréductase) oxyde du NADH de la matrice et transfère deux électrons sur l'ubiquinone permettant sa réduction en ubiquinol. Cette réaction d'oxydo-réduction est associée à une expulsion de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.
- le **complexe II** (succinate-ubiquinone oxydoréductase) oxyde du succinate en fumarate pour réduire du FAD en FADH_2 . Ce FADH_2 est à son tour oxyde pour permettre le transfert de deux électrons sur l'ubiquinone.

- le **complexe III** (ubiquinol-cytochrome *c* reductase) réalise l'oxydation de l'ubiquinol en ubiquinone. Les électrons transportés par l'ubiquinol sont alors transférés sur le cytochrome *c*. Une translocation de protons vers l'espace intermembranaire a également lieu au cours de cette oxydo-réduction.
- le **complexe IV** (cytochrome oxydase) catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction en transférant les deux électrons portés par le cytochrome *c* sur l'oxygène. Cette étape est aussi couplée à un efflux de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

Ainsi, trois de ces complexes (I, III et IV) sont des sites de couplage qui utilisent l'énergie générée par le transfert des électrons pour la translocation active de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Ce mouvement de protons, de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, crée la force protomotrice (Δp) qui a deux composantes :

- *le gradient de pH* (ΔpH) car le compartiment intermembranaire s'acidifie tandis que le milieu matriciel devient alcalin.
- *la formation d'une différence de potentiel électrique transmembranaire* ($\Delta \Psi$), l'intérieur devenant négatif et l'extérieur positif.

- Le **complexe V (ou F₀-F₁ ATP-synthétase)** est une protéine possédant un domaine transmembranaire F₀ qui forme un canal transmembranaire à protons et un domaine hydrosoluble matriciel F₁. Ce complexe couple l'énergie du gradient de protons par son domaine F₀ qui permet la diffusion facilitée de protons vers la matrice à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et P_i par son domaine F₁. Ce complexe, à l'inverse des autres complexes de la chaîne respiratoire, permet de convertir une énergie électrochimique en une énergie chimique potentielle véhiculée par les molécules d'ATP. Cependant, son fonctionnement est réversible, c'est à dire qu'en cas de chute de la force protomotrice ou d'une augmentation du rapport ATP/ADP, elle peut hydrolyser l'ATP et expulser des protons vers l'espace inter-

membranaire. L'ANT assure le transport de l'ADP et ATP entre le cytosol et la matrice de la mitochondrie.

Dans les conditions physiologiques, une quantité très faible de l'oxygène utilisée par la chaîne respiratoire est incomplètement réduite en H₂O, principalement par les complexes I et III. Ce qui donne naissance à des espèces radicalaires (les ROS).

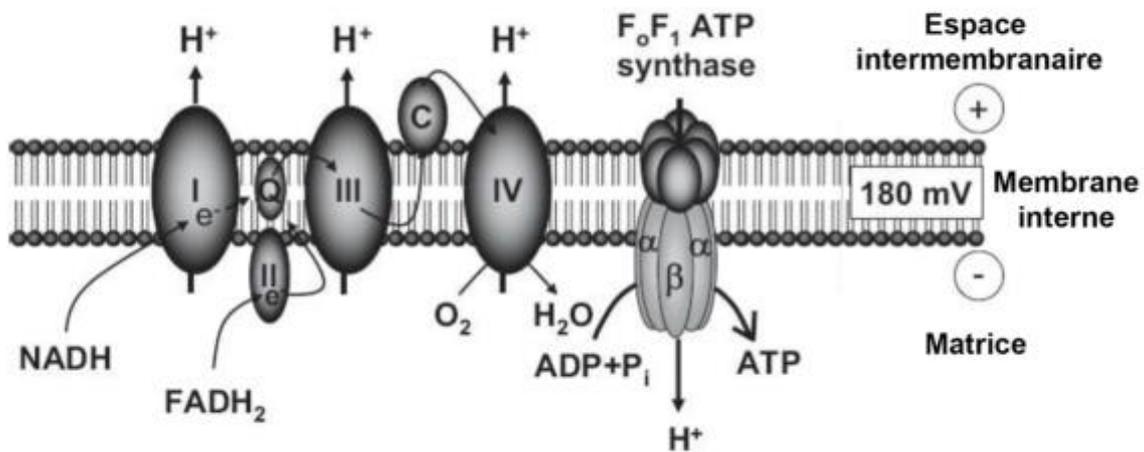


Figure 11: Chaîne respiratoire mitochondriale. A partir des co-enzymes réduites (NADH ou FADH₂) issues du métabolisme énergétique mitochondrial, un flux d'électrons est généré et transféré grâce à quatre complexes (I, II, III et IV) protéiques et à deux navettes (ubiquinone Q et cytochrome c) à l'oxygène moléculaire. Les complexes de la chaîne respiratoire, en plus d'être des transporteurs d'électrons, sont également des pompes à protons qui font sortir les H⁺ de la matrice vers l'espace inter-membranaire, créant ainsi à la fois un gradient de pH et un potentiel de membrane mitochondrial. La F₀/F₁ ATP synthétase permet de convertir cette force protomotrice en ATP en faisant entrer les protons dans la matrice.

2. Production d'espèces réactives d'oxygène (ROS)

Les ROS sont traditionnellement considérées comme délétères (fragmentation de l'ADN, l'oxydation des protéines, peroxydation lipidique, altération des membranes et mort cellulaire) mais leur rôle est bien plus complexe puisqu'elles sont également impliquées dans des phénomènes protecteurs tels le PréCI et PostCI. Au cours de la phosphorylation oxydative décrite précédemment, une quantité d'oxygène radicalaire, O_2^- échappe à la réduction complète en H_2O . L'oxydation de $FADH_2$ au niveau du complexe II produit également des ROS par un phénomène appelé inverse d'électrons (reverse electron transfert). L' O_2^- ayant une durée de vie très courte, ce sont surtout ses dérivés qui sont considérés comme délétères : le peroxyde (ROO⁻), le radical hydroxyles (HO⁻) et le peroxynitrite (ONOO⁻).

3. Homéostasie calcique

Le calcium est un second messager important intra cellulaire. La mitochondrie, en étroite relation avec le réticulum endoplasmique, est très impliquée dans la régulation du calcium cytotologique. Elle possède au niveau de sa membrane interne de nombreux canaux calciques spécifiques. Le passage de Ca^{2+} à travers la membrane interne de la mitochondrie est dépendante du gradient électrochimique créé par la chaîne respiratoire. L'entrée du Ca^{2+} est notamment assurée par un canal appelé MCU et par RaM (rapid mode of uptake).

C. Le pore de transition de perméabilité mitochondrial

1. Historique

En 1976, Hunter *et al.* ont découvert un phénomène qu'ils ont appelé « transition de perméabilité », correspondant à l'ouverture d'un canal, nommé « pore de transition de perméabilité » (92). La transition de perméabilité mitochondriale est bien définie comme la perte de l'imperméabilité de la membrane interne de la mitochondrie, qui ne doit pas être confondue avec la rupture de la membrane externe qui conduit au relargage du cytochrome c et des protéines pro-apoptotiques (93).

2. Structure moléculaire du mPTP

La structure exacte du mPTP est encore débattue, mais du fait de sa haute complexité, il est supposé que celui-ci est constitué d'un complexe multi-protéique (Figure 12).

2.1 *L'Adenine Nucleotide Translocator (ANT)*

L'ANT est une protéine abondante de la membrane interne mitochondriale. Elle catalyse sélectivement et de manière réversible l'échange entre l'ADP et l'ATP. La direction de transport des nucléotides dépend de la condition dans laquelle se trouve la cellule. L'ATP est transportée de la mitochondrie vers le cytoplasme contre de l'ADP dans le sens inverse. Ce transport est inversé dans des conditions d'hypoxie. L'observation initiale de la sensibilité du mPTP à l'ADP alors que les autres nucléotides n'utilisant pas l'ANT comme transporteurs n'avaient pas d'effet sur le mPTP, a rapidement suggéré que l'ANT devrait être impliquée dans la régulation du mPTP. Ces résultats avaient été confirmés par d'autres études confirmant la sensibilité du mPTP à l'ADP/ATP (95).

Cependant, le développement des souris déficientes en ANT a remis en question le rôle primordial de l'ANT dans la structure du mPTP. En effet, les souris double knock out en

ANT1^{-/-} et ANT2^{-/-} avait un mPTP préservé malgré l'absence de l'ANT, bien que les mitochondries aient une diminution du seuil d'ouverture du mPTP au calcium (96).

2.2 *Le Voltage-dependant anion channel (VDAC)*

Il s'agit de la protéine la plus abondante de la membrane externe de la mitochondrie. Sa structure est parfaitement connue. VDAC est perméable aux petits ions (Cl^- , K^+ , Na^+) ainsi qu'à d'autres molécules tels que le glutamate, l'ATP, l'acétylcholine, la dopamine, etc.... Son rôle est de réguler les mouvements des métabolites mitochondriaux. Il existe trois isoformes (VDAC1, VDAC2 et VDAC3) chez les mammifères, ayant *à priori* des fonctions distinctes. De nombreuses études suggèrent que VDAC est un élément majeur du mPTP. Il apparaît en effet que l'incorporation de VDAC purifié dans des bicouches phospholipidiques forme des canaux aux propriétés électrophysiologiques très proches de celle du mPTP. De plus ces canaux sont modulés par l'addition de calcium, de NADH et de glutamate et par la liaison avec l'hexokinase. Cependant, il a été démontré récemment que les caractéristiques principales du mPTP étaient préservées dans les mitochondries isolées chez les souris *knockout* de VDAC1 et VDAC3. VDAC n'est donc maintenant plus considéré comme un élément essentiel du mPTP (97).

2.3 *Le récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR) ou Translocator protein (TPSO).*

Il est localisé dans la membrane externe des mitochondries et présente un site de liaison des benzodiazépines, différent du récepteur classique GABA. Ce récepteur se lie avec

l'ANT et le VDAC. Des résultats suggèrent que ce récepteur a un rôle structurel dans le mPTP (98).

2.4 Le cyclophiline D (Cyp-D)

2.4.1 Conformation

La Cyp-D est une protéine matricielle mitochondriale codée par le gène peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F (*Ppif*), un membre de la grande famille des cyclophilines dont le poids moléculaire est faible, d'environ 19-20 kDa. Il existe 17 cyclophilines dans le génome humain, et qui sont toutes impliquées dans des fonctions de protéines chaperonnes (99). Les cyclophilines sont des protéines très conservées, qui ont toutes une activité peptidyl-prolyl trans isomerase (PPIase), qui lie directement la CsA. Les premières observations ayant conduit à la découverte de la modulation du mPTP par la CsA proviennent des analyses en microscopie électronique de biopsies rénales de patients traités par la CsA, qui montrent des mitochondries géantes avec des inclusions paracrystallines (100). La découverte des effets de la CsA sur le mPTP a permis de progresser dans la connaissance de ce pore. Il a tout d'abord été montré que la CsA inhibait l'état 3 de la respiration mitochondriale dans le tubule rénal et causait une accumulation de calcium dans la matrice (101,102). D'autre part, Crompton *et al.* ont montré que la CsA inhibait la transition de perméabilité (103). Halestrap et Davidson identifièrent la domaine PPIase comme cible de la CsA (104) suivis de Crompton *et al.* qui constatèrent le rôle de la Cyp-D comme modulateur du mPTP (105). La confirmation de l'existence de la Cyp-D comme un composant du pore s'est faite définitivement en 2005 par le développement de souris délétées en gène *Ppif*, et à l'analyse des mitochondries de ces animaux. En effet, les mitochondries étaient résistantes à la transition de perméabilité et au gonflement (106). Cependant tout reste encore débattu puisque certains auteurs suggèreraient

que la CsA démasquerait un site de liaison d'inhibition du Pi (107,108). Il n'existe cependant aucune certitude concernant le mécanisme d'interaction Cyp-D/mPTP ni même sur le mode d'action exacte de la CsA sur le mPTP. L'équipe d'Halestrap a suggéré que dans certaines conditions favorisant l'ouverture du mPTP, la Cyp-D pourrait se fixer à l'ANT, et que lors d'une activation par le Ca^{2+} , un changement significatif de conformation lié à l'activité PPIase transformerait le transporteur spécifique ADP/ATP en un canal aspécifique de haute conductance. La CsA pourrait inhiber l'ouverture du mPTP en empêchant la liaison de la Cyp-D à l'ANT. La délétion de la Cyp-D chez des souris montre que le seuil d'induction de l'ouverture du mPTP par le Ca^{2+} est très augmenté.

2.4.2 Modification de la Cyp-D

La Cyp-D peut être phosphorylée, acétylée et nitrosilée.

- Phosphorylation

Il n'existe qu'une seule publication suggérant la phosphorylation directe de la Cyp-D. Il a été montré que la GSK-3 β peut phosphoryler directement la Cyp-D *in vitro*, sans preuve actuelle *in vivo* (109). La GSK3 β , souvent évoquée comme élément modulateur du mPTP peut se transloquer à la matrice mitochondriale où elle a une interaction directe avec la Cyp-D, mais pas avec VDAC et l'ANT. Cependant cette hypothèse de phosphorylation reste encore controversée (110).

- Acétylation

Il a récemment été proposé que Sirt3 (NAD⁺ dépendent deacetylase sirtuin 3) deacetyle la Cyp-D, site adjacent au site de liaison de la CsA (111). Cette déacétylation de la Cyp-D entraînerait la dissociation de la Cyp-D à l'ANT(112). Bien que ces deux études émettent l'hypothèse que la déacétylation de la Cyp-D pourrait être un contrôle du mPTP, il est encore nécessaire de confirmer ces hypothèses.

- Nitrosylation

Le NO peut influencer la signalisation cellulaire par une S-nitrosylation. Il a été rapporté que plusieurs modulateurs du pore peuvent être nitrosylés comme la F₀F₁-ATPase, VDAC, Cyp-D (113,114). Afin de valider cette hypothèse, une équipe a muté des cellules MEF *Ppif*^{-/-} et a montré que ces cellules mutantes sont résistantes au gonflement mitochondrial et à la mort cellulaire induite par les ROS, suggérant que la modification thiol sur un site spécifique pourrait être déterminante dans la régulation du mPTP. Cependant il est possible que cette mutation masque un site de l'oxydation (115).

2.5 PiC (*Phosphate inorganic carrier*)

Le PiC est le principal transporteur de phosphate inorganique (Pi) dans la matrice mitochondriale par co-transport de proton ou échange d'un ion hydroxyl. Historiquement le Pi est un important modulateur de l'ouverture du mPTP (108,116). Un nouveau modèle de mPTP a été proposé par Leung *et al.* montrant que le PiC induirait en synergie avec le calcium l'ouverture du mPTP en modifiant sa conformation (117). Il a même été suggéré qu'il puisse exister une liaison entre PiC et Cyp-D, qui serait inhibée par la CsA mais aucune démonstration n'a pu le prouver de façon formelle. Par ailleurs, il a été montré que la surexpression de PiC induisait un dysfonctionnement mitochondrial et l'entrée en apoptose (118). L'équipe d'Halestrap a également montré que le Pi augmentait l'ouverture du mPTP, mais de manière indépendante à la Cyp-D (119). Cependant cette hypothèse a été également remise en question récemment quand il a été montré que l'inhibition de 70% de PiC n'entraînant aucune altération du seuil de sensibilité au calcium du mPTP (120).

2.6 *Le complexe I de la chaîne respiratoire*

Le complexe I de la chaîne respiratoire est le seul autre complexe multiprotéique connu pour être potentiellement un des constituants du mPTP (92). Pour Fontaine *et al.*, cette hypothèse est supportée par le fait que le flux d'électrons transitant à travers ce complexe constitue un élément régulateur de la transition de perméabilité indépendant de tout autre mécanisme connu. En effet, d'un part la probabilité d'ouverture du mPTP est plus grande après activation de la chaîne respiratoire par des substrats du complexe I que du complexe II. De plus, en présence de substrat du complexe II, la roténone, un inhibiteur direct du complexe I, protège la mitochondrie de l'induction de la transition de perméabilité (121). Par ailleurs, il

a constaté qu'une levure appelée *Saccharomyces cerevisiae* dont les mitochondries sont dépourvues de complexe I, présente une perméabilité de transition atypique, insensible à la CsA et au Ca^{2+} (122).

2.7 F₀/F₁ ATP-synthétase (ou complexe V de la chaîne respiratoire).

Très récemment, l'équipe de Bernardi a mis en évidence le rôle majeur de la F₀/F₁ ATP-synthase dans la transition de perméabilité (123). Leurs travaux suggèrent que ce complexe de la chaîne respiratoire puisse être le composant principal du mPTP. Le rôle de la F₀/F₁ ATP-synthétase est de convertir la force protomotrice générée par les complexes I, II et IV de la chaîne respiratoire en ATP. Ce complexe est constitué d'un transporteur spécifique membranaire de proton (F₀), d'un domaine extrinsèque hydrophile F₁, côté matriciel, qui supporte l'activité catalytique de la F₀/F₁ ATP-synthétase et d'un "pont" qui relie ces deux sous unités fonctionnelles appelé OSCP (*oligomycin sensitivity binding protein*). La F₀/F₁ ATP-synthétase s'organise en dimère ce qui lui permettrait d'accroître ses performances catalytiques. En 2009, l'équipe de Bernardi a montré que la Cyp-D pouvait se lier à l'OSCP (124). Cette liaison diminue l'activité ATP synthétase alors que la CsA restaure l'activité catalytique en déplaçant la fixation de la Cyp-D à l'OSCP. L'absence d'effet de la CsA sur l'activité de l'ATP synthétase a été vérifiée sur des souris Cyp-D^{-/-}, suggérant que ce phénomène est bien Cyp-D dépendant. Soumis à un stress calcique, les dimères purifiés de F₀/F₁ ATP-synthétase, forme un canal de conductance élevé (1 à 1,3 pS), indépendamment de la Cyp-D, de l'ANT ou de VDAC. De plus, le fait que (1) le Bz-423 (un inducteur de la perméabilité de transition qui se fixe spécifiquement sur l'OSCT) et les oxydants des thiols favorisent la formation de ce canal à haute conductance, (2) les nucléotides (ADP et ATP) inhibent cette ouverture et (3) que les monomères de la F₀/F₁ ATP-synthétase ne présentent

aucune activité de type "canal", suggèrent fortement, que le mPTP est formé, par une modification de conformation des dimères de l'ATPase, en présence de calcium. Cette hypothèse est consolidée par le fait que les autres facteurs de régulations reconnus du mPTP, détaillés dans le paragraphe suivant, tels le pH matriciel, le Mg^{2+} ou encore le P_i , sont également des régulateurs importants de l'ATP synthétase.

2.8 L'hexokinase

L'hexokinase est une enzyme cytosolique qui catalyse la réaction de phosphorylation des hexoses sur leur sixième carbone. L'hexokinase est particulièrement importante pour le métabolisme glucidique puisqu'il s'agit de la première enzyme de la glycolyse. Cette enzyme ubiquitaire est présente dans la quasi-totalité des tissus (sauf dans le foie et le pancréas où elle est remplacée par la glucokinase). Elle joue un rôle dans la régulation du mPTP, en partie *via* le complexe qu'elle forme avec le VDAC.

3. Les facteurs régulateurs du mPTP

3.1 Le calcium

Le calcium est le principal inducteur de l'ouverture du mPTP, suffisant pour induire la transition de perméabilité mitochondriale, qui peut être inhibée par des chélateurs comme l'EGTA. La quantité de calcium nécessaire pour ouvrir le mPTP, ou capacité de rétention calcique, est le critère d'évaluation de la susceptibilité de la mitochondrie à ouvrir le mPTP. Par ailleurs, il existe également une action indirecte du calcium sur le mPTP. Par exemple, le relargage de l'acide arachidonique à partir des phospholipides et l'activation des calpaïnes Ca^{2+} -dépendantes sont des facilitateurs de l'ouverture du mPTP.

3.2 pH

L'acidose inhibe l'ouverture du mPTP comme montré par Haworth et Hunter (92). L'effet protecteur de l'acidose a été démontré sur des modèles *in vitro* et sur des cœurs soumis à une IR.

3.3 Potentiel membranaire

Le mPTP se comporte comme un canal voltage dépendant. Ainsi une hyperpolarisation favorisera un état fermé et une dépolarisation son ouverture. Le potentiel de membrane pourrait agir sur le mPTP en changeant la conformation de l'ANT. Il a également été montré qu'un léger découplage de la mitochondrie était protecteur, par limitation de la production de ROS et retard à l'ouverture du mPTP.

3.4 Phosphate inorganique

Le Pi est essentiel à l'inhibition de l'ouverture du mPTP. En présence de CsA il désensibiliserait le mPTP face à une surcharge calcique. Le Cyp-D pourrait être la cause de ce double effet : lorsqu'elle serait présente, elle masquerait l'action inhibitrice du Pi en bloquant son site de régulation sur le mPTP. A l'inverse, absence, le Pi pourrait inhiber ce pore.

3.5 Stress oxydant

Comme décrit précédemment, le stress oxydatif est un puissant activateur de l'ouverture du mPTP. Il a ainsi été montré que l'administration de divers pro-oxydants potentialise la sensibilité du mPTP à la surcharge calcique. Halestrap *et al.* ont montré que les ROS augmentaient la probabilité d'ouverture du mPTP en affectant la liaison de la Cyp-D à

l'ANT (125). Il semblerait que l'impact de ces ROS ne soit pas la même selon leur localisation. Les ROS matriciels induiraient l'ouverture du mPTP en modifiant les groupements thiols alors qu'une augmentation des ROS cytosolique pourrait être protectrice.

3.6 Les ligands de l'ANT

Les nucléotides adényliques sont les premiers inhibiteurs du mPTP à avoir été identifiés. L'ADP est plus efficace que l'ATP. Les molécules qui sont connues pour diminuer le stock de nucléotides adényliques favorisent l'ouverture du mPTP.

3.7 Le Complexe I

Le mPTP a la particularité d'être modulé par un flux d'électrons par le complexe I (126). Un rôle spécifique lui a été suggéré après la découverte du potentiel inhibiteur de la roténone sur le mPTP (121,127). L'inhibition de la transition de perméabilité par la roténone est maximale dans les mitochondries qui expriment de faibles niveaux de Cyp-D, et où la CsA n'a que peu d'effet inhibiteur alors que l'inhibition par la CsA est maximale dans les mitochondries avec des niveaux élevés d'expression de Cyp-D, où la roténone n'affecte pas le mPTP. Enfin, les tissus avec des mitochondries exprimant des niveaux intermédiaires de Cyp-D sont sensibles à la roténone et à la CsA, avec effets additifs des deux inhibiteurs (121). La probabilité d'ouverture du mPTP est augmentée après activation de la chaîne respiratoire mitochondriale par des substrats du complexe I alors qu'elle est inchangée en présence de substrat du complexe II, III ou IV.

4. Les conséquences de l'ouverture du mPTP

Il est maintenant largement admis que la dysfonction mitochondriale, et l'ouverture du mPTP, joue un rôle majeur dans l'étendue de la taille de l'infarctus lors de l'IR (Figure 13).

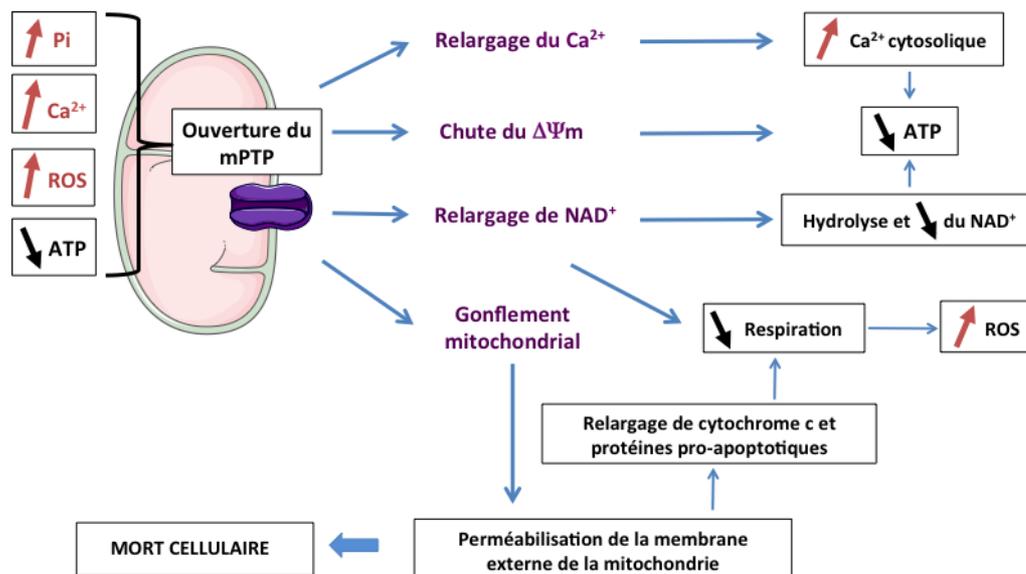


Figure 13: Conséquences de l'ouverture du mPTP durant l'ischémie-reperfusion. Lors de stimulus tels que l'augmentation du Pi, du Ca²⁺ des ROS ou de la diminution de l'ATP, il existe une ouverture prolongée du mPTP. La membrane perd son imperméabilité, le potentiel de membrane s'effondre et il existe une hydrolyse de l'ATP. LA rupture des membranes est entraînée lors du gonflement de la matrice, et un relargage de facteurs pro-apoptotiques s'en suit. Adaptée de Di Lisa *et al.* (128)

Les changements fonctionnels et structuraux de la mitochondrie lors de l'IR ont des conséquences sur l'ensemble de la cellule, par l'ouverture du mPTP qui cause une soudaine

augmentation de la perméabilité membranaire de la mitochondrie au moment de la reperfusion. La mesure directe de l'ouverture du mPTP dans le coeur perfusé à l'aide de [3H]-deoxyglucose piégeage a confirmé que le pore reste fermé pendant l'ischémie mais s'ouvrait au début de la reperfusion. Cela se produit lorsque le pH revient à la normale. L'ouverture du mPTP est favorisée par la surcharge calcique, les concentrations élevées de Pi et les faibles concentrations d'adénine nucléotides, qui sont des événements qui apparaissent lors de l'IR (et décrit précédemment). La transition de perméabilité a comme conséquence un gonflement de la matrice secondaire à une entrée d'eau (*swelling*), un effondrement du potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$) et un découplage de la phosphorylation oxydative. La dissipation de ce $\Delta\Psi_m$ s'accompagne d'un arrêt de la synthèse d'ATP mais également de son hydrolyse par l'ATP synthétase qui se met à fonctionner en sens inverse. L'ouverture du mPTP est facilitée par la liaison de la Cyp-D à la membrane interne de la mitochondrie, modulée par le Ca^{2+} et le Pi. La chute drastique du potentiel de membrane qui est l'inévitable première conséquence d'une ouverture prolongée du mPTP est rapidement suivie par une déplétion en ATP et NAD^+ , le relargage de l'accumulation de calcium et une rupture de la membrane externe, conduisant à une fuite des protéines pro-apoptotiques. Lors de l'ischémie, malgré un découplage de la chaîne respiratoire, une augmentation du Pi, du Ca^{2+} et des ROS, le mPTP reste fermé, notamment antagonisé par l'acidose intra cellulaire. Mais dès la reperfusion, et malgré une récupération du potentiel de membrane, l'ouverture du mPTP est facilitée par le retour à un pH physiologique ainsi que par l'accumulation de Ca^{2+} et de ROS au sein de la mitochondrie. Bien que site de formation des ROS, les fonctions mitochondriales sont profondément altérées par le stress oxydant, principalement par leur lien avec le mPTP qui a été décrit comme « ROS induced-ROS release ». En effet, les ROS facilitent l'ouverture du mPTP qui elle même favorise la formation de ROS en inhibant le flux d'électron *via* la chaîne respiratoire mitochondriale. L'importance de l'ouverture du mPTP dans la médiation de l'IR a

été confirmée par la démonstration que l'inhibition de l'ouverture du mPTP par CsA effet cardioprotecteur (129,130). L'utilisation de la sanglifehrin A (131) et des analogues de la CsA tels que NIM811 (132) et Debio -025 (133), autres inhibiteurs de l'ouverture du mPTP *via* leurs liaisons à la CypD, ont montré que cette action était indépendante de la propriété immunosuppressive de la CsA. L'utilisation des souris transgéniques, notamment des souris knock-out Cyp-D, a permis de confirmer le rôle de la CypD dans la néphroprotection (134).

IV. Protection rénale par conditionnement.

Il est donc possible de limiter certaines conséquences néfastes de l'IR par des manœuvres de protection, appelée conditionnement ischémique ou conditionnement pharmacologique, dans le but de retarder l'ouverture du mPTP.

A. Le conditionnement ischémique

L'intérêt d'un conditionnement ischémique est de rendre un organe résistant à un long épisode d'IR par une application d'un ou plusieurs épisodes transitoires d'ischémie avant ou après un épisode d'ischémie prolongée. Si cet épisode d'ischémie transitoire est réalisé avant une ischémie prolongée, il s'agit d'un pré-conditionnement ischémique (PréCI), si cet épisode d'ischémie transitoire est réalisé au moment de la reperfusion, il s'agit d'un post-conditionnement ischémique (PostCI). Le conditionnement ischémique peut également être obtenu en pratiquant une ischémie de courte durée sur un autre organe du même organisme

(PréCI et PostCI à distance). Ces techniques de conditionnement ischémique partagent des mécanismes communs de protection, que nous allons décrire (figure 14).

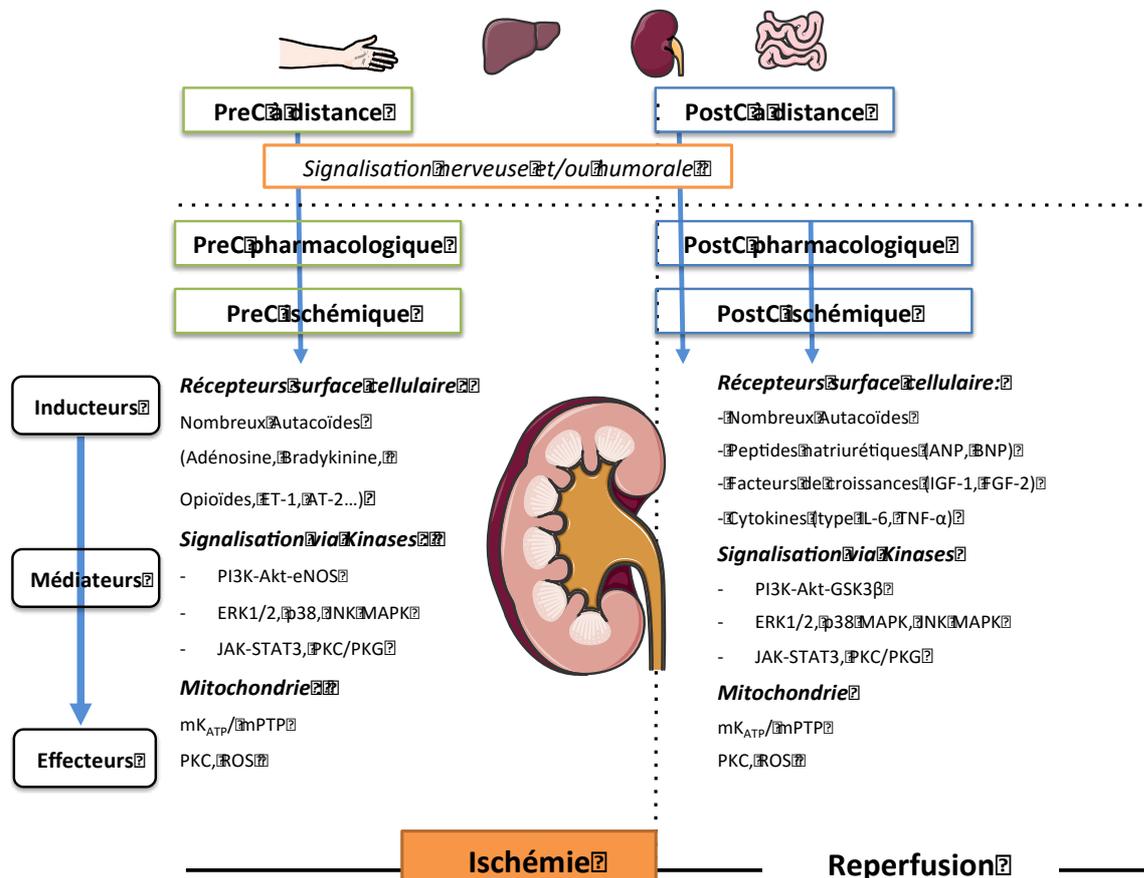


Figure 14: Résumé des principales voies impliquées par le PréCI et le PostCI. Adapté de Hausenloy *et al.* 2009 (135). Les mécanismes du PréCI et du PréCI à distance impliquent des voies de signalisation comprenant des récepteurs de nombreux autocoïdes (tels que adénosine, bradykinine, opoïdes) à la surface cellulaire, des kinases de signalisations et des effecteurs situés au niveau mitochondrial. Le PostCI et le PostCI à distance empruntent des voies similaires à celles du PréCI, au début de la reperfusion. Les voies nerveuses et/ou

humorales semblent être impliquées dans le conditionnement à distance reliant le rein aux autres organes afin d'induire une protection.

1. Le pré-conditionnement ischémique (PréCI)

L'efficacité du PréCI a été publiée pour la première fois en 1986 par Murry *et al.* (136) en montrant que la réalisation de 4 cycles de 5 min d'occlusion de l'artère coronaire espacés de 5 min de reperfusion appliquée immédiatement avant une ischémie prolongée diminuaient la taille de l'infarctus de 75% chez le chien. Le PréCI a ensuite été testé dans de nombreux organes, tels que le cerveau, le foie, le rein, l'intestin grêle, le poumon (137-139).

L'efficacité de ce PréCI suit une cinétique bi-phasique avec une première fenêtre de protection (early preconditioning) qui débute immédiatement après la manœuvre de pré-conditionnement et dure de 2 à 3 heures. Il s'ensuit une période de 12 à 24 heures durant laquelle la protection cesse. Une deuxième fenêtre (late preconditioning) de protection réapparaît pendant une durée s'étendant de la 24^{ième} heure à la 72^{ième} heure après la manœuvre de PréCI. Le PréCI peut être obtenu également en pratiquant une ischémie de courte durée sur un autre organe du même organisme appelé PréCI à distance, que l'on traitera dans une partie indépendante.

Le PréCI rénal a été testé une dizaine d'années après le PréCI cardiaque. Les résultats du PréCI rénal obtenus ont montré un effet positif aussi bien *in vitro* (140) que *in vivo* (141). Torras *et al.* sont les premiers à avoir testé le PréCI dans le rein avec succès (142). On retrouve une protection chez le petit animal (le rat (141) et la souris (143)). Cette protection est retrouvée dans des conditions d'ischémie chaude ou d'ischémie froide simulant une transplantation (144). Cependant l'efficacité du PréCI chez le gros animal est débattue, avec des effets plus variables chez le chien (145,146) et le porc (147-149). L'algorithme de PréCI a une incidence importante sur la protection de l'organe et pourrait expliquer ces différences de protection. La protection apportée par le PréCI diminue plus on augmente le temps entre le

conditionnement et l'ischémie (150). Le protocole du PréCI doit être défini de manière précise et vérifiée. En effet, certaines études ont suggéré que de brefs cycles d'ischémie et de reperfusion n'étaient pas efficaces pour protéger la fonction rénale (151). Toutefois, d'autres études ont confirmé qu'il existe un effet protecteur du PréCI (152-154). Les écarts entre ces différents résultats s'expliquent principalement sur la différence de timing dans le PréCI. Li *et al.* ont montré que l'augmentation du nombre de cycles de PréCI (de 1 à 3) accélérât l'amélioration de la fonction rénale montrant que la rapidité de récupération d'une diurèse optimale et d'un débit sanguin rénal est inversement proportionnelle au nombre de cycles réalisés (146). Une méta-analyse des études animales dans le PréCI a été publiée en 2002 et a pu répondre à la question d'efficacité (155). Cette revue a sélectionné 58 études montrant un effet bénéfique global, avec une réduction de la créatinine plasmatique (HR 1,54 95% CI 1,16-1,93), de l'urée de 1,42 (95% CI 0,97-1,87) et des lésions histologiques (1,12 (95% CI 0,89-1,35)). Les facteurs influençant l'efficacité du PréCI étaient principalement le temps de la fenêtre de protection < 24h ou > 24h mais également l'espèce animale. Aucune différence entre le PréCI ou le PréCI à distance n'a été observée dans cette méta-analyse.

2. Le post-conditionnement ischémique (PostCI)

Le post conditionnement ischémique (PostCI) consiste en l'application de brèves séquences d'ischémie-reperfusion dans les suites d'une occlusion. Cette technique a été réalisée pour la 1^{ère} fois en 2003, par l'équipe de Zhao *et al.* dans l'ischémie reperfusion cardiaque, montrant une diminution de 40 % de la taille de l'infarctus chez l'animal (156). Le PostCI a été ensuite translaté à d'autres organes. Il existe également un nombre limité de données dans le PostCI rénal. Seulement 14 études ont été publiées sur le sujet, en comparaison des innombrables

articles parus sur le cœur (157). La première étude ayant montré que le PostCI avait un effet positif sur la fonction rénale a été publiée en 2007 par Swarc *et al.* (158) Cette technique a permis de diminuer l'apoptose, la nécrose tubulaire aigüe, d'améliorer la fonction rénale (159,160) et de diminuer la fibrose à 12 semaines post-ischémie (161). Le PostCI permet aussi de diminuer l'inflammation et la peroxydation lipidique (162). Cet effet positif a été montré dans plusieurs espèces: chez le rat (160), la souris (158) et le chien (159) avec une efficacité différente en fonction de l'algorithme du PostCI utilisé. Il existe quelques essais expérimentaux en transplantation dans le PostCI. Jiang *et al.* ont montré, dans un modèle d'auto-transplantation chez le chien (mimant une ischémie chaude et froide) une amélioration de la fonction rénale, en terme de créatinine et d'histologie (162).

3. Mécanismes de protection

Les mécanismes reconnus actuellement dans la protection apportée par le conditionnement ischémique sont classés en 3 étapes : les inducteurs, les médiateurs et les effecteurs. Cependant cette séparation n'est pas toujours aussi simple et certains composants peuvent être à la fois inducteurs et médiateurs. Les voies de signalisation décrites ci-dessous à l'origine de la cardioprotection, et encore non complètement élucidées à ce jour. A la différence du PréCI, le PostCI ne cible que des événements survenant à la reperfusion mais possède de nombreuses voies de signalisation communes au PréCI. Ces mécanismes suspectés ne sont probablement pas exclusifs et il paraît vraisemblable qu'un certain nombre d'entre eux soient impliqués en même temps et puissent agir de manière synergique pour protéger le(s) organe(s) cible(s). Il existe de très nombreuses similitudes dans ces mécanismes de protection entre le préCI et le postCI, que nous allons décrire conjointement (Figure 15).

