



HAL
open science

Rôle de l'épithélium et de l'endothélium rénal au cours des glomérulopathies expérimentales. Etude des glomérulonéphrites inflammatoires et des glomérulopathies toxique et hypertensive

Yosu Luque

► **To cite this version:**

Yosu Luque. Rôle de l'épithélium et de l'endothélium rénal au cours des glomérulopathies expérimentales. Etude des glomérulonéphrites inflammatoires et des glomérulopathies toxique et hypertensive. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066394 . tel-01625649

HAL Id: tel-01625649

<https://theses.hal.science/tel-01625649>

Submitted on 28 Oct 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.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (ED 394)

Unité mixte Inserm/UPMC UMR_S1155. Equipe 2.Hôpital Tenon, Paris, France

"Des maladies rénales rares aux maladies fréquentes, remodelage et réparation"

Rôle de l'épithélium et de l'endothélium rénal au cours des glomérulopathies expérimentales

*Etude des glomérulonéphrites inflammatoires et des glomérulopathies toxique et
hypertensive*

Par Monsieur Yosu LUQUE RINCON

né le 4 juin 1984 à San Sebastián (Espagne)

Thèse de Doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Dirigée par Eric Rondeau et Pierre-Louis Tharaux

Présentée et soutenue publiquement le 26 octobre 2016

Devant le jury composé de :

BOFFA Jean-Jacques, Professeur des Universités, Président du jury

FRANÇOIS-PRADIER Hélène, Professeur des Universités, Rapporteur

LEITE-DE-MORAES Maria, Directeur de recherche, Rapporteur

ANGLICHEAU Dany, Professeur des Universités, Examineur

COPIN Marie-Christine, Professeur des Universités, Examineur

RONDEAU Eric, Professeur des Universités, Directeur de thèse

THARAUX Pierre-Louis, Directeur de recherche, Directeur de thèse

MESNARD Laurent, Maître des Conférences des Universités, Membre invité

Al mal de quien la causa no se sabe, milagro es acertar la medicina.

Au mal dont la cause est inconnue, ce serait miracle de trouver le remède.

El ingenioso hidalgo don Quijote de la Mancha, capítulo XXIII

Miguel de Cervantes Saavedra

A mes parents qui m'ont donné le goût du métier et les moyens d'y parvenir

A ma sœur pour son soutien et son aide

A Nico

Remerciements

(en cours de rédaction)

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	8
Liste des Illustrations	10
Liste des Tableaux.....	11
Introduction	13
Glomérulonéphrites rapidement progressives dites "à croissants extracapillaires"	20
1.1.1.Modèle par anticorps anti-membrane basale glomérulaire ou néphrite toxique	21
Modèle ANTI-MBG passif, passif accéléré et actif	22
Un sérum exclusivement anti-membrane basale glomérulaire?	23
Similitudes et différences avec d'autres modèles de glomérulopathies	23
Limites et utilité du modèle de néphrite toxique chez la souris	26
Immunité adaptative	28
Rôle des lymphocytes B	33
Les limites du rôle des lymphocytes dans le modèle : exemple de la souris nude	33
Rôle de l'immunité innée	35
Polynucléaires neutrophiles	35
Récepteurs de type Toll (<i>Toll-like receptors</i> ou TLR)	36
Macrophages	37
Cellules dendritiques	38
Interleukine 15	38
Rôle du complément	39
Rôle de la coagulation	40
Rôle des effecteurs épithéliaux	44
Rôle des cellules progénitrices rénales	46
Cellules endothéliales	46
1.1.2.Cibles thérapeutiques actuelles dans les GNEC	47
Lésions glomérulaires non-inflammatoires: la hyalinose segmentaire et focale (HSF)	49
1.1.3.HSF et déterminants génétiques podocytaires	53
1.1.4.HSF idiopathique	56
1.1.5.HSF et virus	56
1.1.6.HSF toxiques	56
1.1.7.Lésions podocytaires secondaires adaptatives: l'hypothèse hémodynamique	57
Hypertension artérielle et atteinte glomérulaire: une atteinte multiple	60
Hypoxie tissulaire rénale : un facteur local de progression des lésions rénales	62
1.1.8.Facteurs de transcription de réponse à l'hypoxie: HIF	65
1.1.9.HIF dans les modèles expérimentaux de néphropathie	67

1.1.10. HSF et thérapeutique	71
Le podocyte: une cible thérapeutique parfois insoupçonnée.....	71
1.1.11. Corticoïdes	72
1.1.12. Anticalcineurines	73
1.1.13. Inhibiteurs de la mammalian target of rapamycin (mTOR)	74
1.1.14. Rituximab	75
1.1.15. Abatacept	75
1.1.16. Acide rétinoïque	76
1.1.17. Inhibiteurs du SRAA	76
Deux modèles de podocytopathie acquise: la perfusion d'angiotensine II et l'injection d'adriamycine	
77	
1.1.18. Modèle de néphropathie à l'adriamycine: une agression toxique du podocyte	77
Mécanismes pathogéniques du modèle	80
Avantages et limites du modèle	81
1.1.19. Modèle de néphropathie hypertensive par perfusion continue d'angiotensine II	82
Objectifs du travail.....	83
Résultats	85
Partie 1:	85
ROLE DE LA CHAÎNE γ COMMUNE GLOMERULAIRE DANS UN MODELE EXPERIMENTAL DE GLOMERULONEPHRITE INFLAMMATOIRE: LE MODELE ANTI-MBG CHEZ LA SOURIS	85
Partie 2:	86
ROLE PROTECTEUR DE STAT5 PODOCYTAIRE DANS UN MODELE EXPERIMENTAL DE GLOMERULONEPHRITE INFLAMMATOIRE ET DE GLOMERULOPATHIE TOXIQUE	86
Partie 3:	106
ROLE DU FACTEUR DE REPONSE A L'HYPOXIE, EPAS1, DANS L'ENDOTHELIUM AU COURS DE LA GLOMERULONEPHRITE INFLAMMATOIRE ET LA GLOMERULOPATHIE HYPERTENSIVE	106
Discussion générale	113
Rôle des lymphocytes T dans le modèle anti-MBG.....	115
Rôle des lymphocytes NK.....	117
Rôle des cellules dendritiques et autres cellules immunitaires résidentes.....	117
Chaîne γ commune épithéliale rénale et signalisation IL-15.....	118
Système JAK/STAT et rein	122
Le système de réponse à l'hypoxie: un mécanisme clé dans la genèse des lésions rénales et la progression des néphropathies	127
1.1.20. Pas de rôle de Epas1 endothélial dans le modèle anti-MBG	127
1.1.21. Epas1 endothelial et lésions épithéliales rénales dans la néphropathie hypertensive: mécanisme liant agression endothéliale et HSF?	129

Conclusions.....	133
Valorisation scientifique	135
Bibliographie.....	136
Annexe 1.....	171
Annexe 2.....	172

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN: Acide désoxyribonucléique
- ANCA: Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles
- ARA2: Antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II
- CD: Cellule dendritique
- CD11c: *Cluster of differentiation 11c*
- CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité
- CRISPR-Cas9: *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*
- EAG: *Experimental autoimmune glomerulonephritis*
- EGF: *Epidermal Growth Factor*
- Epas1: *Endothelial PAS domain-containing protein 1*
- EPO: Erythropoïétine
- FT: Facteur tissulaire
- γ C: Chaîne gamma commune des interleukines
- GN: Glomérulonéphrite
- GNEC: Glomérulonéphrite extra-capillaire
- HIF: *Hypoxia-inducible factor*
- HIVAN: *HIV associated nephropathy*
- HSF: Hyalinose segmentaire et focale
- HTA: Hypertension artérielle
- ICAM: *Intercellular adhesion molecule*
- IEC: Inhibiteur de l'enzyme de conversion
- IFN: Interféron
- IgG: Immunoglobuline G
- IL: Interleukine

IRCT: Insuffisance rénale chronique terminale

JAK: *Janus kinase*

LPS: Lipopolysaccharide

MAT: Microangiopathie thrombotique

MBG: Membrane basale glomérulaire

MRC: Maladie rénale chronique

NO: Monoxyde d'azote

NTS: *Nephrotoxic serum*

PDGF: *Platelet derived growth factor*

PHD: Prolyl-hydroxylase

PNN: Polynucléaire neutrophile

PTLD: *Post-transplant lymphoproliferaif syndrome*

REIN: Réseau Epidémiologique et Information en Néphrologie

ROS: *Reactive oxygen species*

SCID: *Severe combined immunodeficiency*

SRAA: Système rénine-angiotensine-aldostérone

STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription*

TGF β : *Transforming growth factor β*

Th: *T helper*

TLR: *Toll-like receptor*

TNF: *Tumor necrosis factor*

USRDS: *United States Renal Data System*

VCAM: *Vascular cell adhesion molecule*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

WKY: Wistar-Kyoto

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GLOMERULE (NETTERIMAGES, ELSEVIER®)	16
FIGURE 2: STRUCTURE PODOCYTAIRE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (KIDNEY RESEARCH CENTER, COLOGNE)	18
FIGURE 3: STRUCTURE DE LA BARRIERE DE FILTRATION GLOMERULAIRE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (WOLFF ET AL. 2009)	18
FIGURE 4: DIAPHRAGME DE FENTE PODOCYTAIRE (KIDNEY RESEARCH CENTER, COLOGNE)	19
FIGURE 5: PROLIFERATION EXTRA-CAPILLAIRE, COLORATION PAR L'HEMATOXYLINE ET L'EOSINE (FADILI ET AL. 2009)	20
FIGURE 6: VOIES DE DIFFERENCIATION LYMPHOCYTAIRES T CD4+ AUXILLIAIRES (UPTODATE)	29
FIGURE 7: LESIONS RENALES CHEZ LA SOURIS NUDE APRES INJECTION DE SERUM ANTI-MBG (KUSUYAMA ET AL 1981)	34
FIGURE 8: EFFECTEURS DE L'IMMUNITE INNEE ET MALADIES RENALES(NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY)	35
FIGURE 9: SCHEMA DE LA CASCADE D'ACTIVATION DU COMPLEMENT (UPTODATE)	39
FIGURE 10: REGULATEURS DE LA COAGULATION AVEC UNE FONCTION EN PATHOLOGIE RENALE (MADHUSUDAN ET AL. 2015)	41
FIGURE 11: CASCADE DE LA COAGULATION ET FORMATION DES LESIONS EXTRACAPILLAIRES GLOMERULAIRES (MADHUSUDAN ET AL. 2015)	44
FIGURE 12: LESION GLOMERULAIRE DE HYALINOSE SEGMENTAIRE ET FOCALE (KATHERINE DELL, CLEVELAND CLINIC, OHIO, USA)	50
FIGURE 13: LESION DE HSF EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE TRANSMISSION	50
FIGURE 14: CLASSIFICATION DE COLUMBIA DES TYPES HISTOLOGIQUES DE HSF (BARISONI ET AL. 2009)	52
FIGURE 15: LESIONS GLOMERULAIRES DANS LA NEPHROPATHIE HYPERTENSIVE (FERVENZA ET AL. MEDSCAPE)	61
FIGURE 16: SCHEMA DE LA REGULATION DE HIF (NATURE REVIEWS NEPHROLOGY, MAXWELL ET AL. 2016)	66
FIGURE 17: LESIONS HISTOLOGIQUES OBSERVEES DANS LA NEPHROPATHIE A L'ADRIAMYCINE CHEZ LE RAT (LEE ET AL. 2011)	78
FIGURE 18: ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE COMPARANT LA LIGNEE C57BL6J ET 129S2SVPAS DANS LE MODELE ANTI-MBG (RESULTATS DU DR MESNARD)	107
FIGURE 19: VARIANTS GENETIQUES AU SEIN DU GENE EPAS1 CHEZ LA SOURIS COMPARANT LA SOUCHE C57BL6J ET 129S2SVPAS (RESULTATS DU DR MESNARD)	108
FIGURE 20: RECEPTEURS AUX INTERLEUKINES UTILISANT LA CHAINE GAMMA COMMUNE (ROCHMAN ET AL. 2009. NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY)	119
FIGURE 21: SCHEMA DE L'ACTIVATION JAK/STAT (SHUAI ET AL. 2003. NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY)	123

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: ETIOLOGIES DES GLOMERULONEPHRITES EXTRACAPILLAIRES (LOHR ET AL. MEDSCAPE 2015).....	21
TABLEAU 2: CARACTERISTIQUES DES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES T AUXILLIAIRES TH1 ET TH2 (TIPPING ET AL. 2005).....	30
TABLEAU 3 : CAUSES GENETIQUES DE HSF (D'AGATI ET AL. 2011)	55

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Malgré d'importantes avancées au cours des 50 dernières années, en 2016, la connaissance de la physiopathologie des maladies rénales reste incomplète. La thérapeutique actuelle repose majoritairement sur des traitements systémiques visant plus souvent à limiter la progression qu'à attaquer l'étiologie des maladies rénales et ce, parfois, avec d'importants effets secondaires. Par rapport à d'autres spécialités médicales ayant vu l'essor des thérapies ciblées, le néphrologue a en grande partie dans son arsenal thérapeutique des produits anciens, comme par exemple les corticostéroïdes¹, avec des effets systémiques associés à une forte morbidité. Ceci reflète une connaissance imparfaite des mécanismes initiant et favorisant la progression des lésions rénales. Les quelques lignes infra, extraites du site web du centre hospitalier Mayo Clinic (Rochester, Minnesota, Etats-Unis) et destinées aux patients atteints d'une maladie rénale, illustrent bien les limites actuelles de la connaissance et des thérapeutiques en néphrologie:

"Depending on the underlying cause, some types of kidney disease can be treated. Often, though, chronic kidney disease has no cure. Treatment usually consists of measures to help control signs and symptoms, reduce complications, and slow progression of the disease. If your kidneys become severely damaged, you may need treatment for end-stage kidney disease. Your doctor will work to slow or control the cause of your kidney disease. Treatment options vary, depending on the cause. But kidney damage can continue to worsen even when an underlying condition, such as high blood pressure, has been controlled."

Pourtant, la maladie rénale chronique (MRC) est un problème majeur de santé publique associé à une grande morbi-mortalité. Le risque d'être hospitalisé ou de subir un événement cardio-vasculaire chez les patients ayant une MRC augmente avec le déclin de la fonction rénale². Par ailleurs, la probabilité de décès des patients dialysés de plus de 65 ans est 7 fois supérieure à celle de la population générale (Rapport de l'*United States Renal Data System*, USRDS 2010). Le nombre d'insuffisants rénaux chroniques augmente chaque année à cause de la progression de l'espérance de vie et des grands pourvoyeurs de MRC que sont le diabète et l'hypertension artérielle. En 2013, aux Etats-Unis, le rapport de l'USRDS dénombrait 661 648 patients en insuffisance rénale chronique terminale (IRCT), soit 0,2% de la population générale (Rapport de l'USRDS 2014) mais surtout l'incidence est en continuelle

progression (117 162 nouveaux patients en IRCT en 2013 avec une augmentation de l'incidence annuelle de 14% entre 2003 et 2013). En 2014, en France, le registre du Réseau Epidémiologique et Information en Néphrologie (REIN), dénombrait presque 80 000 patients insuffisants chroniques terminaux, soit 0,12% de la population générale, dont 35000 étaient porteurs d'un greffon fonctionnel et 45 000 étaient dialysés. L'incidence globale standardisée de l'IRCT qui était stable en France entre 2009 et 2011, tend à augmenter depuis, de 2,3 % par an.

Dans le contexte actuel de limitation des ressources, il faut aussi souligner l'aspect économique de la prise en charge de l'IRCT car le coût annuel par patient dialysé en France s'élève à 80 000€ et à 20 000€ pour un patient transplanté rénal à partir de la deuxième année de greffe. Le coût annuel global pour l'Assurance Maladie française de la prise en charge de l'IRCT a été estimé à plus de 4 milliards d'euros par an en 2007.

Cependant, il est à noter que toutes les données précédemment citées ne s'intéressent qu'à l'IRCT car les données épidémiologiques sur les patients suivis pour une MRC aux stades précoce ou modéré (Stades 1 à 4) sont moins standardisées et moins faciles d'accès. A ces patients il faudrait ajouter les patients ayant une MRC non diagnostiquée car actuellement le dépistage n'est pas systématique et la symptomatologie rénale reste assez pauvre. Il est à noter que les patients en IRCT ne sont plus accessibles aux thérapeutiques curatives et ne relèvent que des traitements de suppléance (dialyse ou transplantation rénale) onéreux et non dénués d'effets secondaires.

Les thérapies actuelles pour faire face à la progression de la MRC se fondent principalement sur le ralentissement de la progression vers l'IRCT, la prise en charge des complications et beaucoup moins sur la modulation de l'agression ou de la réponse rénale à cette agression. En effet, le contrôle des facteurs de risque cardio-vasculaires, les mesures hygiéno-diététiques pour diminuer la consommation de sel, et les traitements médicamenteux bloqueurs du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), ayant pour but le contrôle de la pression artérielle et la diminution du débit de protéinurie, sont la base actuelle de la prise en charge de la maladie rénale chronique (Haute Autorité de Santé).

Il est à noter que parmi les patients en IRCT, dans 6% des cas aux USA en 2013 et dans 11,6% des cas en France en 2014, la maladie rénale initiale était inconnue (USRDS et REIN). Le

manque de diagnostic découle d'un diagnostic tardif dans certains cas, mais aussi des lésions communes et peu spécifiques souvent retrouvées dans l'analyse histologique des reins de MRC qui aboutissent au traitement symptomatique cité ci-dessus. Ces éléments montrent bien qu'il existe encore des grandes lacunes dans la compréhension des facteurs initiateurs des lésions rénales et des mécanismes de progression de la MRC. Une meilleure compréhension de ceux-ci devrait permettre de développer des thérapeutiques ciblées aboutissant à une diminution du nombre de patients atteignant le stade de la suppléance.

Même dans le cas précis des maladies rénales ayant un facteur étiologique assez clairement identifié comme le diabète, l'hypertension artérielle ou certaines glomérulonéphrites, et malgré des grandes avancées récentes dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques, la thérapeutique actuelle vise à diminuer l'agression systémique et néglige les mécanismes modulant la réponse tissulaire rénale. Comme nous le verrons dans ce travail, ces mécanismes modulateurs tissulaires rénaux ont un rôle majeur dans l'initiation, la progression et le pronostic de beaucoup de maladies rénales.

Les études épidémiologiques qui ont montré la susceptibilité génétique face à la MRC nous apprennent qu'il existe des facteurs de risque de progression qui vont aboutir à des pronostics rénaux différents face au même niveau d'agression. Il existe, en effet, des différences ethniques majeures dans la prévalence et la gravité de la MRC. Les polymorphismes du gène *APOL1* en sont un exemple marquant qui expliquent en partie la susceptibilité des Afro-américains face à la progression de la MRC^{3,4}. Les mutations du gène *APOL1* sont associées à un début plus précoce de la maladie rénale⁵, de l'albuminurie⁶ et une dégradation plus rapide de la fonction rénale. Ces mutations sont retrouvées exclusivement chez des descendants d'Africains et on pense qu'elles ont apporté une résistance aux trypanosomiasés. Les conséquences fonctionnelles de ces polymorphismes génétiques ne sont pas encore complètement élucidées mais elles pourraient passer par une diminution d'expression d'*APOL1* dans les cellules épithéliales glomérulaires et dans les artéioles rénales⁷. Les études sur *APOL1* dans différentes maladies rénales, souvent ayant une atteinte glomérulaire comme la néphropathie associée au VIH (HIVAN)^{8,9}, la hyalinose segmentaire et focale (HSF)¹⁰ ou la glomérulopathie hypertensive, nous prouvent que ces facteurs locaux tissulaires ont un impact majeur dans la génération et progression des lésions. Cela renforce

l'idée que ces systèmes locaux sont des cibles essentielles afin de moduler non pas l'agression rénale mais la réponse tissulaire rénale face à celle-ci.

Le glomérule, unité de filtration élémentaire du rein (**Figure 1**), est un élément clé dans l'initiation des lésions rénales conduisant dans un deuxième temps à la MRC. Les principales étiologies des maladies rénales comme le diabète, l'hypertension et évidemment les glomérulonéphrites provoquent des altérations de la structure glomérulaire qui portent atteinte à la fonction rénale. Certains mécanismes de réponse glomérulaire aux agressions peuvent être communs et représenter des voies de signalisation pouvant être ciblées en thérapeutique.