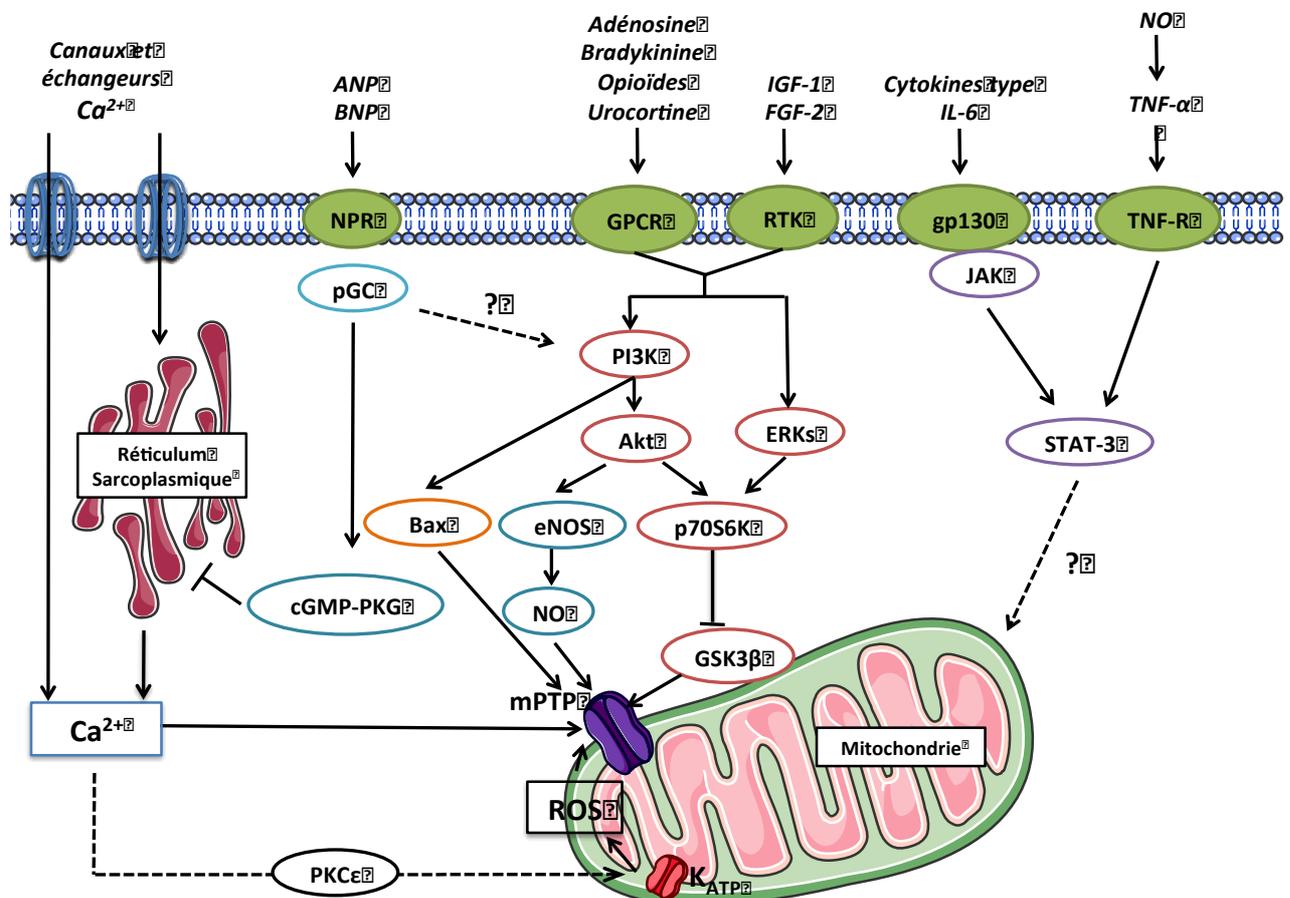


Figure 15 : Schéma récapitulatif des voies de signalisations activées dans le pré et post-conditionnement ischémique, d'après (163). Voies de signalisations du préconditionnement ischémique dans le coeur. Akt: protéine kinase B ; ERK: *Extracellular signal regulated kinase* ; GPCR: Récepteur couplé aux protéines G ; GSK3β: *glycogen synthase kinase 3 beta* ; KATP: canaux K-ATP ; mPTP: pore de transition de perméabilité mitochondrial ; NO: Oxyde nitrique ; PKC: Protéine kinase C ; RTK: Récepteur tyrosine kinase. Voies de signalisations du postconditionnement ischémique dans le cœur : Akt: protéine kinase B ; eNOS: NO synthase endothéliale ; ERK: *Extracellular signal regulated kinase* ; GPCR:

Récepteur couplé aux protéines G ; GSK3 β : *glycogen synthase kinase 3 beta* ; IGF-1: *Insulin-like growth factor* ; IL: Interleukine ; JAK: *Janus kinase* ; KATP: canaux K-ATP ; mPTP: pore de transition de perméabilité mitochondrial ; NO: Oxyde nitrique ; NPR: récepteurs des peptides natriurétiques ; p70S6K: *P706S kinase* ; PKC: Protéine kinase C ; ROS: Radicaux libres de l'oxygène ; RTK: Récepteur tyrosine kinase ; STAT: *Signal transducers and activators of transduction* ; TNF α : Tumor necrosis factor α ; TNF-R: Récepteur du TNF α ;

3.1 Les inducteurs

Les inducteurs les plus fréquemment cités dans la littérature sont l'adénosine, la bradykinine et les dérivés opoïdes. Une attention particulière a été accordée à l'adénosine en tant qu'inducteur des lésions d'ischémie dans la littérature. L'adénosine est un nucléotide endogène, libérée en grande quantité quelques secondes après le début de l'ischémie (146), se fixant sur des récepteurs membranaires spécifiques et induisant une vasoconstriction (164). Son accumulation au cours du PréCI peut déclencher une protection *via* l'activation de récepteurs de l'adénosine, dans le cœur et dans le rein (165-168). Par ailleurs, la liaison des opoïdes à leurs récepteurs conduit à la phosphorylation de ERK et de Akt, à une diminution de l'apoptose et à une diminution du relargage du cytochrome c dans le cytosol (169), entraînant l'ouverture des canaux mitoK_{ATP} et l'inhibition du mPTP (170).

Ces inducteurs agissent sur des récepteurs membranaires couplés à des protéines G. D'autres inducteurs peuvent être également cités, leur action étant indépendante d'un récepteur: les radicaux libres de l'oxygène et le NO (171). Leur rôle reste encore controversé et mal compris. L'équipe de Vanden Hoek a montré que, *in vitro*, le PréCI génère une production de radicaux libres au moment de l'induction et limite le stress oxydatif lors de la reperfusion après une ischémie prolongée (172,173). Enfin, le NO est l'inducteur actuellement le plus

controversé, lié aux difficultés techniques de son analyse (174). Son rôle semble cependant démontré dans le rein (175). D'autres autacoïdes comme les peptides natriurétiques (ANP et BNP), les facteurs de croissance (*Insulin growth factor, transforming growth factor 1β*) et le TNF α , pourraient jouer un rôle d'inducteur dans le postCI puisque l'activation pharmacologique de ces kinases de survie, au moment de la reperfusion, peut diminuer de 40 à 50 % la taille de l'infarctus (176-178).

Ces mécanismes présentés ci dessus sont ceux qui résultent des études expérimentales principalement étudiés dans le cœur. Cependant il apparaît quelques différences entre le mécanisme de protection du PréCI entre le cœur et le rein. L'adénosine exogène apparaît être réno-protective, mais l'injection d'antagoniste de l'adénosine n'abolit pas l'effet protecteur du PréCI dans le rein (152,166). Par ailleurs, la bradykinine et les opiacés ne diminuent pas les lésions d'IR dans le rein à l'inverse du myocarde. L'ion calcium pourrait également être impliqué dans l'induction de cette signalisation dans la mesure où il est capable d'induire un phénomène de pré-conditionnement lorsqu'il est perfusé en excès dans un modèle de Langendorff chez le rat (179). De plus, le vérapamil, bloqueur des canaux calciques, antagonise non seulement le pré-conditionnement par le Ca²⁺ mais également le PréCI conventionnel (180-182).

3.2 Les médiateurs

Les médiateurs sont principalement des protéines kinases. L'activation de certains récepteurs membranaires couplés à des protéines G modulent la production d'AMPC tandis que d'autres activent la phospholipase C, qui, à son tour active la protéine kinase C ou encore la protéine kinase A (183). Cependant plusieurs études ont pu montrer que la voie RISK, la

PKC (184) mais également ERK et Akt (185) jouent un rôle de médiateurs dans le PréCI, de même que iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) (171) et la heme-oxygénase (186).

a. La voie RISK (reperfusion injury salvage kinase)

Cette voie de signalisation est une association de kinases anti-apoptotiques, pro-survivantes activée au moment de la reperfusion (187). Cette voie de protection a été découverte par Yellon *et al.* dans le PostCI (188,189) mais est une voie commune entre le PréCI et le PostCI (135,190,191). Les principaux composants de cette voie de signalisation sont PI3K-Akt, JNK et Erk1/2 (176). Tong *et al.* ont démontré le rôle de PI3K-Akt comme une voie possible de protection du PréCI. Dans le cœur isolé-perfusé, ils démontrent que le PréCI induit la phosphorylation d'Akt et de sa cible sous jacente : GSK-3 β (192). L'activation de cette voie de signalisation conduit à l'inhibition de caspases (193) et du relargage du cytochrome c (194), ainsi qu'à l'inhibition de l'ouverture du mPTP. L'activation pharmacologique de ces kinases de survie, au moment de la reperfusion, peut diminuer de 40 à 50 % la taille de l'infarctus (176).

La glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) impliquée dans cette voie RISK est une sérine thréonine kinase de 47 kDa dont le nom vient de sa capacité à phosphoryler et inactiver la glycogen synthase, une enzyme finale de la voie du glycogène. La GSK-3 β est une enzyme centrale dans un grand nombre de voies de signalisation et un important régulateur de plusieurs facteurs de transcription. Elle contrôle plusieurs processus extra métaboliques perturbés dans l'ischémie, telle la dynamique du cytosquelette, l'expression génique, la prolifération et l'apoptose (195-197). La GSK-3 β régule également la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale par sa capacité à activer Bax, une protéine pro-apoptotique,

constitutionnellement exprimée dans la cellule, en la phosphorylant (198). La phosphorylation de la GSK-3 β entraîne son inhibition et permet une cardioprotection en inhibant le mPTP (199) par son action sur l'ANT (200). Plusieurs études suggèrent que l'inhibition de la GSK-3 β préserve de la dysfonction d'organes après ischémie cérébrale (201), cardiaque (202) et hépatique (203). Au niveau cardiaque, une forme mutée de souris GSK-3 β , non phosphorylable, n'est pas protégeable par un PostCI, suggérant que l'inhibition de la GSK-3 β est nécessaire au fonctionnement du PostCI (202). Au niveau rénal, il a été montré que l'inhibition de la GSK-3 β pouvait réduire l'apoptose dans un modèle d'ischémie reperfusion rénale (204). Howard *et al.* montrent en effet que le rein semblerait avoir la capacité à inhiber l'activité de la GSK-3 β pour réduire les lésions tubulaires, mais cette inhibition ne semble pas suffisante pour protéger la souris contre une agression sévère de l'épithélium tubulaire (205). Les cellules tubulaires GSK3 β -KO ont non seulement une diminution de leurs lésions tubulaires, mais également une accélération de la régénération de ces tubules. La voie RISK apparaît donc comme une voie fondamentale dans la protection myocardique, et également rénale.

De récentes études suggèrent que cette voie n'est pas la seule à être sollicitée. Selon les espèces il semble que d'autres voies de signalisation soient impliquées dans la protection induite par le PréCI et le PostCI.

b. La voie SAFE (survivor activating Factor Enhancement)

Plus récemment une autre voie de signalisation : SAFE a été décrite comme étant une voie de protection indépendante de la voie RISK, impliquant le TNF α et JAK-STAT (206,207). Cette voie est médiée par la fixation de cytokines sur leurs récepteurs

membranaires activant une cascade de signalisation convergeant vers le noyau, entraînant la transcription de protéines impliquées dans divers processus cellulaires et notamment la cardio-protection. L'inhibition pharmacologique, ou la neutralisation génétique d'une composante de la voie SAFE, conduit à l'abolition des effets de cardio-protection dans le PostCI. Le TNF α , à faible concentration, pourrait être un des inducteurs de cette voie. Après fixation à son récepteur, il activerait JAK (*JanusKinase*), qui à son tour phosphorylerait le facteur de transcription STAT3. La translocation de STAT3 au noyau conduirait à la synthèse de facteurs cardioprotecteurs. Cependant les souris knock-out pour STAT3 sont postconditionable, suggérant que cette voie n'est pas la seule impliquée.

La voie RISK et la voie SAFE semblent toutes deux converger vers la mitochondrie pour exercer leurs effets cardioprotecteurs.

c. Les MAP kinase et autres

Les MAPK sont divisées en sous famille : ERK, JNK, p38, qui semblent chacun jouer un rôle dans le PréCI (208,209). L'activation de ERK est controversée dans le PréCI et semble être espèce dépendante (210). L'activation de JNK et p38 réduit la taille de l'infarctus chez le lapin, le porc et le rat (211-213). Cependant JNK et p38 qui ont un rôle important dans le PréCI semblent avoir un rôle délétère dans le PostCI (214). D'autres kinases telles que les protéines kinases C, particulièrement l'isoforme PKC- ϵ , la sphingosine kinase et la protéine kinase G ont également un rôle, non encore parfaitement compris.

3.2 Les effecteurs

a. MitoK_{ATP}

De nombreuses études dans la littérature impliquent le mitoK_{ATP} comme un médiateur de la voie de signalisation lors du PréCI.

Hausenloy *et al.* ont montré que l'administration d'un inhibiteur du mitoK_{ATP} (5-hydroxydecanoate) au moment de la reperfusion myocardique abroge les effets de protection du PréCI (215), suggérant que l'ouverture du mitoK_{ATP} à la reperfusion contribue à la cardioprotection. Certains travaux suggèrent également que les mitoK_{ATP} pourraient agir en amont du mPTP (216). Des études expérimentales (217,218) sont contradictoires quand à l'inhibition pharmacologique des mitoK_{ATP} et de leur protection puisque une autre étude a montré que l'ouverture des mitoK_{ATP} entraînerait l'inhibition de l'ouverture du mPTP (220).

Dans le rein, la présence de mitoK_{ATP} a été suggérée par Cancherini *et al.* (221) mais leur rôle est également controversé : Certains activateurs du mitoK_{ATP} protègeraient contre l'IR (222), certains inhibiteurs du mitoK_{ATP} protègeraient également contre les lésions d'IR (223). Il a été montré que le Levosimendan, ou le Nicorandil, des molécules ouvrant le canal mitoK_{ATP}, préviennent la survenue d'une IRA (222,224). Nilakanta *et al.* ont comparé l'effet d'un inhibiteur (5-hydroxydecanoate (5-HD)) et d'un activateur du mitoK_{ATP} (diazoxide) sur des cellules du tubule proximal de 2 espèces différentes : le rat et le porc. Le diazoxide atténue la cytotoxicité de l'hypoxie-réoxygénation sur les cellules des 2 espèces. L'administration d'un inhibiteur du mitoK_{ATP} protège également les cellules de porc (LLC-PK1) alors qu'elle aggrave les lésions d'hypoxie-réoxygénation dans les cellules de rat. Dans un modèle de rein isolé-perfusé, il a été montré que les mitoK_{ATP} étaient activés lors de l'IR (225) . Tan *et al.* ont de leur côté mis l'accent l'amélioration du dommage de l'ADN mitochondrial par le PostCI, annihilé après l'injection d'un inhibiteur des mitoK_{ATP} (226).

Cependant, malgré toutes ces démonstrations, il n'y a pas de preuve certaine de l'existence des mitoK_{ATP}.

b. Le mPTP

L'ouverture du mPTP, qui a lieu au moment de la reperfusion, est le plus sérieux candidat au rôle d'effecteur final du PréCI et du postCI (227). L'équipe d'Ashraf ont été les premiers, en 2001, à suggérer que le mPTP puisse être l'effecteur du pré-conditionnement sans apporter de preuve expérimentale directe (228). L'année suivante Hausenloy *et al.* ont montré, sur un modèle de cœur isolé/perfusé, que l'effecteur du PréCI pourrait être le mPTP (216).

Le rôle essentiel du mPTP dans la physiopathologie de la reperfusion myocardique repose sur essentiellement deux caractéristiques. D'une part, les conditions de son ouverture (accumulation de calcium mitochondrial, un stress oxydant, une restauration du pH, une concentration d'ATP basse et élevée de phosphates) sont également retrouvées à la reperfusion. D'autre part l'inhibition du mPTP ou l'IR chez des souris transgéniques d'un composant du mPTP permet une meilleure protection. Plusieurs études rapportent que son rôle est déterminant dans la mort cellulaire. Il a été montré que le PréCI et le traitement par le diazoxide inhibent l'ouverture du mPTP en réponse à un stress oxydant. Juhaszova *et al.* ont montré que le PréCI permettait l'inhibition de l'ouverture du mPTP par l'intermédiaire de la phosphorylation de GSK3-β (229). Cette même équipe a également montré que le PréCI provoque une inhibition du mPTP, qui peut être objectivée par la mesure de la captation de ³H-DOG par les mitochondries de cœurs préconditionnés (230). Dans notre laboratoire, Argaud *et al.* ont montré pour la première fois, sur un modèle d'infarctus du myocarde chez le lapin, que le PréCI limitait la nécrose myocardique en inhibant l'ouverture du mPTP induite par une surcharge calcique (231). A côté de ce rôle d'effecteur, Hausenloy *et al.* ont

montré que le mPTP pourrait également intervenir au moment de la phase d'induction du PréCI (232). En effet, ces auteurs ont mis en évidence une possible ouverture transitoire du mPTP qui participerait à la médiation du signal protecteur en modulant la production de ROS. Ces observations ont été confirmées par la même équipe en utilisant des souris transgéniques *knock out* (KO) pour la Cyp-D (233).

Dans le rein, très peu d'études ont cependant montré le rôle déterminant du mPTP, en PréCI ou en postCI. Les principales études ont été réalisées *in vitro*. L'équipe de Weinberg montre en effet une augmentation de la CRC dans les tubules des souris Cyp-D KO (234). L'injection de SiRNA du gène de la Cyp-D a également permis de montrer une protection cellulaire contre les lésions d'hypoxie/réoxygénation (235). Felkamp *et al.* ont mis en évidence une ouverture plus précoce du mPTP (236). Zhang *et al.* ont montré l'implication du mPTP et des canaux mitoK_{ATP} dans le postCI toujours *in vitro* (170).

Les études *in vivo* ont permis de montrer une amélioration de la fonction rénale des souris Cyp-D KO lors d'un épisode d'IR (134,234). Servidio *et al.* ont également montré l'impact de l'ischémie sur la respiration mitochondriale, ainsi que l'efficacité du PostCI dans l'amélioration de la respiration à 24h de reperfusion (160). *In vivo*, aucune étude n'a démontré jusqu'à présent le rôle du mPTP dans la néphro-protection contre les lésions d'IR par mesure de la rétention calcique.

4. Applications cliniques

4.1 Le préconditionnement ischémique

En 1993, la translation du PréCI de l'animal à la clinique a été débutée (237). Depuis, de nombreux essais cliniques ont été publiés, que ce soit au niveau cardiaque, pulmonaire,

hépatique, (238) et cérébral. Cependant il n'existe actuellement aucune étude ayant démontré le rôle du PréCI dans l'ischémie reperfusion rénale. Il y aurait pourtant un potentiel important pour le PréCI à améliorer la fonction rénale post greffe, actuellement une telle étude a été uniquement validée chez le cochon en association avec des traitements immunosuppresseurs (244).

4.2 Le Postconditionnement ischémique

Actuellement aucune étude clinique n'a été encore réalisée pour limiter les lésions d'IR en transplantation.

5. Le pré et post-conditionnement ischémique à distance

5.1 Modalités et mécanismes

Le pré ou post conditionnement à distance sont également des techniques de conditionnement ischémique introduites par Przyklenk dans le début des années 1990 (239), après avoir observé que de brèves occlusions de l'artère coronaire circonflexe, réalisées avant une occlusion de l'artère inter-ventriculaire antérieure, diminuait la taille de l'infarctus. Ce conditionnement a ensuite été étendu à une série d'expérimentation chez le rongeurs, montrant notamment qu'une faible ischémie rénale permettait une protection contre l'infarctus du myocarde (240). Un article publié en 2011 montre une efficacité chez le rat, par un clampage/déclampage en pré ou en post reperfusion de l'artère fémorale, avec une efficacité sur la fonction rénale (241). Il y a maintenant de nombreux résultats montrant que chez, l'animal, l'ischémie transitoire de certains tissus induit une protection dans de nombreux autres organes (242,243).

Comme pour le préCI ou le postCI, les mécanismes de protection du pré et post conditionnement ischémique à distance ont principalement été étudiés dans le cœur. Il a été montré que certains des mécanismes impliqués dans le conditionnement à distance pourraient être similaires à celui du PréCI (244,245). L'hypothèse du mécanisme du conditionnement à distance est multiple, impliquant des médiateurs inflammatoires, neuronaux et humoraux, qui peuvent varier selon le type de stimulus et interagir avec les autres (246). Les protéines kinases ont un rôle clé dans la transduction du signal et sont le point de convergence des inducteurs tels l'adénosine, la bradykinine et l'opioïde (247). Le concept actuel suggère qu'une activation des cascades de signalisation par la phosphoinositide 3-kinase/Akt/NOS/Phospho kinase G, aboutit à l'ouverture des canaux $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ (190,248), eux-mêmes limitant l'ouverture du mPTP, et permettant une nette amélioration de la survie des cellules.

5.2 Applications cliniques

Le pré-conditionnement à distance a montré une réduction significative des lésions myocardiques chez les patients ayant eu un pontage coronarien. Une méta-analyse récente résume les essais contrôlés-randomisés dans le PréCI à distance pour prévenir l'IRA après des interventions de chirurgie vasculaire ou cardiaque (177). Dans cette méta-analyse, 13 essais randomisés ont été analysés, comportant au total 1334 patients. Ces études comportaient 3 études avec chirurgie vasculaire, 3 études avec coronarographie, 7 études avec chirurgie cardiaque (177). Les résultats montrent un risque d'IRA dans les groupes avec préconditionnement à distance plus faible (RR 0.70 ; 95% CI ; 0.48-1.02 ; $p=0.06$) mais non statistiquement significatif. Cependant différentes définitions de l'IRA étaient portées dans ces 13 articles. Il n'y avait pas de différence significative dans l'instauration de la mise en

dialyse dans les 2 groupes (RR1.51, 95% 0.66-3.4 ; p=0.3) ni dans la mortalité intra hospitalière.

Actuellement 3 essais cliniques pour l'utilisation du préCI à distance sont en cours en transplantation rénale : RIPCOT (Remote Ischaemic Preconditioning In Abdominal Organ Transplantation), RIPNOD (Remote Ischaemic Preconditioning in Neurological Death Organ Donors) et REPAIR (Renal Protection Against Ischaemia Reperfusion in Transplantation).

Le PostCI à distance a été testé dans environ 30 essais cliniques dans les 8 dernières années, la plupart dans le cœur avec une majorité d'études positives. Il n'y a pas d'étude clinique dans le rein et le PostCI à distance. Seulement 2 essais cliniques ont été entrepris en pédiatrie avec de faibles participants ayant une tétralogie de fallot, montrant un clampage aortique intermittent. Ces essais ont démontré une cardio protection mais n'ont pas montré de différence dans la survenue d'un événement rénal.

Une étude pilote est en cours qui étudie le rôle du postconditionnement à distance.

B. Le conditionnement pharmacologique par la ciclosporine A

Le préCI et le postCI pouvant être invasifs, il était logique de pouvoir proposer un préconditionnement pharmacologique ayant une action sur le mPTP. La CsA, inhibiteur de ce mPTP, a donc été testée dans l'IR cardiaque.

1. Pharmacologie

La ciclosporine A (CsA) a été découverte dans les années 70 et a permis un changement radical dans la survie des greffons (249). Sa biodisponibilité est très variable,

essentiellement à cause des variabilités interindividuelles de l'absorption intestinale. Dans le plasma, 90% de la CsA est liée aux protéines. Le métabolisme de la CsA est principalement hépatique, *via* le système du cytochrome P450 et sa demi-vie entre 6 et 9 heures (250). L'efficacité thérapeutique de la CsA a pu être montrée en 1981 avec la publication d'une étude européenne multicentrique comparant les taux de survie à un an des greffons rénaux (taux de survie du greffon de 72% dans le groupe recevant la CsA *versus* 52% dans le bras recevant l'association azathioprine stéroïdes) (251). Parallèlement, il a été mis en évidence une néphrotoxicité de la CsA (100,252).

Toutefois, son utilisation reste majoritaire dans le domaine de la transplantation malgré les problèmes d'interactions médicamenteuses, de la néphrotoxicité importante et des risques de cancers et de lymphomes.

2. Mécanismes d'action

La CsA se lie à différentes cyclophilines. Par sa liaison à la cyclophiline A (Cyp-A), la CsA a une action immunosuppressive (253). Le complexe CsA-CypA inhibe la calcineurine, une sérine thréonine phosphatase calcium/calmoduline dépendante, au niveau cytoplasmique. La calcineurine intervient dans la déphosphorylation du facteur nucléaire des lymphocytes T. Elle est à l'origine de l'activation de la transcription du gène codant pour IL-2. L'inhibition de la calcineurine par le complexe CsA-CypA a donc pour conséquence une réduction de la transcription du gène codant pour IL-2, principal événement à l'origine de la modulation de la réponse immunitaire par la CsA. Cependant, il a également été démontré que la CsA activait certains récepteurs de type Toll (Toll-Like Receptor, TLR) et le TNF- α , eux-mêmes à l'origine d'une activation du système immunitaire inné.

Par sa liaison à la Cyp-D, la CsA empêche la modification de conformation de l'adénine nucléotide translocase (ANT) à l'origine de l'ouverture du mPTP (Figure 16). En effet, *in vitro*, les cellules inactivées pour le gène codant pour la Cyp-D ont un retard à l'ouverture du mPTP et une diminution de la mort cellulaire induite par les ROS ou par la surcharge calcique (234). *In vivo*, les souris CypD déficientes ont une taille d'infarctus du myocarde diminuée et une fonction rénale spontanément améliorée après une IR par rapport aux souris wild type (134).

3. Toxicité rénale

La CsA, contrairement au cœur, a une toxicité rénale aiguë et une toxicité chronique (254). Nous nous sommes focalisés sur la toxicité aiguë puisque dans nos expérimentations nous n'injectons qu'une seule dose de CsA. Cette toxicité aiguë est dose dépendante (255) et réversible avec la réduction des posologies (251). Perico *et al*, en perfusant des doses croissantes de CsA par voie IV (10, 20 et 50 mg/kg) montrent que les modifications hémodynamiques sont doses dépendantes sur un rein isolé perfusé, avec une diminution croissante de la perfusion rénale et une augmentation des résistances vasculaires (256). L'injection de doses croissantes de CsA (de 0 à 100 mg/kg/j) à des rats SH induit une toxicité à partir de 20 mg/kg/j. A la dose de 20 mg/kg, Benigni *et al*. montre une chute du débit de filtration glomérulaire et du débit sanguin rénal (257). Racusen *et al*. ont montré qu'une injection IP de 60 mg/kg de CsA faisait chuter le débit sanguin rénal de 24% (258). La CsA induit une vasoconstriction de l'artériole afférente glomérulaire (259), résultant en une diminution du débit sanguin rénal (260,261) et du débit de filtration glomérulaire en administration chronique (257,262). Cette action hémodynamique de la CsA est en effet

induite par la vasoconstriction des artérioles afférentes et efférentes, elle-même secondaire à l'augmentation de facteurs vasoconstricteurs tels que l'endothéline ou le thromboxane et à la réduction de facteurs vasodilatateurs tels que la prostaglandine E2, la prostacycline et le NO (263,264). La CsA injectée à la dose de 100mg/kg /j entraîne une altération de l'épithélium tubulaire 3 jours après le début de l'administration avec persistance de lésions artériolaires 10 jours après l'injection (265). L'effet hémodynamique semble apparaître 10 min après une injection de CsA, dès la dose de 10 mg/kg pour revenir à son état de base 30 min après, avec une diminution beaucoup plus longue dans les doses plus élevées. Abraham *et al.* ont étudié l'hémodynamique intra-rénale en immergeant un rein dans un bain avec de la CsA, et ont pu observer une vasoconstriction et une diminution du débit sanguin pré-glomérulaire (259). Le véhicule (cremophor) a un très faible effet sur l'hémodynamique intra rénale.

Chez l'homme, Heine *et al.* ont montré que les index de résistance mesurés par doppler n'étaient pas modifiés après administration chronique de CsA (266). Covic *et al.* ont également montré que la pression artérielle n'était pas modifiée 2h après l'administration *per os* de CsA sans augmentation des résistances artériolaires au doppler ni modification de la rigidité artérielle (267). Il est intéressant de noter que les 2 études qui ont utilisé la CsA dans des essais cliniques n'ont pas montré de toxicité rénale, pour des doses de 2,5 mg/kg injectées à la reperfusion (268,269). Notons qu'il existe par ailleurs des molécules non immunosuppressives, en particulier le NIM-811 (N-Methyl-4-isoleucine cyclosporin) (270) et le Debio-025, dont les effets mitochondriaux sont comparables à la CsA (271).

4. Conditionnement par la CsA dans le coeur

L'effet cardioprotecteur de la CsA a été découvert pour la 1^{ère} fois sur des cardiomyocytes en culture (129). De très nombreuses études ont pu montrer dans les suites une diminution de la taille de l'infarctus après injection de CsA (104,272,273) mais également un effet positif chez l'homme (268). Il a également été montré que la CsA peut limiter les marqueurs de nécrose cardiaque mais également améliorer la pression du ventricule gauche (130). Cette protection indépendante de son action immunosuppressive a pu être montrée par l'équipe de Di Lisa (274).

La CsA peut être injectée avant l'ischémie mais également juste à la reperfusion avec des effets à chaque fois protecteurs (275). La CsA a même été utilisée dans un essai clinique dans la prise en charge de l'infarctus du myocarde, avec un succès en terme de limitation de nécrose myocardique, à la fois par la diminution des marqueurs de nécrose mais également par diminution de la taille de l'infarctus mesurée à l'IRM (268). De nombreuses études ont souligné le rôle de la CsA dans la prévention des lésions d'IR, qu'elle soit donnée avant l'ischémie ou à la reperfusion, dans différents modèles d'organes et sur des espèces animales diverses (130,276-278).

5. Conditionnement par la CsA dans le rein

La problématique de la vasoconstriction rénale explique le nombre très limité d'études sur la protection de la CsA dans l'IR rénale. *In vitro*, Feldkamp *et al.* ont montré une protection de la CsA sur le potentiel de membrane mitochondriale après hypoxie-réoxygénation, seulement en présence d'ADP et de magnésium (279). *In vivo*, Yang *et al.* ont montré que l'administration de la CsA injectée 6 heures avant l'ischémie permettait de protéger la fonction rénale (280). Une autre étude a montré une protection de la CsA par diminution de l'apoptose (281). Cependant la protection obtenue par la CsA *in vivo* dans le rein n'a jamais

été reliée à une inhibition du mPTP. Yang *et al.* ont montré que la CsA entraînait une surexpression de l'HSP70. Par ailleurs, Singh *et al.* ont utilisé un inhibiteur de l'HSP70 (Quercetin) injecté 2h avant la CsA et ont inhibé les effets de protection de la CsA, concluant à l'effet protecteur de l'HSP70 *via* son induction par la CsA (282).

6. Rôle de l'HSP70 dans la protection cellulaire

6.1 Définition

L'HSP 70 fait partie de la grande famille des Heat Shock Protein (HSP). Ces HSP appartiennent à une classe de protéines très conservées. Cette famille de protéines a été initialement découverte en 1962 par Ferruccio Ritossa en raison de leur inductibilité par la chaleur (283). L'HSP70 porte son nom en regard de son poids moléculaire. C'est une puissante protéine anti-apoptotique jouant un rôle fondamental dans le repliement correct des protéines synthétisées. Les Heat Shock Protéines sont également capables d'activer des voies de signalisation cellulaire en inhibant l'apoptose caspase dépendante. Il existe plusieurs HSP70 différentes en fonction des compartiments : HSP70 sous forme cytoplasmique constitutive, la forme inductible iHSP70 (celle sur laquelle nous agissons lorsqu'est injecté de la CsA), une forme mitochondriale mtHSP70, et une HSP70 localisée dans le réticulum endoplasmique appelée GRP78 (284).

6.2 HSP70 et ischémie-reperfusion

L'HSP70 a un rôle cytoprotecteur décrit à la fois *in vitro* que *in vivo* (285) (figure 17). L'HSP70 est connue pour réguler l'apoptose en diminuant certaines protéines pro-apoptotiques, notamment en augmentant le taux d'une protéine anti-apoptotique : la Bcl-2 (286). L'effet cytoprotecteur induit par l'HSP70 inductible est associé à une diminution de la production de ROS, et la préservation des complexes mitochondriaux, de l'état 3 de la respiration, du potentiel de membrane, et de la formation d'ATP pendant le stress. La

surexpression de l'HSP70 dans les cellules épithéliales intestinales prévient l'apoptose induite par l'hypoxie-réoxygénation

Dans le cœur, la surexpression de l'HSP70 chez des souris transgéniques diminue de 40% la taille de l'infarctus (288). Dans le rein, *in vitro*, l'HSP70 agirait également sur la cellule tubulaire en permettant le maintien de la polarité cellulaire, par le maintien de l'ancrage de la pompe Na/K⁺ATPase au cytosquelette (289). D'autre part, l'inhibition de l'HSP70 par un SiRNA dans une culture cellulaire diminue la protection de l'hypoxie-réoxygénation avec augmentation de production de ROS au niveau cellulaire. Par ailleurs, *in vivo*, le rat brown norway, qui exprime d'avantage d'HSP70, est naturellement plus résistant à l'IR rénale (290). Plusieurs études expérimentales ont pu montrer l'effet protecteur de l'HSP70 en préconditionnement dans le rein, études résumées dans le tableau 2 (287). De plus, l'importante mortalité des souris HSP70 KO^{-/-} (75% après 72h de reperfusion d'une ischémie de 25 min, 25% pour les souris ^{+/+} et aucune mortalité pour les souris wild type) met également en évidence le rôle de cette protéine dans la protection cellulaire.

Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer le rôle de l'HSP70 dans la protection cellulaire. L'HSP70 serait un médiateur dans l'activation de l'autophagie (291). Un autre mécanisme de protection de l'HSP70 déjà décrit serait un rôle d'inactivation de la GSK3 β (non phosphorylée). Wang *et al.* ont démontré que la protection de l'HSP70 contre l'IR était médiée par l'inhibition de Bax, une protéine pro-apoptotique (292) et par la préservation de Bcl-2 (protéine anti-apoptotique). Cette inhibition de Bax serait médiée par l'inactivation de Akt et par inhibition de GSK3 β active (c.à.d. diminution de la quantité de P sur la ser⁹ de la GSK3 β) (293). Les mêmes résultats ont été retrouvés *in vitro*. Par ailleurs, il a été démontré dans le cœur que la GSK3 β régule le mPTP par sa liaison à l'ANT, en diminuant la possibilité à la Cyp-D de se transloquer au mPTP. Certaines études ont montré

que P-GSK3 β permettrait de diminuer les lésions d'ischémie reperfusion avec une relation inverse entre taille de l'infarctus et l'expression de la P-GSK3 β (202).

Auteur	Année	Espèces	Stimulus	ref
Perdrizet	1993	Porc	Chaleur	(294)
Redaelli	2001	Rat	Chaleur	(295)
Yang	2001	Rat	Arsenite	(296)
Yang	2001	Rat	CsA	(280)
Redaelli	2002	Rat	Chaleur	(297)
Yang	2003	Rat	EPO	(298)
Suzuki	2005	Rat	GGA	(299)
Jo	2006	Rat	Chaleur	(300)
Fuller	2007	Rat	Glutamine	(301)
Harrison	2008	Souris	HBA	(302)
Zhang	2009	Rat	Glutamine	(293)
Yeh	2010	Rat	PréCI	(303)
Wang	2011	Souris	GGA	(292)

Tableau 2: Liste des publications traitant de l'IR et l'HSP70. Modèle de protection dans

l'ischémie reperfusion par surexpression de l'HSP70. EPO : érythropoétine, GGA :

Geranylgeranylacetone HBA : inhibiteur de l'HSP90, PréCI préconditionnement ischémique.

5.3 Association HSP70/HIF-1 α

L'hypoxia inductible factor 1 (HIF-1 α) est un facteur de transcription hétérodimère qui permet de synthétiser les protéines nécessaires à un tissu dépourvu d'oxygène. HIF-1 α s'accumule rapidement pendant l'hypoxie mais est rapidement dégradé dès la réoxygénation. En cas d'hypoxie, HIF-1 α se dimérise avec HIF-1 β et se transloque au noyau entraînant la transcription de nombreux gènes. Ces gènes incluent notamment HSP70, Bcl2, l'EPO et le VEGF (304). L'HSP70 est nécessaire à la stabilisation de HIF-1 α et ainsi évite sa dégradation. Une fois synthétisé, HIF-1 α régule négativement l'expression du complexe pro-apoptotique Bax/Bid (305) permettant une diminution de la mort cellulaire, soit par apoptose (voie caspase dépendante), soit par l'autophagie (voie Beclin-1/LC3). De plus, Yeh *et al.* ont montré dans le rein qu'un PréCI augmentait l'expression rénale d'HSP70, protégeant ainsi la cellule des lésions de l'IR, par une diminution de l'apoptose et de l'autophagie selon une voie HIF-1 α dépendante (303). L'hypoxie dans le préCI activerait donc HIF-1 α , qui à son tour induirait la transcription d'HSP70 par la voie de signalisation PI3K/Akt. Cette voie de signalisation est en effet nécessaire à la stabilisation de HIF-1 α par surexpression de l'HSP70 (306). La surexpression de HSP70 permettrait donc ensuite une diminution de la dégradation de HIF-1 α .

Partie II

Hypothèses et objectifs de travail.

Le rôle de la CsA dans la cardioprotection est aujourd'hui bien établi. De plus, les mécanismes qu'elle fait intervenir à cet effet ont été largement étudiés. Cependant, son utilisation au niveau rénal reste controversée. En effet, la CsA induit une vasoconstriction et une néphrotoxicité chronique. Très peu d'études montrent un effet bénéfique de la CsA au décours d'une ischémie-reperfusion rénale. Dans ces études, la CsA est utilisée 6h avant l'ischémie, à de faibles doses (3 mg/kg) (307). Par ailleurs, les effets de la CsA en pré et post-conditionnement sur la respiration mitochondriale et le mPTP n'ont été que très peu étudiés lors de situations d'ischémie-reperfusion rénale. Enfin, les rares études ayant montré un rôle de l'HSP70 *via* le pré-conditionnement à la CsA dans la néphroprotection, ne prennent pas en compte le phénomène de transition de perméabilité.

L'hypothèse de ce travail est que la CsA, utilisée en préCI immédiat ou postCI, protège la fonction rénale lors d'une IR.

Devant cette problématique, les objectifs de notre travail expérimental étaient de:

- 1) Développer un modèle murin d'ischémie-reperfusion rénale.
- 2) Tester des modalités d'injection de la CsA différents par rapport aux études antérieurement publiées sur la protection rénale.
- 3) Confirmer le rôle de l'inhibition du mPTP dans la néphroprotection par un conditionnement à la CsA.
- 4) Tester le rôle de la CsA sur l'HSP70 en lien avec la fonction mitochondriale dans l'ischémie –reperfusion rénale.

Partie III

Matériels et méthodes

I - Le modèle animal

A. Ethiques

Les expérimentations animales ont été réalisées en conformité avec les textes réglementaires français (décret n°2001-464 du 29 mai 2001, et décret n°2001-486 du 06 juin 2001) et les recommandations de l'INSERM (septembre 2002) relatifs à l'expérimentation animale et la protection des animaux de laboratoire. L'ensemble des procédures de ce travail a été approuvé par le comité d'éthique de l'Université Claude Bernard Lyon Est (BH2012-81).

B. Protocole chirurgical

Les souris C57BL6 utilisées sont âgées d'environ 10 à 12 semaines, et pèsent autour de $22,6 \pm 1,6$ g. Elles sont anesthésiées par une injection intra péritonéale de xylazine (5 mg/kg, Rompun, Bayer, Puteaux, France) et de Kétamine (100 mg/kg, imalgene 1000, Acyon, Melan, France). Afin d'éviter la douleur, de la bupremorphine (0.075 mg/kg, vetergesic, Sogeval, Laval, France) est également injectée avant l'anesthésie en intra péritonéale. Les souris sont ensuite intubées par un cathéter de 22 gauge et ventilées mécaniquement par un respirateur adapté (Minivent, Harvard Apparatus®, March, Germany) avec un volume de 150 μ L, et une fréquence de 140/min. La température corporelle des animaux est monitorée *via* un thermomètre rectal et maintenue à 37-38°C à l'aide d'une couverture chauffante. La veine jugulaire externe est disséquée pour les injections nécessaires lors du conditionnement pharmacologique. Ensuite toutes les souris ont une laparotomie avec une néphrectomie droite.

Excepté les sham, les souris ont un clampage de l'artère gauche de 30 min avec un micro clamp (Roboz Surgical Instruments, Washington, DC). L'ischémie peut être visuellement contrôlée. De même après déclampage, la reperfusion peut être contrôlée visuellement. Les souris sont enfin toutes hydratées par 1 mL intra péritonéal NaCl 0,9%. Elles sont ensuite sacrifiées à 20 min ou 24h de reperfusion. Un prélèvement sanguin périorbitaire est réalisé juste avant le sacrifice. A la fin de la reperfusion, les souris sont endormies par le même protocole avant d'être sacrifiées. Le rein gauche est ensuite prélevé, utilisé pour l'histologie, pour l'analyse de mitochondries fraîches ou pour congélation à -80°C et analyses ultérieures. La pression artérielle non invasive a été mesurée chez quelques souris (CODA, Kent scientific, USA)

C. Protocoles expérimentaux

1. Le post-conditionnement

Quatre groupes ont été réalisés, un groupe sham, un groupe ischémique, un groupe post-conditionnement avec la CsA et un groupe post-conditionnement ischémique. Chaque groupe a été sacrifié à 20 min ou à 24h. Soit un total de 8 groupes.

Un groupe Sham : Néphrectomie unilatérale seulement, n=4.

Un groupe ischémique : Néphrectomie unilatérale et clampage de 30 min controlatérale et injection de NaCl 0,9% 10 min avant l'ischémie, n=6.

Un groupe post-conditionnement ischémique (PostCI): Néphrectomie unilatérale et clampage de 30 min controlatérale avec 3 clampages-déclampages successifs de 30 secondes, à partir de 30 secondes selon la reperfusion d'après la méthode décrit par Szwarc *et al.* (308), n=6.

Un groupe post-conditionnement CsA 3 mg/kg (PostCond-CsA): Néphrectomie unilatérale, clampage de 30 min controlatérale et injection de 3 mg/kg de CsA 5 min avant la fin de l'ischémie, n=6.

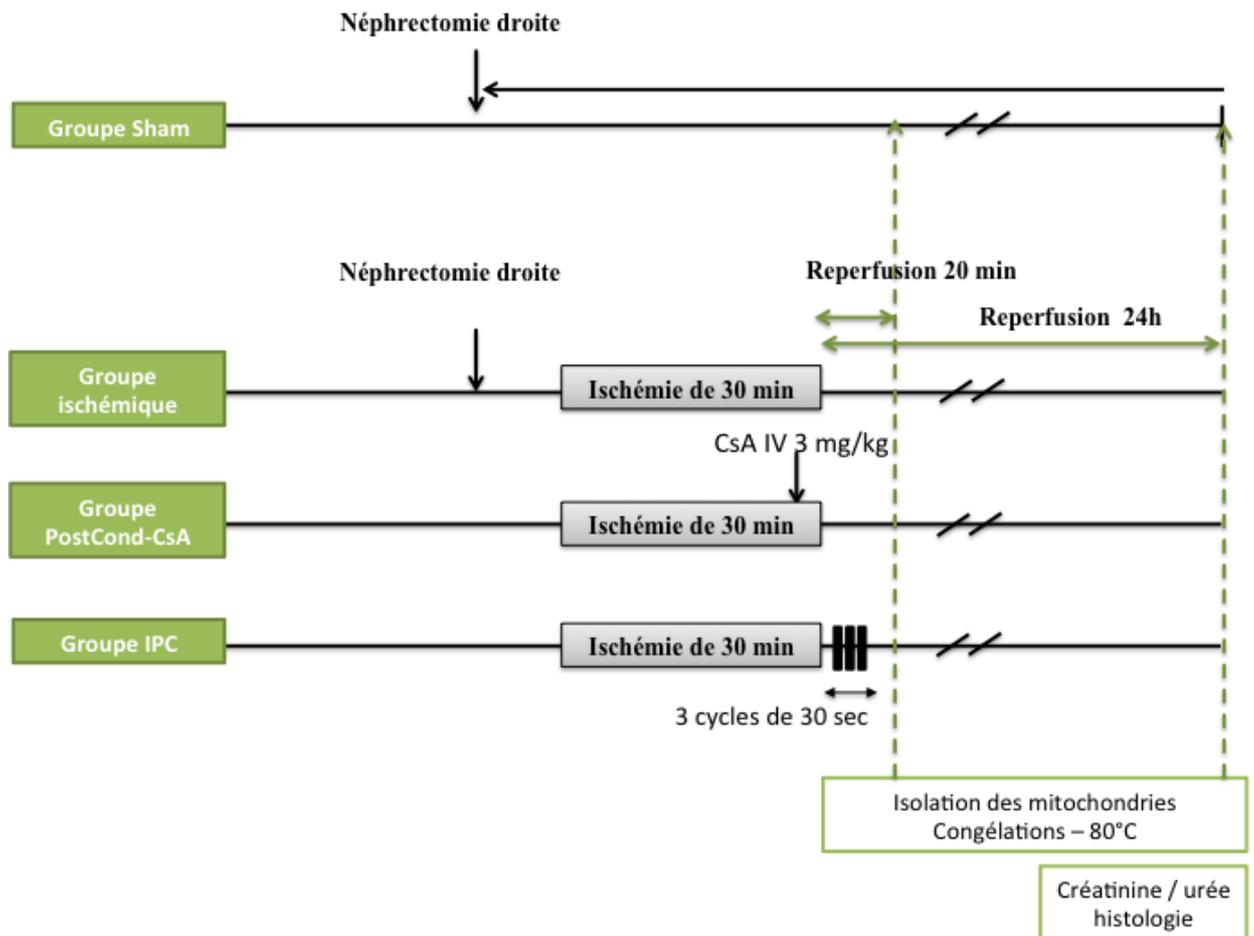


Figure 18: Protocole expérimental réalisé pour l'étude du postconditionnement.

2. Le pré-conditionnement

Sept groupes ont été réalisés : sham, sham avec injection de 3 mg/kg de CsA, sham avec injection de 10 mg/kg de CsA, un groupe ischémique, un groupe avec un préconditionnement à la CsA à 3 mg/kg et un autre groupe avec CsA à 10 mg/kg. Chaque groupe a été analysé à 20 min de reperfusion ou à 24h de reperfusion, soit un total de 12 groupes.

Un groupe Sham: Néphrectomie unilatérale, n=4

Un groupe Sham-CsA 3: Souris C57BL 6 avec néphrectomie unilatérale et injection de 3 mg/kg de CsA, n=4.

Un groupe Sham-CsA 10: Souris C57BL 6 avec néphrectomie unilatérale et injection de 10 mg/kg de CsA, n=4.

Un groupe ischémique: Néphrectomie unilatérale, clampage de 30 min controlatérale et injection de NaCl 0,9% 10 min avant l'ischémie, n=8.

Un groupe pré-conditionnement CsA 3 mg/kg: Néphrectomie unilatérale, clampage de 30 min controlatérale et injection de 3 mg/kg de CsA 10 min avant l'ischémie, n=8.

Un groupe pré-conditionnement CsA 10 mg/kg: Néphrectomie unilatérale, clampage de 30 min controlatérale et injection de 10 mg/kg de CsA 10 min avant l'ischémie, n=6.

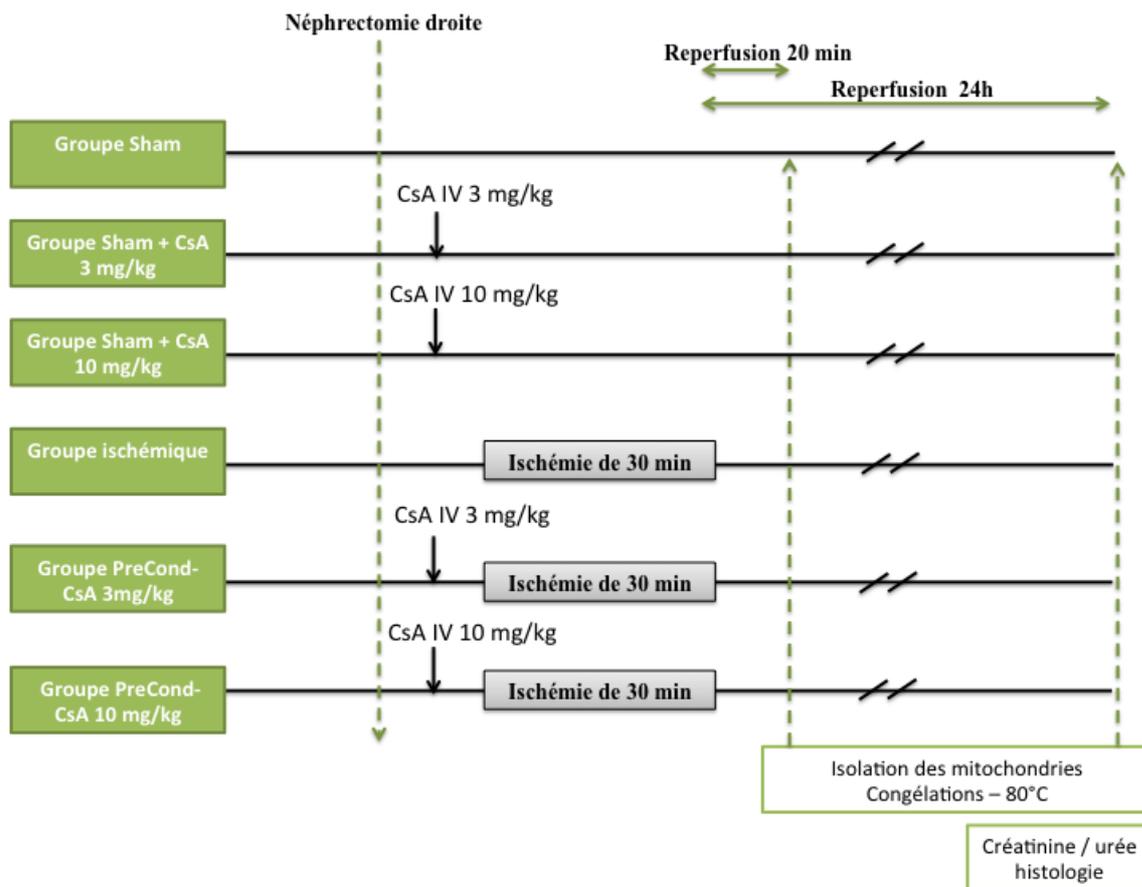


Figure 19: Protocole expérimental réalisé pour l'étude du PréConditionnement par la CsA

3. Le rôle de l'HSP70

Afin de comprendre le rôle de l'HSP70 dans l'ischémie-reperfusion rénale, un inhibiteur de l'HSP70, la quercétin, a été injecté 2 heures avant l'injection de CsA. Nous avons réalisé 3 groupes repris à 20 min et 24h, soit 6 groupes au total. La quercétin (sigma Aldrich, saint Louis, USA) est diluée dans du SSI à pH neutre et est injectée en intra-péritonéale 2h avant l'injection de CsA à la concentration de 100 mg/kg selon les doses déjà décrites dans la littérature (309).

Une groupe Sham-Quercetin : Néphrectomie unilatérale et injection de Quercetin, 100 mg/kg, n=4.

Un groupe pré-conditionnement CsA 10 mg/kg + Quercetin : Néphrectomie unilatérale, clampage de 30 min controlatérale et injection de CsA à 10 mg/kg 10 min avant l'ischémie, n=6. Une injection de Quercetin est réalisée 2 h avant l'ischémie, en intra péritonéale, à la dose de 100 mg/kg.

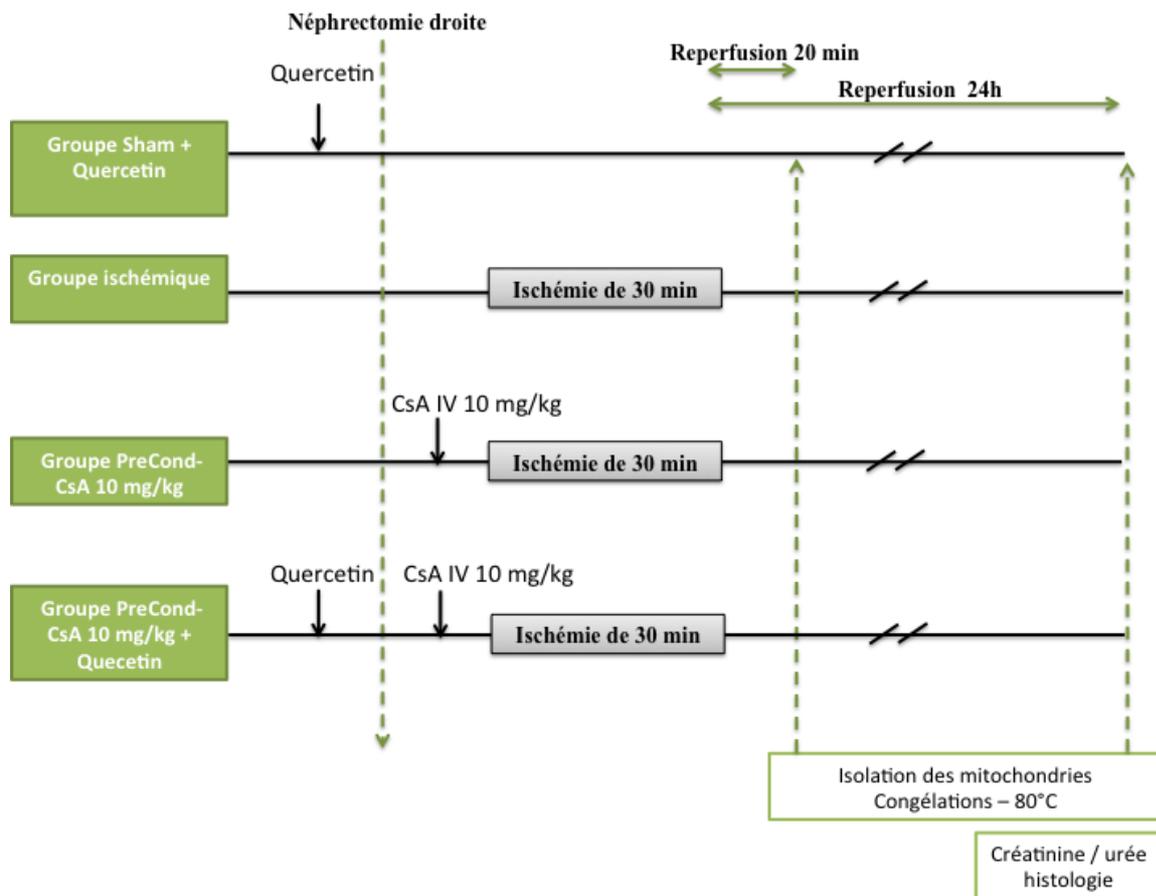


Figure 20: Protocole expérimental réalisé pour l'étude du rôle de l'HSP70 dans le préconditionnement par la CsA.

4. Les souris Cyp-D KO

Les souris déficientes en Cyp-D (*Ppiff^{-/-}*) ont un fond génétique mixte: C57BL6/SV209. Nous avons réalisé dans un premier temps un phénotypage de ces souris par l'utilisation de cage métabolique, afin de recueillir les urines.

Nous avons également réalisé le même protocole chirurgical, à savoir un groupe sham et un groupe ischémique, que nous avons comparé aux souris WT, avec un sacrifice à 20 min ou à 24h, soit un total de 4 groupes.

II – Analyse de la fonction rénale

A. Biologie

La fonction rénale est analysée par dosage enzymatique de la créatinine et de l'urée, généreusement dosée par le laboratoire de biochimie de l'hôpital Edouard Herriot.

Le sang prélevé est immédiatement centrifugé à 8000 tours/min pendant 10 min, puis le plasma est prélevé et analysé. La créatinine est mesurée par une méthode enzymatique (Vista 1500, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) et l'urée par un test à l'uréase (Vista 1500, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany).

B. Histologie

Nous avons également réalisé des coupes d'histologie. Les reins prélevés sont immédiatement fixés dans du formol. Une fois paraffinées, des coupes de 4 μm sont réalisées puis colorées à l'HES. L'analyse histologique réalisée en aveugle par une anatomopathologiste (le Dr Maud Rabeyrin) et moi même suivant un score souvent utilisé à savoir une cotation de 0 à 4. Score 0 : Rein normal , score 1 : 20 % de nécrose tubulaire aiguë, score 2 : 20 à 50% , score 3 : 50-75 % , score 4 : > 75 %.

III – Analyses des fonctions mitochondriales

A. L'extraction mitochondriale

Le rein gauche est prélevé lors du sacrifice, immédiatement rincé et conservé dans une solution tampon contenant du Saccharose 250 mM, de l'EGTA 1 mM, du Tris/HCl 7 mM, pH 7,30 à 4°C). Toutes les manipulations sont réalisées à 4°C. Un broyage mécanique standardisé est pratiqué à l'aide d'un broyeur verre-verre. Les mitochondries sont ensuite isolées par centrifugation différentielle. La première centrifugation est réalisée à 600 x g pendant 7 min. Le surnageant post-nucléaire est ensuite centrifugé à 6400 x g pendant 10 min. Le culot de mitochondries est rincé et suspendu dans le même tampon d'isolation dépourvu d'EGTA. La suspension mitochondriale est homogénéisée à l'aide d'un mini-potter, avant de réaliser un dosage de protéines par la technique de Bradford avec du sérum albumine bovine comme standard (310).

B. La capacité de rétention calcique mitochondriale

La technique utilisée, adaptée de la méthode initialement décrite par Ichas *et al.*(311), consiste à mesurer *in vitro* l'ouverture du mPTP sous la forme d'une libération massive de Ca^{2+} dans le milieu extra-mitochondrial, à la suite d'une surcharge calcique progressive et standardisée d'une préparation de mitochondries isolées. Brièvement, 250 g de protéines mitochondriales sont mises en suspension dans une cuve en téflon thermostatée (25°C) dans 2 ml d'un tampon (saccharose 150 mM, KCl 50 mM et KH_2PO_4 2 mM), ainsi qu'un substrat énergétique capable de pénétrer dans les mitochondries intactes (substrat du complexe II : succinate à 10 mM ; pH 7,4). Après une période de stabilisation de 3 min, le contenu en Ca^{2+} extra-mitochondrial est mesuré à l'aide de la sonde fluorescente Calcium Green-5N (Molecular ProbesTM, Eugene, USA) 0,5 μM , par méthode fluorimétrique (spectrofluorimètre Hitachi F2500, longueur d'onde d'émission : 500 nm, réception : 530 nm). Des injections de 10 nmoles de CaCl_2 sont réalisées toutes les 60 sec, entraînant une augmentation de la quantité de Ca^{2+} dans le milieu extra-mitochondrial, et donc de la fluorescence. Cette dernière retourne progressivement à un niveau basal suite à la recapture mitochondriale du Ca^{2+} . Après une certaine surcharge calcique, une augmentation brutale du Ca^{2+} extra-mitochondrial est enregistrée, correspondant à une libération massive de Ca^{2+} par la mitochondrie, interprétée comme l'ouverture du mPTP (Figure 22). La capacité de rétention calcique (CRC), exprimée en nmol CaCl_2/mg de protéines mitochondriales est définie comme la quantité de calcium administrée nécessaire pour obtenir l'ouverture du mPTP.

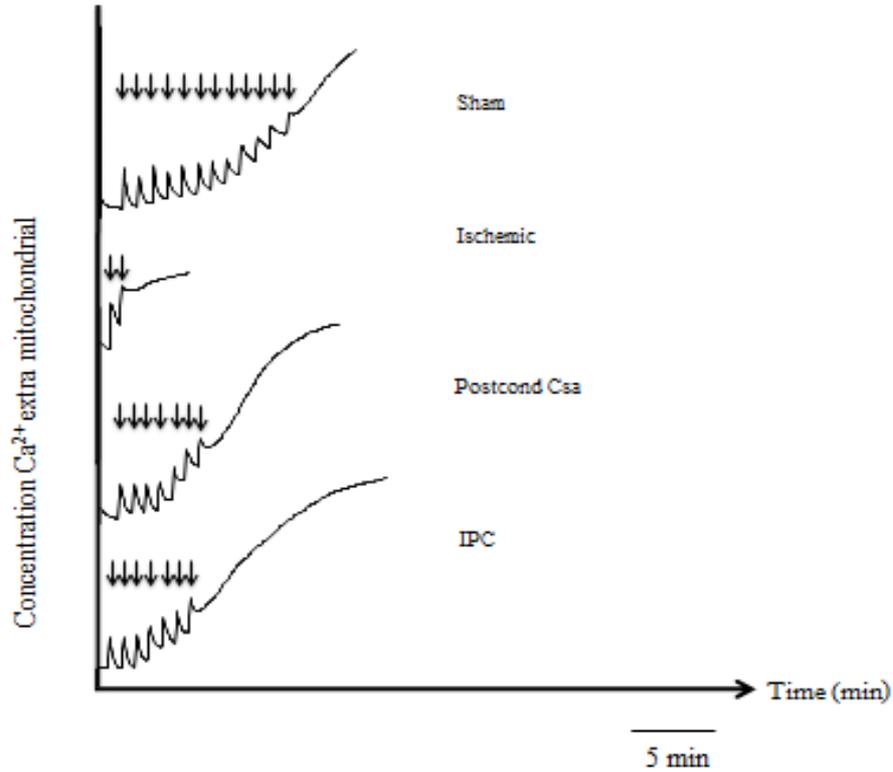


Figure 21: Exemple de mesure de Capacité de Rétention Mitochondriale.

Une augmentation de la fluorescence reflétant l'augmentation de la concentration extra-mitochondriale de Ca^{2+} est enregistrée après chaque administration de 10 nmoles de CaCl_2 . Le Ca^{2+} est immédiatement capté par les mitochondries avec une diminution rapide de la fluorescence. Après une surcharge calcique suffisante, on assiste à une libération massive de calcium interprétée comme l'ouverture du pore de transition de perméabilité (mPTP).

C. Phosphorylation oxydative

La mesure de la consommation d'oxygène par les mitochondries fraîchement isolées est réalisée, à l'aide d'un oxygraphe muni d'une électrode de Clark (OroborosTM, Oxygraph, Autriche). L'enregistrement de la respiration mitochondriale (à partir de 250 g de protéines) est réalisé à 25°C, dans 2 ml de tampon contenant du KCl 100 mM, Mops 50 mM, EGTA 1 mM, KH₂PO₄ 5 mM et sérumalbumine bovine 1 mg/ml en présence de substrats énergétiques (glutamate 5 mM et malate 5 mM ou succinate 10 mM avec inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire : roténone 1µM). L'Etat 3 de la respiration mitochondriale est enregistré de façon classique en présence d'ADP (adénosine diphosphate) 200 mM. Après consommation totale de l'ADP, le retour à une consommation faible d'oxygène caractérise l'Etat 4 (Figure 23). Le *Respiratory Control Index* (RCI), indice de couplage des phosphorylations oxydatives, est défini comme le rapport des consommations d'oxygène Etat 3/Etat 4. De façon arbitraire, un RCI minimum de 4 (substrats du complexe I) est exigé pour les mitochondries issues d'animaux sham afin de poursuivre les manipulations sur mitochondries isolées. La consommation d'oxygène mitochondriale est exprimée en nano-atome-gramme d'oxygène/min/mg de protéines mitochondriales.

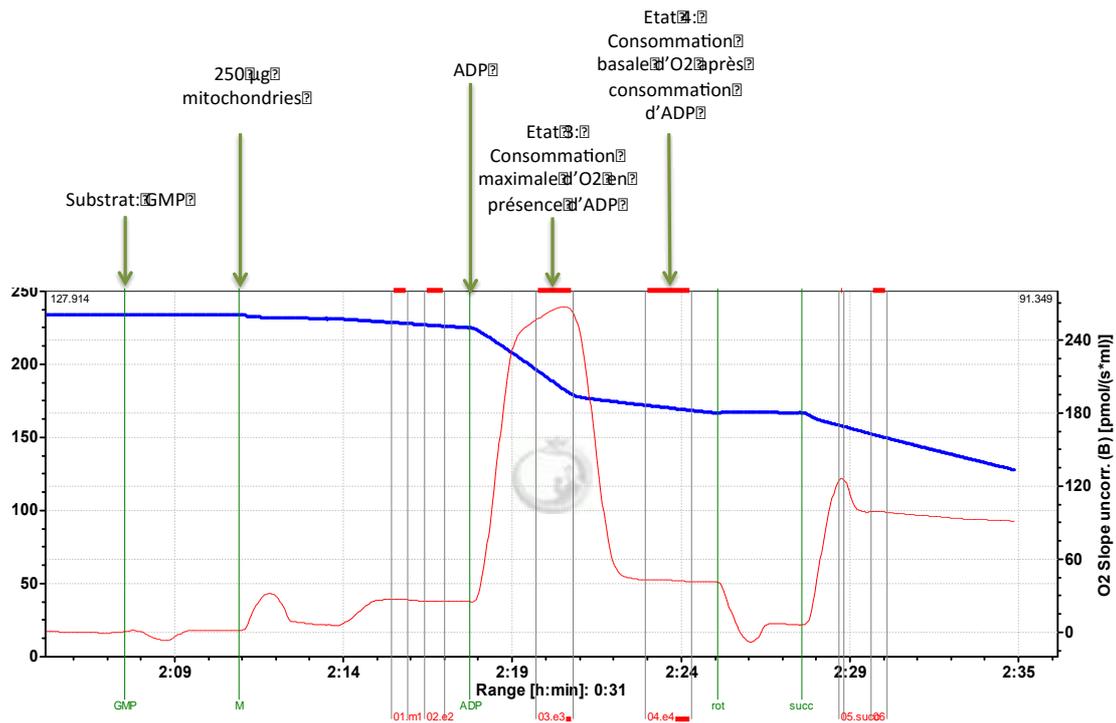


Figure 22: Exemple de l'enregistrement de la respiration mitochondriale du complexe I. L'état 3 correspond à la consommation maximale d'O₂ par la mitochondrie en présence d'ADP, l'état 4 à la consommation basale d'O₂. Le couplage mitochondrial est estimé par le ratio état3/état4.

IV – Analyse des protéines

A. Extraction des protéines

Après congélation à -80°C, les échantillons des reins prélevés sont broyés au precelys (5000rpm- 5x20''-5'') dans un tampon de *single lysis buffer* (SLB) dont la composition est :

1% NP40, 20mM Tris-HCl, 138 mM NaCl, 2,7 mM MgCl₂ et 5% glycérol, pH 8 auquel on ajoute de l'EDTA, Na₃VO₄, NaF, DTT et antiprotéase. La méthode de dosage est basée sur le pouvoir réducteur des protéines en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique (BCA) peut ensuite former des complexes avec les ions Cu²⁺ ainsi réduits (Interchim, BC Assay Protein Quantification Kit). La densité optique est ensuite lue à 562 nm. Pour certains échantillons, nous avons séparé le cytosol du noyau grâce à un kit d'extraction nucléaire et des centrifugations différentielles.

B. Western Blot

Les extraits protéiques totaux sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Pour chaque échantillon, entre 25 à 100 µg de protéines sont chargés dans les puits. Les échantillons sont déposés dans un gel d'acrylamide de 8 à 18 % suivant le poids moléculaire et environ 2 heures de migration (Composition du tampon de migration : 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3) à température ambiante sous une tension de 110V. Puis les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidène difluoride) à l'aide d'un transfert semi-sec sous une tension de 25V pendant 10 minutes (Trans-Blot®, Turbo™, Biorad). La membrane est ensuite saturée pendant une heure à température ambiante dans le tampon TBST (Tris Buffered Saline-Tween) (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) contenant 5% de lait (Biorad) puis incubée pendant une nuit à 4°C sous agitation dans une solution de TBST contenant 1% de lait et l'anticorps primaire à la concentration optimale d'utilisation. Le lendemain trois lavages au TBST de 10 minutes sont réalisés, puis la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire spécifique couplé à la HRP (Horseradish Peroxidase) à la concentration optimale d'utilisation. Après trois lavages de 10 minutes au TBST, les

protéines sont révélées par chimioluminescence à l'aide du kit ECL plus (GE Healthcare®) et d'une caméra à détection chimioluminescente (ChemiDocTMXRS-System, Biorad). Après révélation, les anticorps peuvent être découplés de la membrane par incubation pendant 20 minutes dans une solution de Re-Blot Strong plus (Millipore®) suivi de 5 lavages de 5 minutes dans le TBST. Ainsi, la membrane peut ainsi être de nouveau saturée puis réhybridée avec un autre anticorps selon le protocole décrit. La quantité de protéines a été analysée à l'aide du logiciel ImageLab® (Biorad) en évaluant le nombre de pixel.

V. Statistiques

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm SEM (standard error of the mean). Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Prism®. Une ANOVA à une voie suivie d'un test post hoc Bonferroni a été utilisée pour analyser les différences entre les groupes. Un test Mann and Withney a été réalisé pour la comparaison des deux groupes. Un $p < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

Partie IV

Résultats et discussion

I. Le modèle animal

A. le modèle chirurgical

Dans un premier temps, nous avons du mettre au point le modèle d'ischémie-reperfusion. Nous avons choisi le modèle murin afin de pouvoir ensuite travailler avec des souris transgéniques. Actuellement l'ischémie reperfusion est le plus souvent induite par une ischémie chaude par clampage du pédicule rénale pour une durée d'ischémie définie. Il nous a donc été nécessaire de déterminer quel abord vasculaire, quel type de clampage et quelle durée d'ischémie étaient optimales dans les conditions de notre laboratoire. Il a donc fallu déterminer le temps d'ischémie optimal et le modèle chirurgical : un clampage bilatéral des pédicules rénaux ou une néphrectomie unilatérale et un clampage controlatéral. (Figure 24)

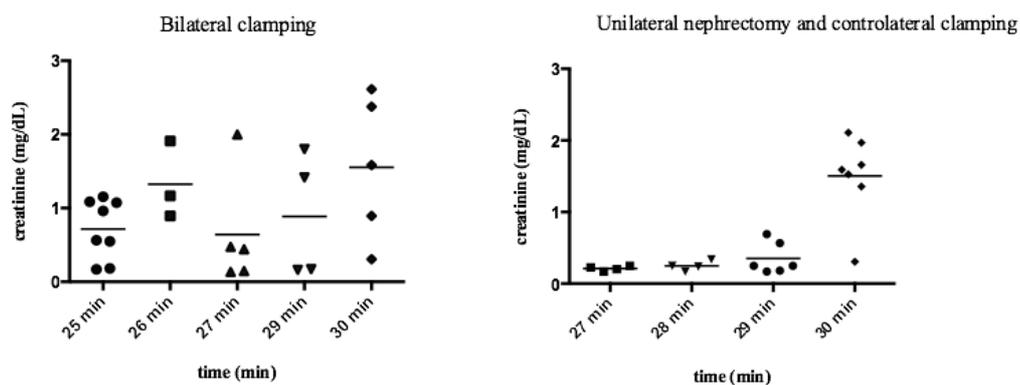


Figure 23: validation du modèle animal d'ischémie-reperfusion chez la souris.

Devant la faible reproductibilité du clampage bilatéral, nous avons opté pour une chirurgie avec une néphrectomie unilatérale et un clampage controlatéral (Figure 21).

Nous avons choisi une ischémie de 30 min. Cette ischémie est une ischémie importante, avec une élévation significative de la créatinine et des lésions de nécrose tubulaire aigüe sévère. Il a été montré que les lésions de NTA sont proportionnelles à la durée d'ischémie chaude (312) et qu'au delà d'une ischémie de 30 min, il existe des lésions irréversibles sur la fonction rénale. Ces 30 min d'ischémie semblent être le temps limite acceptable pour éviter des lésions rénales irréversibles (313,314).

L'ischémie-reperfusion a été réalisée sur de nombreuses espèces animales dans la littérature, et dans le post-conditionnement ischémique principalement chez le rat. De manière générale, plus l'animal est gros, plus le temps d'ischémie doit être long. Dans le cas du post-conditionnement ischémique, sur les 13 études recensées depuis 2007, 10 études ont été réalisées chez le rat, une étude chez la souris et deux chez le chien. Par ailleurs, les durées d'ischémie étaient également très variables, nécessitant une validation du modèle au sein de notre laboratoire. L'ischémie varie de 30 min à 90 min selon l'animal, et entre 20 et 30 min chez la souris. Par ailleurs, la néphrectomie gauche et le clampage bilatéral ont été utilisés dans 10 études sur 12. Cependant dans le reste de la littérature sur l'ischémie reperfusion, décrit par Wei *et al*, le clampage bilatéral est également régulièrement utilisé (315).

Nous avons donc opté pour une néphrectomie avec clampage controlatéral du fait de la faible reproductibilité retrouvée du clampage bilatéral. Par ailleurs, nous avons également testé le temps d'ischémie suffisante pour obtenir une forte nécrose tubulaire aigüe. Alors qu'à 25 min, la fonction rénale en terme d'élévation de la créatinine n'était pas modifiée, on observe une élévation exponentielle de la créatinine à chaque minute d'ischémie après 27 min de clampage. Au delà de 30 min, la mortalité des souris étaient de 100%. La mortalité pour une ischémie de 30 min est d'environ 50 %, témoignant également de la sévérité de

l'ischémie. Chaque souris était sacrifiée à 24h. L'ischémie réalisée dans ces travaux est donc une ischémie très importante comme en témoigne la forte mortalité, ainsi que les lésions histologiques de nécrose tubulaire aigüe, d'environ 50 à 75% au niveau du parenchyme rénal. Un autre inconvénient de ce modèle est l'absence d'ischémie froide, que l'on retrouve dans la transplantation. Malheureusement, l'auto transplantation chez le petit animal est techniquement difficile du fait de leur petite taille. L'examen histologique montre une relation étroite entre le temps d'ischémie et la sévérité des dommages. Deux scores sont utilisés dans la littérature pour la description des lésions histologiques de l'ischémie reperfusion: Jabonski (316) et Goujon (317). Nous avons préférentiellement choisi celui de Jablonski simplifié.

B. La Méthode du TTC

La méthode du TTC (chlorure de triphényltétrazolium) est utilisée dans l'infarctus du myocarde pour quantifier la taille de l'infarctus. Pour résumer, lors de la reprise chirurgicale à 24h de reperfusion, une solution de colorant de bleu unipperse (Ciba-Geigy, Hawthorne, NY) à 10% est injectée au niveau de la veine cave. Le rein est ensuite prélevé, coupé en tranche, et incubé pendant 20 min à 37°C dans une solution de chlorure de triphényltétrazolium (TTC) à 1%. La zone viable apparaît en rouge, la zone nécrosée en jaune. Nous avons testé cette technique pour quantifier les zones nécrotiques. Cependant cette technique n'a pas pu être utilisable puisque le clampage est complet et donc la nécrose tubulaire aigüe dispersée sur l'ensemble du parenchyme. (Figure 24)

A



B



Figure 24: Exemple de la Méthode du TTC appliquée au rein. A. TTC pour un rein normal. B. TTC pour un rein ischémique, avec des plages très étendues de nécrose, sans réelle zone distincte à déterminer.

C. Impact de l'anesthésie et de la néphrectomie sur le mPTP

La capacité de rétention calcique (CRC) est significativement diminuée à 20 min par rapport à la CRC mesurée à 24h, $p=0,009$. Ceci peut-être expliqué par l'impact de l'anesthésie mais également par l'impact de la néphrectomie. Nous avons donc mesuré et comparé la CRC à 20 min et 24h de reperfusion, sur des sham avec et sans néphrectomie. Il n'y a pas de différence entre la CRC des sham avec et sans néphrectomie à 20 min de reperfusion. Cependant à 24h de reperfusion, il existe une différence significative dans la CRC entre les sham avec et sans néphrectomie, $p=0,008$. (Figure 25).

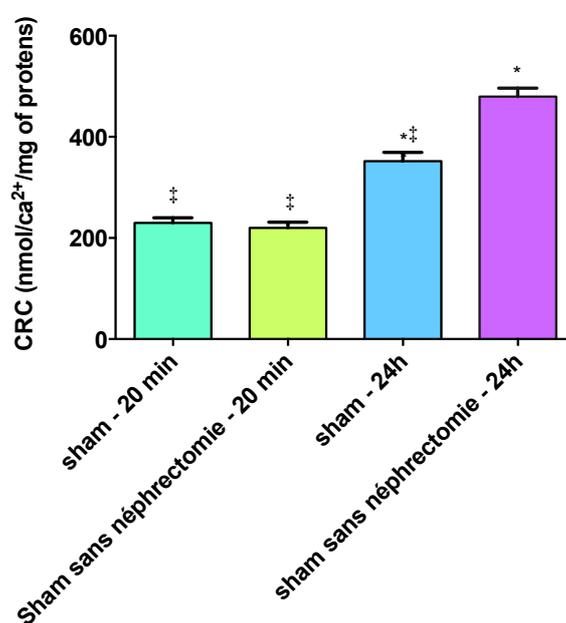


Figure 25: Impact de la néphrectomie et de l'anesthésie sur la CRC.

* vs sham – 20 min et vs sham sans néphrectomie- 24h.

‡ vs sham sans néphrectomie-24h

D. Effets de l'injection de CsA sur la pression artérielle

Nous avons mesuré la pression artérielle de 6 souris après injection de CsA puis chirurgie. Il existe une différence significative entre le pic après injection de CsA et la PAM de base. Cependant, cette différence de pression artérielle n'est pas comparable à la poussée hypertensive des souris après laparotomie. L'ajout de NaCl ne modifie pas quand à lui la pression artérielle. (Figure 27)

	PAM de base	PAM Pic après l'injection de CsA
Souris 1	135	149
Souris 2	128	142
Souris 3	102	117
Souris 4	72	96
Souris 5	97	101
Souris 6	85	108
Moyenne	103	119 *

Tableau 3 : Effets hémodynamiques de l'injection de CsA sur la pression artérielle.

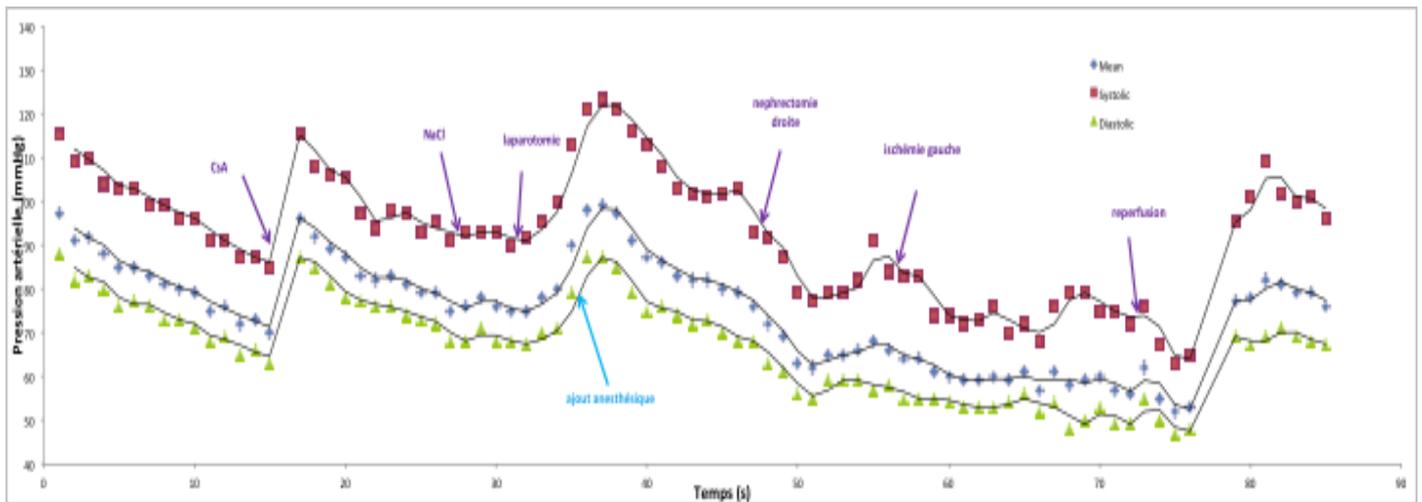


Figure 26: Mesures de pressions artérielles après injection de CsA. Il existe une augmentation significative de la pression artérielle après injection de CsA. Dans la suite de la laparotomie, on observe également une augmentation de la pression artérielle, nécessitant une adjonction de buprémorphine.