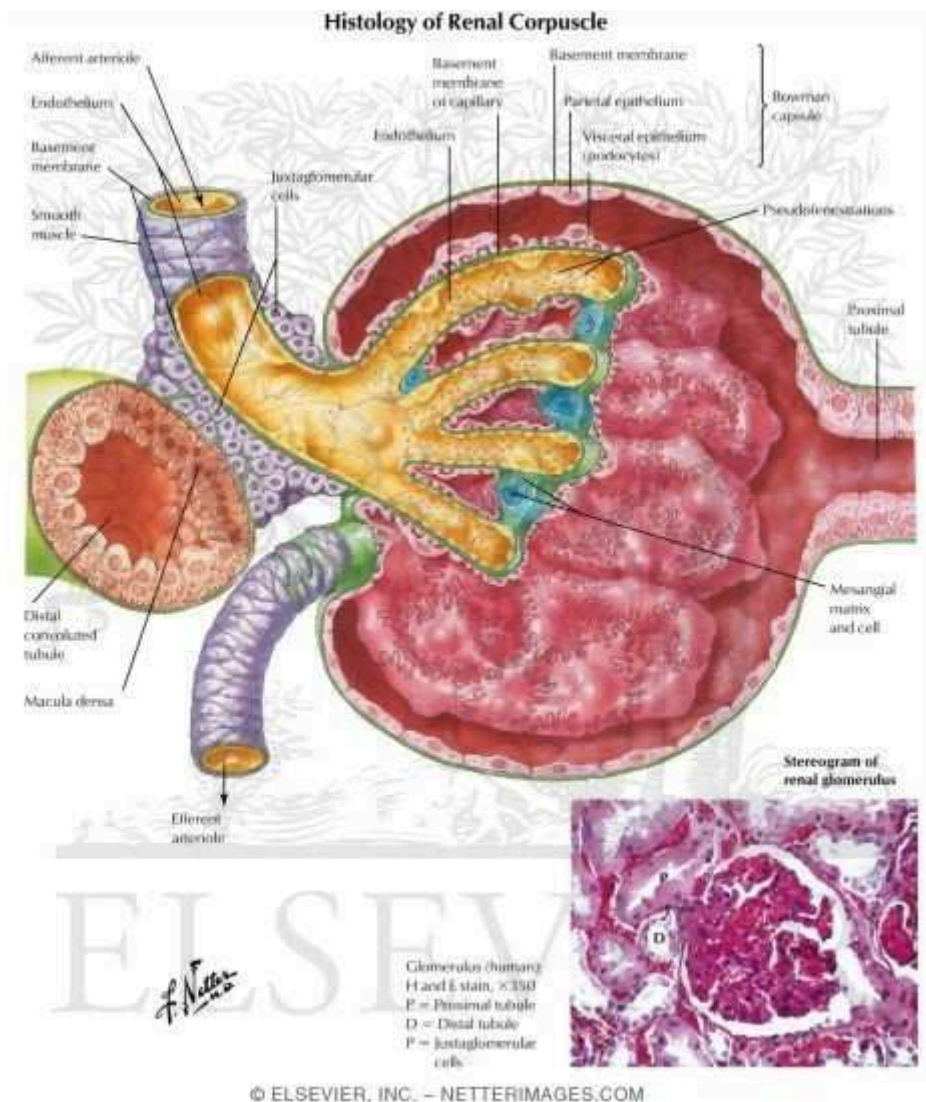


FIGURE 1: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GLOMERULE (NETTERIMAGES, ELSEVIER®)

Chaque rein contient environ 1 million de glomérules qui constituent les unités de filtration du rein. Le glomérule est composé d'un peloton vasculaire spécialisé vascularisé par une artériole afférente et s'évacuant par une artériole dite efférente. Entre l'artériole afférente et efférente se trouve l'appareil juxta-glomérulaire qui régule notamment une fonction endocrine importante du rein qu'est la sécrétion de rénine. Les capillaires glomérulaires sont soutenus par les cellules mésangiales qui sont en continuité avec les cellules musculaires lisses des artérioles. Les cellules endothéliales des capillaires glomérulaires qui sont posées sur la face interne de la membrane basale glomérulaire sont fenestrées. La membrane basale glomérulaire est bordée à sa face externe par les interdigitations ou pédicelles, qui sont des prolongements cytoplasmiques d'une cellule épithéliale très différenciée, le podocyte (**Figure 2**). L'ultrafiltrat glomérulaire, constituant l'urine primitive, atteint la chambre urinaire au contact des podocytes et transite vers le pôle urinaire situé à l'opposé du pôle vasculaire. La barrière glomérulaire est constituée de 3 composants essentiels: la cellule endothéliale au contact du sang, la membrane basale glomérulaire et le podocyte au contact de l'urine primitive. Les pédicelles ou prolongements cytoplasmiques podocytaires sont enchevêtrés pour recouvrir les capillaires glomérulaires et les contacts entre les pédicelles constituent les diaphragmes de fente à travers lesquels transite l'ultrafiltrat (**Figure 3**). La protéine néphrine est le composant principal du diaphragme de fente, ayant un diamètre de 35 à 40 nm, et qui associe d'autres protéines comme NEPH, la podocine ou CD2AP. Le diaphragme de fente est connecté à la structure d'actine du podocyte qui est régulé par l' α -actine-4, l'INP2 et la myosine 1E. Le maintien de cette structure podocytaire est un mécanisme calcium-dépendant. En effet, la phospholipase C epsilon 1 (PLC ϵ 1) entraîne une production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP3). L'IP3, à son tour, permet l'entrée du calcium dans la cellule par le canal calcique transient receptor potential cation channel 6 (TRPC6). TRPC6 régule la polymérisation de l'actine. A la surface basale du podocyte on détecte des molécules d'adhésion comme l'intégrine α 3 β 1 et le α -dystroglycane associé à la laminine. Les intégrines sont couplées au cytosquelette d'actine via un complexe associant taline, vinculine et paxilline. L' α -dystroglycane se lie à l'actine via l'utrophin. La podocalyxine et la glomerular epithelial protein 1 (GLEPP-1) chargées négativement sont détectées au pôle apical de la cellule podocytaire (**Figure 4**).

Les cellules pariétales épithéliales glomérulaires tapissent la face interne de la capsule de Bowman délimitant la partie extérieure de la chambre urinaire.

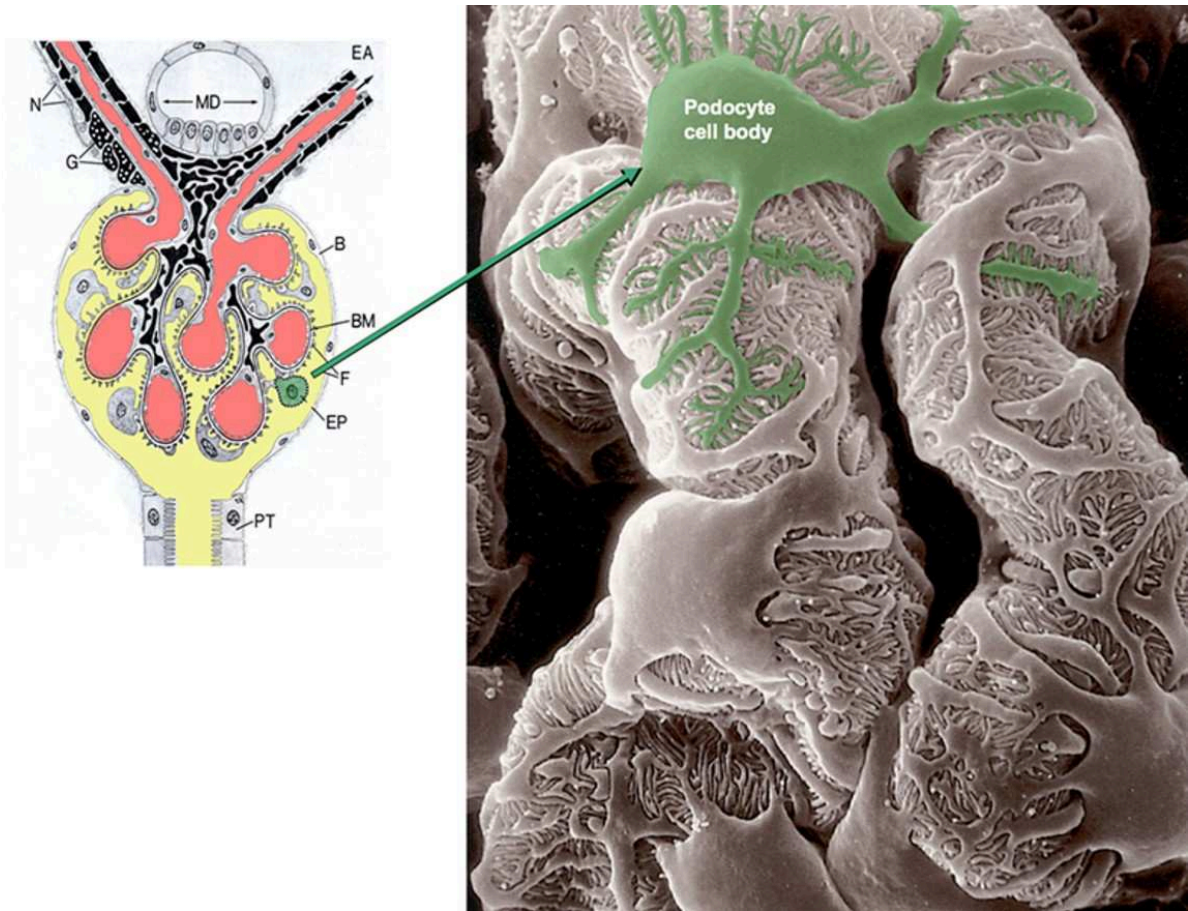


FIGURE 2: STRUCTURE PODOCYTAIRE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (KIDNEY RESEARCH CENTER, COLOGNE)

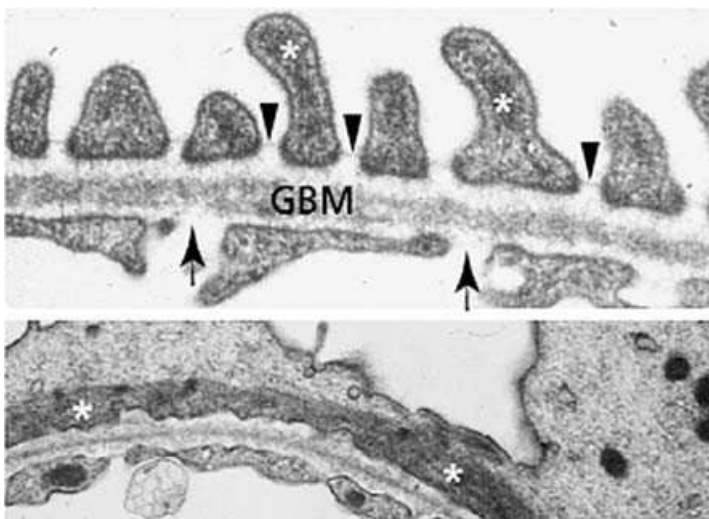


FIGURE 3: STRUCTURE DE LA BARRIERE DE FILTRATION GLOMERULAIRE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (WOLFF ET AL. 2009)

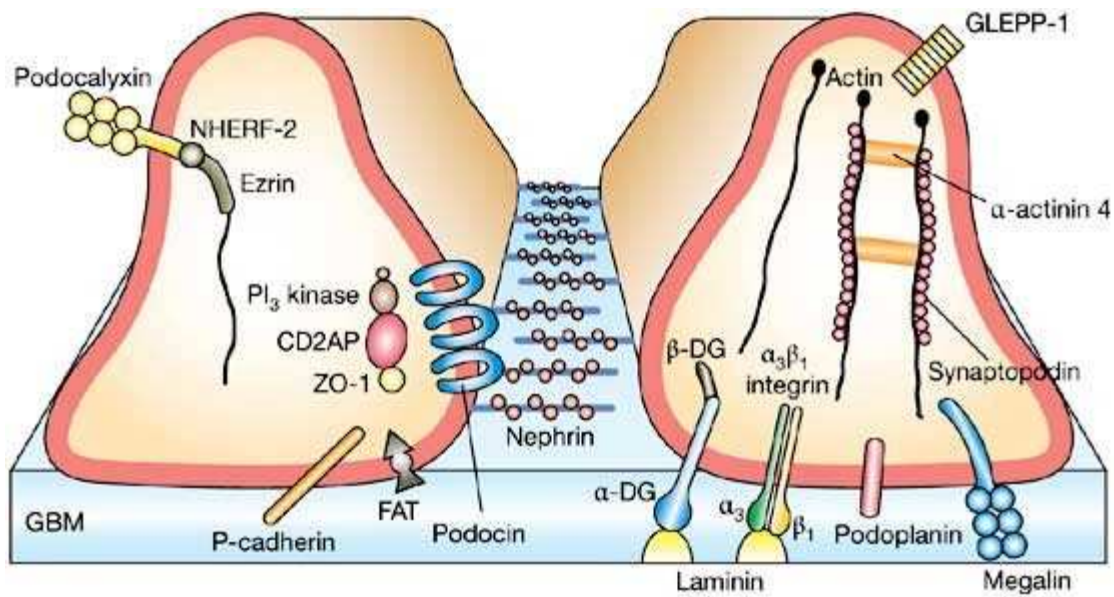


FIGURE 4: DIAPHRAGME DE FENTE PODOCYTAIRE (KIDNEY RESEARCH CENTER, COLOGNE)

Dans ce travail de thèse, le but a été d'approfondir les mécanismes d'initiation et de progression des lésions glomérulaires au cours de différents modèles expérimentaux d'agression glomérulaire. Le premier étudiant les glomérulonéphrites dites inflammatoires (modèle par anticorps anti membrane basale glomérulaire), le second est un modèle d'agression podocytaire plus spécifique (modèle de néphropathie à l'adriamycine) et le dernier étudie le crosstalk podocyte-endothélium glomérulaire au cours de la néphropathie hypertensive expérimentale.

L'hypothèse de ce travail, et liant ces différents modèles expérimentaux, est que les effecteurs locaux tissulaires rénaux, en particulier l'épithélium glomérulaire et l'endothélium ont un rôle clé dans le comportement face à l'agression systémique. Une meilleure compréhension de ces mécanismes de réponse «épithélio-endothéliaux» pourrait permettre le développement de thérapies plus ciblées en néphrologie. Enfin, cette réponse pourrait expliquer la variabilité interindividuelle d'expression de la pathologie rénale chez des individus soumis à des niveaux d'agression similaires.

Dans cette introduction les différentes pathologies glomérulaires étudiées vont être détaillées avec les modèles expérimentaux correspondants. Les connaissances physiopathologiques ainsi que les thérapeutiques actuellement utilisées seront aussi brièvement rappelées.

GLOMERULONEPHRITES RAPIDEMENT PROGRESSIVES DITES "A CROISSANTS EXTRACAPILLAIRES"

Les glomérulonéphrites sont la 3ème cause d'insuffisance rénale terminale aux USA (USRDS) et en France (REIN) après le diabète et l'hypertension artérielle. Elles ont une morbidité liée non seulement à leur gravité mais aussi aux techniques et thérapeutiques utilisées aujourd'hui pour les traiter. La glomérulonéphrite rapidement progressive est un syndrome clinique associant un sédiment urinaire actif (hématurie et protéinurie) avec une dégradation rapide de la fonction rénale. L'évolution naturelle de ce syndrome se fait vers l'insuffisance rénale terminale nécessitant un traitement de suppléance. Malgré l'utilisation de thérapeutiques agressives, le pronostic de ces pathologies reste réservé. Il s'agit d'un diagnostic syndromique et les étiologies en cause sont très variées (**Tableau 1**) mais aboutissent à une lésion commune: l'atteinte glomérulaire sévère incluant une prolifération cellulaire dans la chambre urinaire appelée prolifération extra-capillaire ou "croissant cellulaire". Elle est définie par la présence de deux ou plusieurs couches cellulaires dans l'espace de Bowman (chambre urinaire glomérulaire). La sévérité de l'atteinte rénale et le pronostic sont liés, d'après certaines études, au pourcentage de glomérules présentant une prolifération extra-capillaire sur la biopsie^{11,12} et aux caractéristiques scléreuse ou cellulaire de ceux-ci ainsi qu'à l'intégrité de la capsule de Bowman.

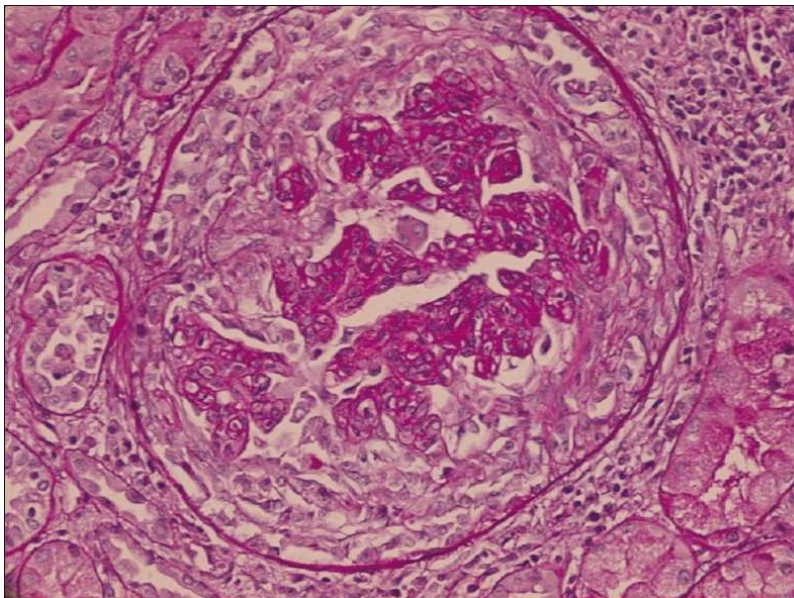


FIGURE 5: PROLIFERATION EXTRA-CAPILLAIRE, COLORATION PAR L'HEMATOXYLINE ET L'EOSINE (FADILI ET AL. 2009)

Crescentic Glomerulonephritis

Anti-GBM antibody

Goodpasture syndrome (lung and kidney involvement)

Anti-GBM disease (only kidney involvement)

Immune complex

Postinfectious (staphylococci/streptococci)

Collagen-vascular disease

Lupus nephritis

Henoch-Schönlein purpura (immunoglobulin A and systemic vasculitis)

Immunoglobulin A nephropathy (no vasculitis)

Mixed cryoglobulinemia

Primary renal disease

Membranoproliferative glomerulonephritis

Fibrillary glomerulonephritis

Idiopathic

Pauci-immune

Granulomatosis with polyangiitis (Wegener granulomatosis)

Microscopic polyangiitis (MPA)

Renal-limited necrotizing crescentic glomerulonephritis (NCGN)

Churg-Strauss syndrome

TABEAU 1: ETIOLOGIES DES GLOMERULONEPHRITES EXTRACAPILLAIRES (LOHR ET AL. MEDSCAPE 2015)

Les mécanismes aboutissant à l'altération de l'homéostasie glomérulaire et la formation des lésions prolifératives ne sont pas complètement élucidés. Par ailleurs, le mécanisme par lequel on observe des lésions tubulo-interstitielles après une atteinte glomérulaire est l'objet d'intenses recherches. Sa compréhension pourrait expliquer la progression vers la MRC et la fibrose rénale.

Les éléments initiateurs de la formation des lésions prolifératives glomérulaires a été extensivement étudié grâce à un modèle expérimental murin de glomérulonéphrite: la néphrite par injection de sérum néphrotoxique ou modèle par anticorps anti-membrane basale glomérulaire (MBG). Il paraît important de détailler le modèle animal pour comprendre ses avantages et ses limites afin d'avoir un regard plus critique auprès des résultats obtenus au cours des dernières années.

MODELE PAR ANTICORPS ANTI-MEMBRANE BASALE GLOMERULAIRE OU NEPHRITE TOXIQUE

Le modèle expérimental classiquement utilisé pour l'étude des glomérulonéphrites sévères et utilisé dans la première partie de ce manuscrit est le modèle dit anti-MBG, parfois appelé «néphrite toxique» voire néphrite de Masugi¹³.

Ce modèle a été mis en place en 1920 par Jean Redman Olivier chez le chien et reproduit chez le lapin par Matazo Masugi en 1932. Il consiste en une injection intraveineuse ou intrapéritonéale d'un sérum immun hétérologue fabriqué à partir d'immunisation de moutons ou de lapins contre des extraits de cortex rénal de rat ou d'autres mammifères. Les anticorps hétérologues se déposent de façon quasi immédiate dans les glomérules. On note un afflux de polynucléaires neutrophiles¹⁴ précoce (<2h). Il s'agit de la première phase appelée phase hétérologue mettant classiquement en jeu l'immunité innée. Secondairement, une immunité adaptative fait suite, caractérisée par la production chez l'animal injecté d'immunoglobulines M et G contre les immunoglobulines de lapin ou de mouton « plantés » dans les glomérules. Ces immunoglobulines (Ig) se déposent secondairement (après J4) dans le glomérule de l'animal dans ce qui est appelé phase autologue. Ce dépôt d'Ig s'accompagne sur le plan histologique de lésions glomérulaires de prolifération endo-capillaire, de thrombi capillaires et dans certains cas de prolifération extra-capillaire. La détection par immunofluorescence des IgG marque un aspect linéaire membranaire. Lors de la découverte des anticorps anti-MBG chez l'Homme en 1967 cet aspect histologique a conduit à un rapprochement entre ce modèle expérimental et le syndrome de Goodpasture¹⁵. Il est cependant évident que même si on observe des lésions histologiques similaires, le modèle animal est allo-immun et le syndrome de Goodpasture chez l'Homme implique l'auto-immunité.

MODELE ANTI-MBG PASSIF, PASSIF ACCELERE ET ACTIF

Afin d'éclaircir les différents modèles englobés sous le terme de néphrite toxique ou modèle anti-MBG, il convient de différencier la méthode utilisée pour induire les lésions rénales. Dans le modèle passif, utilisé dans ce travail, il n'existe pas de pré-immunisation de l'animal contre les IgG hétérologues. Le modèle est alors dit passif « simple ». Une variante dite passif « accéléré », décrite en 1965, consiste à pré-immuniser les animaux allant recevoir le sérum néphrotoxique contre les IgG hétérologues avec de l'adjuvant complet de Freund (émulsion lipidique avec une forme inactivée de mycobactérie potentialisant la réponse immunitaire cellulaire). Les phases autologues et hétérologues sont censées se télescoper le but étant d'augmenter la réponse inflammatoire. Enfin, le modèle actif, décrit en 1962 chez le mouton¹⁶, consiste à immuniser directement l'animal avec des extraits glomérulaires ou de membrane basale hétérologue associés à l'adjuvant de Freund. Ce modèle actif se rapproche

plus de l'auto-immunité et est aussi dénommé "experimental auto-immune glomerulonephritis" (EAG). Il sera détaillé par la suite.

UN SERUM EXCLUSIVEMENT ANTI-MEMBRANE BASALE GLOMERULAIRE?

Le sérum néphrotoxique utilisé pour toutes les expériences de ce travail est produit par le Dr. Laurent Mesnard dans notre laboratoire. La méthode d'obtention de ce sérum et de ceux utilisés dans les différents travaux expérimentaux permet de comprendre sa poly-spécificité. Les dépôts « linéaires » membranaires d'Ig observés en immunofluorescence révèlent non seulement une affinité particulière pour de nombreux épitopes de la MBG mais aussi pour d'autres sites antigéniques, cette fois endothéliaux, mésangiaux et podocytaires¹⁷. La fenestration de l'endothélium glomérulaire faciliterait l'accès des anticorps à la MBG et au mésangium. La nature de l'immunogène est à l'origine de la poly-spécificité du sérum néphrotoxique. Dans plusieurs études, des broyats de cortex total de souris ou de rat sont utilisés afin de produire les anticorps. Dans d'autres, ce sont des extraits protéiques produits à partir de glomérules isolés. Cependant, la poly-spécificité du sérum est probablement à l'origine de sa pathogénicité. En effet, les anticorps anti collagène IV ou anti-laminine seuls n'ont quasiment pas de pouvoir pathogène chez la souris¹⁸ malgré leur dépôt sur la membrane basale glomérulaire et l'élimination du composant anti-collagène IV du sérum néphrotoxique ne diminue pas sa pathogénicité¹⁹. Plusieurs cibles principales du sérum néphrotoxique, en plus du domaine non-collagénique de la chaîne $\alpha 3$ du collagène IV, ont été décrites principalement par l'équipe de David Salant à Harvard: l'aminopeptidase A (ou Glutamyl aminopeptidase)¹⁹, protéine membranaire podocytaire et aussi présente sur la bordure en brosse des cellules tubulaires proximales, l'intégrine $\beta 1$, la laminine $\beta 1$ ou la *protein tyrosine phosphatase, receptor type O* (PTPRO et anciennement notée GLEPP-1)²⁰.

SIMILITUDES ET DIFFERENCES AVEC D'AUTRES MODELES DE GLOMERULOPATHIES

Il est intéressant de noter certaines similitudes et des différences entre le modèle de néphrite toxique et d'autres modèles utilisés classiquement pour l'étude des glomérulopathies immunes comme la glomérulonéphrite extra-membraneuse²¹.

Le modèle classique de néphrite de Heymann, décrit en 1959 chez le rat, reste le meilleur modèle de glomérulonéphrite extramembraneuse de nos jours^{22,23}. Ce modèle auto-immun est induit par l'immunisation de rats contre des extraits de bordure en brosse tubulaire et

entraîne une glomérulopathie protéinurique avec des dépôts membranaires d'Ig. En 1982, la mégaline (une protéine située dans la bordure en brosse des cellules tubulaires proximales et dans les podocytes) fut identifiée comme l'antigène cible des anticorps circulants provoquant, lorsqu'ils se déposent dans le glomérule, l'activation du complément et la genèse des lésions. En 1990, la cible antigénique a été précisée identifiant un complexe associant mégaline et la protéine receptor associated protein (RAP)²⁴. Dans le modèle actif le rat est immunisé contre des extraits de rein de rat contenant des antigènes de la bordure en brosse de la cellule tubulaire proximale associés à l'adjuvant de Freund. Les rats développent des Ig environ 2 semaines après, avec des dépôts glomérulaires d'IgG et C3 survenant à 3-4 semaines. Une protéinurie apparaît dans les 6-8 semaines suivie d'un syndrome néphrotique. Le modèle passif consiste en l'injection d'anticorps dirigés contre la bordure en brosse tubulaire proximale du rat fabriqués chez le lapin ou le mouton ou de l'antigène lui-même. Dans ce cas on observe, comme dans le modèle de néphrite toxique, une phase hétérologue (débutant à 3-4j) et une phase autologue (à 15-21j). On note un épaissement de la MBG, une altération des podocytes, une protéinurie et des dépôts extramembraneux d'IgG, et des fractions C3 et C5b-9 du complément. Lors de la phase autologue les Ig produites par le rat se déposent dans le glomérule et accentuent la protéinurie²⁵.

Il est à noter que la mégaline est absente des podocytes chez l'Homme et chez la souris. Ce modèle n'a donc jamais pu être reproduit chez la souris mais la technique de transgénèse CRISPR-Cas9, actuellement en essor, pourrait permettre de nos jours des nouvelles avancées physiopathologiques utilisant ce modèle chez le rat.

En 2007, Meyer décrit pour la première fois un modèle de lésions podocytaires et albuminurie induit par l'administration d'un sérum hétérologue de lapin immunisé contre des extraits de podocytes murins immortalisés (lignée cellulaire créée par Peter Mundel²⁶) avec l'aide de l'adjuvant de Freund²⁷. On note dans ce modèle une expansion mésangiale, une dédifférenciation podocytaire et des dépôts linéaires membranaires d'Ig et de complément. Il est évident que ce phénotype rénal s'apparente à celui observé dans la néphrite toxique. Ce modèle de moindre gravité nous suggère que les antigènes podocytaires comme l'aminopeptidase A peuvent être en cause dans la genèse des lésions induites par le sérum néphrotoxique. La séparation conceptuelle entre ce modèle et la néphrite toxique est donc

difficile à faire mais dans le modèle de Meyer une prolifération cellulaire extra-capillaire n'est pas observée.

D'un point de vue mécanistique, il existe un modèle plus proche de la physiopathologie auto-immune de la maladie anti-MBG chez l'Homme qui est le modèle actif anti-MBG actuellement nommé "Experimental autoimmune glomerulonephritis" (EAG). En effet, dans le modèle anti-MBG passif utilisé dans ce manuscrit l'élément initiateur est un anticorps hétérologue qui peut difficilement se substituer à la pathologie humaine. L'EAG est déclenchée par des auto-anticorps dirigés contre le domaine non collagénique 1 de la chaîne $\alpha 3$ du collagène IV ($\alpha 3IV-NC1$). Ces anticorps "anti-MBG" ont été identifiés en 1967 et leur rôle pathogène a été discuté chez le primate¹⁵. Plusieurs auteurs ont donc cherché à reproduire un modèle de glomérulonéphrite chez l'animal utilisant cet antigène collagénique. Pendant plusieurs années le modèle d'EAG n'a pu être développé que chez le rat Wistar Kyoto (WKY) immunisé contre des extraits de MBG digérés par la collagénase²⁸⁻³² ou directement contre la fraction $\alpha 3IV-NC1$ ^{33,34} toujours en association avec l'adjuvant complet et/ou incomplet de Freund. En dépit d'une induction d'anticorps, la difficulté à induire des lésions glomérulaires dans d'autres souches de rats^{35,36} et chez la souris a montré une grande dépendance du modèle vis à vis du fonds génétique de l'animal. En effet, des loci de susceptibilité ont été étudiés sur les chromosomes 13 et 16 désignés *Crng1* et *Crng2* et il a été montré que le nombre de copies d'un polymorphisme du gène *Fcgr3*, codant pour un récepteur du fragment Fc des Ig, était en partie responsable de la susceptibilité des rats WKY à la glomérulonéphrite³⁷. *Crng2*, en particulier, module l'activation et le recrutement macrophagique³⁸. Le rôle des lymphocytes T a été démontré par transfert des leucocytes malades à un rat indemne³⁹⁻⁴¹.

En pratique, l'apparition des systèmes de knock-out chez la souris à partir des années 1980 a permis un essor des études physiopathologiques sur la glomérulonéphrite. Cependant, le modèle EAG étant restreint au rat WKY, celui-ci ne s'est pas autant développé comparé au modèle passif anti-MBG.

Enfin, des modèles immunisant des souris contre des fragments humains $\alpha 3IV-NC1$ ont aussi été développés^{42,43} mais sans convenir aux critères d'auto-immunité. Cependant deux éléments peuvent changer cette limitation dans les années à venir. D'une part, une étude récente a réussi à mettre au point un modèle intéressant d'auto-immunisation anti- $\alpha 3IV-NC1$

chez la souris DBA/1⁴⁴. Il est intéressant de noter qu'en fonction de la dose et la répétition des injections la souris va développer une glomérulonéphrite extra-membraneuse (deux doses)⁴⁵ ou des lésions extracapillaires surajoutées montrant un *continuum* lésionnel dans ces différents modèles d'agression glomérulaire. Le rôle de l'immunité T cellulaire dans ce dernier modèle est évoqué mais reste à confirmer. Par ailleurs, l'avènement de la méthode Crispr-Cas9 de modification génétique pourrait aussi redonner essor au modèle EAG chez le rat.

LIMITES ET UTILITE DU MODELE DE NEPHRITE TOXIQUE CHEZ LA SOURIS

L'interprétation des résultats utilisant des modèles expérimentaux nécessite une bonne connaissance de leurs limites. Dans le cas du modèle anti-MBG ou néphrite toxique elles sont de plusieurs natures.

Tout d'abord, ce dernier met en jeu l'alloimmunité et non l'auto-immunité comme dans le cas de certaines glomérulonéphrites chez l'Homme (maladie de Goodpasture). Par ailleurs, la poly-spécificité du sérum fait de la néphrite toxique un modèle complexe et l'analyse des lésions histologiques ne doit pas uniquement s'intéresser aux seuls effets glomérulaires. Il s'agit aussi probablement d'un modèle d'agression endothéliale car on note des thrombi capillaires associés à d'autres lésions de microangiopathie thrombotique⁴⁶, et un recrutement leucocytaire accru, comme on le verra dans la suite du travail. Par ailleurs, il existe dans certains cas une mortalité ultra-précoce (premières heures) persistant même si les animaux sont préalablement néphrectomisés. A l'évidence, il s'expliquerait par des effets vasculaires "hors-cible" du sérum⁴⁷. Des travaux, non encore publiés de notre équipe montrent qu'il existe un effet dépressur hémodynamique précoce (dans les premières heures après l'injection) du sérum néphrotoxique. Cet effet est très dépendant du fond génétique de la souris, avec un effet vasoplégiant plus important chez la souris 129/Sv que chez la souris C57BL/6. Cet effet pourrait expliquer en partie la mortalité précoce parfois observée dans ce modèle. Cet effet vasoplégiant amène à la question du contenu en lipopolysaccharide (LPS) du sérum néphrotoxique. Ceci pourrait avoir une importance pour trois raisons. D'une part, le LPS a une action sur le podocyte via le Toll-like receptor 4. Ce dernier semble moduler la protéinurie comme le montrent les études de J. Reiser et P. Mundel chez la souris⁴⁸. Cet effet du LPS, cependant, semble difficilement extrapolable chez l'Homme⁴⁹. Par ailleurs, la contamination par le LPS du sérum peut majorer l'afflux de polynucléaires neutrophiles lors de la phase hétérologue. Cet effet serait à même d'augmenter les lésions endothéliales

thrombotiques voire extracapillaires⁵⁰⁻⁵². Enfin, le LPS a des effets hypotenseurs et vasoplégiques, et donc une contamination forte bactérienne pourrait expliquer une mortalité précoce chez l'animal. Même si peu d'auteurs ont mesuré les niveaux de LPS de leurs préparations de sérum néphrotoxique, ceci a été réalisé dans le laboratoire. Le sérum utilisé par notre équipe contient une quantité très faible de LPS, 80 000 fois inférieure à la dose utilisée pour induire une protéinurie chez la souris.

Une autre limite du modèle est la variabilité des lésions, en particulier extracapillaires, en fonction de l'animal injecté et de son fond génétique. La proportion de lésions extracapillaires peut ainsi varier entre 1% et 50%. Le modèle est indéniablement un modèle d'atteinte podocytaire, voire de hyalinose segmentaire et focale⁵³ pour certains bien que quelques auteurs mettent en doute la validité du modèle dans l'étude de la formation de la lésion extracapillaire. On note cependant dans le modèle une prolifération podocytaire dans les "croissants cellulaires" et on sait aujourd'hui que ceux-ci font partie intégrante des lésions extracapillaires chez la souris et chez l'Homme^{54,55}.

La variabilité liée au fond génétique montrée, entre autres, par notre équipe⁴⁶ nous rend critique face à de nombreuses études utilisant des lignées génétiquement peu stables, mixtes ou ayant un nombre de croisements en retour (backcross) insuffisant. Cependant cette variabilité peut être contrôlée en n'utilisant des souris de même fond génétique voire issues de la même portée (littermate) comme contrôles. Le respect de ces principes contraignants peut cependant poser des problèmes techniques d'animalerie. Un appariement en âge et sexe est aussi très recommandé du fait de la sensibilité accrue au sérum des souris plus jeunes et femelles.

Malgré les limites énoncées précédemment, et les différences avec la maladie anti-MBG humaine, le modèle expérimental anti-MBG a permis l'étude physiopathologique des glomérulonéphrites depuis quasiment 100 ans. Il est de façon claire un modèle aigu de glomérulopathie associée à une atteinte tubulo-interstitielle. Il est probable, comme on le verra par la suite, que l'atteinte tubulo-interstitielle soit en partie modulée par des mécanismes différents de l'atteinte glomérulaire. En effet, l'atteinte tubulo-interstitielle serait plus dépendante de l'immunité adaptative. Le modèle de néphrite toxique est donc un modèle permettant d'étudier les facteurs de susceptibilité et protecteurs locaux (intra-

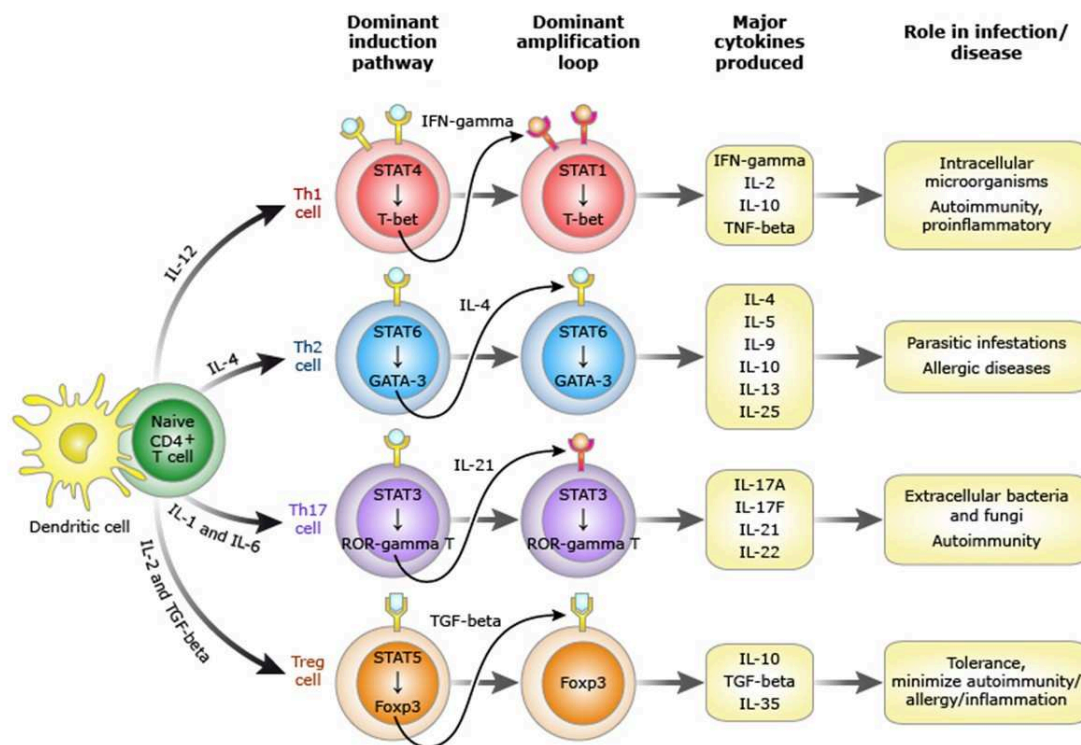
rénaux) conduisant, en particulier, à une modulation des lésions rénales. Il est aussi un bon modèle permettant l'étude de la progression des lésions glomérulaires. Comme exemple nous citerons l'étude du rôle des variations dans le gène *Fcgr3b* conférant une susceptibilité aux lésions rénales aux rats WKY dans le modèle anti-MBG. Cette même susceptibilité est retrouvée dans certaines maladies inflammatoires comme le lupus et la polyangéite microscopique chez l'Homme^{37,56}. Quelle que soit l'agression initiale on ne peut exclure que des mécanismes protecteurs ou aggravants locaux déterminent la gravité des lésions et le pronostic rénal, et c'est là une des raisons majeures de l'intérêt du modèle.

Nous allons maintenant détailler les mécanismes physiopathologiques des glomérulonéphrites qui ont majoritairement été étudiés grâce au modèle de néphrite toxique précédemment présenté.

IMMUNITE ADAPTATIVE

Une littérature très abondante marquée par un début en 1978⁵⁷ mais ayant pris un grand essor dans les années 1990 attribue à l'immunité cellulaire un rôle majeur dans la formation des lésions glomérulaires extracapillaires. Nous allons détailler par la suite les principales études évaluant le rôle des lymphocytes T CD4+ auxiliaires dans le modèle anti-MBG. Ces travaux proviennent essentiellement de l'équipe australienne associant Peter Tipping, Richard Kitching et Stephen Holdsworth et de l'équipe allemande d'Ulf Panzer et Hans-Joachim Paust. Nous mettrons en avant, par ailleurs, certains travaux réalisés par notre équipe discutant cette littérature.

Human T helper (Th) cell subsets



CD4+: cluster of differentiation 4 positive; IL: interleukin; TGF-beta: transforming growth factor-beta; STAT: signal transducer and activator of transcription; T-bet: a transcription factor also called TBX21, for T-box 21; GATA-3: a transcription factor that binds to the deoxyribonucleic acid (DNA) sequence "GATA"; ROR-gamma T: RAR-related orphan receptor-gamma T; Foxp3: forkhead box P3; IFN-gamma: interferon-gamma; TNF-beta: tumor necrosis factor-beta.

UpToDate®

FIGURE 6: VOIES DE DIFFÉRENCIATION LYMPHOCYTAIRES T CD4+ AUXILLIAIRES (UPTODATE)

Les différentes voies de différenciation lymphocytaires T auxiliaires (T helper) ont été étudiées dans le modèle depuis les années 1990 (Figure 6).

La voie de différenciation Th1 est induite par l'IL-12 (secrétée par les cellules dendritiques), l'IL-18, l'IL-27, l'IFN- γ et par la signalisation liée aux *Pattern recognition receptors* (PRR). Les cellules Th1 produisent l'interféron γ , les interleukines 2 et 10, le *Tumor necrosis factor* (TNF) et la lymphotoxine α . Elles activent les macrophages, participent à la réaction d'hypersensibilité retardée et stimulent la production des Ig activant le complément (ex : IgG1) par les lymphocytes B. La voie Th1 a un rôle essentiel dans l'élimination des pathogènes intracellulaires et les mycobactéries en particulier.

La différenciation Th2 est au contraire stimulée par l'IL-4 et les lymphocytes Th2 produisent de l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et l'IL-10 chez la souris. La voie Th2 est impliquée dans les phénomènes

allergiques, la destruction des parasites helminthes et nématodes et promeut la production d'anticorps IgE et IgG ne fixant pas le complément (ex : IgG4) (Tableau 2).

Table 1. Characteristics of T helper subsets.

	Th1 cells	Th2 cells
Inducing stimuli	IL-12, IFN- γ , IL-18, IL-27, PRR signalling	IL-4
Transcription factors	STAT4, STAT1, T-bet, NF κ B	STAT6, GATA3
Cytokines produced	IFN- γ , IL-2, TNF, lymphotoxin α	IL-4, IL-5, IL-13 (IL-10 in mice)
Chemokine receptor expression	CXCR3, CCR5, CCR1	CCR3, CCR4, CCR8
Antibody isotypes	Human: IgG1, IgG3, IgG2 Mouse: IgG2a, IgG3, IgG2b	Human: IgG4, IgE Mouse: IgG1, IgE
Effector response	Cell-mediated immunity, macrophage activation, antibody-mediated cellular cytotoxicity	Activation of eosinophils, allergy

TABEAU 2: CARACTERISTIQUES DES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES T AUXILLIAIRES TH1 ET TH2 (TIPPING ET AL. 2005)

La voie de différenciation Th17 a été découverte plus récemment et semble avoir un rôle important dans la lutte contre les bactéries extracellulaires et certains champignons. Les lymphocytes Th17 sécrètent l'IL-17 et l'IL-21 qui ont une action pro-inflammatoire et participent au recrutement des PNN. La voie Th17 est favorisée par un milieu riche en IL-1 β , IL-6 et IL-21. Il existe un rôle majeur des voies Th1 et Th17 dans les phénomènes d'auto-immunité et de la voie Th2 dans l'atopie. Les cytokines responsables de la production et de la différenciation Th17 activent la protéine transductrice STAT3. Les cellules T régulatrices vont avoir un effet modulateur sur ces différentes sous-populations lymphocytaires. Les sous-populations lymphocytaires auxilliaires peuvent être différenciées par leurs récepteurs aux chimiokines qui leur sont spécifiques. Les cellules Th1 expriment CXCR3 (cysteine-X-cysteine motif receptor 3) et CCR5 (cysteine-cysteine motif receptor 5), les Th2 expriment CCR3, CCR8, et CCR10 et les Th17 expriment CCR2 et CCR6. Certains facteurs de transcription sont essentiels à la différenciation lymphocytaire T auxiliaire. T-bet est essentiel à la maturation Th1: il induit la production d'IFN γ et de IL-12R et inhibe la sécrétion de IL-4, IL-5 et IL-17. De même GATA3 est nécessaire dans la maturation Th2 et ROR γ t pour la différenciation Th17.