E. Caractérisation des souris Cyp-D KO

Nous avons réalisé des mesures de paramètres urinaires chez les souris CypD *Ppif*^{-/-} par leur surveillance au sein de cage métabolique durant une semaine, en les comparant aux souris C57BL6. (Tableau 4)

	C57BL6	CypD ^{-/-}
Poids (g)	28 ± 2,3	26,5 ± 0,9
Diurèse (mL/j)	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Créatininurie (mmol/L)	6 ± 1,4	4,8 ± 0,7 *
Créatininurie (mmol/g)	0,21 ± 0,6	0,18 ± 0,17
Urée urinaire (mmol/L)	1733 ± 470	1433 ± 246 *
Albuminurie/créatininurie (mg/mmol)	1,4 ± 0,5	1,1 ± 0,3
Glycosurie (mmol/L)	5,5 ± 1,9	4,6 ± 2,6
Créatinine (µmol/L)	< 12	13

Tableau 4 : Caractéristiques biologiques des souris cypD^{-/-}.

* vs C57BL6

II. Etude n°1

A. Article n°1

Postconditioning with cyclosporine reduces early renal dysfunction by inhibiting mitochondrial permeability transition.

Sandrine Lemoine^{1,2}, Bruno Pillot¹, Nicolas Rognant¹, Lionel Augeul¹, Maud Rayberin⁵,
Annie Varennes⁴, Maurice Laville^{1,6}, Michel Ovize^{1,3}, Laurent Juillard^{1,2}

Accepté dans Transplantation

En attente des proofs.

Postconditioning with cyclosporine reduces early renal dysfunction by inhibiting mitochondrial permeability transition.

Sandrine Lemoine^{1,2}, Bruno Pillot¹, Nicolas Rognant¹, Lionel Augeul¹, Maud Rayberin⁵, Annie Varennes⁴, Maurice Laville^{1,6}, Michel Ovize^{1,3}, Laurent Juillard^{1,2}

1. INSERM UMR-1060, Laboratoire CarMeN, Université Lyon 1, France

2. Nephrology department, Edouard Herriot Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

3. Service d'Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires, Hospices Civils de Lyon, Louis Pradel Hospital.

4. Biology department, Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France

5. Anatomopathology, Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France

6. Nephrology department, Hospices Civils de Lyon, CHLS, Pierre Bénite, France

Running title: cyclosporine and ischemia reperfusion

Key words:

renal ischemia reperfusion, Cyclosporine, postconditioning, mitochondrial pore of transition

Word count: Abstract: 243 text: 3060

Corresponding author: Dr Sandrine Lemoine

Address : Department of Nephrology, Edouard Herriot hospital, 5 place d'Arsonval, 69437,

Lyon Cedex 03

Phone +33 4 72 11 01 67

Fax =33 4 72 11 02 03

Email: sandrine.lemoine01@chu-lyon.fr

Author participation:

Sandrine Lemoine: participated in research design, writing of the paper, and performance of the research

Bruno Pillot: participated in animal experiments

Nicolas Rognant participated in research design

Lionel Augeul: participated in animal experiments

Maud Rayberin : participated in anatomopathology analysis

Annie Varennes: participated in creatinine and urea dosage.

Maurice Laville : participated in research design

Michel Ovize : participated in research design, correction of the paper

Laurent Juillard: participated in research design, correction of the paper

Abbreviations

CRC : Calcium Retention Capacity

CsA : Cyclosporine A

CypD : Cyclophilin D

EGTA :Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

GSK3b β :Glycogen Synthase Kinase 3 b β

IPC : Ischemic Post-Conditioning

IR: : Ischemia-Reperfusion

mPTP : mitochondrial Permeability Transition Pore

Postcond-CsA : CsA post-conditioning

VDAC : voltage dependent anion channel

ABSTRACT (250)

Background: Ischemia-reperfusion (IR) injury leads to mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening, which contributes to cell death. The aim of this study is to determine whether ischemic or pharmacological post conditioning with cyclosporine A (CsA) might protect the kidney from lethal reperfusion injury.

Methods: Male mice underwent a unilateral (right) nephrectomy followed by 30 minutes of contralateral (left) clamping of the renal artery. We studied four groups at 20 min and 24h of reperfusion: a sham group (n=4), an ischemic group (n=6), CsA-postconditioned group (Postcond-CsA, injection of 3 mg/kg of CsA five min before the end of ischemia, (n=6) and an ischemic postconditioning group (IPC), (n=6), consisting of 3 cycles of 30s of renal ischemia with 30s intervening reperfusion. After 24hrs of reperfusion, we measured plasma creatinine, urea and histological kidney injury. The kidney mitochondria were isolated to assess the mitochondria calcium retention capacity (CRC) and oxidative phosphorylation.

Results: At 24 hrs after reperfusion, serum creatinine decreased in PostcondCsA and IPC compared to ischemic group. The histological score was also significantly improved with postcond-Csa and IPC. At 20 min and 24h of reperfusion, CRC were decreased significantly in the ischemic group. The mitochondrial respiration stay decreased in the ischemic group at 24h of reperfusion whereas the respiration was improved significantly in the postcondCsA and IPC group. Bax and cleaved caspase 3 decreased in PostCsA and IPC group.

Conclusion: Our results suggest that ischemic postconditioning and CsA, administered immediately prior to reperfusion, protect the kidney from lethal injury.

INTRODUCTION

The ischemia-reperfusion (IR) is the main cause of early delayed recovery graft function in renal transplantation. The main treatment available to limit the fatal consequence of ischemia is to restore blood flow as quickly as possible. However, if the reperfusion is the only way to limit ischemic damages, it can also lead by itself to the cell death, especially via the permeability transition (1). Under normal physiological conditions, the mitochondrial inner membrane is impermeable to almost all metabolites and ions, but under stress conditions, the inner membrane of the mitochondria increases permeability. This permeability transition is caused by a very large pore, called mitochondrial permeability transition pore (mPTP) whose the molecular nature is currently not known. The IR combines several conditions that can trigger mPTP opening, including matrix Ca^{2+} overload, overproduction of reactive oxygen species, depletion of adenine nucleotides and accumulation of inorganic phosphates. The opening of the mPTP in the inner mitochondrial membrane leads to the collapse of the membrane potential, matrix swelling, uncoupling of the respiratory chain, efflux of proapoptotic factors, with the F1-FO ATPase hydrolyzing instead of building ATP. A known component of the mPTP is the cyclophilin D (CypD), a matrix-soluble protein that has a binding site for CsA. The mPTP opening is triggered by the binding of this CypD, to the inner membrane protein (2-4). The mPTP opening at the time of reperfusion allows the release by overloaded mitochondria of a large amount of calcium into the cytosol. Several reports demonstrated that mPTP opening plays a critical role in lethal reperfusion injury (1,5-8). In order to delay the opening of mPTP, some interventions have been proposed as ischemic or pharmacological conditioning, in particular CsA, that is an inhibitor of the mPTP via it's binding to CypD.

Van den Akker et al. reviewed all the studies that performed ischemic post conditioning (IPC)

in renal ischemia reperfusion and showed an improvement of renal function in almost all studies (9). Serviddio et al. suggested that the mPTP has a role in the renal protection of IPC without providing the data (10). In fact, only one study focused on the mPTP showing a higher membrane potential after IPC compared to the control group (11).

Currently, while cyclosporine is rather considered as a nephrotoxic agent, there is evidence that it might, when used as a single injection at the time of reperfusion, protect the kidneys from lethal reperfusion injury, as previously shown in other organs including the heart and the brain by the binding of CsA to the cypD (12-14).. However no study performed a postconditioning with CsA.

The aim of this study was, first to compare the efficiency of IPC and postcond-CsA, and second to examine whether CsA, administered immediately prior to reperfusion and IPC might protect the renal function through the inhibition of PTP opening.

RESULTS

Animal model

The mortality rate was 40 % in the ischemic group after 24hrs of reperfusion. The mortality was decreased in the postcond-CsA group and IPC group (8% and 20%, $p=0.05$ and $p=0.2$, respectively). All the lost animals died within a 24h period. The cause of the death was not identified. The mortality in the IPC group vs the postCsA group was probably greater in relation with the clamping of the renal artery, which is a difficult manoeuvre in mice. We didn't use bilateral clamping, because we had a poor reproducibility with important variations of creatinine for the duration of ischemia. (supplemental data).

Renal parameters (Figure 2 and 3)

The creatinine level was 1.78 ± 0.3 mg/dL in the ischemic group. The creatinine level was significantly decreased in the postcond-CsA and IPC groups when compared to the ischemic group (1.17 ± 0.2 and 0.9 ± 0.6 , $p=0.05$ respectively) (figure 2). The mean histological score was significantly improved in the postcond-CsA (1.7 ± 0.4 , $p=0.05$) and the IPC group (1.4 ± 0.2 , $p=0.05$) vs the ischemic group (3 ± 0.26) (Figure 3A).

Retention calcic capacity (CRC) (Figure 4)

The purity of the mitochondria pellet was evaluated at 96% with a flow cytometer (data not shown). The calcium retention capacity (CRC) represents the amount of Ca^{2+} required to trigger a massive Ca^{2+} release (expressed as nmol Ca^{2+} /mg mitochondrial proteins) by mitochondria into the cytosol, as described by Ichas et al (12). CRC is a functional test of the resistance of mPTP opening to a calcium overload. Each CaCl_2 injection causes a peak of extra-mitochondrial Ca^{2+} concentration; then Ca^{2+} is reabsorbed by the mitochondria, resulting in a return to near-baseline level of the extra-mitochondrial Ca^{2+} concentration (Fig. 4a). The abrupt increase of extra-mitochondrial Ca^{2+} concentration indicates a massive release of Ca^{2+} by mitochondria due to the opening of mPTP. We observed a premature reduced Ca^{2+} uptake in the ischemic group because of increase susceptibility of mPTP pore to Ca^{2+} overload in IR.

Twenty min after reperfusion, the CRC was 255 ± 60 nmol Ca^{2+} /mg proteins in the sham group. The CRC was reduced dramatically in the ischemic group when compared to the sham group (60 ± 23 nmol Ca^{2+} /mg proteins). The postcond-CsA and IPC group displayed significantly CRC vs the ischemic group 150 ± 60 nmol Ca^{2+} /mg proteins and 170 ± 50 nmol Ca^{2+} /mg proteins ($p=0.05$, respectively). The CRC was not increased with CsA in the cuvette in the ischemic group contrary to the postcond-CsA and IPC groups, $P<0.05$.

Twenty four hours after reperfusion, the CRC averaged 393 ± 30 nmolCa²⁺/mg proteins in sham group. The CRC was dramatically reduced in the ischemic group when compared to sham (86 ± 48 nmolCa²⁺/mg proteins). The postCsA and IPC group displayed significantly CRC vs the ischemic group 240 ± 43 nmolCa²⁺/mg proteins and 246 ± 68 nmolCa²⁺/mg proteins, $p=0.05$, respectively (Figure 5A). There was no difference between the PostcondCsA and IPC group. After the addition of 10 μ L of CsA in the cuvette, CRC was increased significantly, and up to a similar level, in all groups (Figure 4B). We observed a significant correlation between CRC and creatinine ($r^2= 0.99$, $p=0.0001$; supplemental data, figure 6). The expressions of some proteins of mPTP as cypD or VDAC were not affected by the ischemia (data not shown).

Oxidative phosphorylation (table 1)

The oxidation phosphorylation of the mitochondrial respiration was decreased in all groups 20 min after reperfusion with the glutamate-malate-pyruvate substrate. Twenty-four hours after reperfusion, state 3 (the maximal consumption of oxygen with ADP) is decreased significantly in the ischemic group compared to sham group and mitochondria stay uncoupled even after 24h of reperfusion. PostcondCsA and IPC significantly improved the state 3.

Apoptosis markers (Figure 5)

We found a decrease of Bax concentration in mitochondria for post-condCsA (0.64 ± 0.27) vs ischemic (1.11 ± 0.23), and for IPC (0.68 ± 0.27) vs ischemic, $p=0.01$. We found a decrease of cleaved caspase 3 for the postcond-CsA group (0.46 ± 0.12) and for the IPC group (0.49 ± 0.37) vs the ischemic group (1.63 ± 0.28), $p=0.05$.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated for the first time that: 1) CsA administered as a single bolus at the time of reperfusion can improve post-ischemic renal dysfunction, attenuated renal damage and limit mortality 2) the protection afforded by ischemic and CsA-postconditioning may be likely related to the inhibition of the opening of the PTP.

A pharmacological post conditioning with CsA has been observed in experimental settings of prolonged ischemia-reperfusion in the heart (13), the liver (14) or the brain (15) as well as in clinical situations like acute myocardial infarction (16). Up to now, there is no evidence that CsA, administered after a prolonged ischemic insult, may similarly protect the kidney, although Zhu and yang previously reported that CsA may be protective when given before ischemia (22,23). In this study we showed postcondCsA attenuated the post-ischemic creatinine increase, limited kidney damage and allowed a significant decrease of mortality. Interestingly the order of magnitude observed here is in the range of what has been previously observed in the heart or the brain. Moreover we showed that the apoptosis markers, Bax and cleaved caspase 3, were significantly reduced in PostcondCsA and IPC. It is important to note that a very strong injury was induced in this model of ischemia reperfusion (30 min of warm ischemia after a contralateral nephrectomy), reflected by the high mortality rate of 40 % in the group without protection which supports the benefit of the 2 post conditioning.

CsA is considered as a nephrotoxic drug, leading to acute hemodynamic changes with a decrease of renal blood flow and an increase of renal vascular resistance (17,18). This toxicity is dose-dependent, but transient and reversible when CsA is injected in one single bolus (19,20). Previous studies have shown that the doses of CsA used in the rat to study the renal hemodynamic changes are higher than in this study (20 and 40 mg/kg vs 3 mg/kg in this study) (18,21,22). Indeed, Murray et al showed that the dose of 10 mg/kg of CsA does not modify the renal blood flow and vascular resistance (23). A human study showed also that

one oral single bolus of CsA (20mg/kg) doesn't change the arterial blood pressure and the renal vascular resistance (20). In our study we used a lower dose of CsA (3 mg/kg) than in previous reports and one single bolus. Finally, no visible lesion was detected in sham group after CsA injection in a preliminary study. Some in vitro studies demonstrated that there is a beneficial effect of CsA when cells exposure is limited to four hours, but can lead toxicity after a long time of exposure (24).

The opening of the mPTP is a key event in ischemia-reperfusion and previous reports demonstrated that postcondCsA or IPC inhibit mPTP opening (13,14,25). Our results are in agreement with these previous studies. Also not addressed by our experiments, it was established that CsA inhibits the mPTP by its binding to the cyclophilin D in different organs such as the heart, the brain or the liver directly (26). One in vitro study demonstrated that mPTP is also sensitive to CsA in proximal tubular cells after hypoxia-reoxygenation (27), but only in the presence of ADP and/or Mg²⁺. Only few studies used CsA to protect the kidney against IR injury. Among them, previous studies showed that CsA and Tacrolimus, two anticalcineurin inhibitors, protected the kidney from IR. The mechanism of protection was not explained by a direct binding with the mPTP but by the increase of a heat shock protein 70 induced by CsA or Tacrolimus (28). We demonstrated that PostcondCsA and IPC increased the calcium retention capacity (CRC), an index of the resistance of the mPTP, shortly after reperfusion (20 min) and later, at 24h of reperfusion. These results show that mitochondrial functions are modified at the beginning of the reperfusion.

In IPC, only one study performed by Zhang et al. (11) measured mitochondrial membrane potential in vitro to study mPTP and demonstrated a higher membrane potential after IPC compared to control. We showed also in this study that there is a high negative correlation between renal function and CRC that allows proposing that PTP is also a key event in renal

protection after IR (figure 6). Although IPC and postcondCsA can protect kidney from ischemia reperfusion, their mechanisms of protection probably differ.

Serviddio et al. showed that the capacity of the mitochondria to couple the consumption of oxygen and the production of ATP is impaired severely at the end of ischemia. Previous reports found the same observations in heart (14,32). Our study confirmed that respiration decreased in all groups shortly after reperfusion. Serviddio et al. showed also an improvement of respiration 24hrs after reperfusion, along with a better mitochondrial coupling. We also showed that the postcondCsA provide a better recovery of respiratory chain with a significant increase of RCI and state 3 compared to the ischemic group. Therefore, we showed that the 2 postconditioning interventions could provide an attenuation of mitochondria bioenergetics dysfunction.

Some limitations can be pointed out. Indeed, we evaluated the treatment effects only after 24h of reperfusion. We chose this interval of reperfusion because, in our experience (data not showed) and in the literature, it has been established that there was no change in early histology measurements after 120 min (9,31). Moreover, it could be difficult to discriminate the different mechanisms responsible for this protection. We observed that the opening is maintained closed longer of time, but at 24h of reperfusion, some others mechanisms can also play a role, as inflammation. The short-term analysis of renal function is a limit in our study that was conducted mainly to demonstrate the impact of cyclosporine on the mPTP.

In our study, renal function was evaluated by the elevation in serum creatinine and urea concentration that we demonstrated to be very closely correlated with the duration of ischemia (supplementary data). Indeed, a more complete evaluation of renal function may provide a more reliable description of the renal function. However, this is particularly

challenging in mice, given the experimental limitations for collection of urine for measurement of glomerular filtration rate.

In conclusion, we showed here that cyclosporine A, provided it is administered as a single bolus at the time of reperfusion, could also protect the kidney, possibly via the inhibition of mitochondrial permeability transition.

MATERIALS AND METHODS

Surgical preparation

All experiments were performed in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care and French local law with number BH2012-81.

Eight to 10-week old male C57BL6 mice (Charles River, France) were anesthetized by intraperitoneal injection of xylazine (5 mg/kg, Rompun®, Bayer, Puteaux, France), ketamine (100 mg/kg, Imalgene® 1000, Acyon, Melan, France), and bupremorphine (0.075mg/kg, Vetergesic®, Sogeval, Laval, France). Body temperature was maintained at 37°C using a homeothermic pallet unit.

The animals were intubated orally using a 22-gauge catheter and ventilated with a rodent ventilator (Minivent, Harvard Apparatus®, March, Germany) with a volume of 0.15 mL and a breath rate of 140/min. After laparotomy and right nephrectomy, a 30-minute period of ischemia of the left kidney was obtained by the selective clamping of the left renal vascular pedicle using a microvascular clamp (Roboz Surgical Instruments, Washington, DC). Ischemia and reperfusion were confirmed visually with the coloration of the left kidney.

Experimental design (Figure 1)

Protocol1: Mice were assigned to four groups: sham (n=4), ischemic group (n=6), post-conditioning with CsA (PostCsA) (n=6) and ischemic post conditioning (n=6) (IPC). All animals underwent right nephrectomy followed by a 24-hour reperfusion period. The ischemic group consisted in a right nephrectomy and contralateral clamping, without protection. The postcond-CsA group consisted of an intravenous injection of CsA at 3 mg/kg, 5 min before the reperfusion and the ischemic postconditioning (IPC) group consisted of 3 cycles of 30 seconds of clamping of the renal artery separated by 30s of reperfusion, as previously described (10). The CsA was dissolved in 0.9% saline. Immediately after the surgical procedure, all the mice were hydrated with a subcutaneous injection of 1 mL of 0.9% saline. After 24 hours of reperfusion, under deep anaesthesia, 250 μ L of blood was withdrawn by retro-orbital puncture, and the kidney was excised for isolation of mitochondria. Then mice were euthanized.

Protocol2: The same design was performed but mice were sacrificed at 20 min of reperfusion. Four groups were also performed: sham (n=4), ischemic group (n=4), post-conditioning with CsA (PostcondCsA) (n=4) and ischemic post conditioning (n=4) (IPC) with CRC and oxidative phosphorylation measurements.

Renal parameters

The acute renal failure was assessed 24hrs after reperfusion by measuring the serum concentration of urea and creatinine. Urea was measured with urease test (Vista 1500, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) and serum creatinine was measured by an enzymatic method (Vista 1500, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). Renal tissues were embedded in formaldehyde. Four-micrometer sections were stained with periodic acid-Schiff reagents. Tubular injury was scored by a blinded pathologist semi-quantitatively, using a

scoring system ranging from 0 to 4 who examined at least 10 fields. The lesions of ischemia was defined as a tubular dilatation, naked tubular basement membrane according to the following scoring system as described previously (32): 0=no tubular injury; 1=<20% of tubules injured; 2=21–50% tubules injured; 3=>50% damage of tubule cells; 4=total destruction of all epithelial cells.

Preparation of isolated mitochondria

For mitochondrial isolation, the kidney was excised and immediately placed in a cold isolation buffer, containing (0.25 M sucrose, 2 mM EGTA and 10 mM Tris, pH 7.4). The tissue was cut with scissors and mixed in the same buffer (10 μ L buffer/mg tissue) with a Potter-Elvehjem. The homogenate was centrifuged at 600 g for 7 min and the supernatant at 6400 g for 10 min. The mitochondrial pellet was suspended the mitochondrial pellet was suspended and homogenized in the same buffer without calcium chelating agent. Protein weight was measured according to the Bradford method after each mitochondrial isolation. We used 250 μ g proteins for each CRC or respiration measurement. (33).

Calcium retention capacity

Isolated mitochondria (250 μ g proteins) were suspended in 2 mL of buffer C (150 mM sucrose, 50 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , 5 mM succinic acid in 20 mM Tris–Hcl pH 7.4) in a polystyrene cuvette at 20 min and 24h of reperfusion. Extra-mitochondrial Ca^{2+} concentration was measured with a Hitachi F2500 spectrofluorometer in the presence of 0.8 μ mol Calcium Green-5N (with excitation and emission wavelengths set at 500 and 530 nm, respectively). Ten nM CaCl_2 pulses were performed every minute.

Mitochondrial oxydative phosphorylation

Mitochondrial respiratory function was measured at 25°C using a Clark-type oxygen method electrode (Oroboros oxygraph, Austria). Mitochondria (250 µg proteins) were incubated in the respiration buffer (pH7.4) containing 80 mM KCl, 50 mM MOPS, 1mM EGTA, 5 mM KH₂PO₄ and 1mg/mL defatted BSA. Pyruvate/malate/glutamate (complex I substrates, 3 mM each) The measurement of oxygen consumption was expressed in nmol of oxygen/min/ mg of protein. The state 3 represents the oxygen consumption stimulated by ADP when all required components are presents; the state 4 represents the oxygen consumption after completion of ADP phosphorylation, characterized by a low respiration rate. The respiratory control index (RCI) was determined as the state3/state 4 ratio, and indicates the tightness of the coupling between respiration and phosphorylation, i.e, the capacity of the mitochondria to consume oxygen for producing ATP.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± Standard deviation (SD). The ischemic Group was compared using the One way ANOVA test with Bonferroni correction. (Graphpad software®, San Diego, USA). p<0.05 was considered significant.

Acknowledgments:

Source of funding: Grant of AMGEN

Disclosure: The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

1. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal* 1999; 341 (Pt 2): 233.
2. Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochemical Journal* 1988; 255: 357.
3. Malouitre S, Dube H, Selwood D, Crompton M. Mitochondrial targeting of cyclosporin A enables selective inhibition of cyclophilin-D and enhanced cytoprotection after glucose and oxygen deprivation. *Biochemical Journal* 2009; 425: 137.
4. Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *The American journal of physiology* 1990; 258: C755.
5. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochemical Journal* 1995; 307 (Pt 1): 93.
6. Nazareth W, Yafei N, Crompton M. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1991; 23: 1351.
7. Di Lisa F, Menabò R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 2571.
8. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circulation Research* 2003; 93: 292.
9. van den Akker EK, Manintveld OC, Hesselink DA, de Bruin RWF, Ijzermans JNM, Dor FJMF. Protection against renal ischemia-reperfusion injury by ischemic postconditioning. *Transplantation* 2013; 95: 1299.
10. Serviddio G, Romano AD, Gesualdo L et al. Postconditioning is an effective strategy to reduce renal ischaemia/reperfusion injury. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2008; 23: 1504.
11. Zhang W-L, Zhao Y-L, Liu X-M, Chen J, Zhang D. Protective role of mitochondrial K-ATP channel and mitochondrial membrane transport pore in rat kidney ischemic postconditioning. *Chinese medical journal* 2011; 124: 2191.
12. Ichas F, Jouaville LS, Sidash SS, Mazat JP, Holmuhamedov EL. Mitochondrial calcium spiking: a transduction mechanism based on calcium-induced permeability transition involved in cell calcium signalling. *FEBS Letters* 1994; 348: 211.
13. Argaud L. Postconditioning Inhibits Mitochondrial Permeability Transition. *Circulation* 2005; 111: 194.

14. Leducq N, Delmas-Beauvieux MC, Bourdel-Marchasson I et al. Mitochondrial and energetic dysfunctions of the liver during normothermic reperfusion: protective effect of cyclosporine and role of the mitochondrial permeability transition pore. *Transplantation Proceedings* 2000; 32: 479.
15. Leger P-L, De Paulis D, Branco S et al. Evaluation of cyclosporine A in a stroke model in the immature rat brain. *Experimental neurology* 2011; 230: 58.
16. Piot C, Croisille P, Staat P et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 2008; 359: 473.
17. Weir MR, Klassen DK, Shen SY, Sullivan D, Buddemeyer EU, Handwerger BS. Acute effects of intravenous cyclosporine on blood pressure, renal hemodynamics, and urine prostaglandin production of healthy humans. *Transplantation* 1990; 49: 41.
18. Perico N, Dadan J, Remuzzi G. Endothelin mediates the renal vasoconstriction induced by cyclosporine in the rat. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1990; 1: 76.
19. Sullivan BA, Hak LJ, Finn WF. Cyclosporine nephrotoxicity: studies in laboratory animals. *Transplantation Proceedings* 1985; 17: 145.
20. De Lima JJG, Colombo FMC, Lopes HF, Riccio GMG, Krieger EM. Lack of effect of a single oral dose of cyclosporine on systemic blood pressure and on forearm blood flow and vascular resistance in humans. *American journal of hypertension* 1998; 11: 1371.
21. Bagnis C, Deray G, Dubois M, Jacquiaud C, Bitker MO, Jacobs C. Prevention of acute cyclosporin nephrotoxicity by verapamil and atrial natriuretic factor in the rat. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 1994; 9: 1143.
22. Abraham JS, Bentley FR, Garrison RN, Cryer HM. Cyclosporine A directly constricts intrarenal arterioles. *Transplantation Proceedings* 1991; 23: 356.
23. Murray BM, Paller MS, Ferris TF. Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney International* 1985; 28: 767.
24. Sarró E, Jacobs-Cachá C, Itarte E, Meseguer A. A pharmacologically-based array to identify targets of cyclosporine A-induced toxicity in cultured renal proximal tubule cells. *Toxicology and applied pharmacology* 2012; 258: 275.
25. Gomez L, Thibault H, Gharib A et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 2007; 293: H1654.
26. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1993; 25: 1461.

27. Park JS, Pasupulati R, Feldkamp T, Roeser NF, Weinberg JM. Cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition in kidney proximal tubules after hypoxic and ischemic injury. *AJP: Renal Physiology* 2011; 301: F134.
28. CW Y, HJ A, JY J et al. Preconditioning with cyclosporine A or FK506 differentially regulates mitogen-activated protein kinase expression in rat kidneys with ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2003; 75, 20-24: 1.
29. Zhu T, Au-Yeung KKW, Siow YL, Wang G, O K. Cyclosporine A protects against apoptosis in ischaemic/reperfused rat kidneys. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2002; 29: 852.
30. Paillard M, Gomez L, Augeul L, Loufouat J, Lesnefsky EJ, Ovize M. Postconditioning inhibits mPTP opening independent of oxidative phosphorylation and membrane potential. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009; 46: 902.
31. Miklós Z, Kürthy M, Degrell P et al. Ischaemic postconditioning reduces serum and tubular TNF- α expression in ischaemic-reperfused kidney in healthy rats. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2012; 50: 167.
32. Singh D, Chander V, Chopra K. Cyclosporine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Toxicology* 2005; 207: 339.
33. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976; 72: 248.

Table

Table 1: oxidative phosphorylation

Complex I	20 min of reperfusion			24h of reperfusion		
	State 3	State 4	RCI	State 3	State 4	RCI
Sham	56 ± 5 **	9 ± 1	6.8 ± 0.8 **	61 ± 13*	12 ± 2*	5.2 ± 0.7*
Ischemic	18 ± 4	5.5 ± 1	2.4 ± 0.96	35 ± 18	17 ± 6	2
Post-CsA	23 ± 9	8 ± 2	2.9 ± 0.7	61 ± 13* †	14 ± 8*	4.2 ± 0.43 †
IPC	28 ± 5	9.5 ± 2	2.4 ± 1	71 ± 11* †	16 ± 3	5 ± 0.7* †

State 3 and state 4 were measured in isolated mitochondria with pyruvate/malate/glutamate as substrates of complex I and succinate/rotenone as substrates of complex II, and are expressed in nmol O₂/min/mg. RCI: respiratory control index (state3/state4). Values are mean ± SD. (n=4 to 9)

* p< 0.05 vs ischemic at 24h of reperfusion with ANOVA. ** P<0.05 vs ischemic at 20 min of reperfusion with ANOVA † p<0.05 20 min vs 24 h of reperfusion with Mann and Withney.

Legends to figures

Figure 1 :

Experimental design: All groups except sham underwent 30 min of ischemia with contralateral nephrectomy followed by 24h of reperfusion. CsA is injected 5 min before reperfusion. IPC consisted of 3 episodes of 30 sec of reperfusion followed by 30 sec of ischemia.

Figure 2: A. Serum creatinine and Urea concentration from 250uL of blood at 24h of reperfusion.

* for $p < 0.05$ vs ischemic group. ‡ $p < 0.05$ vs sham.

Figure 3: A. Histological score at 24h of reperfusion. Tubular injury was defined as a tubular dilatation, sloughing of tubular epithelial cells, or naked tubular basement membrane. Only tubules in the outer stripe of the outer medulla (most sensitive zone for ischemic injury) were included in the following scoring system: 0=no tubular injury; 1=<20% of tubules injured; 2=21–50% tubules injured; 3=>50% damage of tubule cells; 4=total destruction of all epithelial cells. * for $p < 0.05$ vs control. ‡ $p < 0.05$ vs sham. B. histological morphology. (x100 and x400) . periodic acid-Schiff reagents. A. sham B. ischemic C. postcond-CsA D. IPC

Figure 4: Calcic retention capacity

A. Typical recording of Ca^{2+} induced mPTP opening in each group. Ten nmol/L of CaCl_2 is injected in the isolated mitochondria suspension and corresponded to a peak of extra-

mitochondrial Ca^{2+} concentration. Ca^{2+} is quickly taken up by the mitochondria and we observed the return of Ca^{2+} extra-mitochondrial concentration near to baseline level. When mPTP opens, the mitochondria releases massive Ca^{2+} quantity, corresponding to the abruptly increase of extra-mitochondrial Ca^{2+} concentration. The calcic retention capacity (CRC) is the amount of Ca^{2+} necessary to open the mPTP and an indicator of the resistance of the mitochondria. In sham group, 12 pulses of 10 nmol/L of CaCl_2 are necessary to open mPTP for 250 μg of protein, i.e 480 nmol of Ca^{2+} for one milligram of protein.

B. Calcic retention capacity et 20 min of reperfusion. Inhibition of mPTP opening was significantly reduced in control vs sham. post Csa or IPC increased CRC. ‡ $p < 0.05$ vs sham.

* $p < 0.05$ vs ischemic group. (n=4)

C. B. Calcic retention capacity at 24 h of reperfusion. Inhibition of mPTP opening was significantly reduced in control vs sham. post Csa or IPC increased CRC. ‡ $p < 0.05$ vs sham.

* $p < 0.05$ vs ischemic group. (n=4 to 6)

D. Calcic retention capacity with CsA 10 μL in the cuvette at 20 min of reperfusion (n=4)

E. Calcic retention capacity with CsA 10 μL in the cuvette at 24 h of reperfusion.

Supplemental digital content:

Figure 5: Markers of apoptosis. A. Cytosolic Caspase-3. Postcond-CsA and IPC decrease caspase 3 activity. B. Mitochondrial Bax. Postcond-CsA and IPC decrease Bax activity. Bars represent mean values avec SD. n=6 for IR, 6 for postcond-CsA and 5 for IPC.

Figure 6:

Different technical procedures of surgery. There is no reproducibility for each time of ischemia in bilateral clamping group. There is no correlation between the time of ischemia and renal function in unilateral nephrectomy and contralateral clamping group.

Figure 7:

Linear correlation between calcium retention capacity (CRC) and renal function.

CRC (nmolCa²⁺/mg of protein) correlates with creatinine (μmol/L), R² = 0.99. Results are mean ± SD.

Figure 1 :

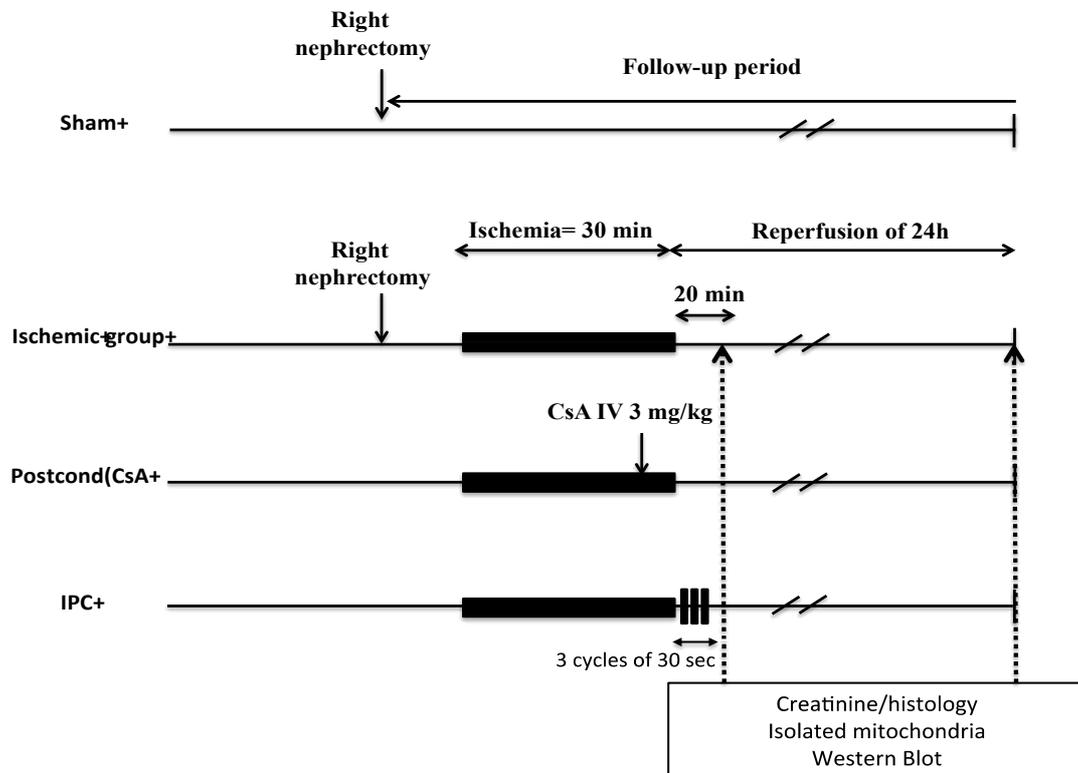


Figure 2 :

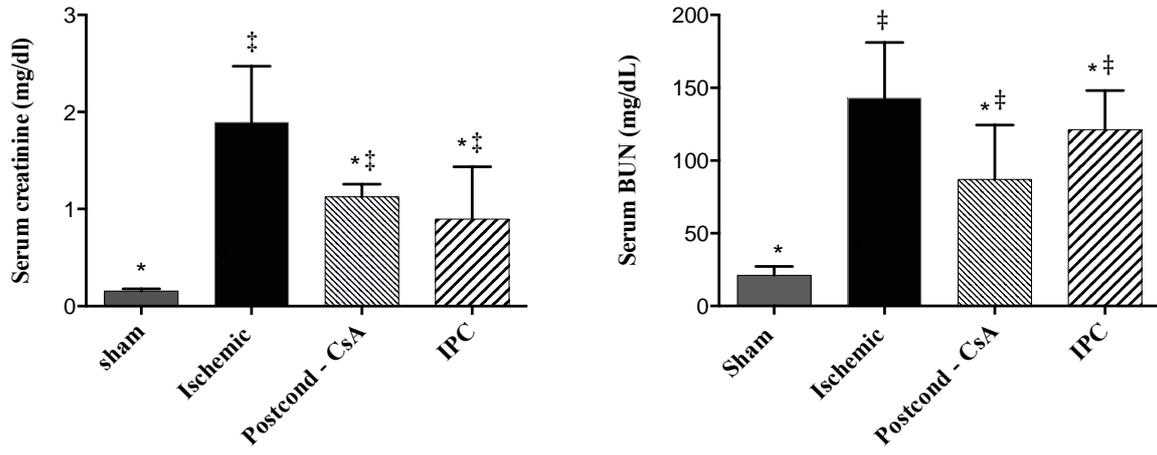


Figure 3 :

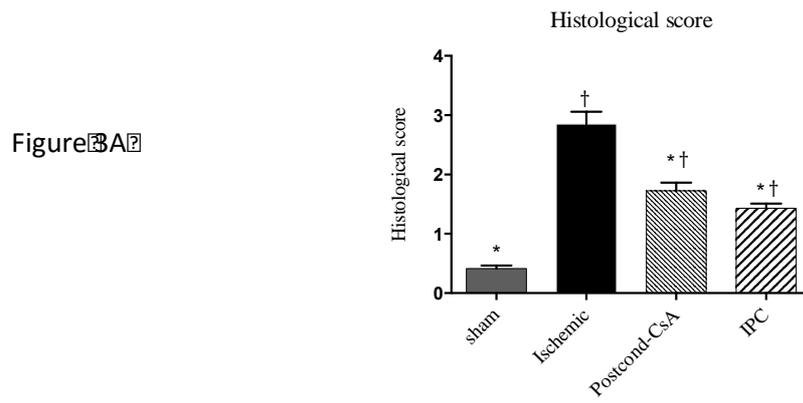


Figure 3B

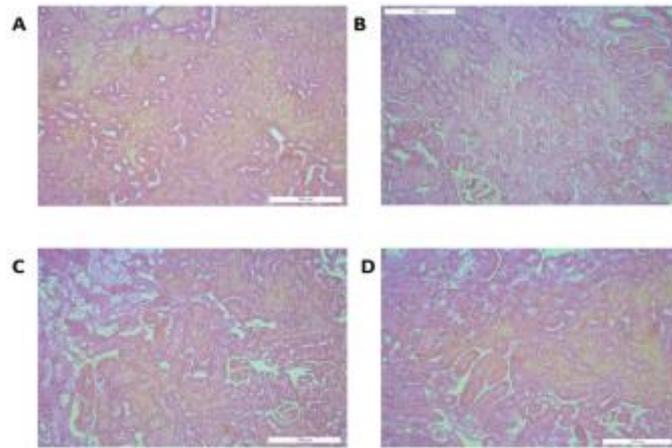
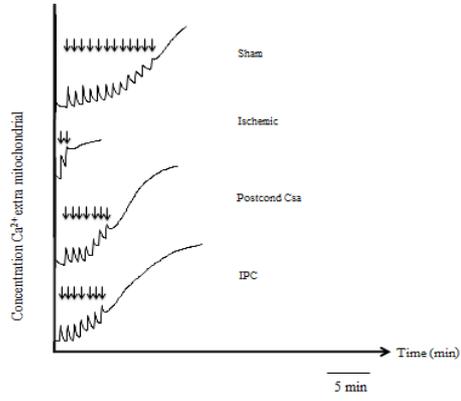
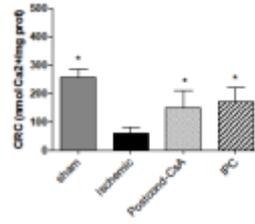


Figure 4 :

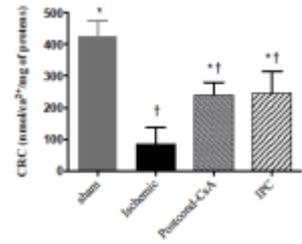
A



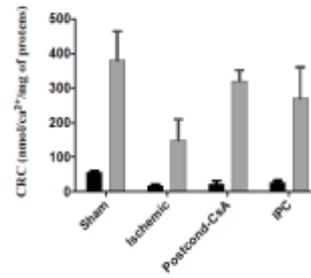
B



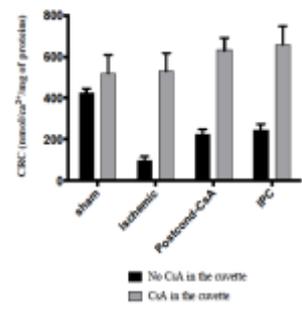
C



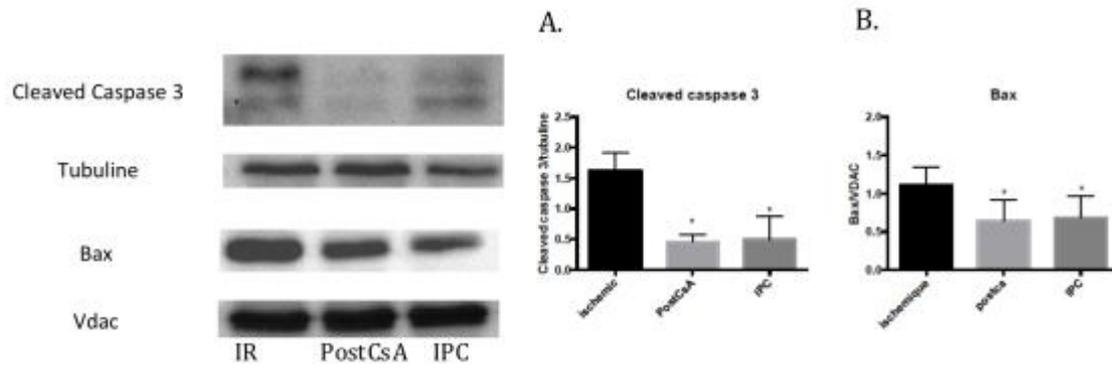
D

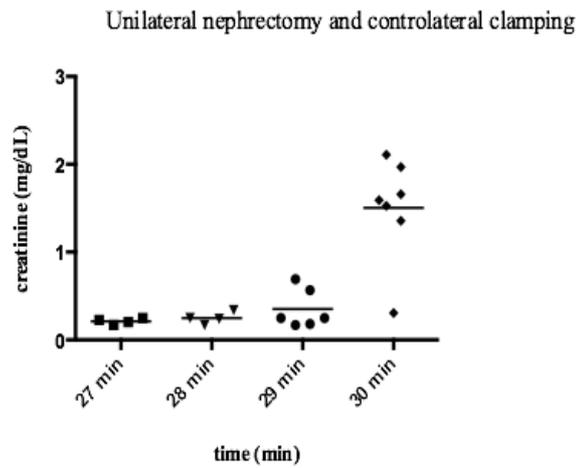
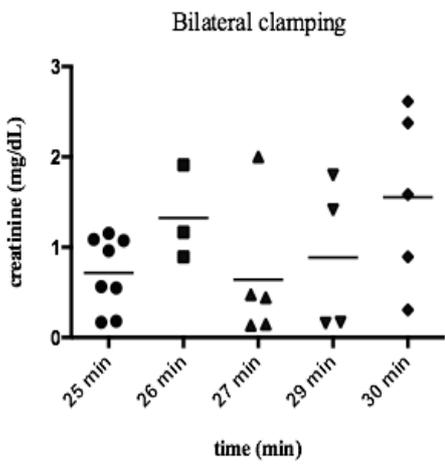
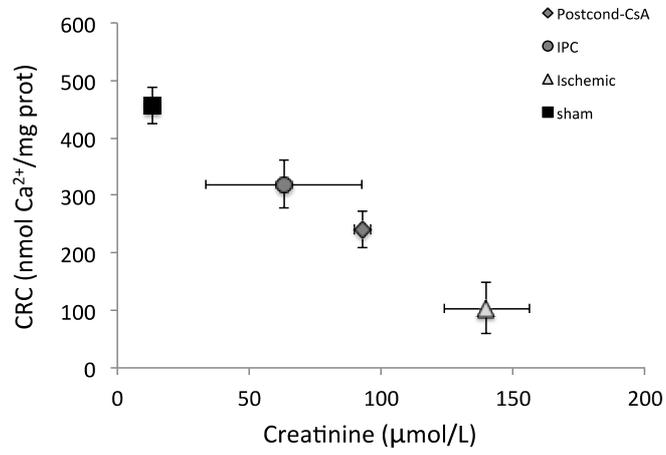


E



Supplemental
datas :





B. Synthèse et discussion

Avec ce premier article nous montrons pour la 1^{ère} fois que le postconditionnement avec la ciclosporine permet de protéger la fonction rénale des lésions d'ischémie-reperfusion, que nous comparons aux résultats d'un postconditionnement ischémique.