Il est à noter que la différenciation lymphocytaire peut être modulée par la dose d'antigène. En effet, des doses faibles d'antigène favorisent la voie Th2 et les fortes doses d'antigène associées à l'adjuvant de Freund (sa version complète contenant des antigènes de mycobactéries) favorisent la voie Th1⁵⁸.

Dans le modèle expérimental anti-MBG il existe une activation lymphocytaire et un infiltrat inflammatoire souvent interstitiel avec une activation Th1. Cette activation Th1 est-elle

responsable des lésions glomérulaires ou est-elle associée à la gravité de la maladie et aux lésions tubulo-interstitielles ? Une étude récente de notre équipe a montré que l'infiltrat lymphocytaire n'était pas, de façon intéressante, corrélé à la sévérité des lésions⁴⁶ mais au fond génétique chez la souris.

Le fond génétique de la souris influence notablement les voies de différenciation Th. Par exemple, la souche C57BL/6 semble présenter une réponse Th plutôt Th1, tandis que les animaux BALB/cby présentent une polarisation préférentiellement Th2⁵⁹. Certains auteurs proposent que la polarisation Th explique la sensibilité différente de ces deux souches de souris au sérum néphrotoxique. Pourtant, les différences liées aux fonds génétiques ne se résument pas au seul compartiment lymphocytaire et bien d'autres facteurs non-lymphocytaires peuvent expliquer ces différences.

Une partie du rôle proposé comme joué par l'immunité cellulaire dans la genèse des lésions de GN s'appuie sur des travaux étudiant l'invalidation génétique des cytokines impliquées dans les voies de différenciation lymphocytaire type Th. La délétion totale des gènes des cytokines impliquées dans la voie Th1 comme l'IL-12⁶⁰, l'IFN γ ⁶¹ ou le TNF⁶² voire l'utilisation d'anticorps bloquants l'IL-12⁶³ et l'IFN γ ⁵⁹ atténuent la gravité des lésions dans le modèle anti-MBG. Cependant, comme nous le verrons au cours de notre travail, la délétion totale ou le blocage par anticorps de ces cytokines peut affecter d'autres cellules cette fois non lymphocytaires notamment épithéliales et présentes dans le tissu rénal. Ces cellules sont à même d'influencer la progression des lésions rénales. Par ailleurs, les résultats concernant certaines cytokines comme l'IFN γ ne sont pas univoques voire contradictoires^{64 65}. Nous verrons par la suite, comme nos résultats le suggèrent, que le rôle de l'immunité cellulaire semble s'opérer principalement dans le compartiment tubulo-interstitiel. Enfin, dans toutes ces études, les souches de souris ne sont souvent pas comparables par méconnaissance de leur fond génétique.

Quant à l'étude de la voie Th2 dans le modèle anti-MBG, la délétion génétique de l'IL-4⁶⁶ et de l'IL-10⁶⁷ a un effet aggravant et l'administration systémique de ces deux cytokines a un effet protecteur⁶⁸⁻⁷¹. Cependant, la délétion du gène de l'IL-13, cytokine produite par les lymphocytes Th2, n'a pas montré d'effet sur les lésions rénales⁷².

Quant aux signaux de co-stimulation, le blocage de CD86 (B7-2) par anticorps bloquant⁷³ ou délétion génétique⁷⁴ ou l'administration de CTLA4-Ig pour bloquer CD28⁷⁵ aboutit à des lésions aggravées avec un effet nul du blocage génétique combiné CD86/CD80 (B7-1)⁷⁶. La modulation de ces signaux de co-stimulation n'a cependant pas d'effet net sur la polarisation Th1/Th2. La modulation du signal CD40/CD154 de co-stimulation nécessaire pour la différenciation Th1/Th2 a aussi un effet dans le modèle puisque son inhibition atténue les lésions rénales et réduit la production d'IL-12 et des cytokines de la voie Th1⁷⁷. Cependant, dans ces études avec blocages systémiques ou délétions génétiques globales l'effet lié soit au compartiment circulant ou soit aux cellules résidentes est difficile à discerner comme nous le verrons par la suite. En effet, il existe une expression de CD80 par le podocyte⁴⁸ dans plusieurs modèles murins d'agression glomérulaire. Par ailleurs, les cellules glomérulaires exprimant le CD40 lors de l'induction du modèle anti-MBG pourraient avoir un rôle important dans le recrutement d'effecteurs inflammatoires⁷⁸.

Le même problème se pose lors de l'étude du rôle des facteurs de transcription classiquement décrits comme d'expression purement lymphocytaire comme JAK/STAT. Comme on le verra dans le manuscrit, STAT3⁷⁹ et STAT5 (Résultats, partie 2), sont détectées dans les cellules épithéliales rénales assurant un rôle majeur dans le développement des lésions.

Chez l'Homme, les arguments étayant le rôle direct de l'immunité cellulaire dans la formation des lésions glomérulaires sont moins bien établis. Les effecteurs cellulaires et cytokiniques lymphocytaires sont présents dans les biopsies des patients atteints de GNRP⁸⁰⁻⁸² mais leur rôle dans la genèse des lésions glomérulaires ou dans la progression de l'atteinte tubulo-interstitielle reste difficile à établir.

Par ailleurs, les travaux australiens et ceux de l'équipe allemande d'Ulf Panzer et Hans-Joachim Paust, ont détaillé le rôle aggravant de la réponse lymphocytaire Th17 dans le modèle anti-MBG utilisant des animaux génétiquement modifiés comme les souris IL-23^{-/-} ou IL-17^{-/-}⁸³. Ces animaux présentent un phénotype rénal atténué après transferts adoptifs lymphocytaires⁸⁴ ou la délétion du facteur de transcription Th17 ROR γ t⁸⁵. La production d'IL-17 provenant au moins des cellules lymphocytaires T $\gamma\delta$ ⁸⁶, peut induire la production du récepteur aux chimiokines CXCL5 dans les cellules tubulaires rénales^{87,88} induisant alors un

recrutement de neutrophiles induisant le microARN-155⁸⁹. Des niveaux élevés d'IL-17 ont aussi été mesurés dans les cortex des rats WKY soumis à la glomérulonéphrite anti-Thy1⁹⁰. Il existe cependant des résultats discordants sur le rôle protecteur de l'IL-17 produite par les cellules résidentes⁹¹. Celles-ci semblent identifiées comme des mastocytes. Une discordance existe entre la phase précoce (aggravation) (J6) et la phase tardive (protection) (J21)⁹² du modèle. Enfin, la signalisation en trans de l'IL-6 comme faisant partie de la voie Th17 a un effet aggravant dans le modèle anti-MBG⁹³.

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) ont un rôle modulateur sur les lymphocytes T auto-réactifs protégeant des phénomènes d'auto-immunité. Il semble exister une relation étroite entre la différenciation Th17 et les Treg. L'IL-6 inhibe la différenciation Treg et l'IL-2 interfère avec la différenciation Th17. L'IL-27 favorise la différenciation Th17 au détriment des Treg et les Treg inhibent la différenciation Th17. Les principales cytokines de l'induction des Treg sont le TGFβ et l'IL-2 qui activent les facteurs de transcription STAT5 et Foxp3. Les Treg secrètent l'IL-10, le TGFβ et l'IL-35. Ces Treg contrôlent l'activité Th1, Th2 et Th17 et ils ont montré un rôle protecteur dans le modèle dans plusieurs études⁹⁴⁻⁹⁶. En particulier, une étude récente met en lumière le rôle de la sous-population Treg CXCR3⁺⁹⁷.

ROLE DES LYMPHOCYTES B

Dans le modèle, il n'existe pas de rôle important des lymphocytes B et de la réponse humorale. En effet, les souris ayant une délétion du gène codant pour la chaîne lourde des Ig, et donc dépourvues de lymphocytes B, développent une réponse au sérum néphrotoxique similaire à leurs homologues sauvages⁹⁸.

LES LIMITES DU ROLE DES LYMPHOCYTES DANS LE MODELE : EXEMPLE DE LA SOURIS NUDE

Comme on l'a vu précédemment, un certain nombre d'études suggèrent le rôle de l'immunité cellulaire dans la formation des lésions glomérulaires et tubulo-interstitielles dans le modèle. Cependant, certaines études sont discordantes et l'une des explications pourrait passer par un effet lié au fond génétique. Cet effet est important et n'est pas souvent pris en compte, tout comme l'implication indirecte des délétions génétiques globales ou les blocages systémiques de cytokines. Celles-ci peuvent aussi affecter les cellules résidentes qui, comme on va le voir prochainement, partagent les systèmes de transduction et certains récepteurs

immuns. Par ailleurs, un effet différentiel glomérulaire et tubulo-interstitiel de l'immunité cellulaire n'est pas exclu.

Cependant, les études jetant le trouble dans cette théorie classique T CD4+ Th1/Th17 médiée, sont celles étudiant le modèle passif anti-MBG avec des souris immunodéficientes notamment dépourvues de lymphocytes T. En 1981, avant que les équipes australiennes avancent le rôle de l'immunité cellulaire dans le modèle, Y. Kusuyama et K. Saito ont injecté un sérum anti-MBG produit chez le lapin à partir d'extraits glomérulaires de rat aux souris athymiques *nu/nu* de fond génétique BALB/c⁹⁹. Ces souris athymiques vont finalement développer des lésions glomérulaires sévères avec des thrombi capillaires, une prolifération endocapillaire, des dépôts d'IgG de lapin et de C3 membranaires. Des synéchies floculo-capsulaires sont observées sur leurs illustrations ainsi qu'un aspect de prolifération extra-capillaire (**Figure 7**). Les conséquences fonctionnelles sur la protéinurie et la fonction rénale ne sont pas décrites.

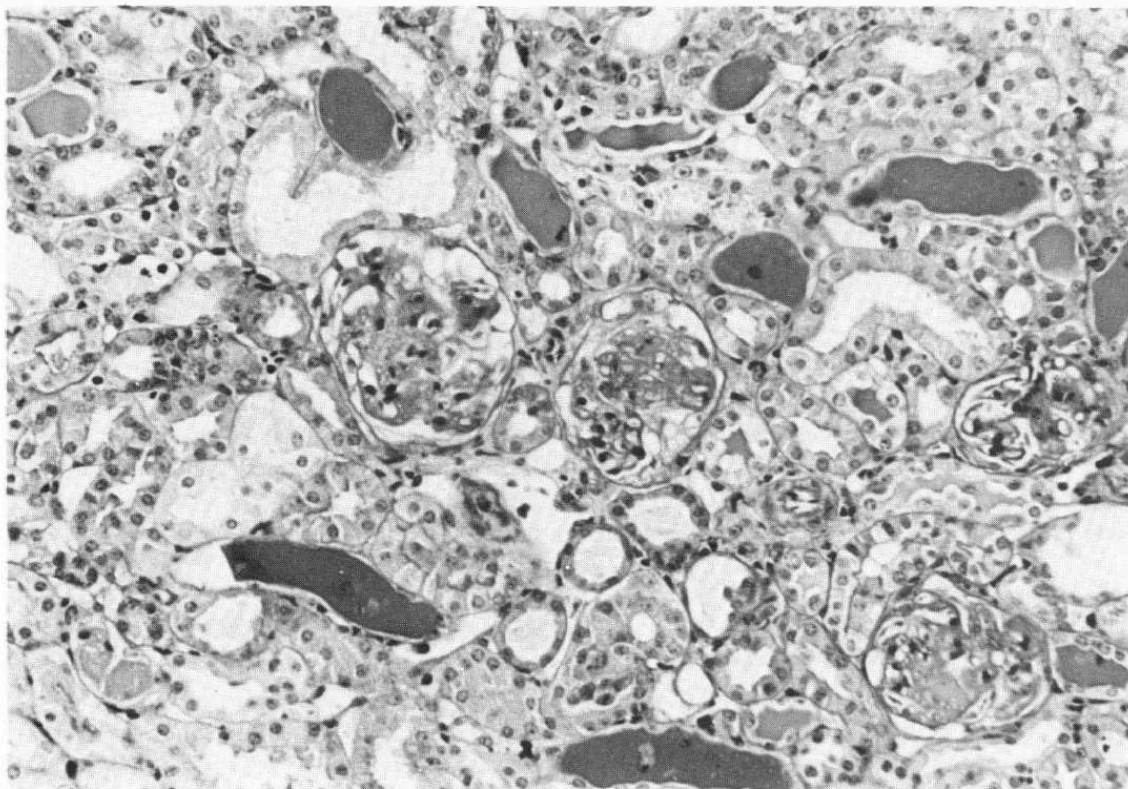


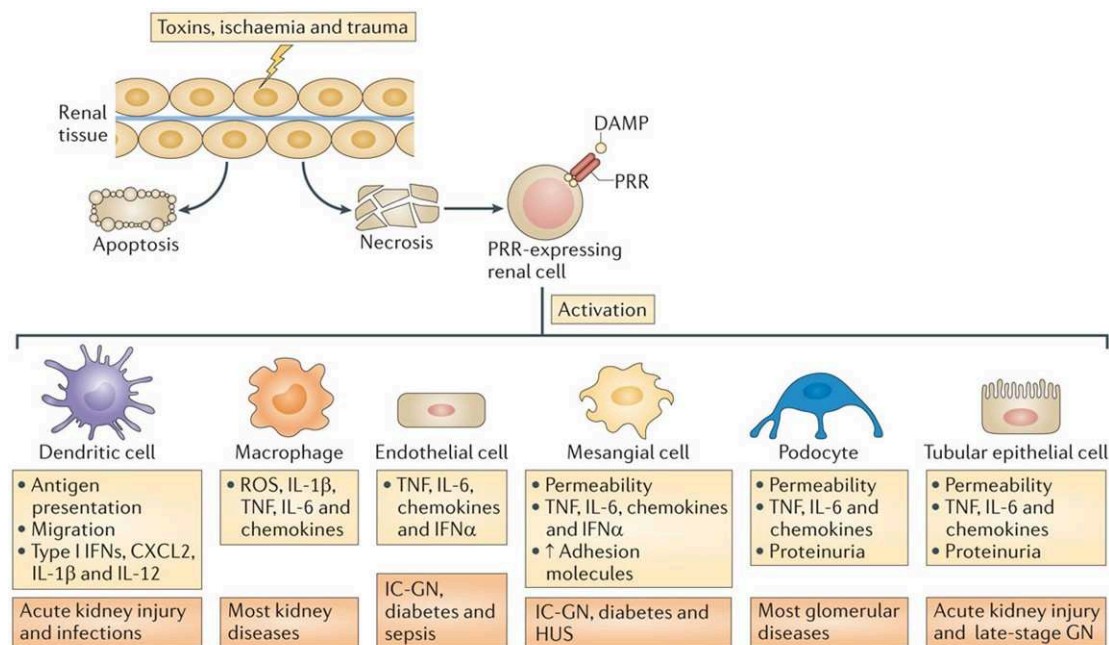
Fig. 1. Light micrograph of a renal cortical specimen from a *nu/nu* mouse 2 weeks after the injection of 0.1 ml of NTS(A). Proteinaceous PAS-positive materials in the glomeruli and numerous tubular casts can be seen. (PAS, original $\times 300$.)

FIGURE 7: LESIONS RENALES CHEZ LA SOURIS NUDE APRES INJECTION DE SERUM ANTI-MBG (KUSUYAMA ET AL 1981)

En 1991, une expérience similaire est de nouveau réalisée par une équipe japonaise avec des rats *nude* de fond génétique ACI injectés avec un sérum anti-MBG fabriqué chez le lapin à partir d'extraits glomérulaires de rat¹⁰⁰. Les rats *nude* injectés par le NTS développent une protéinurie et des lésions glomérulaires avec une dédifférenciation podocytaire et une prolifération mésangiale. Des dépôts linéaires d'IgG de rat et de complément sont observés mais les images histologiques ne permettent pas, cette fois, de conclure à la présence d'une prolifération extracapillaire.

Ces deux expériences utilisant le modèle passif anti-MBG, mettent l'accent sur l'importance de l'immunité innée (**Figure 8**) dans la genèse des lésions glomérulaires, mais laissent entrevoir des contradictions au sein de la littérature étudiant le rôle de l'immunité cellulaire dans le modèle.

RÔLE DE L'IMMUNITÉ INNÉE



Nature Reviews | Immunology

FIGURE 8: EFFECTEURS DE L'IMMUNITÉ INNÉE ET MALADIES RENALES (NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY)

POLYNUCLÉAIRES NEUTROPHILES

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont observés dans les biopsies précoces de glomérulonéphrites post-streptococciques, purpura rhumatoïde, glomérulonéphrites membrano-prolifératives, néphrite lupique, et autres glomérulonéphrites à croissants. Durant la phase précoce de la néphrite toxique on note un afflux de PNN dans les capillaires péri-

tubulaires et glomérulaires atteignant un pic entre 2h et 12h post-injection, comme montré, en 1965, par Dixon et Unanue¹⁰¹. La déplétion en PNN s'accompagne d'une diminution de la gravité du phénotype rénal et de la protéinurie. L'afflux des PNN est dépendant de l'environnement cytokinique local comme la production de fraction C5a du complément, de l'IL-8¹⁰² ou de l'expression épithéliale de CXCL5⁸⁷. L'utilisation de la microscopie intravitale a permis de montrer que le contact entre le PNN et le glomérule est très bref et qu'il est augmenté en cas d'inflammation. Ces PNN sont à l'origine d'une production de ROS locale¹⁰³. Dans le capillaire glomérulaire le PNN interagit étroitement grâce à son récepteur CD11b (Mac-1) avec la cellule endothéliale via les sélectines^{104,105}, intégrines et l'intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). Les PNN vont participer à la phagocytose des complexes immuns in situ et vont produire des réactifs dérivés de l'oxygène (ROS) comme l'H₂O₂ qui, en association avec la myéloperoxidase, vont aboutir aux lésions glomérulaires¹⁰⁶. Un exemple particulier mimant la physiopathologie de l'atteinte rénale de la vascularite à ANCA, est l'injection d'anticorps anti-myéloperoxidase chez la souris induisant des lésions de glomérulonéphrite extra-capillaire qui disparaissent si on déplete la souris en PNN¹⁰⁷. Enfin, la NETose (Neutrophil extracellular trap) ou extravasation de la chromatine associé aux histones (ayant un effet cytotoxique en position extracellulaire) par les PNN aboutit aussi aux dégâts endothéliaux et épithéliaux glomérulaires observés dans la glomérulonéphrite¹⁰⁸.

Un acteur essentiel liant le dépôt glomérulaire des complexes immuns et l'activation des polynucléaires neutrophiles est leur récepteur au fragment constant des Ig (FcR)¹⁰⁹. En effet, l'activation du récepteur FcR des PNN par les complexes immuns active localement la production de ROS par le PNN aboutissant à des lésions endothéliales. L'activation du FcR des PNN apparait comme suffisante pour aboutir aux lésions de façon indépendante des autres FcR des cellules résidentes rénales. Cette activation via le FcR des PNN stimule par ailleurs la production de chimiokines recrutant les autres cellules immunitaires¹¹⁰. Parmi les différentes sous-classes de FcR, le FcγRIIB joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'activation des PNN. La délétion de ce récepteur chez la souris entraîne une susceptibilité accrue au sérum néphrotoxique¹¹¹. Au contraire, l'expression transgénique de FcγRIIB et FcγIIA chez la souris Fcγ^{-/-} restaure la susceptibilité au sérum néphrotoxique¹¹².

RECEPTEURS DE TYPE TOLL (*TOLL-LIKE RECEPTORS* OU TLR)

Ces récepteurs présents à la membrane des macrophages et des cellules dendritiques sont un élément clé de l'immunité innée en reconnaissant des molécules microbiennes. L'activation de ces récepteurs induit une cascade produisant des médiateurs inflammatoires comme l'interféron 1. Dans le modèle anti-MBG le TLR9 augmente le recrutement leucocytaire¹¹³ et les lésions rénales induites par le LPS nécessitent de l'expression du TLR4 par les cellules tissulaires rénales (endothélium glomérulaire en particulier) et les cellules circulantes leucocytaires¹¹⁴.

MACROPHAGES

Les macrophages sont d'importants acteurs favorisant le développement des lésions glomérulaires prolifératives. Leur action est très liée à l'activation de la cascade de la coagulation qui, comme on le verra ci-dessous, est un élément lésionnel majeur. Dans le modèle anti-MBG passif accéléré chez le rat, le pourcentage de macrophages mesuré par un marquage anti-CD68 dans les croissants cellulaires était de 42% dans les lésions récentes et d'environ 70% dans les lésions glomérulaires avancées¹¹⁵. Les macrophages semblent atteindre la chambre urinaire en traversant la capsule de Bowman par des sites de rupture de celle-ci^{116,117}. L'afflux des macrophages vers le glomérule est organisé par différentes chimiokines comme le macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1)^{118,119} et son récepteur chemokine receptor 2B (CCR2B)¹²⁰, macrophage inflammatory protein-1-alpha (MIP-1 α)¹¹⁹ et l'ostéopontine^{121,122}. Par ailleurs des molécules d'adhérence comme VCAM-1, ICAM-1 et CD44 exprimées par les cellules épithéliales pariétales peuvent exercer un rôle dans leur recrutement^{123,124}.