Une revue récente résume les études ayant réalisé un postconditionnement ischémique dans l'IR rénale. De 2007 à nos jours, elles sont au nombre de 13. Nos résultats sont comparables à ceux déjà publiés dans la littérature, à savoir une amélioration de la fonction rénale, une diminution de Bax au niveau mitochondrial et une diminution de la caspase 3. Notre étude est uniquement la 2^{ème} étude réalisée chez la souris, les autres études étant principalement réalisées sur le rat avec des algorithmes assez variés. Nous avons choisi l'algorithme déjà validé chez la souris. Une seule étude avait étudié le mPTP dans ce contexte, et une seule autre la phosphorylation oxydative, nos résultats sur ces paramètres mitochondriaux étant concordants avec ceux déjà publiés.

Dans la conclusion de son article, Van den Akker précisait la nécessité de tester le postconditionnement avec la CsA, question à laquelle nous avons répondu dans cet article. En effet, la CsA, probablement par peur de sa toxicité, n'avait jamais été testée dans le rein dans le post-conditionnement. Une seule publication de 1997 avait montré que la CsA aggravait les lésions rénales quand elle était injectée à la reperfusion. Mais la CsA était injectée plusieurs jours de suite, à la dose de 20 mg/kg chez le rat. Or il a été montré que c'est à partir de cette dose que les effets hémodynamiques de la CsA commencent à être significatifs. Par ailleurs, dans cette étude, nous n'injectons qu'un seul bolus de CsA, sans répéter l'injection.

III. Etude n°2

A. Article n°2

Heat Shock protein 70 modulates the mitochondrial permeability transition after preconditioning for renal ischemia reperfusion by increased dose of cyclosporine

A.

Sandrine Lemoine^{1,2}, Bruno Pillot¹, Lionel Augeul¹, Maud Rayberin⁵, Annie Varennes⁴,
Michel Ovize^{1,3}, Laurent Juillard^{1,2}.

En cours de relecture

Sera soumis à Kidney international

Heat Shock protein 70 modulates the mitochondrial permeability transition after preconditioning for renal ischemia reperfusion by increased dose of cyclosporine

A.

Sandrine Lemoine^{1,2}, Bruno Pillot¹, Lionel Augeul¹, Maud Rayberin⁵, Annie Varennes⁴,
Michel Ovize^{1,3}, Laurent Juillard^{1,2}

1. Inserm CARMEN 1060, University of Lyon, Lyon, France
2. Nephrology department, Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France
3. Cardiology department, Hospices Civils de Lyon, Louis Pradel Hospital, Lyon, France
4. Biology department, Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France
5. Anatomopathology, Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France

Running title: cyclosporine and ischemia reperfusion

Key word: renal ischemia reperfusion, Cyclosporine, preconditioning, mitochondrial pore of transition, HSP 70

Word: Abstract: 290 text:

Corresponding author: Dr Sandrine Lemoine

Address Department of Nephrology, Edouard Herriot hospital, 5 place d'Arsonval, 69437,

Lyon Cedex 03

Phone +33 4 72 11 01 67

Fax =33 4 72 11 02 03

Email: sandrine.lemoine01@chu-lyon.fr

ABSTRACT

Ischemia-reperfusion (IR) injury leads to mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening, which contributes to cell death. The aim of this study is to test a new algorithm of protection with an injection of two different doses of CsA just before the ischemia. Moreover, because the CsA leads to an overexpression of HSP70, we hypothesized that HSP70 may be another pathways of modulation of the mPTP.

Male mice had a right unilateral nephrectomy, with 30 minutes of contralateral clamping of the renal artery. First, we tested the dose of CsA required to protect renal function in 6 groups (sham, sham+3mg/kg and sham+10 mg/kg group, an ischemic group, a preconditioning group with injection of 3 mg/kg of CsA (PrecondCsA-3 mg/kg) or 10 mg/kg of CsA (precond-CsA 10mg/kg) 10 min before ischemia. We tested the mPTP and oxidative phosphorylation after 20 and 24h of reperfusion, and we measured plasma creatinine and histological score after 24h of perfusion. Secondly, we tested the role of HSP70 in the CsA preconditioning by injecting an inhibitor of HSP70 (Quercetin®) 2h before the injection of CsA. We tested mitochondrial function and renal function after 20 min and 24h of reperfusion.

We showed an improvement of renal function only in the precondCsA-10 mg/kg after 24h of reperfusion. The opening of mPTP was significantly delayed with precond-10 mg/kg compared to precond-3 mg/kg. The phosphorylation oxidative was reduced after 20 min of reperfusion but improved after 24 h in the protected groups. The inhibition of HSP70 leads to the inhibition of the CsA protection and to the early opening of the mPTP.

We showed that a high dose of CsA injected just before the ischemia improves renal function and leads to the delay of the opening of mPTP mediated by an increase of HSP70.

INTRODUCTION

The high morbidity and mortality of acute renal failure after ischemia-reperfusion injury (IRI) would lead to propose a pharmacological conditioning for protecting renal function. Cyclosporine A (CsA) has been proposed as a treatment to protect against reperfusion injury in acute myocardial infarction in experimental studies and even in a clinical study. Indeed, several previous reports suggested that CsA protects from IRI through the inhibition of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening by binding of cyclophilin D (Cyp-D) located at the inner mitochondrial membrane. This mPTP opening plays a critical role in lethal reperfusion injury at the time of reperfusion.

We have showed already that the post-conditioning with CsA protected kidney from IRI by the delaying of the mPTP opening ¹. Previous reports showed also that CsA, administered 6 hours before ischemia, protects renal function ². As the ischemic preconditioning, the timing of the CsA injection could be essential in the renal protection. Until now, CsA has been injected only 6 hours before ischemia ²⁻⁴. Initial reports in kidney suggested that the CsA could protect through an overexpression of the heat shock protein 70 (HSP70), explaining the timing of the CsA injection in their study. HSP70 is one of the most highly conserved and ubiquitously expressed molecular chaperone proteins that help maintain normal cellular function normally. HSP may shelter the cell mitochondria from reactive oxygen species, conserving ATP levels, repairing DNA damage, maintaining tight junction integrity and preventing calcium redistribution within the cell in renal ischemia-reperfusion ^{5,6}. Previous reports showed that Hsp70 limits apoptosis by controlling the activity of the kinases Akt and glycogen synthase kinase-3 β that regulate the activity of the pro-apoptotic protein Bax with an inverse correlation between apoptosis, tubular injury and renal dysfunction ⁷. Moreover, the Brown Norway rat, a species with an up expression of HSP70, is more resistant to IRI ⁸.

Geranylgeranylacetone, glutamine, or geldanamycin analogues, all inducers of HSP70, have been used successfully to protect kidney from IRI ^{9,10}. Despite experimental investigations, the protective properties of Hsp70 in renal IRI are not fully understood.

In this study, we proposed to test a new algorithm of protection with an injection just before ischemia with two different doses of CsA. Moreover, because CsA leads to overexpression of HSP70, we would test the link between HSP70 and mPTP.

RESULTS

Impact of CsA on renal function after 24h of reperfusion (figure 2)

First we tested if a dose of 3 and 10 mg/kg deteriorates renal function in sham mice. The creatinine was unchanged in the 3 groups with CsA (p=0.16). The histological score was unchanged between the 3 groups (p=0.9). As previously described, the calcic retention capacity (CRC) is a test of the mPTP opening. More CRC increased, more mPTP is resistant to the opening. CRC was increased significantly in the sham+ 10mg/kg CsA group (586 ± 82 nmol Ca²⁺/mg prot) compared to the sham group (426 ± 50 ; p=0.001,) and sham + 3 mg/kg group (480 ± 50 nmol Ca²⁺/mg prot, p=0.001).

Renal function and histology after 24h of reperfusion

The mortality was increased dramatically in the ischemic group, precond-CsA3mg/kg group (40, 41% respectively, p=0.9 and p=0.2) after 24 hours after reperfusion. There was no mortality in the precond-CsA 10 mg/kg.

The creatinine level decreased significantly in the precond-CsA 10mg/kg group compared to the ischemic group (0.96 ± 0.36 vs 1.9 ± 0.3 mg/dL, p=0.0004) and to the precond-CsA

3mg/kg (1.5 ± 0.33 mg/dL, $p=0.05$). There was no difference between the ischemic and precond-CsA 3mg/kg groups, $p=0.17$ (Figure 3).

For histological score, the precond-CsA 10 mg/kg group was improved significantly (1.54 ± 0.52) vs ischemic mice (2.85 ± 0.5) and vs precond-CsA 3 mg/kg (2 ± 0.35) after 24h of reperfusion (Figure 3). There was no difference between ischemic and preCsA-3mg/kg group.

Impact of the CsA dose on the mPTP and oxidative phosphorylation

CRC was reduced dramatically in the ischemic group when compared to sham group 70 ± 41 and 84 ± 5 nmolCa²⁺/mg proteins after 20 min and 24h of reperfusion respectively, $p=0.001$. The CRC increased significantly in the precond-CsA 3 mg/kg (160 ± 28 and 192 ± 52 at 20 min and 24h of reperfusion respectively) and precond-CsA 10 mg/kg group (200 ± 25 and 276 ± 58 nmolCa²⁺/mg proteins) after 20 min and 24h of reperfusion respectively. We showed a significant difference between the ischemic and precondCsA groups, $p=0.0003$ after 20 min and 24h of reperfusion. We found a significant difference between precond-CsA 3mg/kg and precond-CsA 10 mg/kg after 20 min and 24h of reperfusion, $p=0.01$. After the addition of 10 μ L of CsA in the cuvette, CRC was increased significantly, and up to a similar level, in all group.

After 20 min of reperfusion, the maximal consumption of oxygen with ADP (state 3) was decreased significantly in the ischemic group (20 ± 14 , %, $p=0.009$), in the the precond-CsA 3 mg/kg (30 ± 8) and precond -CsA 10 mg/kg (31 ± 9 nmol O₂/min/mg prot) with no significant difference between the 3 groups. After 24h of reperfusion, the state 3 remains dramatically decreased in the ischemic group, 26 ± 15 nmol O₂/min/mg prot, $p=0.04$. The state 3 was improved in the precond-CsA 3 mg/kg group (54 ± 20) and precond-10 mg/kg group (45 ± 8 nmol O₂/min/mg prot).

Impact of HSP70 in the renal protection after IRI.

In order to show that CsA has also an action via the HSP70 enhancement, we injected an inhibitor of HSP70, as already published ¹¹. First, we verified that the HSP70 protein is increased at 20 min of reperfusion in protected group. HSP70 increases significantly between ischemic group and Precond-CsA 10 mg/kg at + 50%; $p=0.02$. There is no significant difference between control group and precond-CsA 3 mg/kg group, $p=0.08$. HSP70 decreases in the precond-CsA 10mg/kg group with the injection of quercetin, -51%, $p=0.004$) (figure 5)

The Creatinine level (1.53 ± 0.28 mg/dL) and histological score (3.2 ± 0.44) were no different between the ischemic group and the precond-CsA 10 mg/kg + Q group ($p=0.28$) (figure 5).

Impact of HSP70 on the mPTP.

The inhibition of HSP70 decreased CRC dramatically after 20 min (156 ± 60) and after 24h (64 ± 21 nmolCa²⁺/mg proteins), $p=0.08$ and $p=0.04$ respectively. The state 3 was dramatically decreased in the precond-CsA 10 mg/kg + Q group, with no difference between the ischemic group.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that 1) Preconditioning with a bolus of CsA just before the ischemia can improve renal function but depends of the dose of CsA 2) the protection with CsA is likely related to the enhancement of HSP70 protein and his role of the mPTP.

Preconditioning: a question of dose and timing

A pharmacological preconditioning with CsA has been already performed in heart ¹², liver ¹³ or brain ¹⁴. In the kidney, we showed previously that CsA can protect kidney function used in

post-conditioning and Cour *et al.* showed also that CsA protected kidney function after an cardiac arrest ¹⁵. Previous reports showed also that preconditioning with CsA was performed successfully with a dose of 3 mg/kg of CsA injected 6 h before ischemia because CsA was assumed as an inductor of HSP70 ². In this study, we tested another timing and dose of CsA and injected CsA 10 min before ischemia. However, the dose of 3 mg/kg of CsA didn't improve the renal function and histological score after 24h of reperfusion. This lack of protection could be explain because HSP70 was not increased enough and because the mPTP was not enough delayed at the reperfusion, as suggested the significant difference between CRC in 3 mg/kg and 10 mg/kg sham groups. The dose and the timing of the injection of CsA are a crucial point to discuss to translate these experiments to the clinical practice. Soriano *et al.* showed in liver that mPTP is the most inhibited with a dose of CsA at 5 mg/kg, with a decreased protection with a dose superior to 10 mg/kg ¹⁶. In the kidney, we found that an increased dose of CsA increased the inhibition of mPTP in sham mice. Moreover, CsA directly put in contact with mitochondria in the cuvette performed a better inhibition that CsA injected intravenously. However, if CsA is injected 1h before ischemia at 3mg/kg, renal function is protected (data not shown).

Role of the mPTP in CsA preconditioning

The opening of the mPTP is a key event in ischemia-reperfusion and previous reports demonstrated that preconditioning inhibits the mPTP opening, through the modulation of CypD binding to components of the pore. Conversely in the kidney, mPTP has never been study *in vivo* in renal ischemia reperfusion and preconditioning. There was only studies *in vitro* that showed mPTP is also sensitive to the inhibition of CypD by CsA in tubular proximal cells after hypoxia-reoxygenation ¹⁷. We showed also that the CRC increased in the pré-CsA groups compared to the ischemic group, early in the reperfusion (20 min), with a

prolonged effect on the CRC at 24h of reperfusion. It is generally accepted that cypD, binding by CsA, is a regulatory component of the mPTP¹⁸. CypD is expressed in the mitochondrial matrix and is an essential component of the mPTP. Indeed, previous report showed that mice cypD^{-/-} are protected after an ischemia reperfusion processus in heart¹⁹ or in kidney confirming the role of CypD²⁰. There was only one study in vitro that showed mPTP is also sensitive to the inhibition of CypD by CsA in tubular proximal cells after hypoxia-reoxygenation²¹. We showed also that the respiration is dramatically decreased for each group at 20 min of reperfusion, as already described in post-conditionning²², who showed that the coupling respiration/phosphorylation is severely impaired at the end of ischaemia, according to others observations in heart²³. However, we showed an improvement of respiration at 24h of reperfusion with a better mitochondrial coupling after a preconditioning at 24h of reperfusion. In kidney, there is poor data about the preconditioning with CsA, and the main mechanism was explained currently by a decrease of apoptosis via the signaling pathways of HSP70 and of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs)³.

CsA has probably never been tested at this dose of 10 mg/kg in kidney because it is considered as a nephrotoxic drug. However, the protection is obtained after a unique bolus of CsA with a reduced risk of vascular toxicity. In our study, no optic lesion was found in sham group after CsA injection even in the sham+CsA10mg/kg group. Moreover, even if CsA increases renal vascular resistance and decreases renal blood flow, the hemodynamic impact of CsA is transient (<10 min) as demonstrated experimentally with a renal blood flow²⁴⁻²⁶. Preconditioning with CsA inhibits mPTP and improves mitochondrial respiration.

HSP70 and mPTP

Yang et al. chose to inject the CsA, 6h before the ischemia because of the hypothesis that CsA increased HSP70. The hypothesis was strengthened by Singh et al who inhibits HSP70 and showed the lack of renal protection after this inhibition ². The importance of HSP70 is highlighted by the death of KO mice ^{-/-} on the order of 75% 72h after ischemia 25 min in the Wang's study ⁷. Suzuki et al. showed also that the enhancement of HSP70 improved renal function²⁷, and Bidmon et al. showed that HSP70 repairs tubular proximal tubule ²⁸. It was shown that overexpression of HSP70 in transgenic mice protects the heart via a mitochondrial protection ²⁹. The protective effect of HSP70 in renal IR is not completely understood and it is suggested that this protection is mediated by the correction of protein conformation, cytoskeletal stabilisation, anti inflammatory effects, anti apoptotic properties and stimulation of regulatory T cells ^{5,30}. It has been shown also that the ischemic preconditioning could increase the synthesis of HSP70, resulting in an improvement in renal function after 45 min of ischemia in the rat. Taken together all these observations that rise before the overexpression of HSP70 ischemia provides cell protection. In our study, we confirmed that a bolus of CsA increased HSP 70 compared to ischemic group early at the reperfusion with a dose of CsA. In previous report, the expression of HSP70 was increased after 2h of injection with a dose of 3 mg/kg. We showed that a dose of 10 mg/kg increased significantly HSP70 after 1h of CsA injection. Moreover the inhibition of HSP 70 by Quercetin led to decrease renal protection and also decreases the CRC. We showed in this study that the enhancement of HSP70 can have an impact on the opening of the mPTP, since its inhibition was leading to an early mPTP opening.

In conclusion, we showed that the protection of CsA preconditioning is dose and time dependant and is mediated, as the CsA-postconditioning by the delay of the opening of

mPTP. This injection of the CsA increased the HSP70 that have a link with the mPTP since his inhibition inhibits the protection of CsA.

MATERIALS AND METHODS

1. Surgical preparation

All experiments were performed in accordance with the Principles of Laboratory animal care and French local law with number BH2012-81.

Eight to 10-week old male C57BL6 mice (Charles River, France) were anesthetized by intraperitoneal injection of xylazine (5 mg/kg, Rompun®, Bayer, Puteaux, France), ketamine (100 mg/kg, Imalgene® 1000, Acyon, Melan, France), and bupremorphine (0,075mg/kg, Vetergesic®, Sogeval, Laval, France). Body temperature was maintained at 37°C using a homeothermic pallet unit.

The animals were intubated orally using a 22-gauge catheter and ventilated with a rodent ventilator (Minivent, Harvard Apparatus, March, Germany) with a volume of 0.15 mL and a breath rate of 140 /min. After laparotomy and right nephrectomy, a 30-minute period of ischemia of the left kidney was obtained by selective clamping of the left renal vascular pedicle using a microvascular clamp (Roboz Surgical Instruments, Washington, DC). Ischemia and reperfusion were confirmed visually with the coloration of the left kidney.

2. Protocol 1: Impact of the dose of CsA on mPTP and renal function

We performed 6 groups sham (n=4), sham with 3mg/kg of CsA (n=4), sham with 10 mg/kg of CsA (n=4), ischemic (n=8), pre-conditioning with CsA with 3 mg/kg of CsA (n=8), pre-conditioning with CsA with 10 mg/kg of CsA (n=6). All animals underwent right

nephrectomy followed by a 20 min or 24-hours reperfusion period (Figure 1). Preconditioning (pre-cond) consisted in the intravenous injection of CsA at 3mg/kg (Precond-3mg/kg) or 10 mg/kg (precond-10 mg/kg), 10 min before the ischemia. Immediately after the surgical procedure, the mice were hydrated with a subcutaneous injection of 1 mL of 0.9% saline. We performed withdrawn of 250 μ L of blood by retro-orbital puncture. The kidney was removed rapidly and divided in 3 samples, one for isolation of mitochondria, one for histology and one for immunoblot analysis; then mice were euthanized under deep anaesthesia.

3. Protocol 2: Link between HSP 70 and mPTP in renal protection of CsA

In this new set of experiments, mice received Quercetin (100mg/kg, I.P, sigma aldrich, saint Quentin-fallavier, France), an inhibitor of HSP70 in the sham mice (n=4) and 2 hours before the CsA injection (n=6). We sacrificed the mice after 20 min and 24h of reperfusion and then we performed the same procedure than in protocol 1.

4. Renal parameters

Assessment of acute renal failure was determined 24h after reperfusion by measuring the serum concentration of urea and creatinine. Urea was measured with urease test and serum creatinine was measured by an enzymatic method (Vista 1500, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). Renal tissues were embedded in formol. Four-micrometer sections were stained with periodic acid-Schiff reagents. Tubular injury was scored semi-quantitatively using a scoring system ranging from 0 to 4 by a blinded pathologist who examined at least 10 fields (\times 200 magnification). Tubular injury was defined as a tubular dilatation, sloughing of tubular

epithelial cells, or naked tubular basement membrane. Only tubules in the outer stripe of the outer medulla (most sensitive zone for ischemic injury) were included in the following scoring system: 0=no tubular injury; 1=<20% of tubules injured; 2=21–50% tubules injured; 3=>50% damage of tubule cells; 4=total destruction of all epithelial cells ³¹.

5. Mitochondrial explorations

a. Preparation of isolated mitochondria

For mitochondrial isolation, the kidney was excised and immediately placed in a cold isolation buffer, containing (0.25 M sucrose, 2 mM EGTA and 10 mM Tris, pH 7.4). The tissue was cut with scissors and mixed in the same buffer (10 μ L buffer/mg tissue) with a Potter-Elvehjem. The homogenate was centrifuged at 600 g for 7 min and the supernatant at 6400 g for 10 min. The mitochondrial pellet was suspended the mitochondrial pellet was suspended and homogenized in the same buffer without calcium chelating agent. Protein weight was measured according to the Bradford method.

b. Calcium retention capacity

The calcium retention capacity (CRC) represents the amount of Ca^{2+} necessary to trigger a massive Ca^{2+} release (expressed as nmol Ca^{2+} /mg mitochondrial proteins) by mitochondria into the cytosol as described by Ichas et al ³². CRC is a functional test of the resistance of mPTP pore opening to a calcium overload. Isolated mitochondria (250 μ g proteins) were suspended in 2 mL of buffer C (150 mM sucrose, 50 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , 5 mM succinic acid in 20 mM Tris–Hcl pH 7.4) in a polystyrene cuvette. Extra-mitochondrial Ca^{2+} concentration was measured with a Hitachi F2500 spectrofluorometer in the presence of 0.8 μ mol Calcium Green-5N (with excitation and emission wavelengths set at 500 and 530 nm,

respectively). Ten nM CaCl₂ pulses were performed every minute. Each CaCl₂ injection causes a peak of extra-mitochondrial Ca²⁺ concentration; then Ca²⁺ is reabsorbed by the mitochondria, resulting in a return to near-baseline level of the extra-mitochondrial Ca²⁺ concentration (Fig. 2). The abrupt increase of extra-mitochondrial Ca²⁺ concentration indicates a massive release of Ca²⁺ by mitochondria due to the opening of mPTP.

c. Oxidative phosphorylation

Mitochondrial respiratory function is measured at 25°C using a Clark-type oxygen method electrode (Oroboros oxygraph, Austria). Mitochondria (250 µg proteins) were incubated in the respiration buffer (pH7.4) containing 80 mM KCl, 50 mM MOPS, 1mM EGTA, 5 mM KH₂PO₄ and 1mg/mL defatted BSA. Pyruvate/malate/glutamate (complex I substrates, 3 mM each) The measurement of oxygen consumption is expressed in nmol of oxygen/min/ mg of protein. The state 3 is the actively respiring state, i.e the maximal oxygen consumption stimulated by ADP when all required components are presents; the state 4 is the oxygen consumption after completion of ADP phosphorylation, characterized by a low respiration rate. The respiratory control index (RCI) was determined with the ratio state3/state 4 and indicates the tightness of the coupling between respiration and phosphorylation, i.e the capacity of the mitochondria to consume oxygen for producing ATP.

6. Immunoblot analysis

Thirty to hundred µg protein samples were separated by SDS-PAGE (12-15% acrylamide) and transferred to nitrocellulose membranes. Blots were blocked with 5% non-fat milk or BSA in Tris-buffered saline (TBS). Then, membranes were incubated with primary antibodies: antibodies direct against HSP70 (1/500) (BD transduction laboratories, France) at

4°C overnight. All antibodies were incubated in TBS-Tween20 (0.05%)-1% BSA or non fat milk. Blots were then washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated appropriate anti-IgG (1/10000) for 1 hour at room temperature. Enhanced chemiluminescence was performed with the ECL Western blot detection kit (Amersham, GE Healthcare Europe GmbH, Saclay, France) according to the manufacturer's instructions, and blots were exposed to hyperfilm. Equal loading was evaluated by GAPDH staining. Density of protein bands was computerized (Image J software, NIH, Bethesda, Maryland, USA) and expressed relative to the WT group values.

7. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM. Difference between several groups was assessed with ANOVA one way and boferroni correction. Groups were compared using the Mann and Witney test (Graphpad software®). A difference of $p < 0.05$ was considered significant.

1. Lemoine S, Pillot B, Rognant N *et al.* Postconditioning With Cyclosporine A Reduces Early Renal Dysfunction by Inhibiting Mitochondrial Permeability Transition. ... 2015.
2. Yang CW, Ahn HJ, Han HJ *et al.* Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506 reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation* 2001; **72**: 1753–1759.
3. Yang CW, Ahn HJ, Jung JY *et al.* Preconditioning with cyclosporine A or FK506 differentially regulates mitogen-activated protein kinase expression in rat kidneys with ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2003; **75**: 20–24.
4. Zhu T, Au-Yeung KKW, Siow YL *et al.* Cyclosporine A protects against apoptosis in ischaemic/reperfused rat kidneys. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2002; **29**: 852–854.
5. O'Neill S, Harrison EM, Ross JA *et al.* Heat-Shock Proteins and Acute Ischaemic Kidney Injury. *Nephron Exp Nephrol* 2014; **126**: 167–174.
6. Mayer MP. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences* 2013; **38**: 507–514.
7. Wang Z, Gall JM, Bonegio RGB *et al.* Induction of heat shock protein 70 inhibits ischemic renal injury. *Kidney Int* 2011; **79**: 861–870.
8. Basile DP, Donohoe D, Cao X *et al.* Resistance to ischemic acute renal failure in the Brown Norway rat: a new model to study cytoprotection. *Kidney Int* 2004; **65**: 2201–2211.
9. Wang X, Yuan B, Dong W *et al.* Induction of Heat-Shock Protein 70 Expression by Geranylgeranylacetone Shows Cytoprotective Effects in Cardiomyocytes of Mice under Humid Heat Stress. Nikolaidis N, ed. *PLoS ONE* 2014; **9**: e93536.
10. Fuller TF, Rose F, Singleton KD *et al.* Glutamine Donor Pretreatment in Rat Kidney Transplants with Severe Preservation Reperfusion Injury. *Journal of Surgical Research* 2007; **140**: 77–83.
11. Singh D, Chander V, Chopra K. Cyclosporine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Toxicology* 2005; **207**: 339–347.
12. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF *et al.* Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovascular Research* 2002; **55**: 534–543.
13. Leducq N, Delmas-Beauvieux MC, Bourdel-Marchasson I *et al.* Mitochondrial and energetic dysfunctions of the liver during normothermic reperfusion: protective effect of cyclosporine and role of the mitochondrial permeability transition pore. *TPS* 2000; **32**: 479–480.
14. Leger P-L, De Paulis D, Branco S *et al.* Experimental Neurology. *Experimental Neurology* 2011; **230**: 58–66.

15. Cour M, Abrial M, Jahandiez V *et al.* Ubiquitous protective effects of cyclosporine A in preventing cardiac arrest-induced multiple organ failure. *Journal of Applied Physiology* 2014; **117**: 930–936.
16. Soriano ME, Nicolosi L, Bernardi P. Desensitization of the Permeability Transition Pore by Cyclosporin A Prevents Activation of the Mitochondrial Apoptotic Pathway and Liver Damage by Tumor Necrosis Factor. *Journal of Biological Chemistry* 2004; **279**: 36803–36808.
17. Feldkamp T, Park JS, Pasupulati R *et al.* Regulation of the mitochondrial permeability transition in kidney proximal tubules and its alteration during hypoxia-reoxygenation. *AJP: Renal Physiology* 2009; **297**: F1632–F1646.
18. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH *et al.* Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005.
19. Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sangliferin A Acts as a Potent Inhibitor of the Mitochondrial Permeability Transition and Reperfusion Injury of the Heart by Binding to Cyclophilin-D at a Different Site from Cyclosporin A. *Journal of Biological Chemistry* 2002; **277**: 34793–34799.
20. Devalaraja-Narashimha K, Diener AM, Padanilam BJ. Cyclophilin D gene ablation protects mice from ischemic renal injury. *AJP: Renal Physiology* 2009; **297**: F749–F759.
21. Park JS, Pasupulati R, Feldkamp T *et al.* Cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition in kidney proximal tubules after hypoxic and ischemic injury. *AJP: Renal Physiology* 2011; **301**: F134–F150.
22. Serviddio G, Romano AD, Gesualdo L *et al.* Postconditioning is an effective strategy to reduce renal ischaemia/reperfusion injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008; **23**: 1504–1512.
23. Paillard M, Gomez L, Augeul L *et al.* Postconditioning inhibits mPTP opening independent of oxidative phosphorylation and membrane potential. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009; **46**: 902–909.
24. Abraham JS, Bentley FR, Garrison RN *et al.* Cyclosporine A directly constricts intrarenal arterioles. *TPS* 1991; **23**: 356–359.
25. Sullivan BA, Hak LJ, Finn WF. Cyclosporine nephrotoxicity: studies in laboratory animals. *TPS* 1985; **17**: 145–154.
26. Bagnis C, Deray G, Dubois M *et al.* Prevention of acute cyclosporin nephrotoxicity by verapamil and atrial natriuretic factor in the rat. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1994; **9**: 1143–1148.
27. Suzuki S, Maruyama S, Sato W *et al.* Geranylgeranylacetone ameliorates ischemic acute renal failure via induction of Hsp70. *Kidney Int* 2005; **67**: 2210–2220.
28. Bidmon B, Endemann M, Müller T *et al.* Heat shock protein-70 repairs proximal tubule structure after renal ischemia. *Kidney Int* 2000; **58**: 2400–2407.

29. Jayakumar J, Suzuki K, Sammut IA *et al.* Heat shock protein 70 gene transfection protects mitochondrial and ventricular function against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2001; **104**: I303–7.
30. Neill SOA, Hughes J. Heat-shock protein-70 and regulatory T cell-mediated protection from ischemic injury. 2013; **85**: 5–7.
31. Wei Q, Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *AJP: Renal Physiology* 2012; **303**: F1487–F1494.
32. Ichas F, Jouaville LS, Sidash SS *et al.* Mitochondrial calcium spiking: a transduction mechanism based on calcium-induced permeability transition involved in cell calcium signalling. *FEBS Letters* 1994; **348**: 211–215.

Table 1

	20 min of reperfusion			24h of reperfusion		
	State 3	State 4	RCI	State 3	State 4	RCI
Sham	53 ± 17*	8 ± 1	4.9 ± 0.17 *	63 ± 15 *	12 ± 2	5.2 ± 0.7
Ischemic	20 ± 4	6 ± 2	3 ± 0.7	27 ± 15	15 ± 14	2 ± 1 *
Precond-3mg/kg	30 ± 8	8 ± 3.3	3 ± 0.8	54 ± 3 *	16 ± 3	3 ± 0.9 *
Precond-10 mg/kg	31 ± 9	8 ± 1	3.4 ± 0.9	44 ± 6 *	12 ± 1.7	3.9 ± 0.3 *
Precond-10 mg/kg+Q	18 ± 4	5.7 ± 2.4	2.8 ± 0.2	26 ± 5	6 ± 1	4 ± 0.4 *

Table 1: Oxidative Phosphorylation. State 3 and state 4 were measured in isolated mitochondria with pyruvate/malate/glutamate as substrates of complex I and are expressed in nmol O₂/min/mg of proteins. RCI: respiratory control index (state3/state4). Values are mean ± SD. (n=4 to 8). The oxidative phosphorylation is measured at 20 min or 24 h of reperfusion.

* p< 0.05 vs ischemic

Legends to figures

Figure 1:

Experimental design: All groups except sham underwent 30 min of ischemia with contralateral nephrectomy followed by 20 min or 24h of reperfusion. The CsA is injected at 3 or 10 mg/kg 10 min before ischemia. The inhibitor of HSP70 is injected 2h before the injection of CsA. (n=4 to 8 per groups).

Figure 2: Sham groups. A. Serum creatinine in the 3 different sham groups. There is no difference between the 3 groups. B. Histological score. There is no difference between the 3 groups. C. Retention calcic capacity. The increased dose of CsA increased the CRC, with a significant difference between the Sham-10 mg/kg group vs sham and sham + 3 mg/kg group.

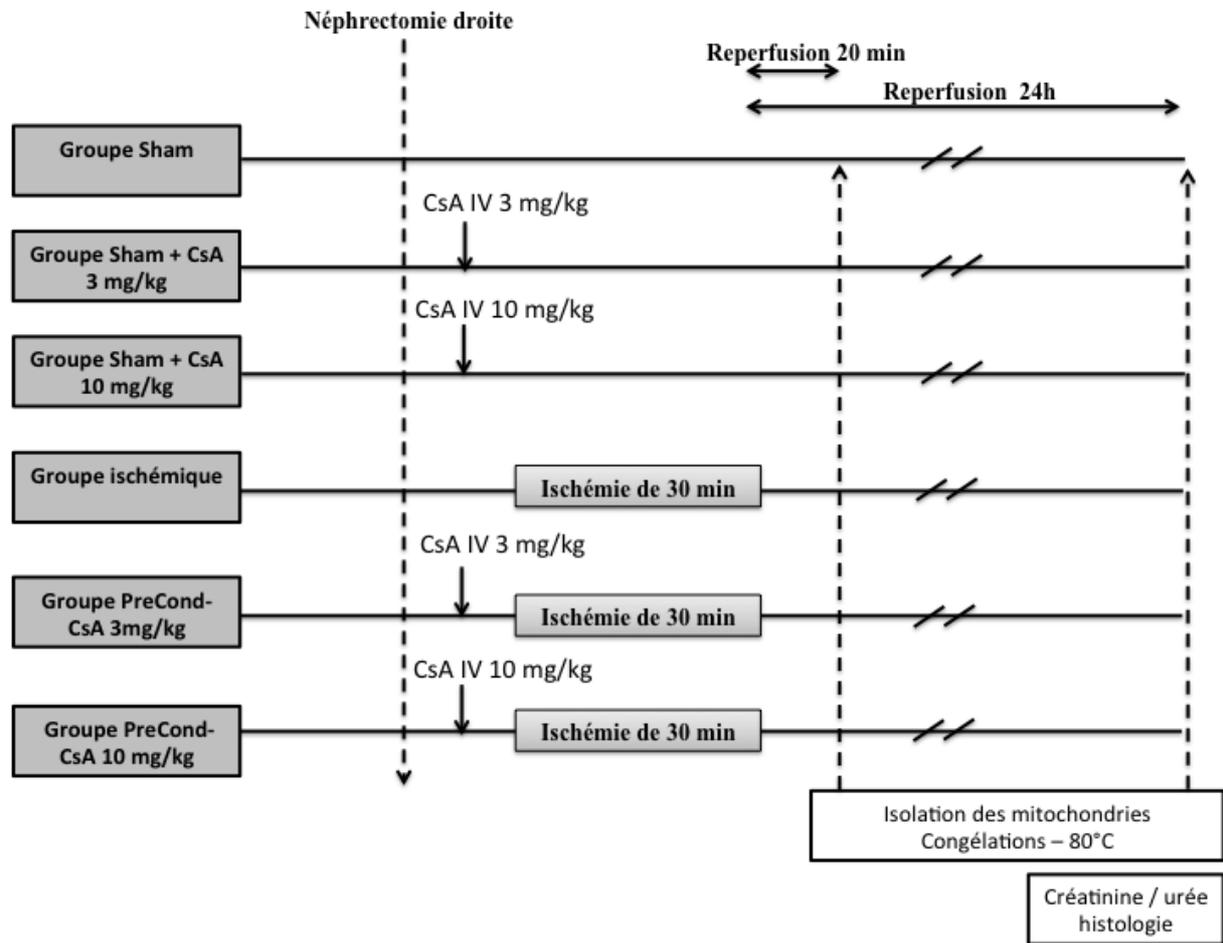
Figure 3 : A. Plasma creatinine levels B. Urea levels on 250 μ L of blood. C. Histological score at 24h of reperfusion * for $p < 0.05$ vs control. E. Sham F. Ischemic group. G. Pre-cond 3-mg/kg group and I/ PRecond-10mg/kg group. Tubular injury was defined as a tubular dilatation, sloughing of tubular epithelial cells, or naked tubular basement membrane. the following scoring system: was used 0=no tubular injury; 1=<20% of tubules injured; 2=21–50% tubules injured; 3=>50% damage of tubule cells; 4=total destruction of all epithelial cells.