Les macrophages vont à leur tour amplifier la réponse inflammatoire en sécrétant du facteur tissulaire¹²⁵, l'interleukine 1¹¹⁵ et le TNF¹²⁶. Cependant la source principale de TNF peut être les cellules résidentes rénales⁶². Le transforming growth factor β (TGF β) sécrété, entre autres, par les macrophages et puissant inducteur de la production de collagène I, a un rôle dans la transformation fibreuse des croissants cellulaires et son blocage améliore les lésions glomérulaires dans le modèle anti-MBG¹²⁷⁻¹²⁹.

Une étude a montré le rôle protecteur de la délétion du mannose récepteur, un PRR reconnaissant de nombreux pathogènes, exprimé par les macrophages activés et par les cellules mésangiales dans le modèle anti-MBG passif accéléré chez la souris malgré une

réponse humorale et T similaire que la souris wild-type¹³⁰. Enfin l'expression des matrix métalloprotéinases MMP est corrélée aux croissants cellulaires et à l'activité de la maladie et en particulier MMP9 a un rôle protecteur dans le modèle anti-MBG via son activité fibrinolytique^{131,132}.

Enfin, le blocage du canal potassique Kv1.3 présent dans les macrophages et les lymphocytes T mémoire a montré son efficacité dans la diminution de la protéinurie et des lésions extracapillaires chez le rat¹³³.

CELLULES DENDRITIQUES

Les cellules dendritiques (CD), principales cellules présentatrices d'antigènes, modulent la réponse immunitaire et infiltrent quasiment tous les organes cibles. Elles ont la particularité de résister à l'irradiation totale utilisée avant les procédures de greffe de moelle osseuse. La caractérisation de leurs fonctions propres est parfois difficile car elles ont des marqueurs communs avec les macrophages tissulaires. Dans le rein, en conditions physiologiques, les cellules dendritiques sont absentes des glomérules et sont identifiées grâce au marqueur CD11c¹³⁴ et CMHII dans l'interstitium rénal. Dans le modèle anti-MBG les données sur le rôle des cellules dendritiques sont controversées. Les CD recrutent les invariant NKT CXCR6+ qui ont un rôle régulateur^{135,136} et stimulent la production d'IL-10¹³⁷ atténuant les lésions glomérulaires. Cependant, elles auraient un rôle pathogène activant la voie Th17 dans la phase tardive de la glomérulonéphrite¹³⁸. Enfin, l'interaction du récepteur CX3CR1 porté par les CD/macrophages et CX3CL1 exprimé par l'épithélium rénal, induit en cas d'agression, aggrave les lésions glomérulaires dans le modèle anti-MBG passif chez la souris¹³⁹.

INTERLEUKINE 15

L'interleukine 15 est une cytokine de l'immunité innée qui agit sur un récepteur hétérotrimérique composé d'une sous-unité α , d'une sous-unité β partagée avec l'IL-2 et de la chaîne γ commune. L'IL-15, qui peut être produite par les cellules immunitaires mais aussi par certaines cellules épithéliales, active les lymphocytes T, B, NK et les PNN. Elle a des effets anti-apoptotiques pour les cellules T, NK et les fibroblastes. L'équipe de Shinozaki a observé, de façon surprenante, que la délétion du gène *Il15* était un facteur aggravant dans le modèle anti-MBG passif accéléré chez la souris en majorant notamment l'apoptose des cellules épithéliales tubulaires¹⁴⁰. L'IL-15 diminue la sécrétion de la chimiokine MCP-1. Le récepteur

de l'IL-15 est localisé par PCR dans les cellules épithéliales tubulaires proximales. Il est conclu que cette cytokine pourrait être un facteur de survie local tubulaire médié par les cellules NK. Paradoxalement, la délétion du gène de l'IL-15 aboutit aussi à une déplétion en cellules NK et NKT, amenant une certaine complexité dans l'interprétation de ces résultats. Les aspects concernant l'IL-15 seront développés dans la partie 1 des résultats et dans la discussion de ce travail.

RÔLE DU COMPLÉMENT

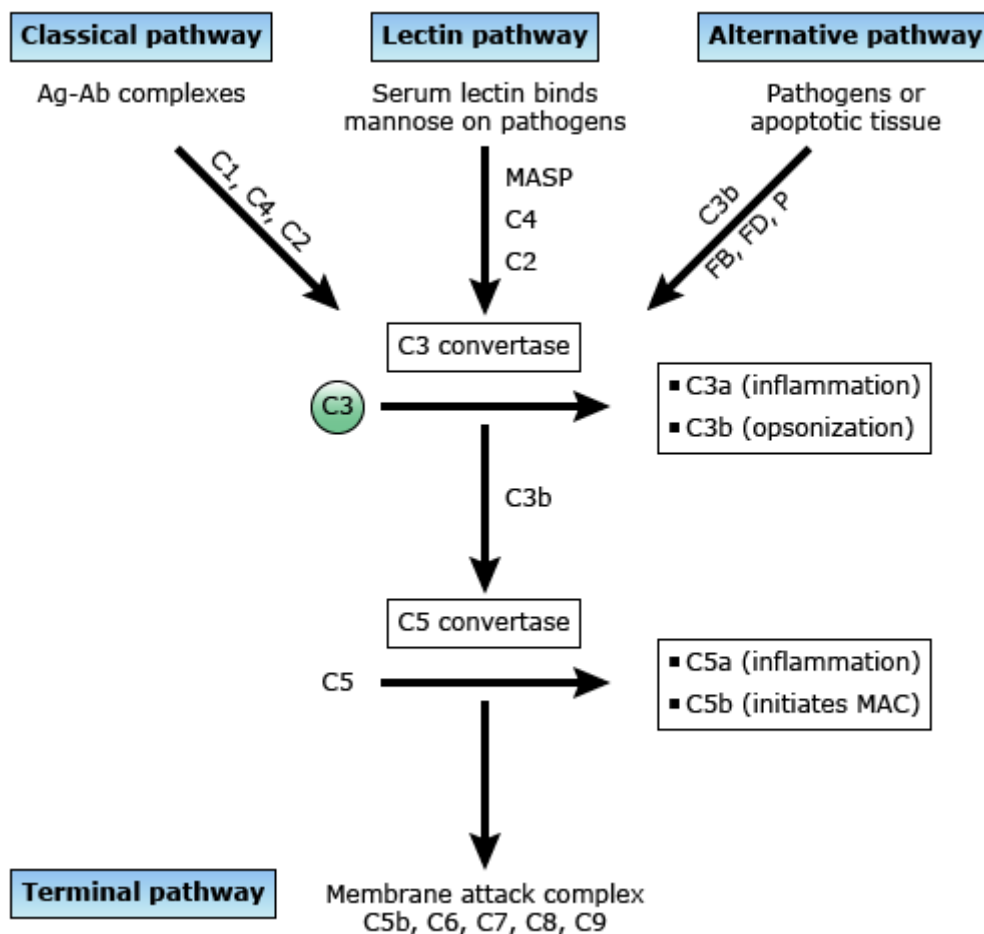


FIGURE 9: SCHEMA DE LA CASCADE D'ACTIVATION DU COMPLÉMENT (UPTODATE)

Le système du complément (**Figure 9**) fait partie de la réponse immunitaire innée mais participe aussi dans les mécanismes immunitaires adaptatifs. Les protéines du complément circulantes, sont majoritairement produites par le foie, mais elles peuvent aussi être produites par les cellules rénales elles-mêmes. Ces protéines jouent un rôle important dans la genèse des lésions endothéliales observées lors des glomérulonéphrites. La cascade d'activation du complément, qui reconnaît les pathogènes et les cellules du soi altérées,

utilise 3 voies différentes : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne. Le complément activé a 3 types d'effecteurs : les anaphylatoxines C3a et C5a qui sont des puissantes molécules pro-inflammatoires, les opsonines (C3b, iC3b et C3d) recouvrant les pathogènes ou cellules cibles avant sa dégradation et le complexe d'attaque membranaire C5b-9 qui a une action lytique sur les cellules opsonisées ou altérées¹⁴¹.

Le complément a un rôle majeur dans l'élimination des complexes immuns. Dans le rein le déficit en C3 est associé à la survenue de glomérulonéphrites médiées par les complexes immuns¹⁴². Plusieurs études ont montré que par l'activation de la voie classique, le complément amplifie les lésions glomérulaires au cours des glomérulonéphrites¹⁴³⁻¹⁴⁵.

Les souris ayant une délétion génétique de C3 ou de C4 ont un recrutement de PNN diminué et des lésions glomérulaires amoindries dans un modèle passif anti-MBG montrant le rôle du complément dans le modèle¹⁴⁶. Enfin, l'absence des protéines régulatrices comme decay-accelerating factor (DAF ou CD55) aggrave les lésions dans ce même modèle.

Le cas particulier de la glomérulonéphrite médiée par les antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) est intéressant car l'activation des PNN et la genèse des lésions impliquent l'interaction entre les ANCA et le récepteur du C5a (C5aR)¹⁴⁷.

La modulation des protéines régulatrices du complément a permis d'avancer dans la compréhension du rôle de cette voie dans la pathologie rénale. Une étude récente a comparé le rôle de la voie alterne du complément, utilisant des souris avec une délétion génétique du facteur B, dans le modèle passif et passif accéléré anti-MBG¹⁴⁸. Les résultats reflètent que la délétion du facteur B, et donc l'interruption de la voie alterne, n'a pas d'effet dans le modèle passif et cependant le modèle passif accéléré révèle un rôle protecteur de cette voie dans les GN médiées par les complexes immuns. Ces résultats sont en accord avec la participation de cette voie dans un modèle expérimental de néphrite lupique¹⁴⁹.

Enfin, le rôle pathogène de la suractivation de la voie alterne du complément est essentiel dans d'autres types de pathologies glomérulaires comme la glomérulonéphrite membrano-proliférative, la glomérulopathie à dépôts de C3 et les micro-angiopathies thrombotiques, mais ceci ne sera pas discuté dans ce travail.

ROLE DE LA COAGULATION

Les dépôts glomérulaires de fibrine sont une caractéristique histologique des GNEC chez l'Homme et dans les modèles expérimentaux. Ils sont le reflet des lésions endothéliales sévères et des altérations locales de la cascade de la coagulation associées à un déficit des systèmes fibrinolytiques voire une production accrue de fibrine (**Figure 10**). Les modèles animaux ont montré que la défibrination peut prévenir¹⁵⁰ voire inverser la formation de croissants glomérulaires¹⁵¹.

Table 1 | Coagulation regulators with known functions in renal physiology and pathophysiology

Coagulation regulator (alternative name(s))	Function	Expression	Effects in renal physiology and pathophysiology	Refs
Procoagulant				
Tissue factor (thromboplastin, CD142, factor III)	Initiator; cofactor for factor VIIa in factor IX and factor X activation	Subendothelium	Induced in CGN, TMA, DN and endotoxaemia Inhibition protects against CGN and TMA	33–38,40,41, 43–45,98, 102,190
Factor Xa	Enzyme	Plasma	Inhibition is protective in DN, endotoxaemia, MsPGN and IR	49–51,97,136
Factor VIII (antihæmophilic factor)	Cofactor for activated factor IX in factor X activation	Plasma	Links impaired kidney function with risk of venous thrombosis	75
Factor V (labile factor)	Cofactor for factor Xa in prothrombin activation	Platelets and plasma	Factor V-dependent initiation of coagulation in human mesangial cells <i>in vitro</i> FV Leiden mutation conveys protective effects in DN	42,112
Prothrombin/ thrombin (factor IIa)	Zymogen and protease	Plasma	Elevated in AKI, nephrotic syndrome, CKD, CGN and other renal diseases Inhibition protects against tubular atrophy, AKI and proinflammatory and proliferative responses in proximal tubular cells and mesangial cells	55,56,90,106, 108,135, 54,165
Fibrinogen (factor I)	Fibrin precursor	Plasma, platelets	Plasma levels are elevated in diabetic patients and after renal IR Heterozygous but not homozygous depletion is protective in AKI, CGN and IR B β 15–42 peptide protects against renal IR injury	48,119,147, 149–151
Anticoagulant				
Thrombomodulin	Cofactor for thrombin in protein C activation	Endothelial surface	Shedding of thrombomodulin and elevated plasma levels of soluble thrombomodulin in diabetes and CKD Soluble thrombomodulin is protective in experimental glomerulonephritis and IR Thrombomodulin lectin-like domain deficiency exacerbates HUS and DN	81,86,101, 103–105,131, 133,181
Protein C	Zymogen and protease	Plasma	Renal-specific expression is reduced in various kidney diseases Activation is impaired in animals and patients with diabetes and in renal insufficiency Treatment with activated protein C is protective in experimental DN, IR and endotoxaemia	25,28,29,46, 82,100,167, 168,172
Antithrombin (heparin cofactor)	Protease inhibitor	Plasma	Deficient in experimental nephrotic syndrome Protects against tubular atrophy, AKI and PAN-induced nephrosis	145,191
Tissue factor pathway inhibitor (extrinsic pathway inhibitor)	Protease inhibitor	Endothelial surface via GPI, platelets, plasma	Induced in CGN Elevated levels partially compensate coagulation activation in diabetes Deficiency inhibits experimental glomerulonephritis Inhibition is protective in experimental kidney fibrosis	125,182, 184,185

AKI, acute kidney injury; CGN, chronic glomerulonephritis; CKD, chronic kidney disease; DN, diabetic nephropathy; GPI, glycosylphosphatidylinositol; HUS, hæmolytic uraemic syndrome; IR, ischaemia-reperfusion; MsPGN, mesangioproliferative glomerulonephritis; PAN, puromycin aminonucleoside; TMA, thrombotic microangiopathy.

FIGURE 10: REGULATEURS DE LA COAGULATION AVEC UNE FONCTION EN PATHOLOGIE RENALE (MADHUSUDAN ET AL. 2015)

Le facteur tissulaire (FT), liant et activant le facteur VII, semble être un élément initiateur aboutissant *in fine* au dépôt de fibrine glomérulaire dans les GNEC¹²⁵. Il peut être exprimé par les cellules endothéliales, les podocytes et les macrophages. Le TNF et l'interleukine 1 sécrétés par les macrophages stimulent la production endothéliale glomérulaire de FT¹⁵². Au

cours des glomérulonéphrites le FT est produit par les cellules glomérulaires dans la phase précoce et par les macrophages dans un deuxième temps¹²⁵. L'inhibiteur du facteur tissulaire, qui est diminué dans la phase initiale de la GN alors que l'expression de FT augmente, accroît son expression dans les phases tardives limitant les dépôts de fibrine dans un modèle anti-MBG chez le lapin et chez l'Homme^{153,154}. L'administration d'un inhibiteur du FT recombinant a un effet protecteur dans le modèle expérimental de GN chez le lapin diminuant les dépôts de fibrine et la formation de croissants glomérulaires¹⁵³.

La thrombine, clivant le fibrinogène pour former les monomères de fibrine, participe aussi à la genèse des lésions glomérulaires comme le montre une étude chez la souris utilisant l'hirudine, un antagoniste de la thrombine et la délétion génétique de PAR-1 (protease-activator receptor 1), un récepteur cellulaire de la thrombine exprimé par l'endothélium, les cellules mésangiales et l'épithélium rénal. Ces deux approches aboutissent à une protection des souris et une diminution du pourcentage de croissants glomérulaires dans le modèle passif accéléré anti-MBG¹⁵⁵. Le niveau de thrombine mesurée dans les urines a été testé par une étude cherchant à développer des marqueurs de GN à croissants chez l'Homme. Le niveau de thrombine est plus élevé dans cette pathologie que dans d'autres pathologies non-prolifératives avec une spécificité de 90% mais une sensibilité médiocre autour de 70%¹⁵⁶.

Le système fibrinolytique a aussi un rôle majeur dans la formation et la résolution des lésions extracapillaires glomérulaires¹⁵⁷ (**Figure 11**). La plasmine, qui catalyse l'hydrolyse de certaines liaisons peptidiques, est capable de lyser la fibrine. La plasmine provient de l'activation du plasminogène (synthétisé par le foie) par l'urokinase et par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) qui est sécrété par l'endothélium. Le tPA est inhibé par les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAI-1 et PAI-2). Dans les GN humaines et le modèle anti-MBG on mesure une baisse du système fibrinolytique avec une diminution du tPA et une augmentation de PAI-1 résultant en un dépôt accru de fibrine glomérulaire¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Le récepteur de l'urokinase (uPAR) est aussi élevé dans les GNEC humaines¹⁶⁰. La fibrine stimule par ailleurs le recrutement des macrophages. Le récepteur cellulaire PAR-2, présent dans les cellules glomérulaires et les macrophages aggrave les lésions de GN via une augmentation de PAI-1 et une inhibition de MMP-9. La délétion de PAR-2 chez la souris est par ailleurs protectrice dans le modèle et diminue le niveau de PAI-1 et les dépôts de fibrine¹³¹. La vitronectine, une protéine circulante sécrétée par les hépatocytes, stabilise le PAI-1

augmentant sa demi-vie mais a aussi un rôle dans la prolifération cellulaire épithéliale et dans l'inhibition de la voie terminale du complément. La vitronectine est aussi détectée dans les lésions de GN chez l'Homme et de façon intéressante elle peut être éliminée par les échanges plasmatiques à différence du PAI-1. Des résultats discordants ont été publiés concernant l'effet de la délétion de PAI-1. En effet, une équipe australienne a montré que sa délétion protégeait les animaux et diminuait les lésions glomérulaires dans le modèle passif accéléré¹⁵⁸. Cependant, de façon contradictoire, la délétion génétique de PAI-1 chez la souris dans un modèle passif anti-MBG aurait un rôle aggravant et activerait la production locale du facteur pro-fibrosant $TGF\beta$ ¹⁶¹ ce qui montre un rôle plus complexe de PAI-1 qui n'est pas limité à l'inhibition du tPA¹⁶². Ces résultats discordants se sont révélés être expliqués par une différence du fond génétique des souris utilisées.

a Acute glomerular injury

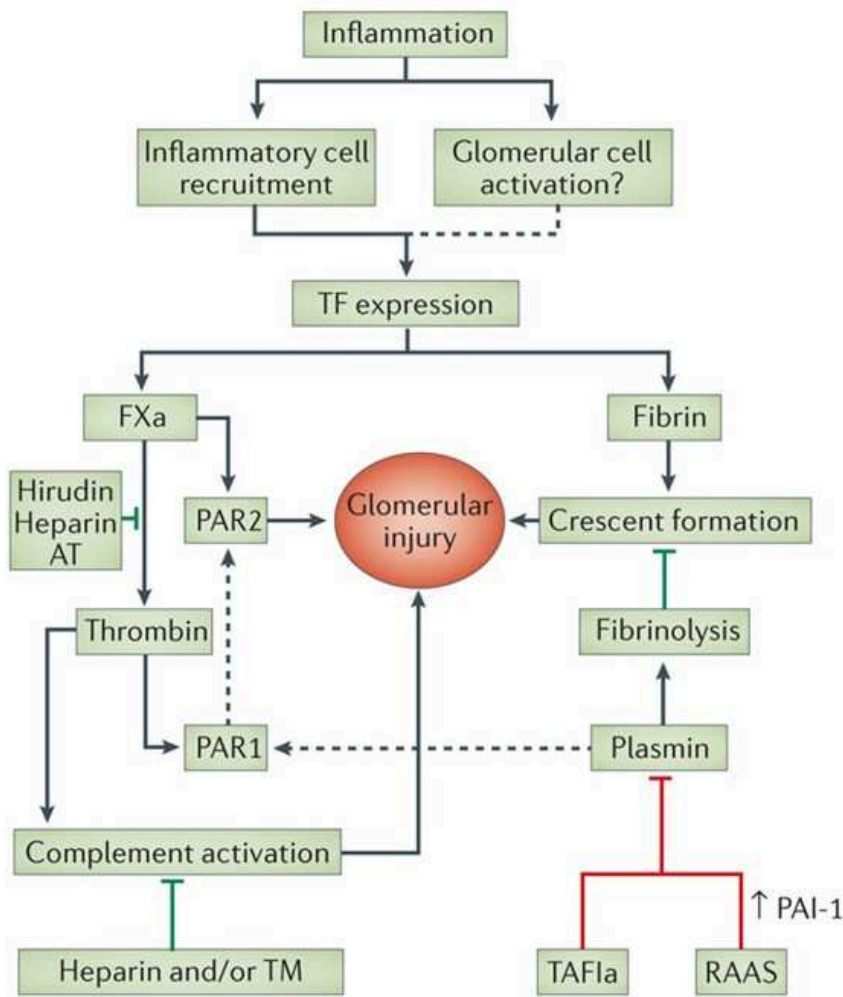


FIGURE 11: CASCADE DE LA COAGULATION ET FORMATION DES LESIONS EXTRACAPILLAIRES GLOMERULAIRES (MADHUSUDAN ET AL. 2015)

ROLE DES EFFECTEURS EPITHELIAUX

Classiquement, la prolifération cellulaire extracapillaire a été vue comme un afflux de cellules inflammatoires circulantes colonisant depuis l'interstitium ou le compartiment vasculaire la chambre urinaire. Cependant, les études récentes accordent un rôle majeur dans la constitution du croissant cellulaire à la prolifération des cellules épithéliales glomérulaires (podocytes et cellules pariétales glomérulaires). Ces cellules sont des acteurs clés dans la constitution des lésions glomérulaires et donc dans le pronostic rénal. De ce fait ces cellules épithéliales glomérulaires se révèlent comme des cibles thérapeutiques potentielles dans les glomérulonéphrites.