Figure 4: Calcic retention capacity.at 20 min and 24 h of reperfusion. Inhibition of mPTP opening was significantly reduced in ischemic group vs sham. The CRC of thePre-CsA 10mg/kg is improved at 20 min and 24h of reperfusion, vs ischemic and precond-3 mg/kg respectively. * $p < 0.05$ vs ischemic. B. Calcic retention capacity with CsA 10 μ L in the cuvette.

Figure 5: protocol2: analysis with the inhibitor of HSP70. A. Western blot of HSP70. HSP70 is increased in the precond-10 mg/kg group. B. Plasma creatiine levels. No protection with the inhibitor of HSP70/. C. Calcic retention capacity. CRC is decreased by Quercetin. D. Hsitological score. The inhibition of HSP70 increased the histological score. E. histological analysis for sham + quercetin. F: histological analysis for PRecond10 mg/kg and quercetin.

Figure 1:

Protocol 1



Protocol 2

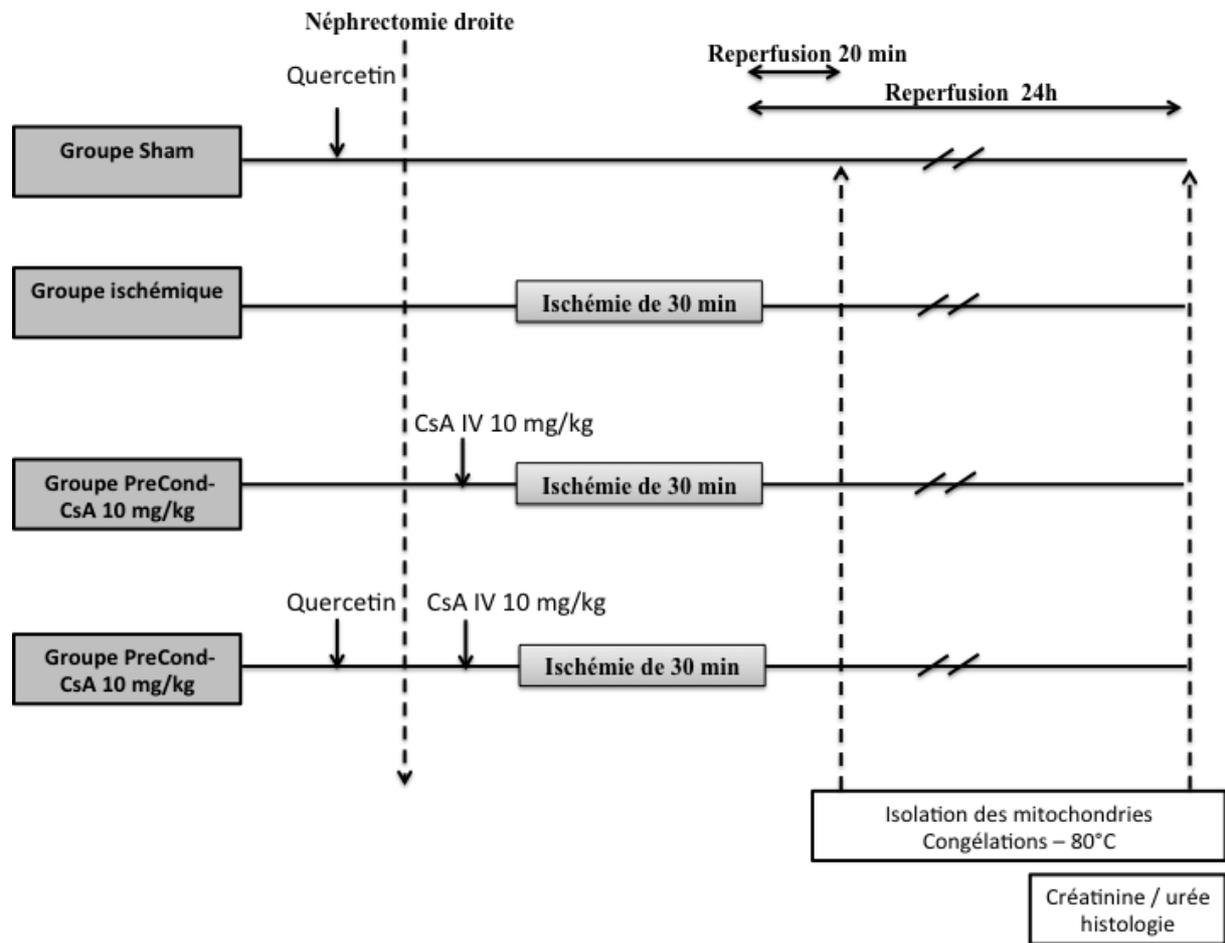


Figure 2 :

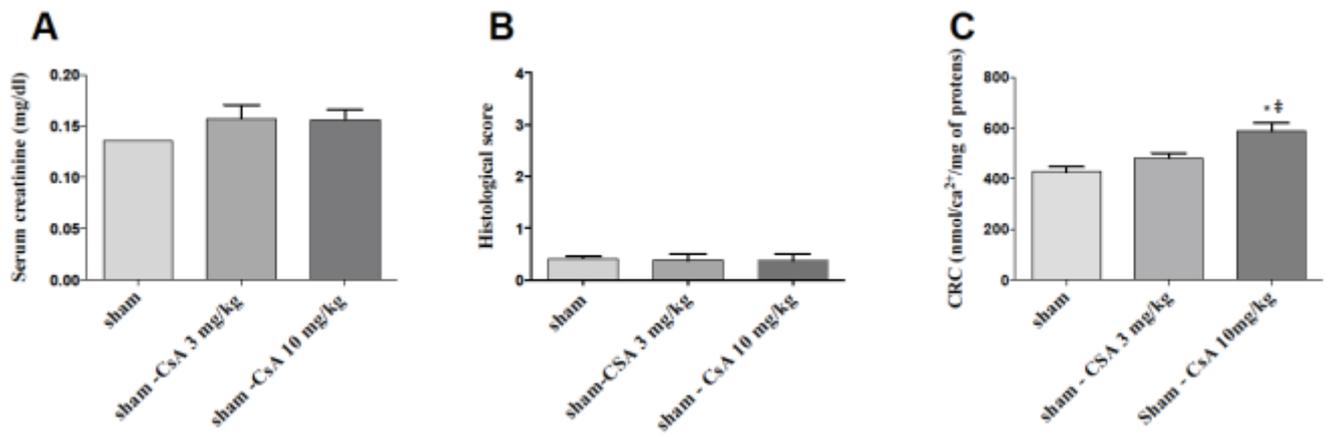


Figure 3

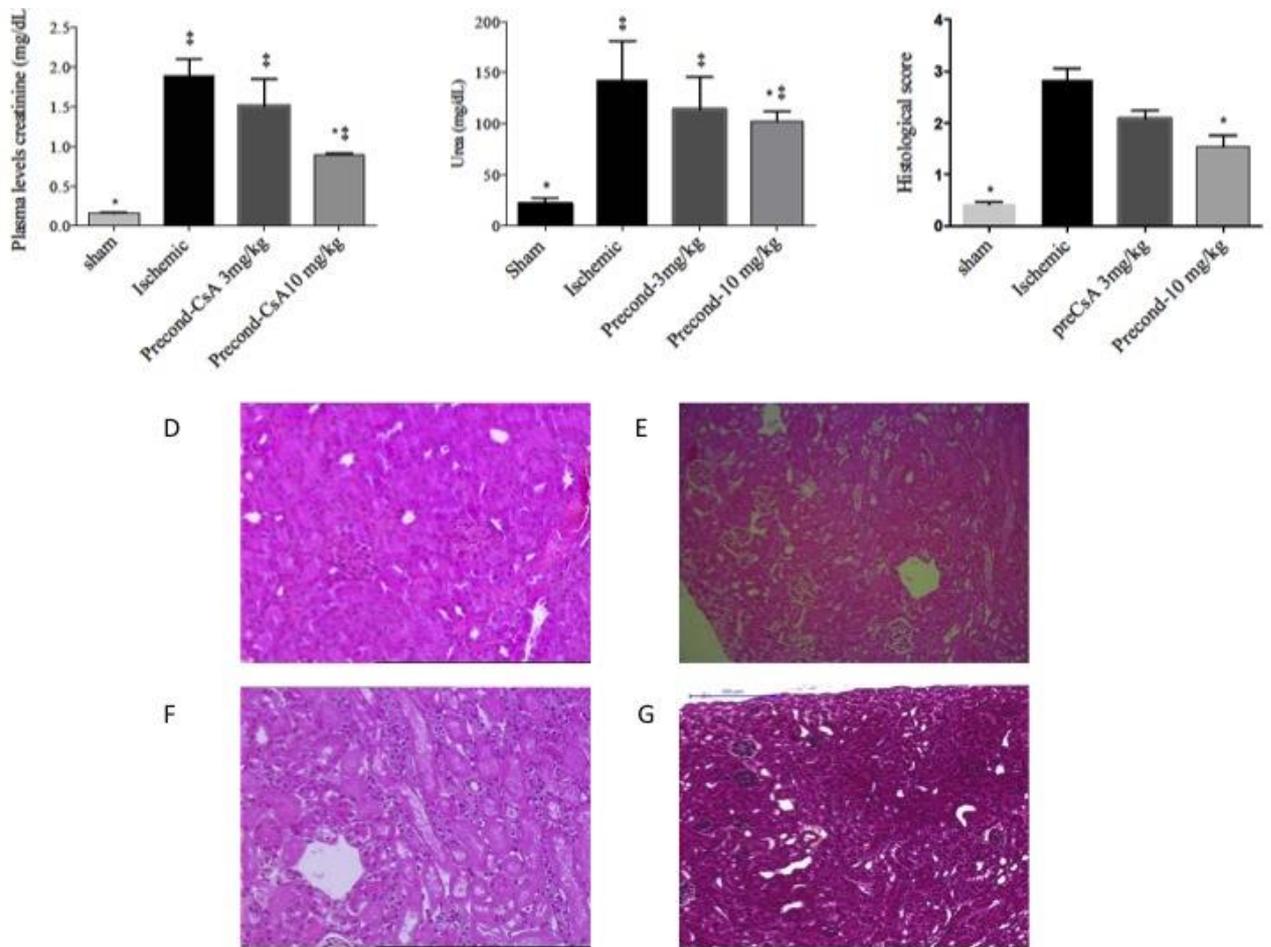


Figure 4:

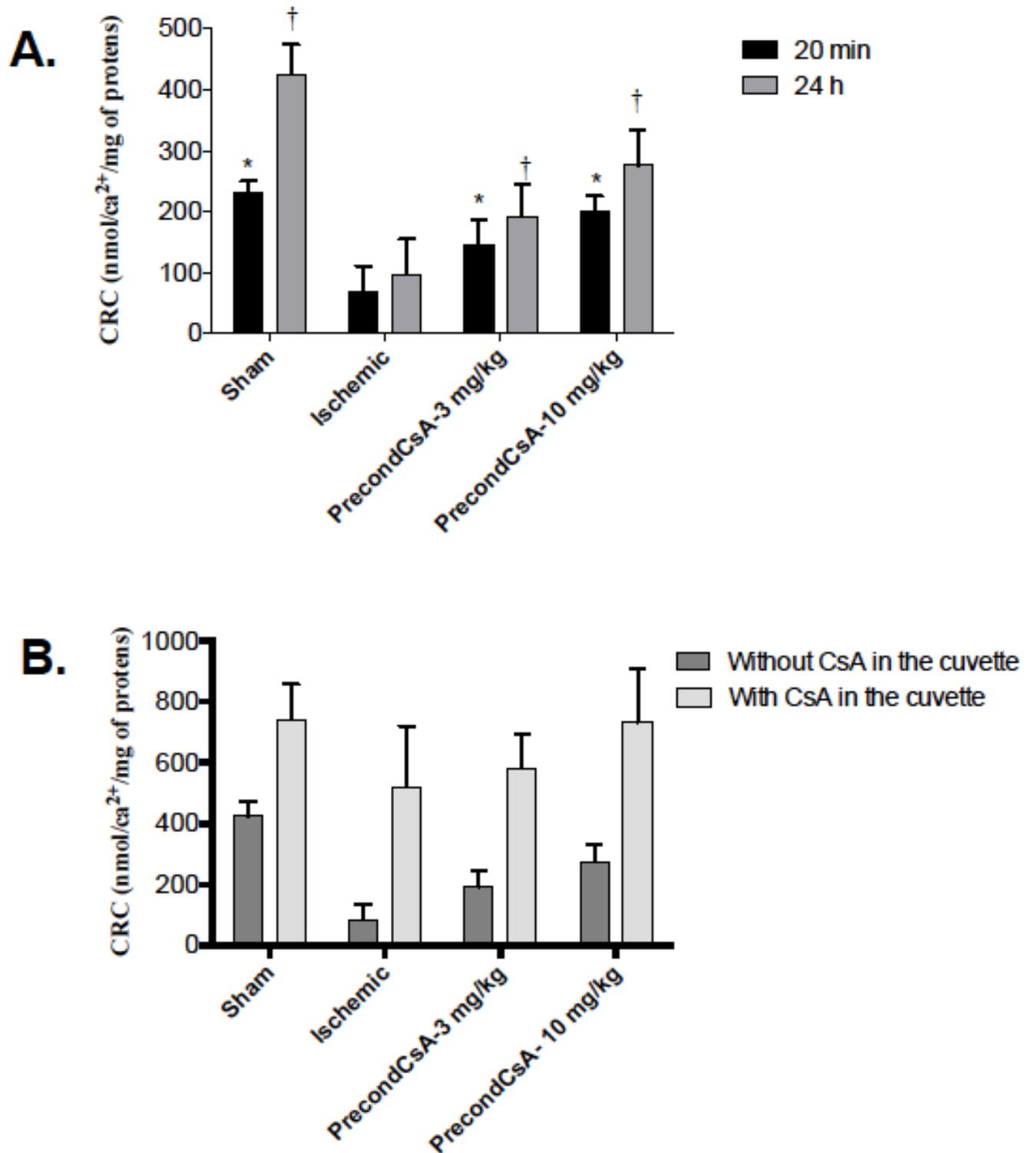
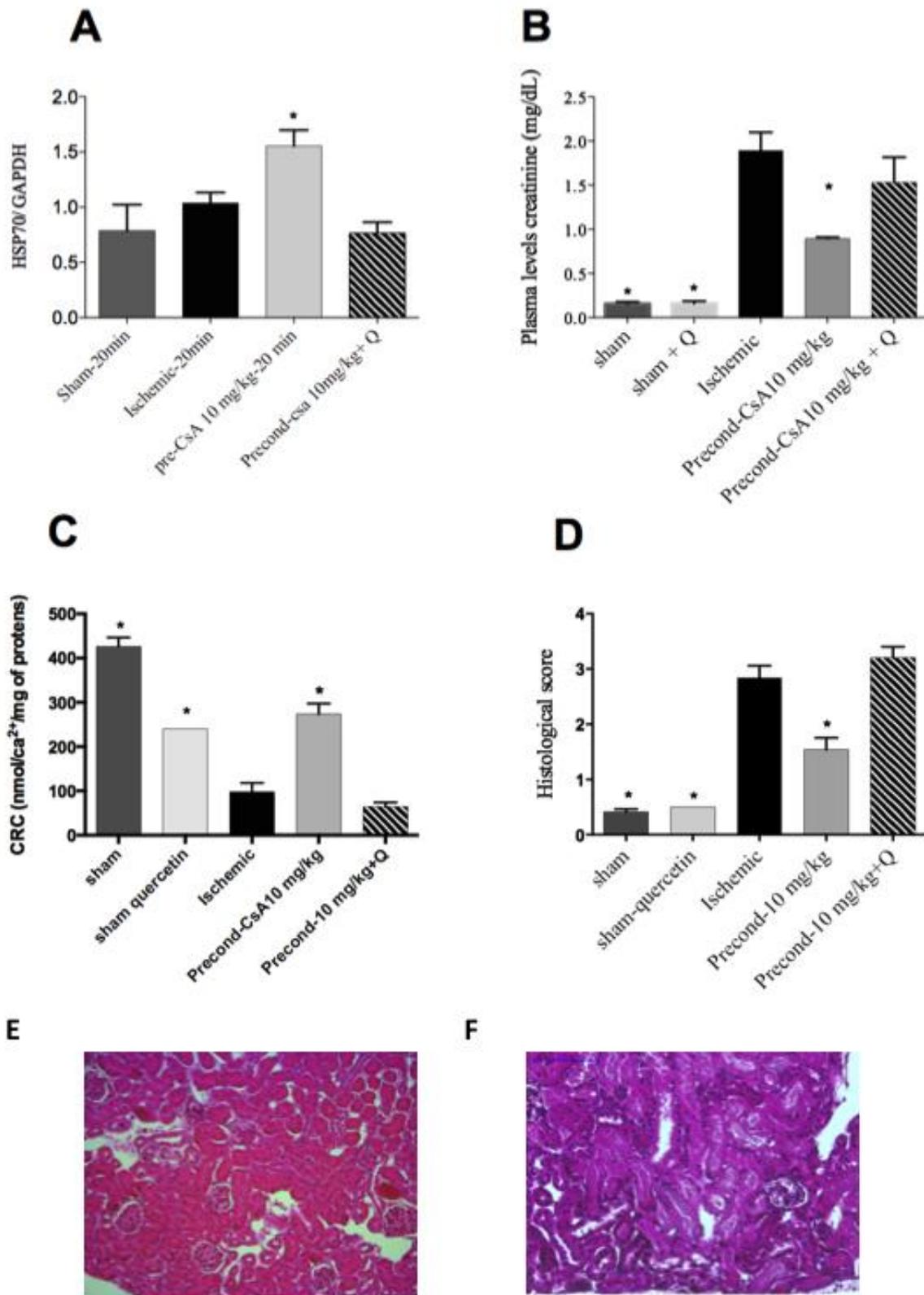


Figure 5



B. Résultats complémentaire :

D'autres résultats non soumis dans cet article complètent notre travail:

1. Dosage des taux résiduel de CsA

Afin de monitorer la toxicité éventuelle de la dose de CsA injectée à la souris, nous avons réalisé un dosage du taux résiduel de CsA 24h après l'injection de CsA (n=2 pour précond-3mg/kg et précond-10 mg/kg). Le taux résiduel est de 30 $\mu\text{g/L}$ pour le groupe précond-3mg/kg et de 36 $\mu\text{g/L}$ pour le groupe précond-10 mg/kg.

Par ailleurs, nous avons également réalisé un dosage de la CsA au niveau du surnageant après préparation des mitochondries pour réaliser un dosage de CsA. La dose moyenne dans le groupe précond-CsA 3 mg/kg est de 1931 $\mu\text{g/L}$ (n=3) et de 3139 $\mu\text{g/L}$ dans le groupe précond-10 mg/kg (n=3). (Figure 27)

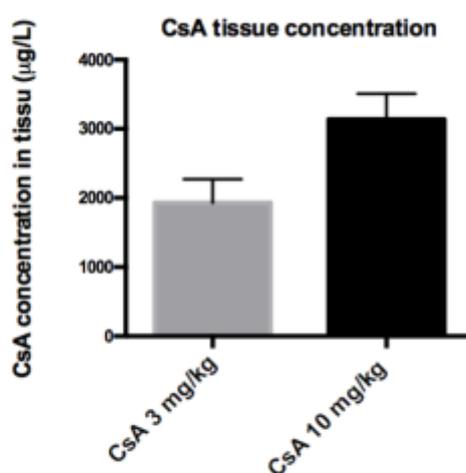


Figure 27: Concentration intra cellulaire rénale de la CsA au début de l'ischémie entre différentes doses de CsA (3 et 10 mg/kg).

2. Effet dose et effet timing dans le pré-conditionnement avec la CsA (suite)

Dans ce contexte de pré-conditionnement à la CsA, nous avons testé également dans notre modèle un pré-conditionnement à une dose de 3 mg/kg de CsA injectée 1 heure avant l'ischémie (n=6), précondCsA-1h.

2.1. Fonction rénale et histologie

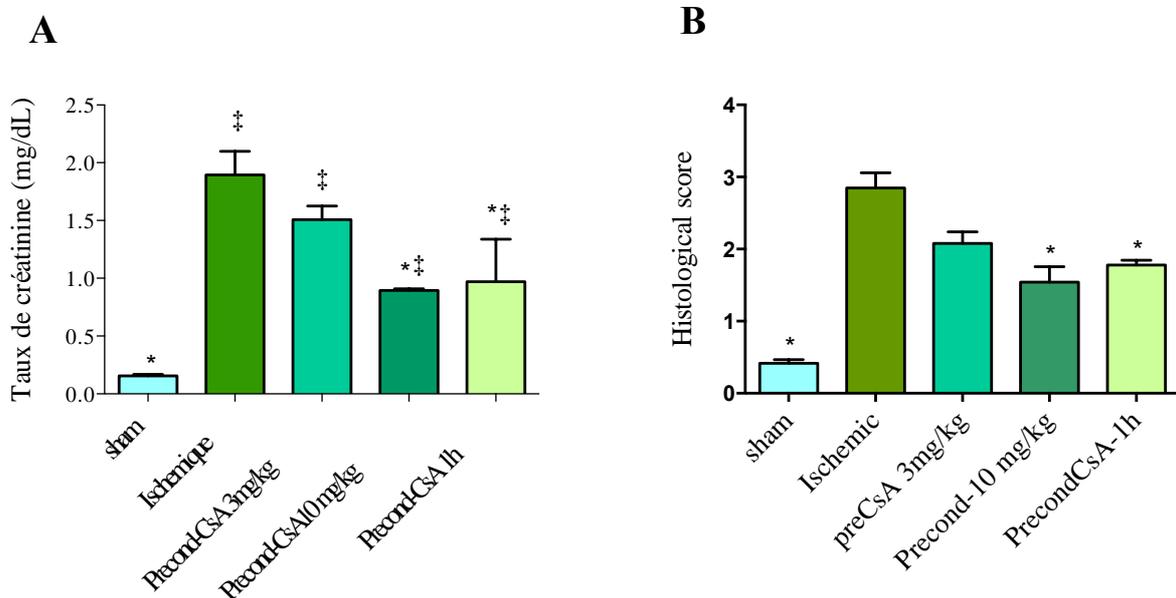


Figure 28: Dosages de la créatinine plasmatique entre le groupe préconditionnement à 3 mg/kg injecté 1h ou 10 min avant l'ischémie. A: Comparaison du taux de créatinine plasmatique dans le groupe sham (n=4), ischémique (n=6), précond-CsA 3 mg/kg 1h avant l'ischémie (n=6), précond-CsA 3 mg/kg 10 min avant l'ischémie (n=6) et précond-CsA 10 mg/kg 10 min avant l'ischémie (n=6). B: Comparaison du score histologique dans le groupe sham (n=4), ischémique (n=6), précond-CsA 3 mg/kg 1h avant l'ischémie (n=6), précond-CsA 3 mg/kg 10 min avant l'ischémie (n=6) et précond-CsA 10 mg/kg 10 min avant l'ischémie (n=6).

* $p < 0,05$ vs groupe ischémie

‡ $p < 0,05$ vs groupe sham

Il existe une diminution significative du taux de créatinine plasmatique dans le groupe précond-CsA 3 mg/kg-1h ((créatinine à $0,97 \pm 0,36$ mg/dL)) vs le groupe ischémique ($1,9 \pm 0,57$ mg/dL), $p=0,001$, et vs le groupe précond-CsA 3 mg/kg – 10 min (créatinine à $1,5 \pm 0,3$ mg/dL), $p=0,001$. Il n'y a pas de différence entre le groupe précond-CsA 3 mg/kg-1h et le groupe précond-CsA 10 mg/kg, $p=0,9$.

Les lésions histologiques du groupe précond-CsA 3 mg/kg-1h ($1,7 \pm 0,1$) sont plus faibles que les lésions du groupe ischémie (score $2,9 \pm 0,5$), $p=0,01$.

2.2. Capacité de rétention calcique et phosphorylation oxydative

2.2.1. Capacité de rétention calcique

La capacité de rétention calcique est estimée à 213 ± 78 nmol de Ca^{2+} / mg de protéines pour le groupe précond-CsA 3 mg/kg-1h, contre 192 ± 52 pour le groupe précond-CsA 3 mg/kg-10 min et 273 ± 58 nmol de Ca^{2+} / mg de protéines dans le groupe précond-CsA 10 mg/kg. Il existe une différence significative entre le groupe ischémique (84 ± 51 nmol de Ca^{2+} / mg de protéines) et le groupe précond-CsA 3 mg/kg-1h, $p=0,0001$). Il n'y a pas de différence dans la CRC entre le groupe précond-CsA 1h et précond-CsA 10 mg/kg.

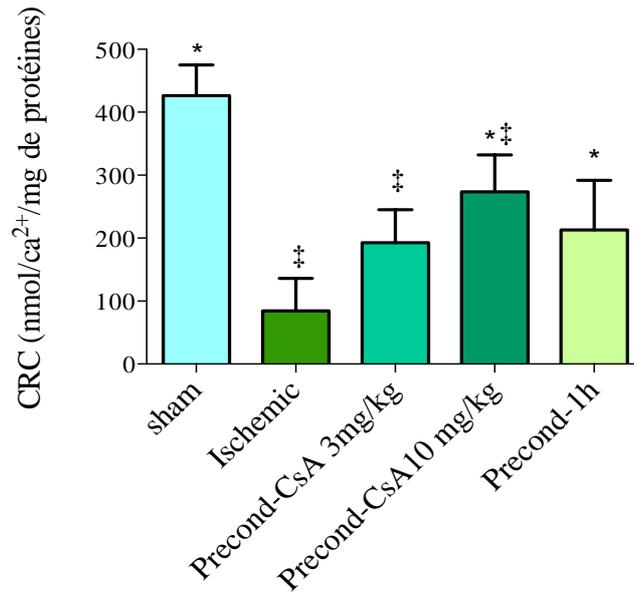


Figure 29: Capacité de rétention calcique En fonction du temps d'injection de la CsA. Comparaison de la capacité de rétention calcique dans le groupe sham (n=4), ischémique (n=6), précond-CsA 3 mg/kg 1h avant l'ischémie (n=6), précond-CsA 3 mg/kg 10 min avant l'ischémie (n=6) et précond-CsA 10 mg/kg 10 min avant l'ischémie (n=6).

* p<0,05 vs le groupe ischémie

‡ p<0,05 vs le groupe sham

2.2.2. Phosphorylation oxydative

	Sham	Ischémie	PrécondCsA- 3mg/kg 10 min	PrécondCsA- 10mg/kg 10 min	PrécondCsA- 1h
Etat 3	63 ± 12 *	27 ± 15	54 ± 20 *	44 ± 6 *	42 ± 8,4 *
Etat 4	12 ± 2	15 ± 14	16 ± 3	12 ± 2	10 ± 3
RCI	5,1 ± 0,6 *	2,6 ± 1,2	3 ± 1 *	3,9 ± 0,3 *	4 ± 0,4 *

Tableau 5: Phosphorylation oxydative pour le complexe I dans le groupe sham (n=4), ischémique (n=6), précond-CsA 3 mg/kg 1h avant l'ischémie (n=6), précond-CsA 3 mg/kg 10 min avant l'ischémie (n=6) et précond-CsA 10 mg/kg 10 min avant l'ischémie (n=6).

* p<0,05 vs groupe ischémique

3. Comparaison entre l'efficacité du pré-conditionnement et celle du post-conditionnement

Avant de proposer une application en recherche clinique, il est intéressant de déterminer quel type de conditionnement pourrait-être le plus efficace.

La mortalité des souris préCond-CsA 10 mg/kg est de 0%, de 8% pour les souris postCsA et de 20% pour les souris PostCI. Cette mortalité supérieure dans le groupe PostCI tient de la difficulté chirurgicale à réaliser un clampage-déclampage sans léser le pédicule vasculaire dans un modèle murin. Il n'y a pas de différence significative en terme de créatinine entre les 3 protections, bien que la moyenne du postCsA soit tout de même plus élevée. Il n'y a pas de différence significative en terme de CRC entre les 3 groupes.

En somme, la seule différence retrouvée dans ces différents conditionnements est la mortalité.

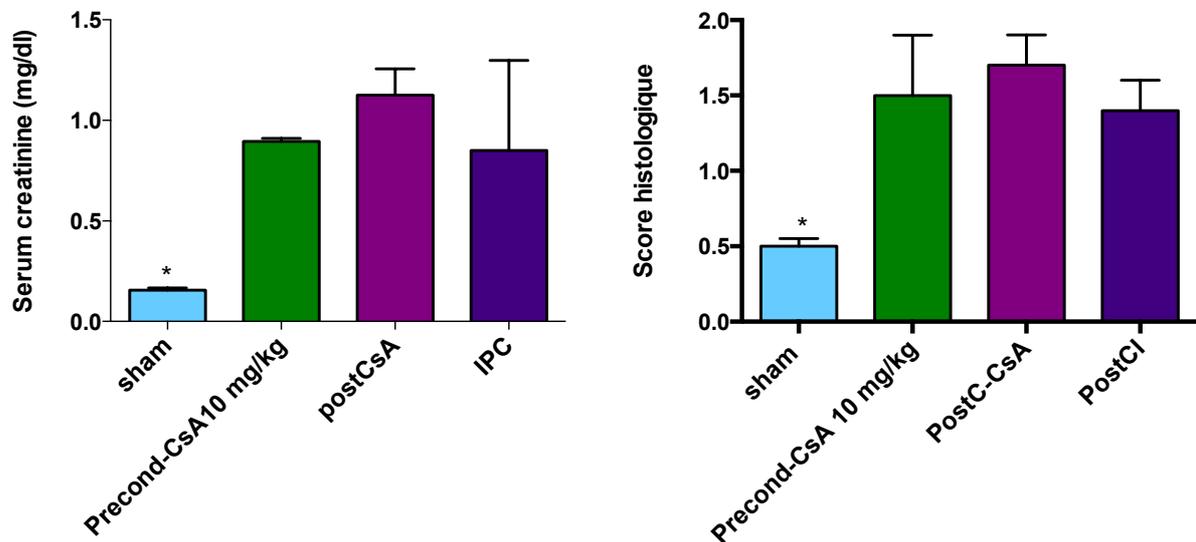


Figure 30: Comparaison de la fonction rénale entre le pré-conditionnement par la CsA, le post conditionnement par la csA et le PostCI.

* $p < 0,05$ vs groupe précond-CsA 10 mg/kg

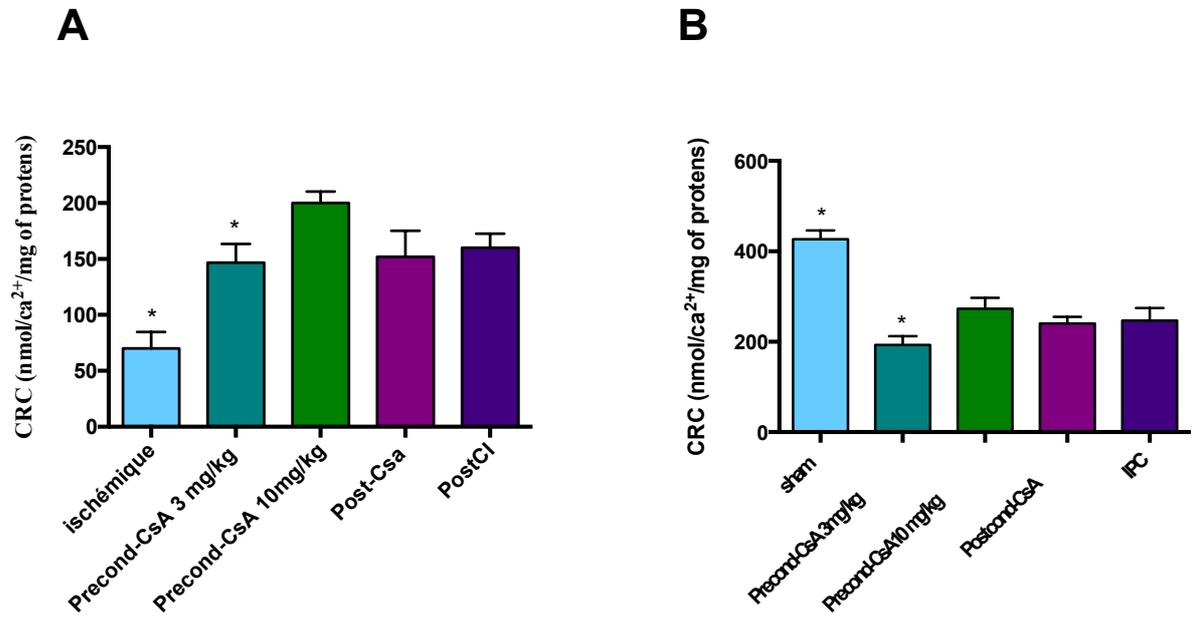


Figure 31: Comparaison de le CRC entre le préconditionnement par la CsA, le post conditionnement par la csA et le PostCI. A. CRC à 20 min de reperfusion. B. CEC à 24h de reperfusion.

* $p < 0,05$ vs groupe précond-CsA 10 mg/kg

4. Ischémie-reperfusion chez les souris cypD-KO

4.1. Fonction rénale

Il existe une différence significative entre la créatininémie des souris C57BL6 ischémiques et les souris CypD-KO ischémiques, $p=0,04$. Cependant il n'existe pas de différence en terme d'histologie entre les souris ischémiques C57BL6 et cypD-KO.

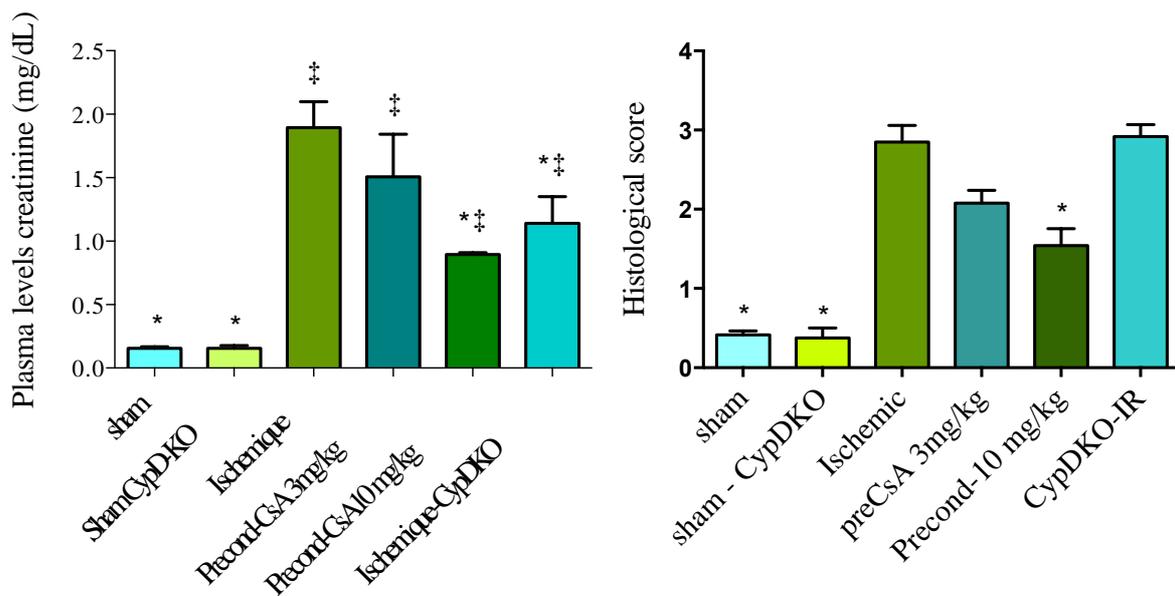


Figure 32: Taux de créatinine plasmatique et score histologique au cours de l'IR des souris CypD-KO.

* $p<0,05$ vs groupe ischémie

‡ $p<0,05$ vs groupe sham

4.2. Fonction mitochondriale

4.2.1. Capacité de rétention calcique

La CRC augmente de manière significative chez les souris sham qui ont eu une injection de CsA et chez les sham CypD KO. Il existe une différence significative entre la CRC des souris cypD KO et des souris qui ont eu une injection de CsA.

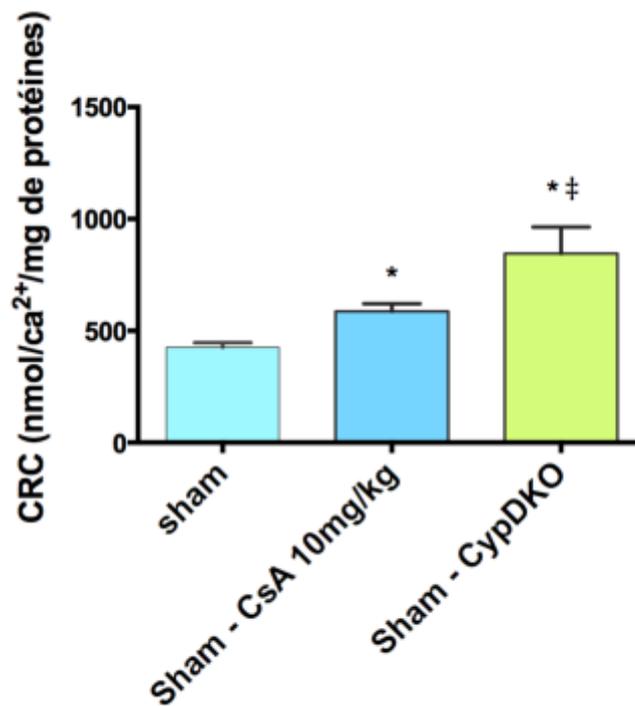


Figure 33: Comparaison de la mesure de la capacité de rétention calcique entre les souris sham C57BL6 et cypD KO dans le rein.

* $p < 0,05$ vs groupe sham

‡ $p < 0,05$ vs sham – CsA 10 mg/kg

Chez les souris ischémiques, la CRC est significativement augmentée chez les souris cypD KO comparée aux souris protégées par la CsA, à 20 min et à 24h de reperfusion.

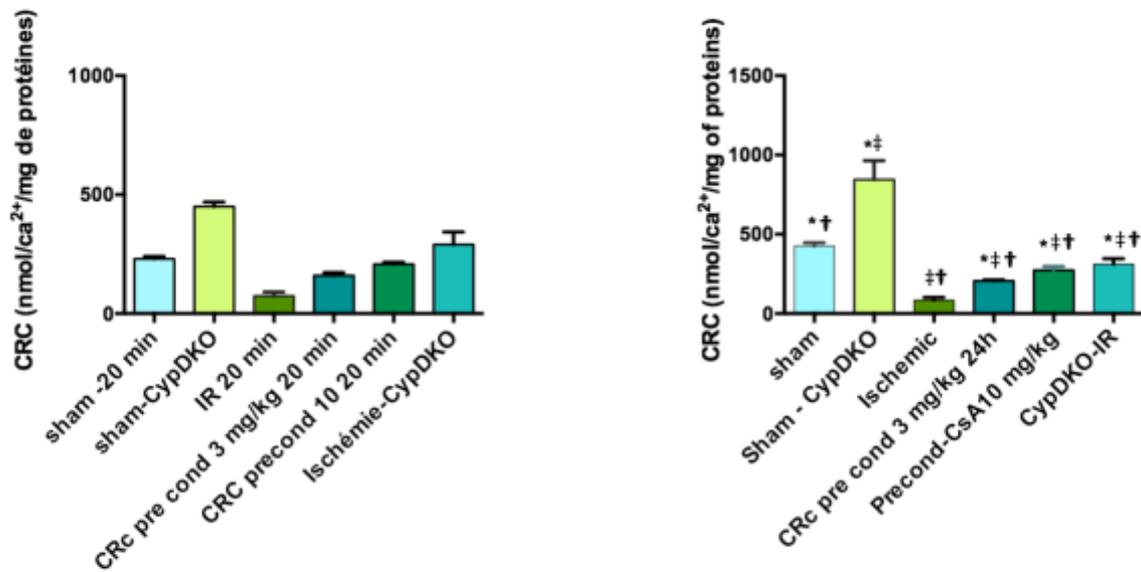


Figure 34: Comparaison de la mesure de la capacité de rétention calcique entre les souris ischémiques C57BL6 et cypD KO et les souris protégées par la CsA dans le rein.