CELLULES EPITHELIALES PARIETALES GLOMERULAIRES

Les cellules pariétales glomérulaires recouvrent la face interne de la capsule de Bowman et ont une capacité de prolifération en conditions pathologiques. Une meilleure caractérisation récente de ce type cellulaire par des protéines comme la claudin-1¹⁶³, ZO-1 ou la sestrin-2¹⁶⁴ peut permettre une meilleure compréhension du rôle de ce type cellulaire dans les glomérulopathies. Un grand pas en avant a été réalisé par les études récentes de l'équipe allemande de Marcus Moeller qui, en utilisant des souris transgéniques ayant des cellules pariétales fluorescentes, montre que la prolifération de ces cellules constitue en grande partie des croissants cellulaires lors des glomérulonéphrites¹⁶⁵. Les stimuli de ces cellules sont des facteurs de croissance comme le PDGF ou le FGF-2¹⁶⁶ ou le facteur macrophagique MIF¹⁶⁷. Ces cellules activées expriment le CD44 et peuvent changer de phénotype pour devenir des pseudo-cellules macrophagiques inflammatoires et produire du collagène I^{168,169} ou d'autres protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine.

PODOCYTES

Pendant longtemps les podocytes étaient vus comme des cellules en différenciation terminale et sans capacité de prolifération. Cet aspect les excluait d'une participation quelconque dans la prolifération extra-cellulaire. Cependant, l'équipe de M. Moeller a rapporté que chez la souris jeune, les cellules pariétales peuvent proliférer et se différencier en podocytes¹⁷⁰. Les synéchies entre podocytes et cellules pariétales sont un élément précoce dans la glomérulonéphrite¹⁷¹ et les cellules podocytaires proliférantes composeraient un quart de la masse totale du croissant cellulaire dans le modèle anti-MBG chez la souris⁵⁴. Les podocytes sont aussi retrouvés dans les GN humaines⁵⁵.

Il est intéressant de noter que des altérations génétiques podocytaires peuvent conduire à une modulation des lésions extracapillaires rénales montrant l'importance de ce type cellulaire dans la genèse des lésions. La seule délétion podocytaire spécifique du gène *Vhl*, protéine qui participe à la dégradation via le protéasome des facteurs de réponse à l'hypoxie HIF α , provoque une prolifération podocytaire et des lésions extracapillaires chez la souris. Ces anomalies s'associent avec une protéinurie et une perte de fonction rénale médiée par une surexpression du récepteur pro-inflammatoire Cxcr4¹⁷². Par ailleurs, l'expression de l'heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) a été montrée dans les podocytes pendant la glomérulonéphrite chez la souris¹⁷³ et chez l'Homme¹⁷⁴. La délétion podocytaire du récepteur

de l'EGF diminue, par ailleurs, la gravité des lésions glomérulaires extracapillaires dans le modèle anti-MBG suggérant que les inhibiteurs d'EGFR pourraient être une cible thérapeutique d'intérêt dans les glomérulonéphrites.

Plus récemment, l'activation de la voie impliquant la nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) et la peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) podocytaire, pouvant être activée par la pioglitazone, a été identifiée comme un facteur de survie du podocyte face à l'agression immune dans le modèle anti-MBG passif et les podocytopathies toxiques chez la souris^{175,176}. Par ailleurs, une étude récente de petite taille, rapporte un effet bénéfique des thiazolidinediones en association aux corticoïdes dans le traitement du syndrome néphrotique chez l'enfant¹⁷⁶.

Enfin, la signalisation JAK/STAT classiquement décrite dans les cellules immunitaires aurait aussi un rôle dans les mécanismes de protection ou dédifférenciation podocytaire. En effet, la délétion podocyte-spécifique de *Stat3*, ayant montré son rôle protecteur dans un modèle de néphropathie associée au VIH¹⁷⁷, a aussi le même rôle dans le modèle anti-MBG chez la souris⁷⁹ et peut être activée par l'IL-6. Cette notion sera développée en détail dans la discussion.

ROLE DES CELLULES PROGENITRICES RENALES

Deux études ont permis de détecter des progéniteurs CD133+/CD24+ sur le pôle urinaire ou vasculaire de la capsule de Bowman qui peuvent se différencier en podocytes. D'après une équipe italienne, la prolifération de ces cellules pourrait être à l'origine de la formation des croissants cellulaires^{178,179}.

CELLULES ENDOTHELIALES

La cellule endothéliale est une interface essentielle entre le compartiment vasculaire et le tissu. Elle régule, entre autre, le recrutement leucocytaire et l'oxygénation tissulaire. La lésion glomérulaire dans les glomérulonéphrites est initiée à partir du compartiment vasculaire. Les dépôts immuns glomérulaires ou les agressions inflammatoires proviennent de la circulation sanguine et la cellule endothéliale glomérulaire est la première cellule touchée. Le caractère fenestré de l'endothélium glomérulaire et la pression de filtration à laquelle il est soumis autoriserait aux anticorps circulants l'accès à la membrane basale et/ou aux podocytes. Les phénomènes thrombotiques intra-glomérulaires observés dans les glomérulonéphrites sont

un bon exemple de cette altération endothéliale primitive. Dans le modèle anti-MBG chez la souris et le rat on note une perte de la différenciation endothéliale focale et précoce^{180,181}. L'étude des marqueurs endothéliaux comme Tie-2, l'angiopoietine 1, VEGFR2 a mis en évidence une baisse de tous ces marqueurs de différenciation à J14 et J21 de l'injection du sérum attestant d'une destruction de l'endothélium¹⁸⁰. Dans une autre étude de notre groupe chez la souris, on observe des lésions endothéliales (turgescence endothéliale, perte des fenestrations) et des doubles contours de la MBG dans le modèle. Ces lésions sont complétées par des lésions de mésangiolyse, et sont toutes caractéristiques de la micro-angiopathie thrombotique⁴⁶ (MAT). Ces lésions sont dépendantes du niveau de VEGFR2 endothélial qui varie à son tour en fonction du fond génétique de la souris. Ces lésions histologiques de MAT sont aussi observées dans certains cas de GNEC chez l'Homme^{182,183}. L'administration de VEGF exogène, majoritairement produit par les podocytes dans le glomérule à l'état physiologique et agissant comme un facteur de survie endothélial glomérulaire a montré un rôle protecteur dans le modèle anti-MBG chez le rat à un temps tardif¹⁸⁴. Enfin, l'activité du VEGF/VEGFR est augmentée dans les glomérules des patients atteints de GNEC¹⁸⁵.

CIBLES THERAPEUTIQUES ACTUELLES DANS LES GNEC

Les GNEC évoluent naturellement vers l'IRC terminale en quelques semaines ou mois en absence de traitement. Malgré des étiologies différentes, le traitement actuel des glomérulonéphrites extracapillaires repose sur des principes communs avec quelques différences en fonction de la pathologie diagnostiquée.

Les glomérulonéphrites rapidement progressives sont classées chez l'Homme en plusieurs catégories : maladie anti-MBG (Goodpasture), GN avec dépôts de complexes immuns, GN pauci-immunes et un sous-groupe dit idiopathique (sans dépôts glomérulaires ni anticorps circulants détectés). Elles partagent, comme on l'a vu, une lésion commune la prolifération extracapillaire et l'activation de la cascade de coagulation intra-glomérulaire.

Le degré d'atteinte de la fonction rénale, le pourcentage de glomérules présentant une prolifération cellulaire ou une sclérose et le pourcentage de fibrose interstitielle retrouvée à la biopsie rénale peuvent guider le traitement du néphrologue.

Les choix thérapeutiques actuels ciblent l'immunité et donc majoritairement le compartiment circulant. Les avancées physiopathologiques montrant que le tissu rénal est un acteur majeur de sa propre agression ne se traduisent pas à ce jour par des thérapeutiques ciblées. Cependant, certaines des thérapeutiques à visée immunosuppressive couramment utilisées peuvent, comme on le verra, produire des effets sur le tissu rénal lui-même. En effet, le système immunitaire et les cellules résidentes rénales comme l'épithélium partagent des voies de signalisation communes ajoutant un niveau de complexité supplémentaire à l'interprétation des effets thérapeutiques.

Dans le domaine des GNEC les attitudes thérapeutiques actuelles sont assez mal documentées et le rationnel scientifique est limité. Par exemple, à ce jour l'intérêt des immunosuppresseurs et les corticoïdes dans une autre pathologie qui peut s'accompagner de prolifération extracapillaire comme la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA est encore largement débattue¹⁸⁶.

Les drogues utilisées de nos jours dans ce vaste spectre de pathologies sont assez réduites et incluent les corticostéroïdes en bolus intraveineux puis par voie orale, la cyclophosphamide orale ou intraveineuse, le rituximab voire les échanges plasmatiques.

Dans l'attente du résultat de la biopsie rénale et/ou du bilan immunologique, un traitement empirique par bolus de corticoïdes est souvent débuté en cas de forte suspicion de GNRP. Les premières études ont en effet suggéré l'absence d'efficacité de la dose standard orale de corticoïdes dans le démarrage du traitement et on fait proposer des bolus.

Dans le cadre de la maladie anti-MBG (Goodpasture) la plupart des études ne sont pas contrôlées¹⁸⁷. Le fait que les patients ayant un début de traitement précoce aient un meilleur pronostic rénal peut juste traduire une sévérité initiale différente de la maladie.

Une seule étude randomisée étudiant le rôle des échanges plasmatiques dans cette pathologie a analysé 17 patients. Elle a comparé un régime immunosuppresseur (corticoïdes et cyclophosphamide) seul *versus* un régime immunosuppresseur associé à des échanges plasmatiques. Le taux d'IRCT à la fin du traitement était supérieure dans le groupe ayant eu des échanges plasmatiques mais les auteurs précisent que ce groupe avait des caractéristiques histologiques plus favorables et une fonction rénale moins altérée de base¹⁸⁸.

Une des conclusions de l'étude est que les patients ayant moins de 30% de lésions extracapillaires et une créatininémie inférieure à 265 $\mu\text{mol/L}$ avaient un meilleur pronostic que les patients ayant une atteinte extracapillaire sévère et plus de 354 $\mu\text{mol/L}$ de créatinémie au diagnostic. Cette étude est corroborée par une étude rétrospective chinoise sur 221 patients étudiant les facteurs de risque associés au mauvais pronostic rénal qui retrouve la créatininémie au diagnostic comme facteur de mauvais pronostic et suggère que l'association stéroïdes, cyclophosphamide et échanges plasmatiques est associée à une meilleure survie¹⁸⁹. La fonction rénale au diagnostic et le pourcentage de croissants semblent être des critères pronostics retrouvés dans la majorité des études rétrospectives¹⁹⁰. De facto, les patients requérant l'épuration extra-rénale au diagnostic ou ayant 100% de lésions prolifératives à la biopsie n'ont souvent pas de récupération rénale.

I. LESIONS GLOMERULAIRES NON-INFLAMMATOIRES: LA HYALINOSE SEGMENTAIRE ET FOCAL (HSF)

L'atteinte glomérulaire observée dans les maladies rénales peut aussi prendre une forme non proliférante et non inflammatoire. L'élément marquant de ce deuxième type de glomérulopathies est une atteinte sélective de la barrière glomérulaire et en particulier des cellules épithéliales glomérulaires : le podocyte. Les lésions d'HSF sont à l'origine de 20% des syndromes néphrotiques de l'enfant et de 40% chez l'adulte aux USA¹⁹¹. Il s'agit de la première cause glomérulaire primitive d'IRCT aux USA.

La symptomatologie se caractérise par une fuite protéique dans les urines constituée principalement d'albumine, la protéine majoritaire du plasma. Le syndrome néphrotique, aboutissement clinique de cette atteinte glomérulaire non inflammatoire, associe une protéinurie de fort débit ($>3\text{g}/24\text{h}$) et une baisse de l'albumine plasmatique ($<30\text{g/L}$).

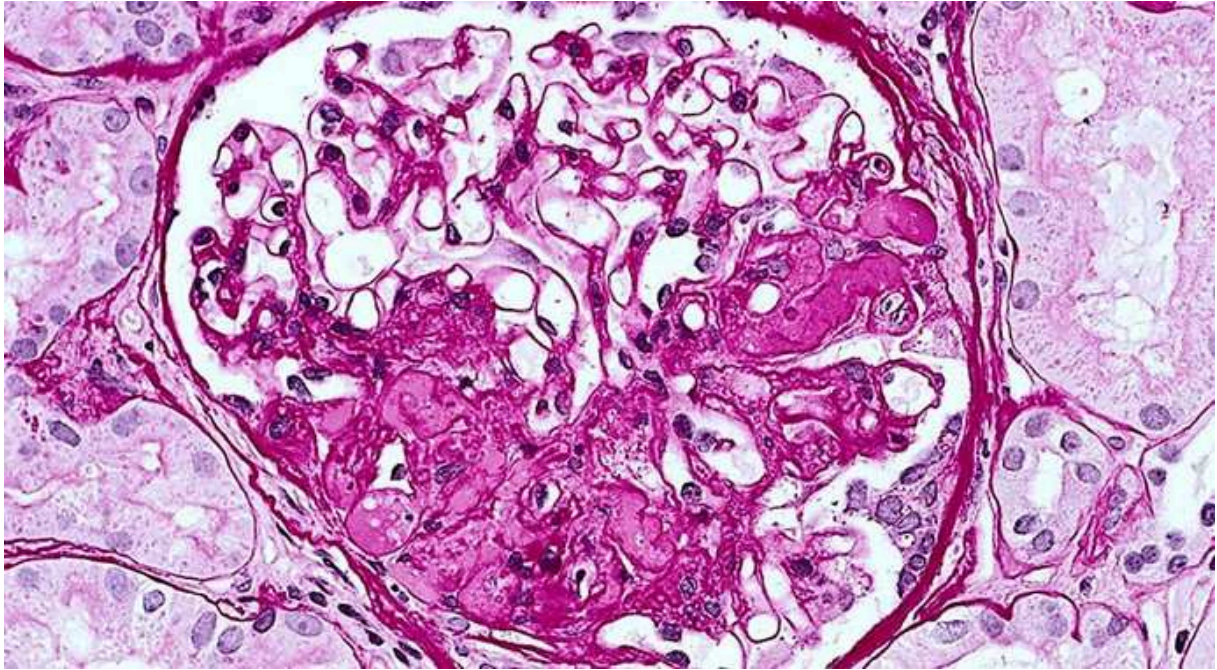


FIGURE 12: LESION GLOMÉRULAIRE DE HYALINOSE SEGMENTAIRE ET FOCALE (KATHERINE DELL, CLEVELAND CLINIC, OHIO, USA)

Cette atteinte glomérulaire se caractérise par une altération morphologique du flocculus glomérulaire avec une rétraction focale, un détachement des cellules podocytaires et des synéchies avec la capsule de Bowman (**Figure 12**). L'architecture capillaire effondrée associée à ces altérations épithéliales constitue des lésions de hyalinose segmentaire et focale (HSF).

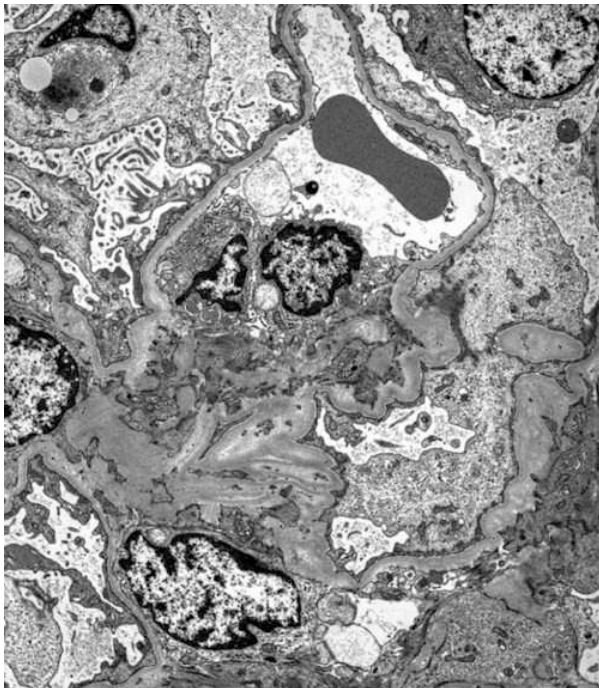


FIGURE 13: LESION DE HSF EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE TRANSMISSION

En microscopie électronique (**Figure 13**) la lésion princeps est une dédifférenciation de la cellule podocytaire avec en particulier une fusion des pédicelles, les expansions cytoplasmiques recouvrant les capillaires glomérulaires et dont l'association étroite constitue le diaphragme de fente¹⁹². Cette lésion glomérulaire, qui comme la prolifération extracapillaire, est non-spécifique et commune à plusieurs pathologies, évolue vers la sclérose glomérulaire globale et à la perte de fonction rénale. Les différentes études ont conclu à l'atteinte du podocyte comme le mécanisme principal de cette lésion. Le podocyte, cellule très différenciée et polarisée, a un cytosquelette d'actine. Cette cellule grâce à ses prolongements cytoplasmiques, les pédicelles, et aux facteurs de survie qu'il sécrète (ex: VEGFA) procure un soutien structurel aux capillaires glomérulaires. Le podocyte synthétise par ailleurs les protéines constituant le diaphragme de fente et une partie de la matrice extracellulaire de la MBG en association avec l'endothélium¹⁹³.

Sur le plan histologique, on a décrit plusieurs types de hyalinose segmentaire et focale mais l'association d'un type histologique à une étiologie ou à un pronostic n'est pas clairement démontrée¹⁹⁴. Seules les formes collapsantes semblent avoir un pronostic moins bon sur deux études de cohorte^{195,196}. L'oblitération des capillaires glomérulaires par l'effondrement de leur structure et l'accumulation de matrice extra-cellulaire est une caractéristique histologique de l'HSF. Des protéines plasmatiques sont accumulées et ont donné le nom de hyalinose à la lésion. On note des synéchies entre les podocytes et la capsule de Bowman avec des cellules podocytaires détachées de la MBG. Au niveau de ces synéchies on note une accumulation de matrice extracellulaire produite par les cellules pariétales activées qui peuvent migrer et coloniser le flocculus. Les podocytes, parfois turgescents, forment une couronne entourant les capillaires collapsés. On ne note habituellement pas d'altérations associées de la membrane basale glomérulaire. La microscopie électronique montre l'effacement et la fusion des pédicelles. En immuno-fluorescence des dépôts d'IgM et de fraction C3 du complément peuvent être observés de façon non-spécifique. Il existe une classification histologique différenciant les HSF (**Figure 14**) péri-hilaires, cellulaires, de type tip-lesion (pôle urinaire), collapsantes et non-spécifiques (Not-otherwise-specified ou NOS). La forme collapsante est à des tableaux cliniques plus sévères avec des syndromes néphrotiques et ont une prédominance ethnique chez les descendants d'origine africaine. Le pronostic est moins bon que les autres formes et l'arrivée au stade IRCT est plus précoce¹⁹⁷.

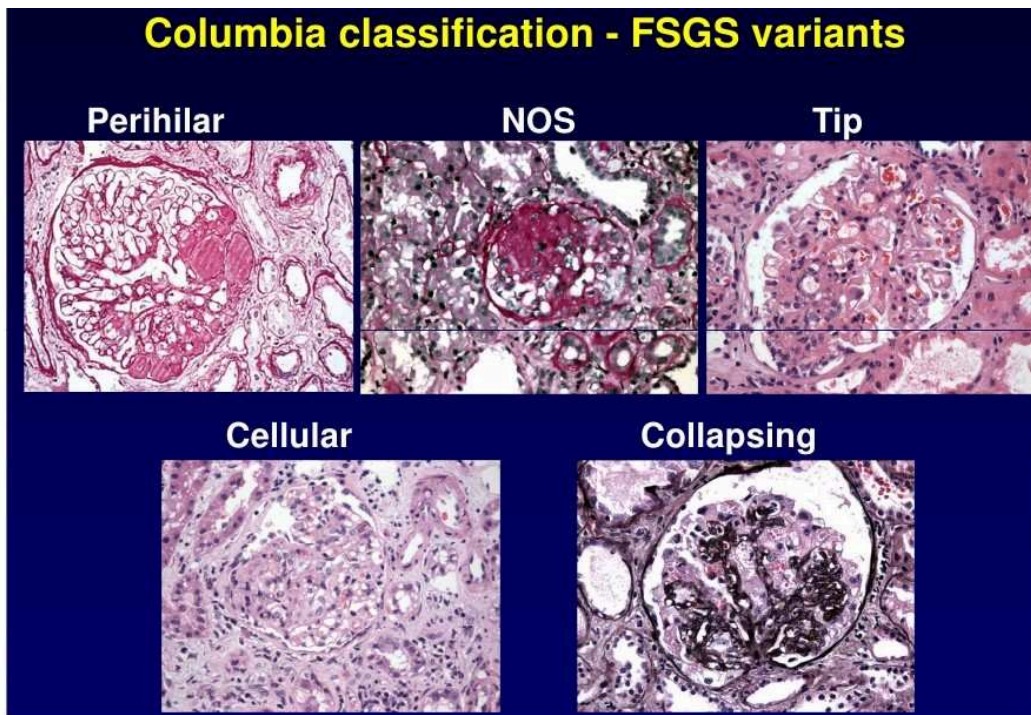


FIGURE 14: CLASSIFICATION DE COLUMBIA DES TYPES HISTOLOGIQUES DE HSF (BARISONI ET AL. 2009)

Malgré une avancée dans le domaine, avec en particulier la recherche d'étiologies génétiques, au moins 80% des HSF sont dites idiopathiques¹⁹². La mort du podocyte, une cellule très différencié, est un des principaux mécanismes lésionnels. En effet, la déplétion podocytaire induite par une toxine diphtérique spécifiquement produite in situ dans ces cellules chez la souris, a montré que la perte de plus de 40% des podocytes entraîne l'apparition des lésions d'HSF, une protéinurie et une dégradation de la fonction rénale¹⁹⁸. Par ailleurs on note que la lésion podocytaire peut se propager par contigüité car dans une étude utilisant un modèle chimérique, l'atteinte des cellules podocytaires transgéniques exprimant la toxine se propage aux cellules adjacentes non transgéniques par des mécanismes encore méconnus¹⁹⁹.

Dans le modèle de HSF induit par l'adriamycine (doxorubicine) chez la souris, que nous avons utilisé dans la partie 2 des résultats et détaillé par la suite, la souris BALB/c a une susceptibilité accrue alors que la souris C57BL/6 est clairement résistante. Une étude récente a permis de déterminer le gène de susceptibilité de la souche BALB/c comme associé au gene *Prkdc* (protein kinase, DNA-activated, catalytic protein). Ce gène participe au système de réparation de l'ADN double-brin²⁰⁰. La souris BALB/c aurait un système de réparation déficient qui semble demasqué par la toxicité induite par l'adriamycine, un agent intercalant.

Nous allons détailler les causes des HSF primitives et secondaires et nous focaliser particulièrement sur les HSF secondaires liées à l'hypertension artérielle. Nous présenterons deux modèles expérimentaux de lésions épithéliales glomérulaires induits par des agressions acquises: un modèle expérimental de podocytopathie toxique: la podocytopathie à l'adriamycine chez la souris et un modèle d'atteinte glomérulaire hypertensive, le modèle murin par perfusion continue d'angiotensine II.

HSF ET DETERMINANTS GENETIQUES PODOCYTAIRES

En 1998 la néphrine a été identifiée comme le constituant principal du diaphragme de fente podocytaire²⁰¹. La découverte de mutations dans son gène *NPHS1* dans des HSF familiales²⁰² ont marqué le début d'une recherche menant à la découverte de nombreux gènes de susceptibilité podocytaire comme *NPHS2*²⁰³ (codant pour la podocine) dont la mutation aboutit aux lésions d'HSF.

Même si les mutations dans les gènes *NPHS1* et *NPHS2* sont les plus fréquentes, d'autres gènes cibles ont été identifiés et sont résumés dans le **Tableau 3**. Ces mutations aboutissent à un syndrome néphrotique apparaissant le plus souvent dans les étapes précoces de la vie et étant résistant aux stéroïdes. En effet, chez les enfants de moins de un an présentant un syndrome néphrotique le test génétique retrouve une mutation d'un de ces gènes dans plus de 60% des cas. Les gènes identifiés sont impliqués dans la croissance podocytaire, la différenciation, les mécanismes de motilité cellulaire, les interactions inter-cellulaires ou cellule-matrice extracellulaire. Souvent ces mutations aboutissent à une déstructuration du cytosquelette d'actine et à la fusion des pédicelles. Le podocyte est sensible au stress mécanique ou shear-stress^{204,205} et des facteurs de susceptibilité induits par des mutations génétiques peuvent aggraver les lésions dues à une seconde agression environnementale comme l'hyperpression glomérulaire, la production de ROS ou une agression toxique (ex: lésions de l'ADN par l'adriamycine). Ces facteurs de susceptibilité peuvent donc n'être symptomatiques qu'à l'âge adulte.

Certains micro-ARN comme le micro-ARN-30 régulent certains gènes ayant un rôle dans la signalisation calcique/calcineurine comme *TRPC6*. En effet, la diminution génétique de miR-30 active la voie des calcineurines et l'expression des gènes *TRPC6*, *PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3R1*, et

NFATC3. Ces souris ont une protéinurie et des altérations podocytaires ultrastructurelles²⁰⁶ en lien avec le cytosquelette d'actine.

Un exemple de susceptibilité, déjà évoqué au début de l'introduction, est les mutations du gène *APOL1* associées à un risque accru d'HSF et d'évolution vers l'IRCT dans la population africaine. Les mécanismes lésionnels dépendant de *APOL1* ne sont pas encore clairement élucidés³. Une étude *in vitro* récente suggère une dysrégulation du potassium intracellulaire induisant un stress cellulaire et la mort cellulaire dans des cellules embryonnaires humaines surexprimant *APOL1*²⁰⁷.

Human gene product	Gene	Inheritance	Chromosome	Function	Clinical Features and Syndromic Associations
Slit Diaphragm Proteins					
Nephrin	NPH51	AR	19q13.1	Major structural protein of slit diaphragm; forms zipper-like structure through homophilic interactions; signaling platform	Finnish type congenital nephrotic syndrome and some sporadic childhood FSGS
Podocin	NPH52	AR	1q25-31	Stomatin family member anchoring nephrin, NEPH and CD2AP to lipid rafts and forming signaling complex at slit diaphragm	Familial or sporadic steroid resistant FSGS or DMS in early childhood
CD2-associated protein	CD2AP	AD; rarely AR	6p12	Adaptor protein that links to nephrin and podocin at slit diaphragm; also expressed by T lymphocytes	Adult onset FSGS, also rarely in childhood
Cell Membrane-Associated Proteins					
Transient receptor potential cation channel 6	TRPC6	AD	11q21-22	Cation channel with roles in calcium influx, mechanosensation, cell growth; gain of function mutation	Familial or sporadic adult onset FSGS
Protein tyrosine phosphatase receptor type O (GLEPP1)	PTPRO	AR	12p22	Tyrosine phosphatase expressed on apical foot process membrane; roles in contact inhibition and signaling	Familial FSGS in mid childhood
Laminin-β2	LAMB2	AR	3p21	Anchors basal podocyte membrane to GBM	Pierson syndrome in infancy (microcoria, neuromuscular junction defects, early onset DMS or FSGS)
β4-integrin	ITGB4	AR	17q11	Anchors basal podocyte membrane to GBM	Epidermolysis bullosa; infantile FSGS
Tetraspanin CD151	CD151	AR	11p15	Anchors basal podocyte membrane to GBM	Epidermolysis bullosa, deafness, infantile FSGS
Cytosolic or Cytoskeletal Proteins					
α-Actinin-4	ACTN4	AD	19q13	Spectrin family member that cross-links actin filaments; gain of function mutation	Familial or sporadic adult onset FSGS with subnephrotic or nephrotic-range proteinuria
Phospholipase C ε1	PLCE1	AR	10q23-24	Located in podocyte cell body; catalyzes hydrolysis of phosphatidylinositol to generate IP3 and DAG; roles in cell growth, differentiation and motility	Non-syndromic DMS or early-onset childhood FSGS
Myosin heavy chain 9	MYH9	AD	22q12.3	Non-muscle myosin IIA heavy chain; role in actin-based cell contraction and motility	Epstein-Fechter syndrome (FSGS, deafness, cataracts, macrothrombocytopenia, leukocyte inclusions)
Inverted formin 2	INF2	AD	14q32	Formin family member, regulation of actin filament nucleation and polymerization	Familial FSGS with onset in adolescence or adulthood
Myosin 1E	MYO1E	AR	15q21-26	Member of class I myosins that interact with cell membranes via C-terminus and with actin filaments via N-terminus motor domain	Familial FSGS with onset in mid childhood
Nuclear Proteins					
Wilms tumor 1	WT1	AD	11p13	Zinc finger transcription factor; role in development of genitourinary tract and maintenance of mature podocyte phenotype	Frasier syndrome (FSGS, male pseudohermaphroditism, gonadoblastoma), isolated DMS or FSGS
SMARCA-like protein	SMARCA1	AR	2q34-36	Chromatin bundling protein that probably regulates gene transcription	Derys-Drash syndrome (DMS, male pseudohermaphroditism, Wilms tumor)
Mitochondrial Components					
trNAleu	mtDNA-A3243G	Maternal	mtDNA	Mitochondrial transfer RNA required for synthesis of mitochondrial proteins	MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes) and FSGS
Parahydroxybenzoate-polyphenyltransferase	COO2	AR	4q21-22	Mitochondrial respiratory chain electron carrier	Coenzyme Q deficiency; collapsing FSGS and encephalopathy in infancy
Coenzyme Q10 biosynthesis monooxygenase 6	COO6	AR	14q24.3	Required for synthesis of coenzyme Q10 which is a mitochondrial respiratory chain electron carrier	Familial FSGS or DMS and deafness in early childhood
Lysosomal Protein					
Lysosomal integral membrane protein (LIMP) type 2	SCARB2	AR	4q13-21	Integral lysosomal membrane protein; role in membrane recycling	Action myoclonus-renal failure syndrome; (ataxia, myoclonus, collapsing FSGS)
Unknown Cellular Location					
Apolipoprotein L1	APOL1	AR	22q12	Podocyte function unknown; confers resistance to sleeping sickness by lysing trypanosomal organisms	Risk allele for FSGS and hypertensive ESRD in patients of African descent

AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; DAG, diacylglycerol ;DMS, diffuse mesangial sclerosis; GLEPP1, glomerular epithelial protein 1; IP3, inositol triphosphate; mt, mitochondrial

TABLEAU 3 : CAUSES GENETIQUES DE HSF (D'AGATI ET AL. 2011)

HSF IDIOPATHIQUE

La recherche d'un facteur circulant responsable des lésions d'HSF a fait l'objet de très nombreuses études. En effet, certains patients atteints d'HSF récidivent très précocement leur syndrome néphrotique après transplantation rénale. Les échanges plasmatiques permettent parfois de contrôler la pathologie suggérant fortement la présence d'un facteur dit "de perméabilité glomérulaire" circulant²⁰⁸. Par ailleurs, l'injection de sérum humain de patients souffrant d'HSF chez le rat, semble induire une perméabilité à l'albumine sur des glomérules isolés ex vivo et une albuminurie avec effacement des pédicelles in vivo. Plusieurs candidats ont été proposés comme la cardiotrophine-like cytokine 1²⁰⁸, la protéine CASK ou le récepteur soluble de l'urokinase (suPAR)²⁰⁹ plus récemment, mais les preuves expérimentales sont contradictoires et ne permettent pas à ce jour des conclusions solides^{210,211}.

HSF ET VIRUS

Le podocyte peut être la cible de certaines infections virales comme le VIH-1 et aboutir à des lésions de hyalinose segmentaire et focale. En effet, le VIH-1 infecte le podocyte et les cellules tubulaires et peut persister dans l'épithélium rénal malgré un traitement anti-rétroviral bien conduit et une normalisation du taux de CD4²¹². Le type d'HSF associée avec l'infection liée au VIH-1 est une forme généralement collapsante et d'évolution rapide²¹³. Les gènes *nef* et *vpr* ont été identifiés comme clés dans l'atteinte podocytaire en interagissant avec les protéines podocytaires²¹⁴. *Nef* peut interagir avec le domaine SH3 de la famille des kinases Src et ainsi activer STAT3 et la voie des MAP kinases pour aboutir à une dédifférenciation et une prolifération podocytaire²¹⁵⁻²¹⁷. *Nef* interagit aussi avec la diaphanous interacting protein (DIP) pour aboutir à la dérégulation du cytosquelette d'actine via une surexpression de Rac1 et une réduction de RhoA. *Vpr* à son tour est responsable de l'arrêt en phase G2 et de l'apoptose des cellules épithéliales tubulaires par une suractivation de ERK²¹⁸. D'autres virus ont été associés à des lésions d'HSF comme le parvovirus B19²¹⁹, le sv40²²⁰, le cytomegalovirus²²¹ et l'Epstein-Barr virus²²².

HSF TOXIQUES

Les mécanismes des HSF associées aux toxiques ne sont pas clairement élucidés. La consommation d'héroïne a été associée dans les années 1970-1980 à des cas d'HSF mais les cas sont beaucoup plus rares de nos jours et un rapport avec des composants utilisés pour couper la drogue étaient probablement en cause²²³. L'interféron utilisé principalement dans le traitement des hépatites C (IFN α) et de la sclérose en plaques (IFN β) a été impliqué dans la genèse des lésions d'HSF²²⁴. Le podocyte ayant des récepteurs pour l'IFN α et β peut être en effet une cible directe du traitement. Le pamidronate, un biphosphonate inhibiteur des ostéoclastes a aussi été associé à des cas d'HSF où la protéinurie et l'altération de la fonction rénale étaient améliorées par l'arrêt du médicament²²⁵. Le pamidronate a un effet sur le cytosquelette d'actine des ostéoclastes et pourrait avoir un mécanisme de toxicité similaire pour le podocyte. En transplantation rénale, les anticalcineurines et le sirolimus (inhibiteur de la mammalian target of rapamycin) ont aussi été associés à des cas de HSF lié à l'effet vasoconstricteur des anticalcineurines et à l'effet propre du sirolimus^{226,227} sur les constituants du cytosquelette podocytaire et du diaphragme de fente comme la néphrine.

LESIONS PODOCYTAIRES SECONDAIRES ADAPTATIVES: L'HYPOTHESE HEMODYNAMIQUE

Chez l'Homme, on sait que quelques années après une néphrectomie unilatérale, le débit de filtration glomérulaire n'est pas divisé par deux mais peut atteindre 70% de la valeur initiale. Cette observation implique que, le rein ayant un nombre limité de glomérules à l'âge adulte, les glomérules du rein restant augmentent leur taux de filtration. C'est un phénomène nommé hyperfiltration.

Cette hyperfiltration glomérulaire n'est pas uniquement notée après néphrectomie mais aussi dans d'autres conditions de perte néphronique: le diabète, l'hypertension artérielle²²⁸ sévère, la drépanocytose et la grossesse.

Cependant, il est intéressant de noter qu'une des situations d'hyperfiltration physiologique comme la grossesse n'aboutit pas à des lésions glomérulaires ou rénales. Il est aussi vrai que la plupart des patients ayant eu une néphrectomie unilatérale ne vont pas développer, malgré cette hyperfiltration manifeste, une pathologie rénale. Ces deux éléments suggèrent que le développement des lésions glomérulaires et rénales nécessite la combinaison de l'hyperfiltration et d'une susceptibilité tissulaire rénale voire une mise en défaut des

mécanismes de défense glomérulaires. Cependant, ces mécanismes reliant hyperfiltration et lésions glomérulaires ne sont pas complètement élucidés²²⁹.

En 1981, l'équipe de Brenner avance la théorie selon laquelle l'augmentation de la pression glomérulaire et l'hyperfiltration sont des facteurs favorisant les lésions glomérulaires et la progression de la maladie rénale chronique²³⁰⁻²³².

La baisse de la masse rénale s'accompagne d'une vasodilatation réflexe des artérioles afférentes et efférentes entraînant une élévation du flux dans les capillaires glomérulaires. La réduction de la résistance vasculaire étant plus importante dans l'artériole afférente que l'efférente, il en résulte une augmentation de la pression hydrostatique intraglomérulaire. Il faut savoir que la pression hydrostatique physiologique exercée sur la barrière glomérulaire est très élevée (35 à 40 mmHg). Cette augmentation de pression est proportionnelle à la quantité de néphrons perdus^{232,233}. L'augmentation du volume glomérulaire mettrait les podocytes dans une situation où ils leur serait plus difficile se diviser du fait du stress mécanique. Cependant, dans certaines études mesurant la pression glomérulaire par microponction, on note que l'augmentation du volume glomérulaire est associée à une albuminurie accrue mais elle n'est pourtant pas corrélée à une augmentation de pression intra-glomérulaire²³⁴⁻²³⁶. L'hypertrophie glomérulaire serait alors plus en rapport avec les lésions podocytaires que l'hyperpression. Le détachement des podocytes suite à ce stress mécanique^{229,237} et la repopulation de ces zones dénudées de membrane basale par des cellules pariétales ayant proliféré²³⁸ semble être à l'origine des lésions d'HSF. Un des médiateurs de l'hypertrophie glomérulaire secondaire à la néphrectomie unilatérale ou sub-totale pourrait être la phosphorylation de la protéine ribosomale p70S6 qui est un effecteur de la voie mTOR-S6K1. Cette phosphorylation augmenterait le niveau de cycline-D1 et diminuerait la cycline-E1. La rapamycine, un inhibiteur de la voie mTOR inhibe cette hypertrophie glomérulaire secondaire à la néphrectomie chez la souris, cependant les conséquences sur la fonction rénale et la protéinurie ne sont pas évoquées dans l'étude²³⁹.

D'après Kriz et Lemley²²⁹, l'hyperpression glomérulaire se traduirait par une expansion du flocculus et une prolifération mésangiale et endothéliale qui subissent directement les effets de cette augmentation de la pression hydrostatique. Pour eux, les podocytes protégés par la MBG sont peu exposés à cette hyperpression sauf dans le cas d'une altération de celle-ci

(comme dans le cas du syndrome d'Alport) et ce serait plutôt l'hypertrophie glomérulaire qui entrainerait la souffrance podocytaire et leur détachement. La fusion des pédicelles en diminuant les diaphragmes de fente serait un mécanisme de protection podocytaire, réversible en cas d'une agression transitoire, entraîné par des mécanorécepteurs situés dans les diaphragmes de fente^{240,241}. On voit dans les modèles de podocytopathie à l'adriamycine chez le rat qu'après l'agression les diaphragmes de fente sont substitués par d'autres types de jonctions serrées impliquant la protéine zonula-occludens 1 (ZO-1) et la podocine^{242,243}.

En 1989, l'équipe américaine de Rennke a montré que l'ablation d'un des deux reins aggravait significativement les lésions de HSF induites par l'adriamycine chez le rat²⁴⁴. En effet, les expériences de néphrectomie subtotale chez l'animal ont associé une diminution de la masse rénale avec des phénomènes de glomérulosclérose et altération de la MBG²⁴⁵ entraînant une protéinurie. Cette néphrectomie subtotale est d'ailleurs utilisée à ce jour par certaines équipes comme modèle de néphropathie chronique^{246,247} et entraîne une hypertension artérielle, une protéinurie et une perte progressive de fonction rénale. Une activation de la production de molécules pro-fibrosantes comme le TGF β a été observée en réponse à une surcharge protéique du podocyte dans le modèle^{248,249}. L'augmentation de la pression intraglomérulaire a montré une activation des cellules mésangiales avec une production de protéines de la matrice extracellulaire dans des expériences sur des glomérules ex-vivo²⁵⁰.

Ces mécanismes mécaniques s'associent à des facteurs toxiques pour l'épithélium rénal comme l'angiotensine II. En effet, cette molécule a un effet vasoconstricteur sur les artéioles afférente et efférente mais aussi un effet pro-apoptotique direct sur le podocyte²⁵¹ pouvant passer par l'activation du canal calcique TRPC6²⁵². De façon intéressante les expériences menées avec des rats néphrectomisés ont montré que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion comme l'enalapril ont un effet anti-protéinuriant et retardent la glomérulosclérose malgré la persistance d'une hyperfiltration glomérulaire et d'un flux capillaire augmenté^{253,254}. Dans ces études, les diurétiques donnent lieu à un effet anti-hypertenseur systémique similaire mais celui-ci ne s'accompagne pas d'effet sur la protéinurie, la glomérulosclérose et l'hyperpression glomérulaire. Cela suggère un effet local de l'angiotensine II via ses effet hémodynamiques artériolaires voire son effet direct toxique sur l'épithélium. Les inhibiteurs du SRAA ont montré un effet bénéfique sur la pression intraglomérulaire et sur les lésions rénales scléreuses glomérulaires dans un modèle de rat

protéinuriques MWF/Ztm²⁵⁵. Par ailleurs, un flux de protéines augmenté traversant la membrane basale induit aussi une toxicité podocytaire et une induction de voies profibrosantes comme le TGFβ²⁴⁸ menant à un stress du réticulum, activant les voies apoptotiques et induisant une réorganisation du cytosquelette du podocyte avec une dédifférenciation²⁵⁶. De ce fait, et grâce à l'étude Modification of Diet in Renal Disease dans les années 1990, les restrictions protéiques aux patients ayant une maladie rénale ont été proposées²⁵⁷ mais l'effet anti-protéinuriant de cette restriction se heurte avec une autre complication de la MRC, la dénutrition et l'hypoalbuminémie qui entraînent une grande morbi-mortalité dans cette population²⁵⁸. A l'heure actuelle les recommandations de la Haute Autorité de Santé datant de 2012 conseillent une consommation de protéines entre 0,8 et 1 g/kg/j uniquement à partir du stade 3 de la MRC (DFG < 60ml/min/1,73 m²).

II. HYPERTENSION ARTERIELLE ET ATTEINTE GLOMERULAIRE: UNE ATTEINTE MULTIPLE

L'hypertension artérielle systémique (HTA) est associée à une importante morbi-mortalité cardio-vasculaire et représente la deuxième cause d'IRCT aux USA et en France. L'HTA se complique sur le plan rénal d'un ensemble lésionnel nommé néphroangiosclérose ou néphropathie hypertensive ou "hypertensive nephrosclerosis" pour les auteurs anglophones. En France, la dénomination utilise le terme "angio" qui se rapporte à l'effet vasculaire fibrosant de l'HTA. Cependant, on va voir que les effets de l'HTA ne portent pas que sur les vaisseaux ou artérioles rénales et que le glomérule et le secteur tubulo-intertitiel peuvent aussi présenter des lésions secondaires à l'HTA²⁵⁹. Nous allons donc préférer le terme de néphropathie hypertensive qui tient compte des différentes lésions observées dans le cadre de l'HTA chronique dans le rein.