* vs sham

† vs CypD-IR

‡ vs IR

Il n'y a pas de différence entre la CRC des souris cypD KO avec ou sans CsA dans la cuve.

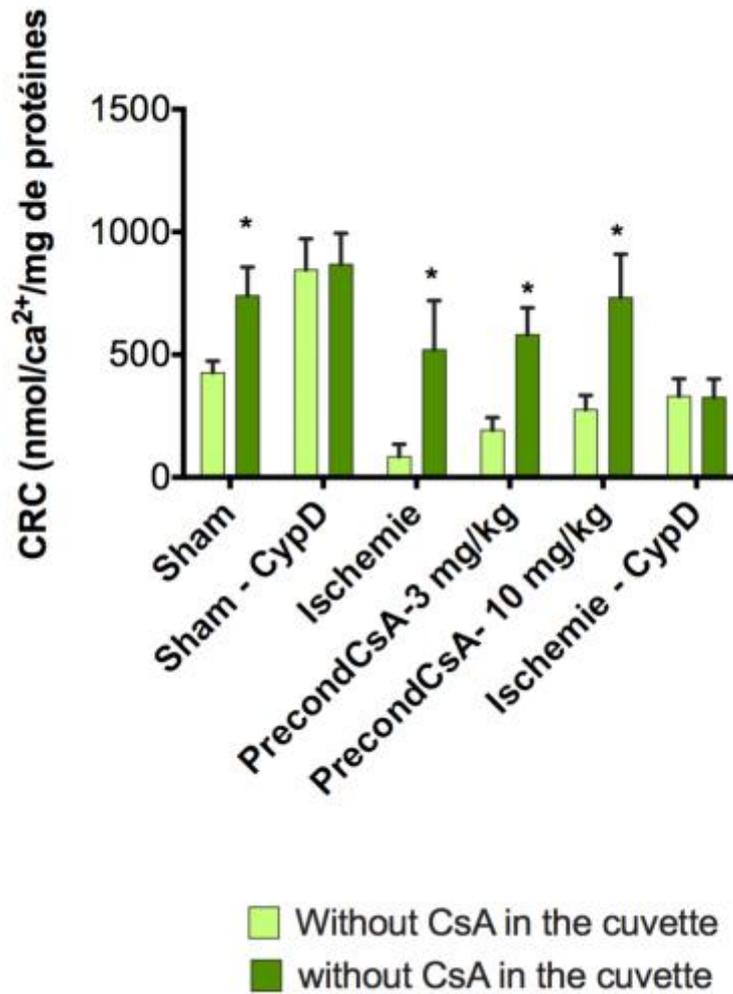


Figure 35: Comparaison de la mesure de la capacité de rétention calcique entre les souris ischémiques C57BL6 et cypD KO et les souris protégées par la CsA dans le rein avec ou sans CsA dans la cuve.

* vs le groupe sans CsA dans la cuve

4.2.2. Phosphorylation oxydative

	Sham C57BL6	Sham CypD KO	Ischémique C57BL6	Ischémique CypD KO
Etat 3	58 ± 12	65 ± 14	31 ± 19 *	39 ± 22 *
Etat 4	12 ± 2,3	13 ± 2,6	11 ± 9	11 ± 6
RCI	5,2 ± 0,57	4,8 ± 0,25	2,8 ± 1,3 *	3,3 ± 0,6 *

Tableau 6 : Phosphorylation oxydative dans le groupe cypD-KO.

Il n'y a pas de différence à 24h de reperfusion entre les souris ischémiques C57BL6 et les souris ischémiques CypD KO tant au niveau de l'état 3 que du RCI. Il n'y a pas de différence entre les souris sham C57BL6 et les souris CypD KO.

C. Synthèse et discussion

L'injection intra veineuse de CsA a pour conséquence une concentration élevée de CsA intra-cellulaire à 10 min de l'injection au moment de l'ischémie. Les résultats des taux résiduels à 24h montrent que nous ne sommes pas dans des situations d'immunosuppression chronique où le taux résiduel de CsA varie habituellement entre 80 et 150 µg/L.

Nos résultats confirment également que les séquences d'injection de la CsA ainsi que la dose injectée sont déterminantes. Plus l'injection de CsA est rapprochée de l'ischémie, plus la dose doit être importante. Ce sont des informations à prendre en compte dans l'application à la clinique. Dans le préconditionnement ischémique, il a déjà été montré que l'algorithme de courtes séquences d'ischémie-reperfusion avant une ischémie longue est déterminant dans la néphroprotection (159). De la même manière, il semble qu'une dose croissante de CsA *in vitro* sur les cardiomyocytes augmente la résistance à l'ouverture du mPTP. Par ailleurs, Soriano *et al.* discutent également l'efficacité de la dose de CsA sur le mPTP dans l'IR hépatique, avec une dose d'efficacité maximale de 5 mg/kg (318). Dans la littérature, en fonction de l'espèce animale et de l'organe étudié, les doses injectées de CsA sont différentes (319). En effet, une dose de 10 mg/kg de CsA est injectée à la souris et au rat (202), une dose de 5 ou 10 mg/kg au lapin (132,231) et une dose de 5 mg/kg au porc (320) dans le coeur. Dans le cerveau, une dose de 10 mg/kg est injectée aux souris (321). Comme nous avons précédemment décrit, l'utilisation de la CsA dans le rein est plus délicate du fait d'un effet hémodynamique direct sur la vascularisation rénale. La seule dose testée dans les publications antérieures était une dose de 3 mg/kg 6h avant l'ischémie (280,281). Dans notre travail, nous

avons donc testé différentes doses de CsA (3 et 10 mg/kg), et différents timing (1h et 10 min avant l'ischémie). Rapprocher l'injection de CsA semblait important dans l'optique d'une application à la clinique. En effet, l'injection 6h avant peut-être plus difficile à anticiper qu'une injection 10 min avant, en termes de planning opératoire. Nous confirmons au niveau rénal ce qui avait été précédemment décrit dans les autres organes, à savoir une résistance croissante à l'ouverture du mPTP avec une dose croissante de CsA. Nous avons donc pu mettre en évidence que la dose de CsA à injecter pour une protection de la fonction rénale était optimale pour une dose de 10 mg/kg 10 min avant l'ischémie. Cette injection, unique, en bolus, n'entraîne pas de néphrotoxicité surajoutée. Par ailleurs, il n'a jamais été décrit de néphrotoxicité avec cette utilisation en bolus dans les différentes études cliniques pharmacologiques précédemment publiées. En effet, l'étude récente de Chiari *et al.* montre une cardioprotection dans la chirurgie valvulaire avec pré-conditionnement à la CsA sans modification significative de la clairance de la créatinine (269). Par ailleurs Piot *et al.* dans l'essai clinique de cardioprotection en post-conditionnement par la CsA dans l'infarctus du myocarde ne montre pas non plus d'effets secondaires sur la fonction rénale (322). Dans ces 2 cas, la CsA était injectée à la dose de 2,5 mg/kg de CsA. Dans notre étude expérimentale, la dose de CsA protectrice correspond à celle du modèle animal murin de l'infarctus du myocarde. Bien que Ysebaert *et al.* aient montré des conséquences néfastes sur la fonction rénale après l'injection de 20 mg/kg de CsA chez le rat en post conditionnement, cette étude utilisait des doses ayant précédemment montré un effet hémodynamique aigu significatif et l'injection de CsA était répétée les jours suivant l'ischémie (323). Les conditions expérimentales étaient donc différentes du protocole actuel où une seule injection est réalisée. De plus, l'injection en bolus ne montre pas d'altération du parenchyme rénal dans notre étude.

Le rôle de l'HSP70 dans la néphro-protection est également un élément important à discuter. En effet, nous montrons pour la première fois que l'HSP70 pourrait avoir un lien avec le mPTP. En effet, comme nous l'avons décrit précédemment, la surexpression de l'HSP70 avant l'ischémie permet de protéger la fonction rénale (292,324) mais également la fonction cardiaque (325). De nombreux essais expérimentaux ont utilisé des préconditionnements pour augmenter cette HSP70, notamment avec l'utilisation du GGA et de la glutamine (293,301). Cependant aucune translation en recherche clinique n'a été proposée du fait de l'absence claire d'explication à cette néphro-protection. Nous montrons avec cette étude qu'il existe un lien avec le mPTP puisque l'inhibition de cette HSP70 entraîne une ouverture précoce du mPTP.

Ce lien entre HSP70 et mPTP pourrait être un autre mécanisme de protection contre l'ischémie reperfusion, sur laquelle il serait possible de proposer d'autres alternatives thérapeutiques. Les nombreuses données sur la littérature relatent effectivement un lien entre HSP70 et mitochondrie. Il a été montré que l'induction de HSP70 chaperonne la superoxyde dismutase de type 2 jusqu'à la membrane externe de la mitochondrie, où le complexe se dissocie pour importer le SOD-2 dans la matrice mitochondriale et se lie à l'HSP70 mitochondriale (326). Les concentrations d'ATP intra cellulaire semble dans cette étude réguler les interactions entre HSP70 et SOD2. Une des hypothèses que l'on pourrait fournir sur le rôle de l'HSP70 dans l'ischémie reperfusion pourrait donc être une importation adéquate de la SOD et ainsi une diminution du stress oxydant et du découplage de la chaîne respiratoire. Pendant l'ischémie, la diminution de l'ATP pourrait entraîner une diminution du SOD-2, une aggravation du stress oxydant, et donc une ouverture plus rapide du mPTP. Par ailleurs, il a également été montré que l'activité de la SOD-1 et 2 était significativement diminuée chez les souris KO HSP70. Une étude a pu montrer que dans des cellules tubulaires, l'hypoxie-réoxygénation augmentait l'HSP70 *via* l'augmentation de l'Hypoxia-inductible

factor (HIH-1 α) (303). Une seconde hypothèse qui pourrait donc être envisagée est la réalisation d'un pré-conditionnement ischémique simulé par l'effet hémodynamique de la CsA. Cependant il a également été montré que la CsA entraînait une synthèse d'endothéline, et une inhibition de HIH-1 α . Des expériences complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer l'action de l'HSP70 sur le mPTP.

Par ailleurs, il a été montré que la GRP78, une HSP70 située dans le réticulum endoplasmique, se détacherait de la membrane du RE pour se lier aux protéines malformées. Il y aurait une redistribution de la GRP78 dans la membrane du RE. La surexpression de la GRP78 modulerait l'ouverture d'un translocon et d'un relargage du calcium lors du stress cellulaire (327).

La Figure 36 décrit donc la synthèse des éléments jusqu'à présent démontrés.

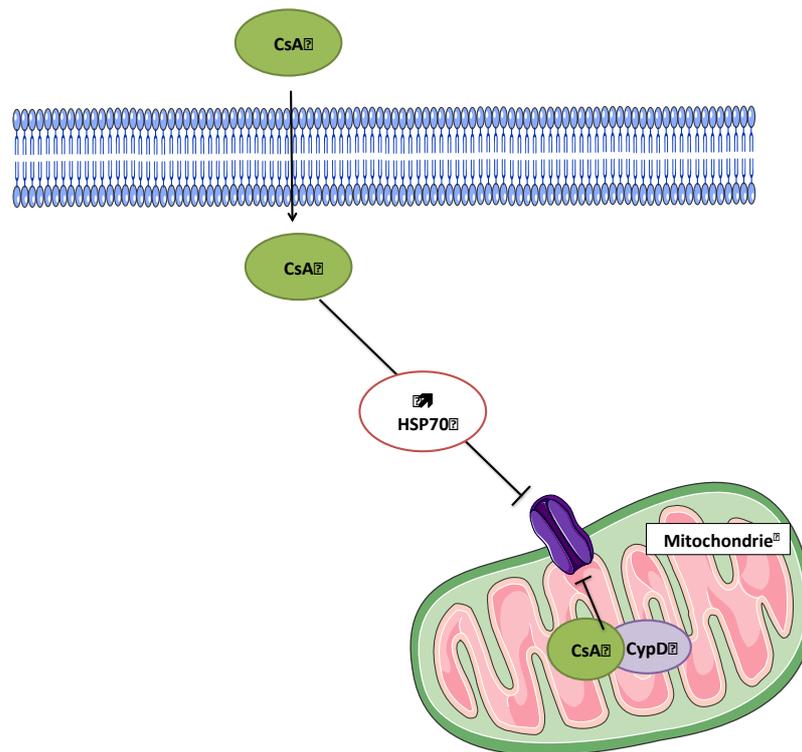


Figure 36 : Résumé des résultats de recherche. A. Synthèse des résultats expérimentaux présentés B. CsA : Ciclosporine A- HSP70 : Heat Shock Protéine 70- CypD : Cyclophiline D.

De manière surprenante, nous n'avons pas retrouvé de protection chez les souris cypD-KO comparé aux résultats antérieurs de la littérature, que ce soit dans le cœur, dans le cerveau ou sur le rein. En effet, Panadilam *et al.* ont montré que les souris cypD-KO étaient mieux protégées que les souris WT (134). Une ischémie de 37 min avait été réalisée, donc 7 min supérieure à notre modèle chirurgical. Par ailleurs, Park *et al.* ont également montré *in vitro* une différence en terme d'ouverture de mPTP mais également de protection face à l'hypoxie-réoxygénation (234). Deux explications peuvent être fournies : la différence de fond génétique et le modèle opératoire.

Le fond génétique de nos souris cypD-KO est un fond mixte C57BL6 et SV tant que celui de Panadilam est un fond C57BL6 pur. La critique de nos résultats est que nous n'avons pas comparé nos souris cypD-KO à leur WT correspondant, mais aux souris C57BL6 pure.

Dans un second temps, le modèle chirurgical a pu avoir un rôle. En effet, un clampage bilatéral est réalisé dans la littérature. Ces résultats en termes de fonction rénale sont surprenants étant donné que la CRC est augmentée chez ces souris. Enfin, nous n'avons pas réalisé d'analyses histologiques en microscopie électronique afin de vérifier l'absence d'anomalies structurales rénales qui pourraient expliquer ces résultats. En effet, les cellules rénales étant très hétérogènes, il est possible que l'absence de CypD entraîne des anomalies architecturales ne pouvant être mise en évidence avec une simple analyse en microscopie optique.

Partie V

Conclusion

L'insuffisance rénale aigüe a des conséquences importantes en terme de morbi-mortalité. Bien que la CsA ait une action vasoconstrictrice et soit également néphrotoxique lors de son utilisation chronique, nous avons montré qu'elle permet de protéger le rein des lésions d'ischémie-reperfusion par injection d'un seul bolus de ciclosporine 10 min avant l'ischémie à la dose de 10 mg/kg, ou bien par l'injection de CsA 5 min juste avant la reperfusion. Nous avons pu montrer que son utilisation n'était pas délétère, mais qu'elle offrait également une protection significative sur le parenchyme rénal lors d'une situation d'ischémie-reperfusion.

Le timing d'injection et la dose de CsA doivent être un élément déterminant à prendre en compte lors de la translation à la clinique. Dans les suites de cette validation expérimentale, il nous semble maintenant nécessaire de proposer une étude clinique afin de démontrer l'intérêt d'un bolus de CsA pour protéger la fonction rénale lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion. Seul le post conditionnement ischémique à distance a montré une certaine efficacité suivant ses conditions de réalisation dans des essais cliniques. L'adjonction de CsA pourrait être une arme thérapeutique supplémentaire et un essai randomisé permettrait de valider cette hypothèse. La transplantation est un domaine qui pourrait bénéficier d'un conditionnement par la ciclosporine A, d'autant plus que cette drogue est déjà utilisée dans les suites. Cette situation clinique est néanmoins complexe puisqu'il faut également prendre en compte, en plus des lésions liées à l'ischémie chaude, celles liées à l'ischémie froide. Le moment de l'injection est dans ce contexte crucial à déterminer puisque la CsA utilisée en pré-conditionnement pourrait être injectée au donneur, alors que la CsA utilisée en post-conditionnement serait à injecter au receveur. Par ailleurs, il pourrait même se discuter d'associer 2 conditionnements différents, un préconditionnement à la CsA chez le donneur et

un post-conditionnement ischémique chez le receveur. Cependant au niveau expérimental, il a été montré que le pré-conditionnement avec la CsA chez le donneur dans un modèle de transplantation rénale chez le rat n'avait pas d'efficacité sur la fonction rénale (333). Dans cet article, la CsA était utilisée à la dose de 5 mg/kg, et donc peut être insuffisamment dosée. Par ailleurs, il a été montré dans le cœur que l'association PostCI et preCond-CsA n'apportait pas de protection supplémentaire. Le conditionnement par la CsA pourrait également être envisagé dans les situations de clampage aortique, en cas de néphrectomie partielle ou de chirurgie aortique.

Les résultats expérimentaux de cette thèse sont donc une première étape justifiant la conception d'un essai randomisé à l'échelle humaine afin de diminuer les risques d'apparition d'une IRA au cours des épisodes d'ischémie-reperfusion en néphrologie.

Partie VI

Bibliographie

- ADDIN PAPERS2_CITATIONS <papers2_bibliography/>1. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. 2012 Feb 7;:1–141.
2. Fliser D, Laville M, Covic A, Fouque D, Vanholder R, Juillard L, et al. A European Renal Best Practice (ERBP) position statement on the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Clinical Practice Guidelines on Acute Kidney Injury: Part 1: definitions, conservative management and contrast-induced nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. Oxford University Press; 2012 Dec 12;27(12):4263–72.
 3. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P, Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *BioMed Central Ltd*; 2004. pp. R204–12.
 4. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *BioMed Central Ltd*; 2007. p. R31.
 5. Ali T, Khan I, Simpson W, Prescott G, Townend J, Smith W, et al. Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study. *Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology; 2007 Apr;18(4):1292–8.
 6. Bucaloiu ID, Kirchner HL, Norfolk ER, Hartle JE, Perkins RM. Increased risk of death and de novo chronic kidney disease following reversible acute kidney injury. *Kidney Int*. Nature Publishing Group; 2011 Dec 7;81(5):477–85.
 7. Bagshaw SM, George C, Bellomo R, ANZICS Database Management Committee. A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. Oxford University Press; 2008 May;23(5):1569–74.
 8. Liaño F, Felipe C, Tenorio MT, Rivera M, Abraira V, Sáez-de-Urturi JM, et al. Long-term outcome of acute tubular necrosis: A contribution to its natural history. *Kidney Int*. 2007 Jan 31;71(7):679–86.
 9. Gammelager H, Christiansen CF, Johansen MB, Tønnesen E, Jespersen B, Sørensen HT. Five-year risk of end-stage renal disease among intensive care patients surviving dialysis-requiring acute kidney injury: a nationwide cohort study. *Critical Care*. *BioMed Central Ltd*; 2013 Jul 22;17(4):R145.
 10. Coca SG, Yusuf B, Shlipak MG, Garg AX, Parikh CR. Long-term risk of mortality

and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2009 Jun;53(6):961–73.

11. VA/NIH Acute Renal Failure Trial Network, Palevsky PM, Zhang JH, O'Connor TZ, Chertow GM, Crowley ST, et al. Intensity of renal support in critically ill patients with acute kidney injury. *N Engl J Med.* 2008 Jul 3;359(1):7–20.
12. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA.* American Medical Association; 2005 Aug 17;294(7):813–8.
13. Chawla LS, Amdur RL, Amodeo S, Kimmel PL, Palant CE. The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease. *Kidney Int.* Nature Publishing Group; 2011 Mar 23;79(12):1361–9.
14. Dasta JF, Kane-Gill SL, Durtschi AJ, Pathak DS, Kellum JA. Costs and outcomes of acute kidney injury (AKI) following cardiac surgery. *Nephrol Dial Transplant.* Oxford University Press; 2008 Jun;23(6):1970–4.
15. Kramann R, Kusaba T, Humphreys BD. Who regenerates the kidney tubule? *Nephrol Dial Transplant.* Oxford University Press; 2014 Aug 25;:gfu281.
16. Nadasdy T, Laszik Z, Blick KE, Johnson LD, Silva FG. Proliferative activity of intrinsic cell populations in the normal human kidney. *Journal of the American Society of Nephrology.* 1994 Jun;4(12):2032–9.
17. Angelotti ML, Ronconi E, Ballerini L, Peired A, Mazzinghi B, Sagrinati C, et al. Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury. *Stem Cells.* 2012 Aug;30(8):1714–25.
18. Berger K, Bangen J-M, Hammerich L, Liedtke C, Floege J, Smeets B, et al. Origin of regenerating tubular cells after acute kidney injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* National Acad Sciences; 2014 Jan 28;111(4):1533–8.
19. Kusaba T, Lalli M, Kramann R, Kobayashi A, Humphreys BD. Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule. *Proc Natl Acad Sci USA.* National Acad Sciences; 2014 Jan 28;111(4):1527–32.
20. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int.* 2006 Jan;69(2):213–7.
21. Abuelo JG. Normotensive ischemic acute renal failure. *N Engl J Med.* 2007 Aug 23;357(8):797–805.
22. Aukland K, Bower BF, Berliner RW. Measurement of Local Blood Flow with Hydrogen Gas. *Circulation Research.* Lippincott Williams & Wilkins; 1964 Feb 1;14(2):164–87.
23. Pallone TL, Zhang Z. Physiology of the renal medullary microcirculation. *Journal of Physiology-Renal physiology.* 2003.

24. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 2011 Nov;121(11):4210–21.
25. Bastin J, Cambon N, Thompson M, Lowry OH, Burch HB. Change in energy reserves in different segments of the nephron during brief ischemia. *Kidney Int*. 1987 Jun;31(6):1239–47.
26. Uchida S, Endou H. Substrate specificity to maintain cellular ATP along the mouse nephron. *Am J Physiol*. 1988 Nov;255(5 Pt 2):F977–83.
27. Bagnasco S, Good D, Balaban R, Burg M. Lactate production in isolated segments of the rat nephron. *Am J Physiol*. 1985 Apr;248(4 Pt 2):F522–6.
28. Silva P. Energy and fuel substrate metabolism in the kidney. *Semin Nephrol*. 1990 Sep;10(5):432–44.
29. Molitoris BA. Ischemia-induced loss of epithelial polarity: potential role of the actin cytoskeleton. *Am J Physiol*. 1991 Jun;260(6 Pt 2):F769–78.
30. Sutton TA, Molitoris BA. Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Semin Nephrol*. 1998 Sep;18(5):490–7.
31. Lee DBN, Huang E, Ward HJ. Tight junction biology and kidney dysfunction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Jan;290(1):F20–34.
32. Woroniecki R, Ferdinand JR, Morrow JS, Devarajan P. Dissociation of spectrin-ankyrin complex as a basis for loss of Na-K-ATPase polarity after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Feb;284(2):F358–64.
33. Blantz RC, Deng A, Miracle CM, Thomson SC. Regulation of kidney function and metabolism: a question of supply and demand. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2007;118:23–43.
34. Mason J, Torhorst J, Welsch J. Role of the medullary perfusion defect in the pathogenesis of ischemic renal failure. *Kidney Int*. 1984 Sep;26(3):283–93.
35. Conger J. Hemodynamic factors in acute renal failure. *Adv Ren Replace Ther*. 1997 Apr;4(2 Suppl 1):25–37.
36. Kwon O, Hong SM, Ramesh G. Diminished NO generation by injured endothelium and loss of macula densa nNOS may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion. *Journal of Physiology-Renal* . 2009.
37. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int*. 2004 Aug;66(2):480–5.
38. Kelly KJ, Williams WW, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest*. 1996 Feb 15;97(4):1056–63.

39. Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int.* 2007 May 2;72(2):151–6.
40. Rabelink TJ, de Boer HC, van Zonneveld AJ. Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease. *Nature Publishing Group. Nature Publishing Group*; 2010 May 25;6(7):404–14.
41. Basile DP, Fredrich K, Chelladurai B, Leonard EC, Parrish AR. Renal ischemia reperfusion inhibits VEGF expression and induces ADAMTS-1, a novel VEGF inhibitor. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Apr;294(4):F928–36.
42. Miklos Z, Kürthy M, Degrell P, Ranczinger E, Vida M.... Jancso G. Ischaemic postconditioning reduces serum and tubular TNF- α expression in ischaemic-reperfused kidney in healthy rats. *Clin Hemorheol Microcirc.*2012;50(3):167–78.
43. Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *The Journal of transplantation.* 2007.
44. Solez K, Morel-Maroger L, Sraer JD. The morphology of “acute tubular necrosis” in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model. *Medicine.* 1979.
45. Awad AS, Rouse M, Huang L, Vergis AL, Reutershan J, Cathro HP, et al. Compartmentalization of neutrophils in the kidney and lung following acute ischemic kidney injury. *Kidney Int.* 2009 Jan 7;75(7):689–98.
46. Day YJ. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages. *AJP: Renal Physiology.* 2004 Dec 7;288(4):F722–31.
47. Zhou W, Farrar CA, Abe K, Pratt JR, Marsh JE, Wang Y, et al. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2000 May;105(10):1363–71.
48. Farrar CA, Kupiec-Weglinski JW, Sacks SH. The innate immune system and transplantation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2013 Oct;3(10):a015479–9.
49. *Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury.* International Review of Cell and Molecular Biology [Internet]. Elsevier; 2012. pp. 229–317.
50. Chatauret N, Badet L, Barrou B, Hauet T. Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury. *Progrès en Urologie - FMC.* Elsevier; 2014 Jun 1;24(S1):S4–S12.
51. Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Mechanisms and Prevention. Elsevier Inc; 2008 Dec 1;40(10):3279–88.
52. Stromski ME, Cooper K, Thulin G, Gaudio KM, Siegel NJ, Shulman RG. Chemical and functional correlates of postischemic renal ATP levels. *Proc Natl Acad Sci USA.*

1986 Aug;83(16):6142–5.

53. Kako K, Kato M, Matsuoka T, Mustapha A. Depression of membrane-bound Na⁺-K⁺-ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am J Physiol.* 1988 Feb;254(2 Pt 1):C330–7.
54. Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusumoto K. The myocardial Na⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾ exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circulation Research.* Lippincott Williams & Wilkins; 1999 Oct 29;85(9):777–86.
55. Imahashi K, Kusuoka H, Hashimoto K, Yoshioka J, Yamaguchi H, Nishimura T. Intracellular sodium accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury. *Circulation Research.* Lippincott Williams & Wilkins; 1999 Jun 25;84(12):1401–6.
56. Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circulation Research.* Lippincott Williams & Wilkins; 1989 Oct;65(4):1045–56.
57. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem.* 2000 Feb;205(1-2):1–11.
58. Cruthirds DL, Novak L, Akhi KM, Sanders PW, Thompson JA, MacMillan-Crow LA. Mitochondrial targets of oxidative stress during renal ischemia/reperfusion. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2003 Apr;412(1):27–33.
59. Plotnikov EY, Kazachenko AV, Vyssokikh MY, Vasileva AK, Tevirkun DV, Isaev NK, et al. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney. *Kidney Int.* 2007 Dec;72(12):1493–502.
60. Jennings RB, Ganote CE. Mitochondrial structure and function in acute myocardial ischemic injury. *Circulation Research.* 1976 May;38(5 Suppl 1):I80–91.
61. Jennings RB, Herdson PB, Sommers HM. Structural and functional abnormalities in mitochondria isolated from ischemic dog myocardium. *Lab Invest.* 1969 Jun;20(6):548–57.
62. Shen AC, Jennings RB. Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury. *Am J Pathol.* 1972 Jun;67(3):441–52.
63. Basnakian AG, Kaushal GP, Shah SV. Apoptotic pathways of oxidative damage to renal tubular epithelial cells. *Antioxid Redox Signal.* 2002 Dec;4(6):915–24.
64. Berghe TV, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Publishing Group.* Nature Publishing Group; 2014 Feb 1;15(2):135–47.
65. Jouan-Lanhouet S, Riquet F, Duprez L, Berghe TV, Takahashi N, Vandenabeele P. Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* Elsevier Ltd; 2014 Sep 9;:1–12.

66. Linkermann A, De Zen F, Weinberg J, Kunzendorf U, Krautwald S. Programmed necrosis in acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. Oxford University Press; 2012 Sep;27(9):3412–9.
67. Linkermann A, sen JHBA, Himmerkus N, Liu S, Huber TB, Kunzendorf U, et al. Rip1 (Receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int*. Nature Publishing Group; 2012 Jan 11;81(8):751–61.
68. Nowak G, Soundararajan S, Mestril R. Protein kinase C- interaction with iHSP70 in mitochondria promotes recovery of mitochondrial function after injury in renal proximal tubular cells. *AJP: Renal Physiology*. 2013 Sep 1;305(5):F764–76.
69. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group; 1972 Aug 1;26(4):239–57.
70. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier; 2000 Feb;32(2):197–208.
71. Lieberthal W, Koh JS, Levine JS. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol*. 1998 Sep;18(5):505–18.
72. Lieberthal W, Menza SA, Levine JS. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am J Physiol*. 1998 Feb;274(2 Pt 2):F315–27.
73. Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobé G, Connor J, O'Toole KM, et al. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol*. American Society for Investigative Pathology; 1992 Apr 1;140(4):831–8.
74. Ueda N, Kaushal GP, Shah SV. Apoptotic mechanisms in acute renal failure. *Am J Med*. 2000 Apr 1;108(5):403–15.
75. Nogue S, Miyazaki M, Kobayashi N, Saito T, Abe K, Saito H, et al. Induction of apoptosis in ischemia-reperfusion model of mouse kidney: possible involvement of Fas. *Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology; 1998 Apr 1;9(4):620–31.
76. Kaushal GP, Singh AB, Shah SV. Identification of gene family of caspases in rat kidney and altered expression in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1998 Mar;274(3 Pt 2):F587–95.
77. Holly TA, Drincic A, Byun Y, Nakamura S. Caspase Inhibition Reduces Myocyte Cell Death Induced by Myocardial Ischemia and Reperfusion In Vivo. *Journal of molecular and cardiology*1999;31(9):1709–15.
78. Saikumar P, Dong Z, Patel Y, Hall K, Hopfer U, Weinberg JM, et al. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury.

Oncogene. 1998 Dec 31;17(26):3401-15.

79. Wei Q, Dong G, Chen J-K, Ramesh G, Dong Z. Bax and Bak have critical roles in ischemic acute kidney injury in global and proximal tubule-specific knockout mouse models. *Kidney Int. Nature Publishing Group*; 2013 Mar 6;84(1):138–48.
80. Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM, Feuerstein D, Kaskel FJ, Tellis V, et al. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemia-reperfusion injury. *Transplantation Journal*. 2003 Jul;76(1):50–4.
81. Wolfs TGAM, de Vries B, Walter SJ, Peutz-Kootstra CJ, van Heurn LWE, Oosterhof GON, et al. Apoptotic Cell Death Is Initiated During Normothermic Ischemia in Human Kidneys. *Am J Transplant. Munksgaard International Publishers*; 2005 Jan;5(1):68–75.
82. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science. American Association for the Advancement of Science*; 1998 Aug 28;281(5381):1305–8.
83. Ortiz A, Lorz C, Egido J. The Fas ligand/Fas system in renal injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1999.
84. Liu H, Baliga R. Endoplasmic reticulum stress-associated caspase 12 mediates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis. *Journal of the American Society of Nephrology. American Society of Nephrology*; 2005 Jul;16(7):1985–92.
85. Faitova J, Krekac D, Hrstka R, Vojtesek B. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Cell Mol Biol Lett. Versita*; 2006 Sep 5;11(4):488–505.
86. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Autophagy in ischemic heart disease. *Circulation Research. Lippincott Williams & Wilkins*; 2009 Jan 30;104(2):150–8.
87. Inoki K. mTOR signaling in autophagy regulation in the kidney. *Semin Nephrol. Elsevier*; 2014 Jan;34(1):2–8.
88. Pallet N, Livingston M, Dong Z. Emerging functions of autophagy in kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2014 Jan;14(1):13–20.
89. Decuypere JP, Pirenne J, Jochmans I. Autophagy in Renal Ischemia-Reperfusion Injury: Friend or Foe? *Am J Transplant*. 2014 Jun 1;14(6):1464–5.
90. Brenner C, Moulin M. Physiological Roles of the Permeability Transition Pore. *Circulation Research. Lippincott Williams & Wilkins*; 2012 Oct 11;111(9):1237–47.
91. Rouslin W. Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis. *Am J Physiol*. 1983 Jun;244(6):H743–8.
92. Hunter DR, Haworth RA, Southard JH. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem*. 1976 Aug 25;251(16):5069–77.
93. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in

Cell Death. *Physiological Reviews*. 2007 Jan 1;87(1):99–163.

94. Alam MR, Baetz D, Ovize M. Cyclophilin D and myocardial ischemia-reperfusion injury: A fresh perspective. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier; 2014 Oct 2;0(0).
95. Lê Quốc K, Lê Quốc D. Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1988 Sep;265(2):249–57.
96. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*. 2004 Jan 29;427(6973):461–5.
97. Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol*. 2007 May;9(5):550–5.
98. Kinnally KW, Zorov DB, Antonenko YN. Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. 1993. pp. 1374–8.
99. Davis TL, Walker JR, Campagna-Slater V, Finerty PJ, Paramanathan R, Bernstein G, et al. Structural and Biochemical Characterization of the Human Cyclophilin Family of Peptidyl-Prolyl Isomerases. *Petsko GA, editor. PLoS Biol. Public Library of Science*; 2010 Jul 27;8(7):e1000439.
100. Mihatsch MJ, Olivieri W, Marbet U, Thiel G, Harder F, Zollinger HU. Giant mitochondria in renal tubular cells and cyclosporin A. *The Lancet*. 1981 May 23;1(8230):1162–3.
101. Jung K, Pergande M. Influence of cyclosporin A on the respiration of isolated rat kidney mitochondria. *FEBS Letters*. 1985 Apr 8;183(1):167–9.
102. Fournier N, Ducet G, Crevat A. Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr*. 1987 Jun;19(3):297–303.
103. Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J*. 1988 Oct 1;255(1):357–60.
104. Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ, Kerr PM. Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Detection of Mitochondrial Diseases [Internet]*. Boston, MA: Springer US; 1997. pp. 167–72.
105. Tanveer A, Virji S, Andreeva L, Totty NF, Hsuan JJ, Ward JM, et al. Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. *Eur J Biochem*. 1996 May 15;238(1):166–72.

106. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al., editors. *Nature Publishing Group*; 2005 Mar 31;434(7033):658–62.
107. Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2005 May 13;280(19):18558–61.
108. Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2008 Sep 26;283(39):26307–11.
109. Rasola A, Sciacovelli M, Pantic B, Bernardi P. Signal transduction to the permeability transition pore. *FEBS Letters. Elsevier*; 2010 May 17;584(10):1989–96.
110. Xi J, Wang H, Mueller RA, Norfleet EA, Xu Z. Mechanism for resveratrol-induced cardioprotection against reperfusion injury involves glycogen synthase kinase 3 β and mitochondrial permeability transition pore. *European Journal of Pharmacology*. 2009 Feb;604(1-3):111–6.
111. Hafner AV, Dai J, Gomes AP, Xiao C-Y, Palmeira CM, Rosenzweig A, et al. Regulation of the mPTP by SIRT3-mediated deacetylation of CypD at lysine 166 suppresses age-related cardiac hypertrophy. *Aging (Albany NY)*. 2010 Dec;2(12):914–23.
112. Shulga N, Wilson-Smith R, Pastorino JG. Sirtuin-3 deacetylation of cyclophilin D induces dissociation of hexokinase II from the mitochondria. *Journal of Cell Science. The Company of Biologists Ltd*; 2010 Mar 15;123(Pt 6):894–902.
113. Kohr MJ, Aponte AM, Sun J, Wang G, Murphy E, Gucek M, et al. Characterization of potential S-nitrosylation sites in the myocardium. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2011 Mar 30;300(4):H1327–35.
114. Sun J, Morgan M, Shen R-F, Steenbergen C, Murphy E. Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport. *Circulation Research. Lippincott Williams & Wilkins*; 2007 Nov 26;101(11):1155–63.
115. Nguyen TT, Stevens MV, Kohr M, Steenbergen C, Sack MN, Murphy E. Cysteine 203 of cyclophilin D is critical for cyclophilin D activation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2011 Nov 18;286(46):40184–92.
116. Crompton M, COSTI A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. *European Journal of Biochemistry. Blackwell Publishing Ltd*; 1988 Dec 1;178(2):489–501.
117. Leung AWC, Varanyuwatana P, Halestrap AP. The mitochondrial phosphate carrier

- interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2008 Sep 26;283(39):26312–23.
118. Alcalá S, Klee M, Fernández J, Fleischer A, Pimentel-Muiños FX. A high-throughput screening for mammalian cell death effectors identifies the mitochondrial phosphate carrier as a regulator of cytochrome c release. *Oncogene*. 2008 Jan 3;27(1):44–54.
 119. McGee AM, Baines CP. Phosphate is not an absolute requirement for the inhibitory effects of cyclosporin A or cyclophilin D deletion on mitochondrial permeability transition. *Biochem J. Portland Press Ltd*; 2012 Mar 14;443(1):185–91.
 120. Varanyuwatana P, Halestrap AP. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion*. 2012 Jan;12(1):120–5.
 121. Li B, Chauvin C, De Paulis D, De Oliveira F, Gharib A, Vial G, et al. Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D. *BBA - Bioenergetics. Elsevier B.V*; 2012 Sep 1;1817(9):1628–34.
 122. Jung DW, Bradshaw PC, Pfeiffer DR. Properties of a Cyclosporin-insensitive Permeability Transition Pore in Yeast Mitochondria. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 1997 Aug 22;272(34):21104–12.
 123. Giorgio V, Stockum von S, Antoniel M. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. 2013.
 124. Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, Dabbeni-Sala F, Basso E, Petronilli V, et al. Cyclophilin D modulates mitochondrial F₀F₁-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2009 Dec 4;284(49):33982–8.
 125. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie*. 2002 Feb;84(2-3):153–66.
 126. Fontaine E, Ichas F, Bernardi P. A Ubiquinone-binding Site Regulates the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 1998 Oct 2;273(40):25734–40.
 127. Chauvin C, De Oliveira F, Ronot X, Mousseau M, Leverve X, Fontaine E. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol Chem*. 2001 Nov 2;276(44):41394–8.
 128. Di Lisa F, Canton M, Carpi A. Mitochondrial injury and protection in ischemic pre- and postconditioning. *antioxydant & redox signaling*. 2011.
 129. Nazareth W, Yafei N, Crompton M. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *JMCC. Elsevier*; 1991 Jan 12;23(12):1351–4.
 130. EJ Griffiths, Halestrap AP. Protection by Cyclosporin A of Ischemia/Reperfusion-

- Induced Damage in Isolated Rat Hearts. *J mol Cell Cardiol.* Elsevier; 1993 Jan 12;25(12):1461–9.
131. Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2002 Sep 20;277(38):34793–9.
 132. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raissy O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Lippincott Williams & Wilkins*; 2005 Jan 18;111(2):194–7.
 133. Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *American Physiological Society*; 2007 Sep 1;293(3):H1654–61.
 134. Devalaraja-Narashimha K, Diener AM, Padanilam BJ. Cyclophilin D gene ablation protects mice from ischemic renal injury. *AJP: Renal Physiology.* 2009 Aug 19;297(3):F749–59.
 135. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: Underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis.* Elsevier; 2009 Jun;204(2):334–41.
 136. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* Lippincott Williams & Wilkins; 1986 Nov 1;74(5):1124–36.
 137. Liu Y, Kato H, Nakata N, Kogure K. Protection of rat hippocampus against ischemic neuronal damage by pretreatment with sublethal ischemia. *Brain Res.* 1992 Jul 17;586(1):121–4.
 138. Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, et al. Ischemic preconditioning of the liver in rats: Implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med.* Elsevier; 1996 Sep 1;128(3):251–8.
 139. Osborne DL, Aw TY, Cepinkas G, Kvietys PR. Development of ischemia/reperfusion tolerance in the rat small intestine. An epithelium-independent event. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation; 1994 Nov;94(5):1910–8.
 140. Turman MA, Kahn DA, Rosenfeld SL, Apple CA. Characterization of human proximal tubular cells after hypoxic preconditioning: constitutive and hypoxia-induced expression of heat shock proteins HSP70 (A, B, and C, HSC70 and HSP90). *Biochemical and molecular medicine.* 1997;60(1):49–58.
 141. Toosy, McMorris, Grace, Mathie. Ischaemic preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury. *BJU Int.* Blackwell Science Ltd; 1999 Sep 1;84(4):489–94.

142. Torras J, Herrero-Fresneda I, Lloberas N, Riera M, Ma Cruzado J, Ma Grinyó J. Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. *Kidney Int.* 2002 Jun;61(6):2218–27.
143. Joo JD, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. Ischemic preconditioning provides both acute and delayed protection against renal ischemia and reperfusion injury in mice. *Journal of the American Society of Nephrology.* American Society of Nephrology; 2006 Nov;17(11):3115–23.
144. Fuller TF, Freise CE, Feng S, Niemann CU. Ischemic preconditioning improves rat kidney graft function after severe ischemia/reperfusion injury. *Elsevier*; 2005 Jan;37(1):377–8.
145. Salehipour M, Khezri A, Monabbati A, Jalaeian H, Kroup M, Azizi V, et al. Ischemic preconditioning protects the dog kidney from ischemia-reperfusion injury. *Urol Int.* Karger Publishers; 2007;79(4):328–31.
146. Li F-Z, Kimura S, Nishiyama I, Rahman M, Zhang G-X, Aba Y. Ischemic preconditioning protects post-ischemic renal function in anesthetized dogs: role of adenosine and adenine nucleotides¹. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2005 Jul;26(7):851–9.
147. Behrends M, Walz MK, Kribben A, Neumann T, Helmchen U, Philipp T, et al. No protection of the porcine kidney by ischaemic preconditioning. *Exp Physiol.* 2000 Nov;85(6):819–27.
148. Orvieto MA, Zorn KC, Mendiola FP, Gong EM, Lucioni A, Mikhail AA, et al. Ischemia preconditioning does not confer resilience to warm ischemia in a solitary porcine kidney model. *Urology.* Elsevier; 2007 May;69(5):984–7.
149. Hernandez DJ, Roberts WB, Miles-Thomas J, Magheli A, Saha S, Schaeffer EM, et al. Can ischemic preconditioning ameliorate renal ischemia-reperfusion injury in a single-kidney porcine model? *J Endourol.* 2008 Nov;22(11):2531–6.
150. Bonventre JV. Kidney ischemic preconditioning. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.* 2002 Jan 1;11(1):43.
151. Zager RA, Jurkowitz MS, Merola AJ. Responses of the normal rat kidney to sequential ischemic events. *Am J Physiol.* 1985 Jul;249(1 Pt 2):F148–59.
152. Lee HT, Emala CW. Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A(1) and A(3) receptors. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Mar;278(3):F380–7.
153. Cochrane J, Williams BT, Banerjee A, Harken AH, Burke TJ, Cairns CB, et al. Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic, and morphologic injury from ischemic acute renal failure in the rat. *Ren Fail.* 1999 Mar;21(2):135–45.
154. Riera M, Herrero I, Torras J, Cruzado JM, Fatjo M, Lloberas N, et al. Ischemic preconditioning improves postischemic acute renal failure. 1999 Sep;31(6):2346–7.

155. Wever KE, Menting TP, Rovers M, van der Vliet JA, Rongen GA, Masereeuw R, et al. Ischemic Preconditioning in the Animal Kidney, a Systematic Review and Meta-Analysis. Eltzschig HK, editor. PLoS ONE. Public Library of Science; 2012 Feb 28;7(2):e32296.
156. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2003 Aug;285(2):H579–88.
157. van den Akker EK, Manintveld OC, Hesselink DA, de Bruin RWF, IJzermans JNM, Dor FJMF. Protection Against Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Ischemic Postconditioning. *Transplantation Journal*. 2013 Jun;95(11):1299–305.
158. Szwarc I, Soullier S, Gayrard N, Mejean C, Mourad G, Argiles A. Ischemic postconditioning prevents ischemic acute renal failure. *Elsevier*; 2007 Oct;39(8):2554–6.
159. Jiang B, Liu X, Chen H, Liu D, Kuang Y, Xing B, et al. Ischemic Postconditioning Attenuates Renal Ischemic/Reperfusion Injury in Mongrel Dogs. URL. Elsevier Inc; 2010 Dec 1;76(6):1519.e1–1519.e7.
160. Serviddio G, Romano AD, Gesualdo L, Tamborra R, Di Palma AM, Rollo T, Altomare E, Vendemiale G. Postconditioning is an effective strategy to reduce renal ischaemia/reperfusion injury. 2008 Feb 26;23(5):1504–12.
161. Weng X, Shen H, Kuang Y, Liu X, Chen Z, Zhu H, et al. Ischemic Postconditioning Inhibits the Renal Fibrosis Induced by Ischemia-reperfusion Injury in Rats. URL. Elsevier Inc; 2012 Aug 1;80(2):484.e1–484.e7.
162. Jiang B, Chen Q, Liu X, Kong D, Kuang Y, Weng X, et al. Ischemic Postconditioning Protects Renal Function After 24 Hours of Cold Preservation in a Canine Autotransplantation Model. Elsevier Inc; 2012 Jul 17;44(6):1776–81.
163. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, et al. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular Research*. 2010 Aug 1;87(3):406–23.
164. Spielman WS, Arend LJ. Adenosine receptors and signaling in the kidney. Hypertension. Lippincott Williams & Wilkins; 1991 Feb 1;17(2):117–30.
165. Meldrum DR. Mechanisms of cardiac preconditioning: ten years after the discovery of ischemic preconditioning. *Journal of Surgical Research*. Elsevier; 1997 Nov;73(1):1–13.
166. Sugino H, Shimada H, Tsuchimoto K. Role of adenosine in renal protection induced by a brief episode of ischemic preconditioning in rats. *Jpn J Pharmacol*. 2001 Oct;87(2):134–42.

167. Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM. Intravenous pretreatment with A1-selective adenosine analogues protects the heart against infarction. *Circulation*. Lippincott Williams & Wilkins; 1992 Feb 1;85(2):659–65.
168. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*. Lippincott Williams & Wilkins; 1991 Jul 1;84(1):350–6.
169. Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after renal ischemia/reperfusion injury in rat. *Transpl Int*. Blackwell Publishing Ltd; 2008 Apr;21(4):364–71.
170. Zhang W, Zhao Y, Liu X, Chen J, Zhang D. Protective role of mitochondrial K-ATP channel and mitochondrial membrane transport pore in rat kidney ischemic postconditioning. *Chinese Medical Journal-Beijing*. 2011.
171. Ogawa T, Nussler AK, Tuzuner E, Neuhaus P, Kaminishi M, Mimura Y, et al. Contribution of nitric oxide to the protective effects of ischemic preconditioning in ischemia-reperfused rat kidneys. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. Elsevier; 2001 Jul;138(1):50–8.
172. Levraut J, Iwase H, Shao Z-H, Vanden Hoek TL, Schumacker PT. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2003 Feb;284(2):H549–58.
173. Lebuffe G, Schumacker PT, Shao Z-H, Anderson T, Iwase H, Vanden Hoek TL. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2003 Jan;284(1):H299–308.
174. Rhoden EL, Rhoden CR, Lucas ML, Pereira-Lima L, Zettler C, Belló-Klein A. The role of nitric oxide pathway in the renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Transpl Immunol*. 2002 Nov;10(4):277–84.
175. Liu X, Chen H, Zhan B, Xing B, Zhou J, Zhu H, et al. Attenuation of reperfusion injury by renal ischemic postconditioning: The role of NO. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007 Aug;359(3):628–34.
176. Hausenloy D. Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovascular Research*. Oxford University Press; 2004 Aug;63(2):305–12.
177. Yang Y, Lang X-B, Zhang P, Lv R, Wang Y-F, Chen J-H. Remote Ischemic Preconditioning for Prevention of Acute Kidney Injury: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Am J Kidney Dis*. Elsevier; 2014 Oct;64(4):574–83.
178. Zhu M, Feng J, Luchinette E, Fischer G, Xu L, Pedrazzini T, et al. Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K–PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway. *Cardiovascular Research*. Oxford University Press; 2006 Oct 1;72(1):152–62.

179. Miyawaki H, Zhou X, Ashraf M. Calcium Preconditioning Elicits Strong Protection Against Ischemic Injury via Protein Kinase C Signaling Pathway. *Circulation Research*. 1996 Jul 1;79(1):137–46.
180. Miyawaki H, Ashraf M. Ca²⁺ as a Mediator of Ischemic Preconditioning. *Circulation Research*. 1997 Jun 19;80(6):790–9.
181. Alvarez A, Martul E, Veiga F, Forteza J. Functional, histologic, and ultrastructural study of the protective effects of verapamil in experimental ischemic acute renal failure in the rabbit. *Ren Fail*. 1994;16(2):193–207.
182. Elkadi HK, Mardan AH, Nghiem DD, Southard JH. The role of calcium antagonists in the management of renal warm ischemia. *J Urol*. 1989 Apr;141(4):974–80.
183. Tong H, Rockman HA, Koch WJ, Steenbergen C, Murphy E. G protein-coupled receptor internalization signaling is required for cardioprotection in ischemic preconditioning. *Circulation Research*. 2004 Apr 30;94(8):1133–41.
184. Lee HT. Preconditioning and Adenosine Protect Human Proximal Tubule Cells in an In Vitro Model of Ischemic Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology; 2002 Nov 1;13(11):2753–61.
185. Mahfoudh-Boussaid A, Zaouali MA, Hadj-Ayed K, Miled A-H, Saidane-Mosbahi D, Rosello-Catafau J, et al. Ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and upregulates hypoxia inducible factor-1 α in ischemic kidney: the role of nitric oxide. *Journal of Biomedical Science*. BioMed Central Ltd; 2012 Jan 17;19(1):7.
186. X He, Xu X, Fan M, Chen X, Sun X, Chen L, Mu Q, Mao Q, ChaoZ. et al. Preconditioning with Hyperbaric Oxygen Induces Tolerance Against Renal Ischemia-Reperfusion Injury Via Increased Expression of Heme Oxygenase-1. *Journal of Surgical Research*. Elsevier Inc; 2011 Oct 1;170(2):e271–7.
187. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 1994 Oct;94(4):1621–8.
188. Schulman D, Latchman DS, Yellon DM. Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2002 Oct;283(4):H1481–8.
189. Hausenloy DJ. New directions for protecting the heart against ischaemia–reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular Research*. Oxford University Press; 2004 Feb 15;61(3):448–60.
190. Hausenloy D, Yellon D. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovascular Research*. Oxford University Press; 2006 May 1;70(2):240–53.
191. Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. The Reperfusion Injury Salvage Kinase Pathway: A Common Target for Both Ischemic Preconditioning and

- Postconditioning. *Trends in Cardiovascular Medicine*. Elsevier; 2005 Feb;15(2):69–75.
192. Tong H, Imahashi K, Steenbergen C. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective. *Circulation Research*. 2002.
 193. Terada K, Kaziro Y, Satoh T. Analysis of Ras-Dependent Signals That Prevent Caspase-3 Activation and Apoptosis Induced by Cytokine Deprivation in Hematopoietic Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000 Jan;267(1):449–55.
 194. Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol*. 1999 Aug;19(8):5800–10.
 195. Ferkey DM, Kimelman D. GSK-3: new thoughts on an old enzyme. *Dev Biol*. 2000 Sep 15;225(2):471–9.
 196. Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*. 2001 Nov;65(4):391–426.
 197. Jope RS, Johnson GVW. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci*. 2004 Feb;29(2):95–102.
 198. Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, et al. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci*. Society for Neuroscience; 2004 Nov 3;24(44):9993–10002.
 199. Juhaszova M, Zorov DB, Kim S-H, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, et al. Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 2004 Jun 1;113(11):1535–49.
 200. Das S, Wong R, Rajapakse N, Murphy E, Steenbergen C. Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibition Slows Mitochondrial Adenine Nucleotide Transport and Regulates Voltage-Dependent Anion Channel Phosphorylation. *Circulation Research*. Lippincott Williams & Wilkins; 2008 Jul 3;103(9):983–91.
 201. Collino M, Thiemermann C, Mastrocola R, Gallicchio M, Benetti E, Miglio G, et al. Treatment with the glycogen synthase kinase-3beta inhibitor, TDZD-8, affects transient cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat hippocampus. *Shock*. 2008 Sep;30(3):299–307.
 202. Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of GSK3 β by Postconditioning Is Required to Prevent Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore During Reperfusion. *Lippincott Williams & Wilkins*; 2008 May 27;117(21):2761–8.
 203. Cuzzocrea S, Mazzon E, Esposito E, Muià C, Abdelrahman M, Di Paola R, et al.

- Glycogen synthase kinase-3 β inhibition attenuates the development of ischaemia/reperfusion injury of the gut. *Intensive Care Med.* 2007 May;33(5):880–93.
204. Wang Z, Havasi A, Gall JM, Mao H, Schwartz JH, Borkan SC. Beta-catenin promotes survival of renal epithelial cells by inhibiting Bax. *J Am Soc Nephrol. American Society of Nephrology*; 2009 Sep;20(9):1919–28.
 205. Howard C, Tao S, Yang H-C, Fogo AB, Woodgett JR, Harris RC, et al. Specific deletion of glycogen synthase kinase-3 β in the renal proximal tubule protects against acute nephrotoxic injury in mice. *Kidney Int. Nature Publishing Group*; 2012 Jul 11;82(9):1000–9.
 206. Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology. Elsevier Inc*; 2009 Jul 1;47(1):32–40.
 207. Hattori R. Role of STAT3 in Ischemic Preconditioning. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology. Elsevier*; 2001 Nov;33(11):1929–36.
 208. Ping P, Murphy E. Role of p38 mitogen-activated protein kinases in preconditioning: a detrimental factor or a protective kinase? *Circulation Research. Lippincott Williams & Wilkins*; 2000 May 12;86(9):921–2.
 209. Michel MC, Li Y, Heusch G. Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol. Springer-Verlag*; 2001 Mar 1;363(3):245–66.
 210. Kim SO, Baines CP, Critz SD, Pelech SL, Katz S, Downey JM, et al. Ischemia induced activation of heat shock protein 27 kinases and casein kinase 2 in the preconditioned rabbit heart. *Biochem Cell Biol.* 1999;77(6):559–67.
 211. Baines CP, Liu GS, Birincioglu M, Critz SD, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol.* 1999 Apr;276(4 Pt 2):H1361–8.
 212. Sato M, Cordis GA, Maulik N, Das DK. SAPKs regulation of ischemic preconditioning. *AJP: Heart and Circulatory Physiology.* 2000 Sep;279(3):H901–7.
 213. Sun H-Y, Wang N-P, Halkos M, Kerendi F, Kin H, Guyton RA, et al. Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis. Kluwer Academic Publishers*; 2006 Jun 27;11(9):1583–93.
 214. Schwartz LM. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *AJP: Heart and Circulatory Physiology.* 2005 Oct 21;290(3):H1011–8.
 215. Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *The Lancet.* 2007.

216. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovascular Research*. Oxford University Press; 2002 Aug 15;55(3):534–43.
217. Mizumura T, Nithipatikom K, Gross GJ. Bimakalim, an ATP-sensitive potassium channel opener, mimics the effects of ischemic preconditioning to reduce infarct size, adenosine release, and neutrophil function in dogs. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1236–45.
218. Mizumura T, Nithipatikom K, Gross GJ. Effects of nicorandil and glyceryl trinitrate on infarct size, adenosine release, and neutrophil infiltration in the dog. *Cardiovascular Research*. 1995 Apr;29(4):482–9.
219. Minamino T, Jiyoong K, Asakura M, Shintani Y, Asanuma H, Kitakaze M, et al. Rationale and design of a large-scale trial using nicorandil as an adjunct to percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation acute myocardial infarction: Japan-Working groups of acute myocardial infarction for the reduction of Necrotic Damage by a K-ATP channel opener (J-WIND-KATP). *Circ J*. 2004 Feb;68(2):101–6.
220. Costa ADT, Quinlan CL, Andrukhiv A, West IC, Jaburek M, Garlid KD. The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2006 Jan;290(1):H406–15.
221. Cancherini DV, Trabuco LG, Rebouças NA, Kowaltowski AJ. ATP-sensitive K⁺ channels in renal mitochondria. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Dec;285(6):F1291–6.
222. Zager RA, Johnson AC, Lund S, Hanson SY, Abrass CK. Levosimendan protects against experimental endotoxemic acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Jun;290(6):F1453–62.
223. Pompermayer K, Souza DG, Lara GG, Silveira KD, Cassali GD, Andrade AA, et al. The ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney Int*. 2005 May;67(5):1785–96.
224. Shimizu S, Saito M, Kinoshita Y, Ohmasa F, Dimitriadis F, Shomori K, et al. Nicorandil ameliorates ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney. *British Journal of Pharmacology*. Blackwell Publishing Ltd; 2011 Apr 18;163(2):272–82.
225. Rahgozar M, Willgoss DA, Gobé GC, Endre ZH. ATP-dependent K⁺ channels in renal ischemia reperfusion injury. *Ren Fail*. 2003 Nov;25(6):885–96.
226. Tan X, Zhang L, Jiang Y, Yang Y, Zhang W, Li Y, et al. Postconditioning ameliorates mitochondrial DNA damage and deletion after renal ischemic injury. *Nephrol Dial Transplant*. Oxford University Press; 2013 Nov;28(11):2754–65.
227. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug 10;1366(1-2):79–94.

228. Xu M, Wang Y, Hirai K, Ayub A, Ashraf M. Calcium preconditioning inhibits mitochondrial permeability transition and apoptosis. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2001 Feb;280(2):H899–908.
229. Juhaszova M, Wang S, Zorov DB. The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008.
230. Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KHH, Halestrap AP. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol (Lond)*. The Physiological Society; 2003 Jun 1;549(Pt 2):513–24.
231. Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Béjui F, et al. Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovascular Research*. Oxford University Press; 2004 Jan 1;61(1):115–22.
232. Hausenloy D, Wynne A, Duchon M, Yellon D. Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation*. Lippincott Williams & Wilkins; 2004 Apr 13;109(14):1714–7.
233. Hausenloy DJ, Lim SY, Ong S-G, Davidson SM, Yellon DM. Mitochondrial cyclophilin-D as a critical mediator of ischaemic preconditioning. *Cardiovascular Research*. Oxford University Press; 2010 Oct 1;88(1):67–74.
234. Park JS, Pasupulati R, Feldkamp T, Roeser NF, Weinberg JM. Cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition in kidney proximal tubules after hypoxic and ischemic injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011 Jul;301(1):F134–50.
235. Hu W, Chen Z, Ye Z, Xia D, Xia Z, Ma J, et al. Knockdown of Cyclophilin D Gene by RNAi Protects Rat from Ischemia/ Reperfusion-Induced Renal Injury. *Kidney Blood Press Res*. Karger Publishers; 2010 Jun 24;33(3):193–9.
236. Feldkamp T, Park JS, Pasupulati R, Amora D, Roeser NF, Venkatachalam MA, et al. Regulation of the mitochondrial permeability transition in kidney proximal tubules and its alteration during hypoxia-reoxygenation. *AJP: Renal Physiology*. 2009 Nov 24;297(6):F1632–46.
237. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *The Lancet*. 1993;342(8866):276–7.
238. Amador A, Grande L, Martí J, Deulofeu R, Miquel R, Solá A, et al. Ischemic Preconditioning in Deceased Donor Liver Transplantation: A Prospective Randomized Clinical Trial. *Am J Transplant*. Blackwell Publishing Ltd; 2007 Sep;7(9):2180–9.
239. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic “preconditioning” protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. Lippincott Williams & Wilkins; 1993 Mar 1;87(3):893–9.
240. Lang SC, Elsässer A, Scheler C, Vetter S, Tiefenbacher CP, Kübler W, et al. Myocardial preconditioning and remote renal preconditioning--identifying a

- protective factor using proteomic methods? *Basic Res Cardiol.* 2006 Mar;101(2):149–58.
241. Kadkhodae M, Seifi B, Najafi A, Sedaghat Z. First report of the protective effects of remote per- and postconditioning on ischemia/reperfusion-induced renal injury. *Transplantation.* 2011 Nov 27;92(10):e55.
 242. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K...Masahiko konoshita. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of “remote preconditioning”. *Journal of the american college of cardiology.* 1999.
 243. Ateş E, Genç E, Erkasap N, Erkasap S, Akman S, Firat P, et al. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation Journal.* 2002 Nov 15;74(9):1247–51.
 244. Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sárváry L, Strasser RH. Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovascular Research.* 2002 Aug 15;55(3):590–601.
 245. Kharbanda RK, Nielsen TT, Redington AN. Translation of remote ischaemic preconditioning into clinical practice. *The Lancet.* Elsevier Ltd; 2009 Oct 31;374(9700):1557–65.
 246. Gassanov N, Nia AM, Caglayan E, Er F. Remote Ischemic Preconditioning and Renoprotection: From Myth to a Novel Therapeutic Option? *Journal of the American Society of Nephrology.* American Society of Nephrology; 2014 Jan 31;25(2):216–24.
 247. Armstrong S, Ganote CE. Adenosine receptor specificity in preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: evidence of A3 receptor involvement. *Cardiovascular Research.* 1994 Jul;28(7):1049–56.
 248. Costa ADT, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, et al. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circulation Research.* 2005 Aug 19;97(4):329–36.
 249. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med.* 1989 Dec 21;321(25):1725–38.
 250. Hesselink DA, Bouamar R, van Gelder T. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity. *Ther Drug Monit.* 2010 Aug;32(4):387–93.
 251. Calne RY, White DJ, Evans DB, Thiru S, Henderson RG, Hamilton DV, et al. Cyclosporin A in cadaveric organ transplantation. *British Medical Journal (Clinical research ed).* BMJ Group; 1981 Mar 21;282(6268):934–6.
 252. Naesens M, Kuypers DRJ, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009 Feb;4(2):481–508.
 253. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions.* 1976 Jul;6(4):468–75.

254. Paller MS, Murray BM. Renal dysfunction in animal models of cyclosporine toxicity. 1985 Aug;17(4 Suppl 1):155–9.
255. Di Palo FQ, Rivolta R, Elli A, Castagnone D, Palazzi P, Abelli P, et al. Effect of cyclosporin A on renal cortical resistances measured by color Doppler flowmetry on renal grafts. *Nephron*. Karger Publishers; 1993;65(2):240–4.
256. Perico N, Dadan J, Remuzzi G. Endothelin mediates the renal vasoconstriction induced by cyclosporine in the rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1990 Jul;1(1):76–83.
257. Benigni A, Morigi M, Perico N, Zoja C, Amuchastegui CS, Piccinelli A, et al. The acute effect of FK506 and cyclosporine on endothelial cell function and renal vascular resistance. *Transplantation Journal*. 1992 Nov;54(5):775–80.
258. Racusen LC, Kone BC, Solez K. Early renal pathophysiology in an acute model of cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Ren Fail*. 1987;10(1):29–37.
259. J.S Abraham, F.R Bentley, R.N Garrison and H.M Cryer. Cyclosporine A directly constricts intrarenal arterioles. *Transplantation proceedings*. 1991 Feb;23(1 Pt 1):356–9.
260. Barros EJ, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N. Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int*. 1987 Jul;32(1):19–25.
261. English J, Evan A, Houghton DC, Bennett WM. Cyclosporine-induced acute renal dysfunction in the rat evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function.. *Transplantation Journal*. 1987 Jul 1;44(1):135..
262. Weir MR, Klassen DK, Shen SY, Sullivan D, Buddemeyer EU, Handwerger BS. Acute effects of intravenous cyclosporine on blood pressure, renal hemodynamics, and urine prostaglandin production of healthy humans. *Transplantation Journal*. 1990 Jan;49(1):41–7.
263. Hortelano S, Castilla M, Torres AM, Tejedor A, Boscá L. Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubule cells. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2000 Dec;11(12):2315–23.
264. Textor SC, Burnett JC, Romero JC, Canzanello VJ, Taler SJ, Wiesner R, et al. Urinary endothelin and renal vasoconstriction with cyclosporine or FK506 after liver transplantation. *Kidney Int*. 1995 May;47(5):1426–33.
265. Ryffel B, Mihatsch MJ. Cyclosporine Nephrotoxicity. *Toxicologic Pathology*. SAGE Publications; 1986 Jan 1;14(1):73–82.
266. Heine GH, Girndt M, Sester U, Köhler H. No rise in renal Doppler resistance indices at peak serum levels of cyclosporin A in stable kidney transplant patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2003 Aug;18(8):1639–43.
267. Covic A, Mardare N, Gusbeth-Tatomir P, Buhaescu I, Goldsmith DJA. Acute effect of CyA A (Neoral) on large artery hemodynamics in renal transplant patients. *Kidney*

- Int. 2005 Feb;67(2):732–7.
268. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008 Jul 31;359(5):473–81.
 269. Chiari P, Angoulvant D, Mewton N, Desebbe O, Obadia J-F, Robin J, et al. Cyclosporine protects the heart during aortic valve surgery. *Anesthesiology*. 2014 Aug;121(2):232–8.
 270. Cour M, Abrial M, Jahandiez V, Loufouat J, Belaidi E, Gharib A, et al. Ubiquitous protective effects of cyclosporine A in preventing cardiac arrest-induced multiple organ failure. *J Appl Physiol*. 2014 Sep 11.
 271. Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2007 Jun 1;293(3):H1654–61.
 272. Weinbrenner C, Liu GS, Downey JM, Cohen MV. Cyclosporine A limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Cardiovascular Research*. 1998 Jun;38(3):676–84.
 273. Cai Q, Baxter GF, Yellon DM. Reduction of infarct size in isolated rat heart by CsA and FK506: possible role of phosphatase inhibition. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1998 Oct;12(5):499–501.
 274. Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem*. 2001 Jan 26;276(4):2571–5.
 275. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, et al. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2005 Feb;38(2):367–74.
 276. Shiga Y, Onodera H, Matsuo Y, Kogure K. Cyclosporin A protects against ischemia-reperfusion injury in the brain. *Brain Res*. 1992 Nov 6;595(1):145–8.
 277. Travis DL, Fabia R, Netto GG, Husberg BS, Goldstein RM, Klintmalm GB, et al. Protection by cyclosporine A against normothermic liver ischemia-reperfusion in pigs. *Journal of Surgical Research*. Elsevier; 1998 Mar;75(2):116–26.
 278. Konukoglu D, Taşci I, Cetinkale O. Effects of cyclosporin A and ibuprofen on liver ischemia-reperfusion injury in the rat. *Clinica Chimica Acta*. 1998 Jul 6;275(1):1–8.
 279. Feldkamp T, Park JS, Pasupulati R, Amora D, Roeser NF, Venkatachalam MA, et al. Regulation of the mitochondrial permeability transition in kidney proximal tubules and its alteration during hypoxia-reoxygenation. *AJP: Renal Physiology*. 2009 Nov 24;297(6):F1632–46.

280. Yang CW, Ahn HJ, Han HJ, Kim WY, Li C, Shin MJ, et al. Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506 reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation Journal*. 2001 Dec 15;72(11):1753–9.
281. Zhu T, Au-Yeung KKW, Siow YL, Wang G, O K. Cyclosporine A protects against apoptosis in ischaemic/reperfused rat kidneys. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002 Sep;29(9):852–4.
282. Singh D, Chander V, Chopra K. Cyclosporine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Toxicology*. 2005 Jan 14;:1–9.
283. Ritossa F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones*. 1996 Jun;1(2):97–8.
284. O'Neill S, Harrison EM, Ross JA, Wigmore SJ, Hughes J. Heat-shock proteins and acute ischaemic kidney injury. *Nephron Exp Nephrol*. Karger Publishers; 2014;126(4):167–74.
285. Kabakov A, Budagova K, Latchman DS, Kampinga H. Stressful preconditioning and HSP70 overexpression attenuate proteotoxicity of cellular ATP depletion. 2002 Aug;283(2):C521–34.
286. Beere HM. “The stress of dying”: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science*. 2004 Jun 1;117(Pt 13):2641–51.
287. O'Neill S, Harrison EM, Ross JA, Wigmore SJ, Hughes J. Heat-Shock Proteins and Acute Ischaemic Kidney Injury. *Exp Nephrol*. Karger Publishers; 2014;126(4):167–74.
288. Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 1995 Apr;95(4):1446–56.
289. Riordan M, Sreedharan R, Wang S, Thulin G, Mann A, Stankewich M, et al. HSP70 binding modulates detachment of Na-K-ATPase following energy deprivation in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Jun;288(6):F1236–42.
290. Basile DP, Donohoe D, Van Why S. Resistance to ischemic acute renal failure in the Brown Norway rat: a new model to study cytoprotection. *Kidney Int [Internet]*. 2004 Jun;65(6):2201–11.
291. yang Y, Fiskus W, Yong B, Atadja P, Takahashi Y, Pandita TK, et al. Acetylated hsp70 and KAP1-mediated Vps34SUMOylation is required for autophagosome creation in autophagy. *PNAS*. 2014 Dec 3;:1–6.
292. Wang Z, Gall JM, Bonegio RGB, Havasi A, Hunt CR, Sherman MY, et al. Induction of heat shock protein 70 inhibits ischemic renal injury. *Kidney Int*. Nature Publishing Group; 2011 Jan 26;79(8):861–70.

293. Zhang D, Zou Z, Li Y-K, Yuan H-B, Shi X-Y. Glutamine-induced heat shock protein protects against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Nephrology*. Blackwell Publishing Asia; 2009 Sep 1;14(6):573–80.
294. Perdrizet GA, Kaneko H, Buckley TM, Fishman MS, Pleau M, Bow L, et al. Heat shock and recovery protects renal allografts from warm ischemic injury and enhances HSP72 production. 1993 Feb;25(1 Pt 2):1670–3.
295. Redaelli CA, Wagner M, Kulli C, Tian YH, Kubulus D, Mazzucchelli L, et al. Hyperthermia-induced HSP expression correlates with improved rat renal isograft viability and survival in kidneys harvested from non-heart-beating donors. *Transpl Int*. 2001 Dec;14(6):351–60.
296. Yang CW, Kim BS, Kim J, Ahn HJ, Park JH, Jin DC, et al. Preconditioning with sodium arsenite inhibits apoptotic cell death in rat kidney with ischemia/reperfusion or cyclosporine-induced Injuries. The possible role of heat-shock protein 70 as a mediator of ischemic tolerance. *Exp Nephrol*. 2001;9(4):284–94.
297. Redaelli CA, Tien Y-H, Kubulus D, Mazzucchelli L, Schilling MK, Wagner ACC. Hyperthermia preconditioning induces renal heat shock protein expression, improves cold ischemia tolerance, kidney graft function and survival in rats. *Nephron*. 2002 Apr;90(4):489–97.
298. Yang CW, Li C, Jung JY, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, et al. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J*. Federation of American Societies for Experimental Biology; 2003 Sep;17(12):1754–5.
299. Suzuki S, Maruyama S, Sat W, Morit Y, Sato W, Morita Y, et al. Geranylgeranylacetone ameliorates ischemic acute renal failure via induction of Hsp70. *Kidney Int*. 2005 Jun;67(6):2210–20.
300. Jo S-K, Ko GJ, Boo CS, Cho WY, Kim HK. Heat preconditioning attenuates renal injury in ischemic ARF in rats: role of heat-shock protein 70 on NF-kappaB-mediated inflammation and on tubular cell injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006 Nov;17(11):3082–92.
301. Fuller TF, Rose F, Singleton KD, Linde Y, Hoff U, Freise CE, et al. Glutamine donor pretreatment in rat kidney transplants with severe preservation reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*. 2007 Jun 1;140(1):77–83.
302. Harrison EM, Sharpe E, Bellamy CO, McNally SJ, Devey L, Garden OJ, et al. Heat shock protein 90-binding agents protect renal cells from oxidative stress and reduce kidney ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Aug;295(2):F397–405.
303. Yeh C-H, Hsu S-P, Yan C-C, Chien C-T, Wang N-P. Hypoxic preconditioning reinforces HIF-alpha-dependent HSP70 signaling to reduce ischemic renal failure-induced renal tubular apoptosis and autophagy. *Life Sciences*. 2010 Jan 16;86(3-4):115–23.

304. Date T. Expression of constitutively stable hybrid hypoxia-inducible factor-1 protects cultured rat cardiomyocytes against simulated ischemia-reperfusion injury. *AJP: Cell Physiology*. 2005 Feb 1;288(2):C314–20.
305. Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, et al. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol*. American Society for Microbiology; 2004 Apr;24(7):2875–89.
306. Zhou J, Schmid T, Frank R, Brune B. PI3K/Akt Is Required for Heat Shock Proteins to Protect Hypoxia- inducible Factor 1. *J Biol Chem*. 2004 Mar 17;:1–8.
307. Yang CW, Ahn HJ, Han HJ, Kim WY, Li C, Shin MJ, et al. Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506 reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation* [Internet]. 2001 Dec 15;72(11):1753–9.
308. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 1999 Jul 15;341 (Pt 2):233–49.
309. Singh D, Chander V, Chopra K. Cyclosporine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Toxicology* [Internet]. 2005 Feb;207(3):339–47.
310. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248–54.
311. Ichas F, Jouaville LS, Sidash SS, JP Mazat. Mitochondrial calcium spiking: A transduction mechanism based on calcium-induced permeability transition involved in cell calcium signalling. *FEBS Letters* [Internet]. Elsevier; 1994 Nov 7;348(2):211–5.
312. Desai MM, Gill IS, Ramani AP, Spaliviero M, Rybicki L, Kaouk JH. The impact of warm ischaemia on renal function after laparoscopic partial nephrectomy. *BJU Int*. Blackwell Science Ltd; 2005 Feb;95(3):377–83.
313. Novick AC. Renal hypothermia: in vivo and ex vivo. *Urol Clin North Am*. 1983 Nov;10(4):637–44.
314. Bhayani SB, Rha KH, Pinto PA, Ong AM, Allaf ME, Trock BJ, et al. Laparoscopic partial nephrectomy: effect of warm ischemia on serum creatinine. *J Urol*. 2004 Oct;172(4 Pt 1):1264–6.
315. Wei Q, Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *AJP: Renal Physiology*. 2012 Dec 1;303(11):F1487–94.
316. Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation Journal*. 1983 Mar;35(3):198–204.

317. Goujon JM, Hauet T, Menet E, Levillain P, Babin P, Carretier M. Histological evaluation of proximal tubule cell injury in isolated perfused pig kidneys exposed to cold ischemia. *Journal of Surgical Research*. Elsevier; 1999 Apr;82(2):228–33.
318. Soriano ME, Nicolosi L, Bernardi P. Desensitization of the permeability transition pore by cyclosporin A prevents activation of the mitochondrial apoptotic pathway and liver damage by tumor necrosis *J Biol Chem*. 2004.
319. Hausenloy DJ, Boston-Griffiths EA, Yellon DM. Cyclosporin A and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent. *British Journal of Pharmacology*. Blackwell Publishing Ltd; 2012 Mar;165(5):1235–45.
320. Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Cyclosporine A at reperfusion reduces infarct size in pigs. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2010 Feb;24(1):85–7.
321. Leger P-L, De Paulis D, Branco S, Bonnin P, Couture-Lepetit E, Baud O, et al. Evaluation of cyclosporine A in a stroke model in the immature rat brain. *Exp Neurol* [Internet]. 2011 Jul;230(1):58–66.
322. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008 Jul 31;359(5):473–81.
323. Ysebaert DK, De Greef KE, Nouwen EJ, Verpooten GA, Eyskens EJ, De Broe ME. Influence of cyclosporin A on the damage and regeneration of the kidney after severe ischemia/reperfusion injury. *Elsevier*; 1997 Aug;29(5):2348–51.
324. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CPZ, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 Inhibits Heat-induced Apoptosis Upstream of Mitochondria by Preventing Bax Translocation. *J Biol Chem* [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2005 Nov 18;280(46):38729–39.
325. Wang X, Yuan B, Dong W, Yang B, Yang Y, Lin X, et al. Induction of heat-shock protein 70 expression by geranylgeranylacetone shows cytoprotective effects in cardiomyocytes of mice under humid heat stress. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e93536.
326. Afolayan AJ, Teng RJ, Eis A, Rana U. Inducible HSP70 regulates superoxide dismutase-2 and mitochondrial oxidative stress in the endothelial cells from developing lungs. *American Journal of transplantation*. 2014.
327. Hammadi M, Oulidi A, Gackière F, Katsogiannou M, Slomianny C, Roudbaraki M, et al. Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. *FASEB J*. 2013 Apr;27(4):1600–9.

RESUME

L'ischémie-reperfusion (IR) rénale entraîne des lésions de nécrose tubulaire aigue, nécessitant parfois une épuration extra rénale transitoire voir définitive. La mitochondrie joue un rôle important dans la physiopathologie de ces lésions d'IR en entraînant la mort cellulaire. L'étude de l'IR dans la cellule cardiaque a permis de mettre en évidence le rôle central du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) dans le déclenchement de cette mort cellulaire. La ciclosporine (CsA) a été proposée comme thérapeutique pour protéger la cellule des lésions d'IR en retardant l'ouverture de ce mPTP. Cependant la CsA a des effets rénaux vasoconstricteurs aigus, nécessitant une validation expérimentale de sa protection dans l'IR rénale. Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis au point un modèle murin d'IR rénale. Ensuite nous avons montré que le post-conditionnement à la CsA, ainsi que le post-conditionnement ischémique, permettent d'améliorer la fonction rénale avec un retard à l'ouverture du mPTP. Dans un deuxième travail, nous montrons que le pré-conditionnement à la CsA est dose et temps dépendant, et médié en partie par l'augmentation d'expression d'une protéine chaperonne, l'Heat Shock Protéine 70 (HSP70). L'injection en bolus de CsA permet également d'améliorer la fonction rénale dans ce modèle d'IR avec un retard à l'ouverture du mPTP. Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la protection rénale, notamment dans la réduction des épisodes d'insuffisance rénale aigue après chirurgie aortique ou en transplantation rénale.

TITLE

Pharmacological conditioning with Cyclosporin A in renal ischemia reperfusion

ABSTRACT

Ischemia-reperfusion (IR) is a situation encountered in transplantation or during aortic surgery, which can result in renal damages, requiring sometimes transient or definitive dialysis. Mitochondria play a crucial role in the pathophysiology of IR causing cell death. Previous studies of cardiac IR highlighted the role of mitochondrial permeability transition pore (mPTP). Cyclosporin A (CsA) has been proposed as a treatment to protect the kidney from IR by the delay of the opening of the mPTP. However, CsA has acute renal hemodynamic effects and a long-term toxicity, requiring an experimental validation of its protection in the renal IR. In this work, we developed a mouse model of renal IR. In a first study, we showed that the post-conditioning with CsA and ischemic post-conditioning improve renal function with a delay of the opening of the mPTP. In a second study, we showed that a high dose of CsA injected just before the ischemia improves renal function and leads to the delay of the opening of mPTP mediated by an increase of HSP70. Our results open new perspectives in renal protection, especially for reducing episodes of acute renal failure in aortic surgery or in renal transplantation.

DISCIPLINE

Physiologie

MOTS CLES

Ischémie-reperfusion, ciclosporine A, pore de transition de perméabilité, HSP70.

INTITULE DU LABORATOIRE

INSERM CarMeN 1060 – Equipe 5 – Université Lyon 1 – Université Claude Bernard Lyon 1

8, avenue Rockefeller 69373 Lyon Cedex 08