Une première observation est que le niveau de pression artérielle n'est pas le seul facteur déterminant des lésions rénales dans la néphropathie hypertensive. En effet, les facteurs ethniques influencent la survenue de l'HTA mais aussi la fréquence des complications rénales^{260,261}. Comme on l'a vu précédemment les mutations du gène *APOL1* chez les descendants africains ont un impact délétère augmentant le risque de glomérulosclérose hypertensive³. Il existe donc des facteurs de susceptibilité tissulaires qui vont avoir une grande influence sur l'apparition et la progression des lésions.

Dans cette partie je ne présenterai pas les conséquences rénales de l'HTA maligne mais seulement les conséquences de l'HTA chronique.

Sur le plan histologique, l'atteinte vasculaire consiste en un épaissement intimal avec une réduction du diamètre de la lumière des petites artères et des artéioles rénales²⁶². On détecte une hypertrophie de la média et une hypertrophie fibroblastique de l'intima. Cette réponse adaptative permet une moindre atteinte des artéioles et des capillaires glomérulaires. Par ailleurs on note une hyalinose artériolaire (dépôt de matériel protéique plasmatique) prédominant sur l'artéiole afférente.

Sur le plan tubulo-interstitiel, on note des lésions d'atrophie et dilatation tubulaires et parfois un infiltrat inflammatoire tubulo-interstitiel peu spécifique. Cette atteinte est probablement secondaire à des phénomènes d'ischémie locaux comme on va le voir dans la partie dédiée à l'hypoxie rénale.

Pour finir, les glomérules présentent deux types de lésions caractéristiques: une sclérose globale avec rétraction du floculus classiquement définis comme glomérules "ischémiques" et des lésions d'HSF (**Figure 15**).

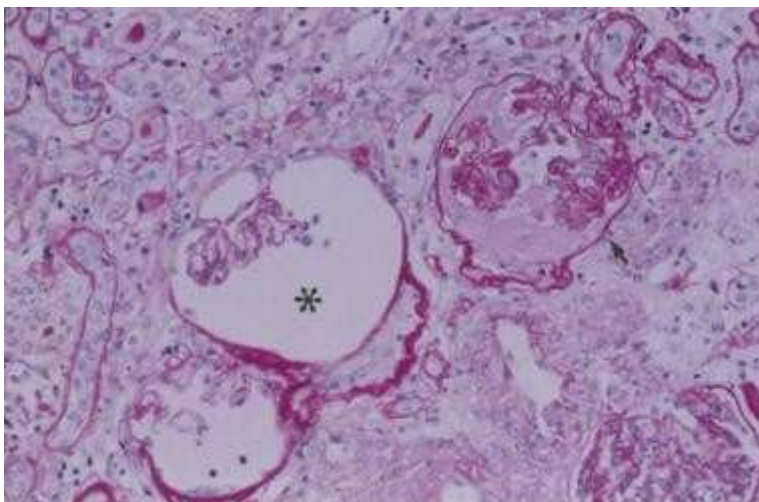


FIGURE 15: LESIONS GLOMERULAIRES DANS LA NEPHROPATHIE HYPERTENSIVE (FERVENZA ET AL. MEDSCAPE)

Les mécanismes pouvant aboutir aux lésions d'HSF dans l'HTA sont divers. A part la susceptibilité génétique, le mécanisme hémodynamique local a été détaillé précédemment et implique l'hyperpression glomérulaire et l'hypertrophie compensatrice. En plus des hauts niveaux de pression artérielle systémique chez les patients hypertendus on note une perte de la masse néphronique²²⁸ dans cette étude chez des patients caucasiens avec une HTA

primitive. L'altération de l'hémodynamique locale peut aussi être due à des altérations du métabolisme du monoxyde d'azote (NO) un puissant vasodilatateur endogène de demi-vie courte et produit principalement par l'endothélium en conditions physiologiques. Chez une souche de rats spontanément hypertensifs, l'administration de L-arginine, un précurseur du NO, réduit de façon significative les lésions glomérulaires²⁶³.

Cependant, dans une grande partie des HTA, il existe une stimulation de la production d'angiotensine II par l'appareil juxta-glomérulaire rénal qui va comme on l'a vu avoir des effets hémodynamiques en ayant un effet vasoconstricteur sur les artérioles afférentes et efférentes mais aussi des effets toxiques épithéliaux en particulier sur le podocyte.

III. HYPOXIE TISSULAIRE RENALE : UN FACTEUR LOCAL DE PROGRESSION DES LÉSIONS RENALES

Dans la suite de l'étude des facteurs locaux épithéliaux ou endothéliaux dans les atteintes glomérulaires, la 3^{ème} partie de ce travail étudie le rôle du système de réponse à l'hypoxie des cellules résidentes rénales et en particulier de l'endothélium dans un modèle d'agression glomérulaire comme est l'hypertension induite par la perfusion d'angiotensine II. Ces systèmes d'adaptation à l'hypoxie utilisant les protéines Hypoxia Inducible factor (HIF) se sont révélés des acteurs majeurs dans la protection ou la progression face à l'agression rénale. Le système est complexe et peut être protecteur ou aggravant en fonction du type cellulaire (épithélial ou endothélial) étudié et en fonction de l'isoforme α de HIF étudiée (HIF-1 ou HIF-2/EPAS1). Comme on va le voir l'hypoxie tissulaire rénale est une voie commune de progression des néphropathies chroniques comme la néphropathie hypertensive mais peut être aussi impliquée de façon plus évidente dans les phénomènes aigus tel que l'ischémie-reperfusion.

En effet, même s'ils reçoivent 20% du débit cardiaque (environ 1 litre de sang par minute), du fait de leurs caractéristiques anatomiques et fonctionnelles, les reins ont une oxygénation faible et sont très sensibles aux phénomènes d'hypoxie locale. Le débit sanguin rénal est déterminé par la pression artérielle de perfusion et les résistances vasculaires intra-rénales. Les reins reçoivent un débit sanguin qui n'est en rien justifié par leurs besoins métaboliques, mais bien par leur fonction de filtration. Très peu d'oxygène sera donc soustrait par millilitre de sang passant par les reins. Le rein ne consomme que 10 à 15 % de l'oxygène qui lui est

présenté. Par ailleurs, on constate que la pression partielle en oxygène dans le tissu rénal est basse et atteint 30 mmHg dans le cortex rénal et à 10 mmHg dans la médullaire²⁶⁴ (versus 50 à 70 mmHg pour l'intestin grêle par exemple) d'après des études réalisées chez l'animal. Concernant l'anatomie rénale, le réseau artériel et veineux pré et post glomérulaire circule en parallèle et en contact étroit sur une longue distance. Cela favorise la diffusion de l'oxygène du réseau artériel au réseau veineux avant que l'oxygène atteigne les tissus. Par ailleurs, le débit sanguin est diminué au niveau de la médullaire par rapport au cortex. En plus des considérations anatomiques, les cellules tubulaires rénales ont une consommation d'oxygène élevée requise pour réaliser la réabsorption active du sodium et une faible tolérance au métabolisme anaérobie. La combinaison d'une oxygénation faible et des besoins en oxygène élevés des cellules tubulaires fait du rein un organe très sensible aux phénomènes d'hypoxie ou d'hypoperfusion²⁶⁵.

L'hypoxie locale rénale a été proposée en 1998 par Fine comme une conséquence commune à de nombreuses néphropathies et comme un facteur de progression majeur de la maladie rénale chronique^{266,266}. Cette hypothèse se centrerait sur le compartiment tubulo-interstitiel majoritairement. En effet, la perte de fonction rénale est mieux corrélée avec les lésions tubulo-interstitielles qu'avec les lésions glomérulaires et toutes les néphropathies chroniques sont caractérisées par un appauvrissement du réseau capillaire péri-tubulaire^{267,268}. Cela suggère que l'hypoxie tissulaire locale accompagne l'évolution de la MRC. Cette hypoxie tubulo-interstitielle a été démontrée sur plusieurs modèles animaux de néphropathies expérimentales²⁶⁹⁻²⁷¹ et chez l'Homme^{272,273} grâce aux séquences T2* de l'imagerie par résonance magnétique. Le réseau capillaire péri-tubulaire étant alimenté par l'artéριοle efférente glomérulaire, Fine propose que la destruction glomérulaire s'accompagne d'une diminution du débit capillaire tubulaire générant une hypoxie locale, une dysfonction endothéliale et un stress oxydant qui affecte le compartiment tubulo-interstitiel. En effet, l'hypoxie des cellules tubulaires induit des altérations phénotypiques avec une dédifférenciation, et une mort cellulaire à terme²⁷⁴. En réponse à l'hypoxie les fibroblastes interstitiels activent la production de matrice extracellulaire. On note par ailleurs une augmentation du TGFβ, des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF et du PDGF produit par les cellules tubulaires. Le PDGF a une action sur les péricytes qui vont exprimer l'α-smooth muscle actin et se transformer en myofibroblastes pro-fibrotiques²⁷⁵.

Il est intéressant de noter que la plupart des étiologies conduisant à la MRC chez l'Homme sont des sources potentielles de phénomènes hypoxiques intra-rénaux. En effet, la fibrose à elle seule diminue la diffusion tissulaire de l'oxygène, la diminution du débit glomérulaire aboutit au phénomène d'hypoxie "stagnante" et le stress oxydatif induit par différents facteurs environnementaux ou toxiques comme l'angiotensine II aboutissent à un découplage mitochondrial et une hypoxie locale qui peut être entre autre majorée par l'anémie ou les facteurs induisant une augmentation de la consommation d'oxygène tubulaire²⁷⁶.

Les études utilisant la microscopie intravitale ont permis de montrer que, dans le modèle de néphrite Thy-1 chez le rat, les altérations du débit des capillaires péri-tubulaires s'accompagnaient d'une hypoxie des cellules tubulaires environnantes²⁶⁹. L'angiotensine II est par ailleurs un facteur hypoxique local important. En effet le bloqueur du SRAA, olmesartan, permet de diminuer les altérations vasculaires des capillaires péri-tubulaires et l'hypoxie tubulaire dans le modèle de néphrectomie des 5/6 chez le rat²⁷⁰. Par ailleurs l'angiotensine augmente aussi le taux de réabsorption tubulaire du sodium qui est un élément majeur dans la consommation d'oxygène par les cellules tubulaires dans le modèle de rat spontanément hypertendus SHR²⁷⁷. Cette élévation du taux de réabsorption du sodium est diminuée en cas d'administration d'un ARA2 mais pas en cas de contrôle similaire de la pression artérielle systémique par des diurétiques ce qui prône pour un effet spécifique pression indépendant de l'angiotensine II dans la génération d'hypoxie tissulaire²⁷⁸. Dans un modèle de perfusion d'angiotensine II un agent mimétique de la superoxyde dismutase (le tempol) permettait d'abolir les effets délétères de l'angiotensine II et la baisse de la PO₂ dans le tubule proximal suggérant que l'hypoxie tissulaire angiotensine II-induite peut être médiée par une augmentation du stress oxydatif tissulaire et l'accumulation de ROS comme les anions superoxyde²⁷⁸.

Cependant le rôle de l'hypoxie dans la genèse des lésions glomérulaires est moins bien documenté que pour les lésions tubulo-interstitielles. La lésion glomérulaire ne sert qu'à induire une hypoxie tubulo-interstitielle ou existe-t-il des mécanismes hypoxiques locaux qui se déclenchent au sein du glomérule et qui participeraient aux lésions glomérulaires elles-mêmes? Comme on l'a vu précédemment, l'angiotensine II, par exemple, augmente le stress oxydatif du podocyte. Pourrait-on moduler les lésions glomérulaires en modulant les voies de réponse à l'hypoxie des cellules glomérulaires? Dans les cellules épithéliales et endothéliales

rénales les protéines Hypoxia inducible factors ont un rôle principal dans la réponse hypoxique comme nous allons le voir.

FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE REPONSE A L'HYPOXIE: HIF

Les cellules résidentes rénales peuvent répondre à la baisse de la pression partielle en oxygène par la mise en jeu de facteurs de transcription nommés Hypoxia inducible factors (HIF).

HIF est un facteur de transcription hétérodimérique de la famille hélice-boucle-hélice Per-ARNT-Sim (PAS)²⁷⁹. Cette famille de protéines qui contiennent ces domaines PAS a été identifiée en 1991 par homologie de séquence avec les protéines suivantes: period (Per, protéine du cycle circadien chez la Drosophile), single-minded (Sim, protéine ayant une fonction dans le développement du système nerveux central de la Drosophile) et aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter (ARNT, protéine translocatrice du récepteur nucléaire de l'aryl-hydrocarbure présente chez les vertébrés)^{280,281}. Les domaines PAS constituent des capteurs pour une grande variété de stimuli chimiques ou physiques et régulent l'activité de plusieurs protéines effectrices. Malgré la diversité fonctionnelle la structure protéique des domaines PAS est assez conservée et comporte 5 feuillets β plissés et plusieurs hélices α . Le complexe HIF, découvert en 1992 en étudiant les facteurs augmentant l'expression du gène de l'érythropoïétine in vitro²⁸², est composé d'une sous-unité α sensible aux variations de la P_{O_2} et d'une sous-unité β qui est exprimée de façon constitutive et qui est nommée HIF-1 β ou aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT). En normoxie, la sous-unité α de HIF est constamment dégradée par le système d'ubiquitination et le protéasome. Les résidus proline de HIF- α sont hydroxylés par des protéines prolyl hydroxylase domain-containing protein (PHD; PHD-1, -2 et -3) ce qui active le recrutement de la protéine suppresseur de tumeurs von Hippel-Lindau (pVHL)²⁸³. pVHL est un des composants du complexe de l'ubiquitine ligase E3 qui reconnaît HIF- α et induit son ubiquitination²⁸⁴ (**Figure 16**). Les enzymes PHD sont des dioxygénases 2-oxoglutarate-dépendantes qui hydroxylent les résidus proline et qui ont un ion Fe^{2+} dans leur site d'activation²⁸⁵. L'activité des PHD nécessite de l'oxygène comme substrat et représente l'élément oxygène dépendant de la voie HIF^{286,287}. Par ailleurs HIF-1 α est aussi contrôlé par hydroxylation d'un de ses résidus asparagine par FIH-1 ce qui bloque le recrutement d'autres co-activateurs comme CREB-binding protein

(CBP/p300) et bloque l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α ²⁸⁸. En hypoxie, la sous-unité α n'est pas dégradée et est transloquée dans le noyau où elle forme un hétérodimère avec HIF-1 β pour se lier aux éléments de réponse à l'hypoxie (Hypoxia responsive elements ou HRE) et activer de nombreux gènes cibles impliqués dans l'adaptation tissulaire à l'hypoxie comme les gènes impliqués dans la glycolyse, l'érythropoïèse et l'angiogénèse (ex: VEGFA)²⁸⁹. Cependant cette étude réalisée sur des cultures cellulaires n'est qu'un reflet imparfait des gènes cibles de HIF dans les cellules résidentes rénales.

Le système HIF est complexe car il existe trois isoformes de la sous-unité α . HIF-1 α est exprimé dans la quasi totalité des cellules de l'organisme alors que HIF-2 α ou Endothelial-PAS-domain-containing protein 1 (Epa1) a une expression plus restreinte et est en particulier impliquée dans la production d'érythropoïétine. HIF-1 α et Epa1 ont certaines fonctions communes mais de plus en plus de rôles distincts sont déterminés. Le rôle de HIF-3 reste cependant plus obscure et certains de ses variants pourraient agir comme des inhibiteurs des autres sous-unités HIF.

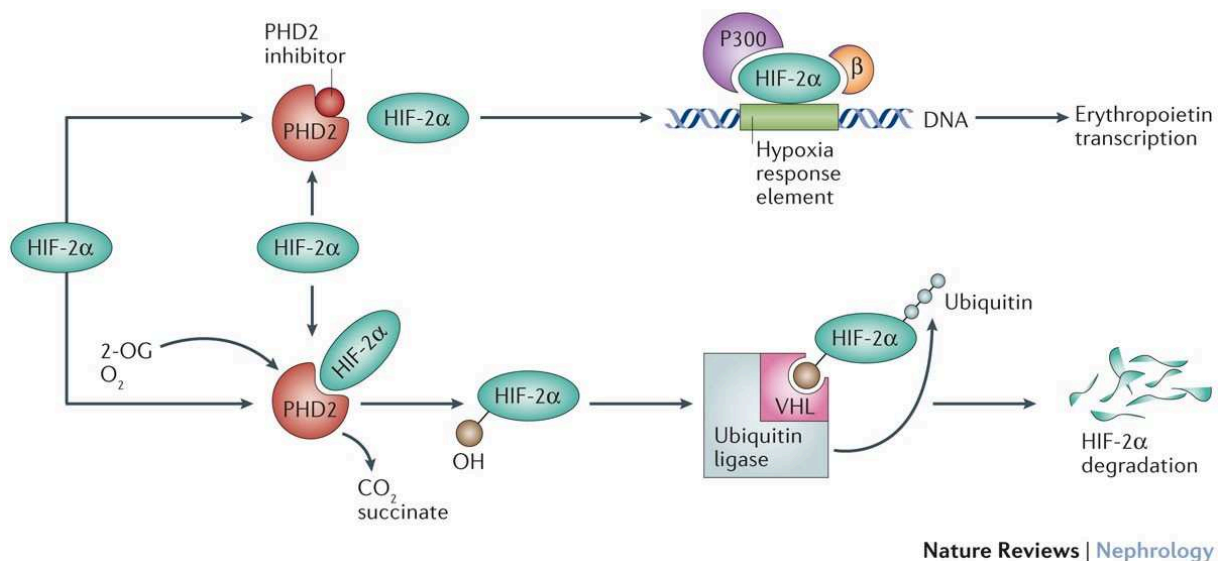


FIGURE 16: SCHEMA DE LA REGULATION DE HIF (NATURE REVIEWS NEPHROLOGY, MAXWELL ET AL. 2016)

Dans le rein les rôles et les localisations de HIF-1 α et Epa1 semblent bien distinctes. Une étude chez le rat avec plusieurs modèles d'hypoxie tissulaire induite par l'hémorragie, le monoxyde de carbone, ischémie artérielle ou le cobalt induisaient une surexpression de HIF-1 α détecté par immuno-histochimie dans les cellules épithéliales tubulaires²⁹⁰ ce qui est confirmé par une deuxième étude²⁹¹ qui ne s'intéresse qu'au compartiment tubulo-interstitiel. Dans l'anémie hémorragique et l'exposition au monoxyde de carbone, HIF-1 α est

retrouvé dans les cellules tubulaires proximales, dans les cellules tubulaires distales après exposition au cobalt et dans les tubules connecteurs et les tubes collecteurs dans tous les modèles. Au contraire, l'expression de Epas1 était induite dans les cellules endothéliales, dans les cellules glomérulaires dont les cellules épithéliales pariétales et podocytaires et des cellules interstitielles identifiées comme des fibroblastes. L'expression basale de ces facteurs de transcription est quasi nulle à l'état basal chez le rat adulte mais induite dans les étapes de développement. Par ailleurs, Epas1 semble réguler fortement l'expression de l'endogline. Epas1 a un rôle principal dans la stimulation de la production de l'EPO lors de l'hypoxie chez la souris et chez l'homme au sein des fibroblastes interstitiels corticaux péri-tubulaires^{292,293}.

Sur le plan développemental la délétion totale de Epas1²⁹⁴ et de HIF-1 α sont létales car ces protéines sont essentielles à la réponse aux catécholamines pendant le développement et au fonctionnement cardiaque.

HIF DANS LES MODELES EXPERIMENTAUX DE NEPHROPATHIE

L'étude des protéines HIF dans différents modèles de néphropathie nous montre les rôles différents de HIF-1 α et Epas1 dans le rein. Par ailleurs, il semble exister une importance de la chronologie de l'activation du système: de façon aiguë dans des modèles d'AKI HIF peut être protecteur mais la surexpression de HIF-1 α en particulier dans l'épithélium rénal peut favoriser la fibrose et les lésions tubulaires²⁹⁵.

Théoriquement, le modèle d'ischémie-reperfusion chez l'animal est bien adapté pour l'étude du système HIF car l'ischémie impose une hypoxie tissulaire rénale et il s'agit d'un modèle expérimental d'une cause fréquente d'IRA chez l'homme sur rein natif ou lors de la transplantation rénale.

Globalement, l'activation globale de HIF a un rôle protecteur dans le modèle ischémie reperfusion²⁹⁶. En effet, l'activation de HIF par l'administration de cobalt, un chélateur du fer qui est un cofacteur des PHD, ou par d'autres drogues, améliore les lésions tubulaires chez le rat^{297,298}. Par ailleurs une déficience hétérozygote de HIF-1 α ou Epas1^{299,300} aggravent aussi les lésions tubulaires avec une augmentation marquée du stress oxydatif cellulaire. Enfin, des inhibiteurs pharmacologiques des PHD ou le monoxyde de carbone administré avant l'agression ischémique chez le rat ont aussi amélioré le pronostic rénal et tubulaire³⁰¹ faisant

de l'activation de HIF un des mécanismes impliqués dans l'effet protecteur du préconditionnement ischémique. HIF-1 α pourrait exercer sa protection tubulaire par l'induction du micro-ARN 489 dans le modèle murin d'ischémie-reperfusion³⁰². Cependant, les approches pharmacologiques ne peuvent pas cibler spécifiquement HIF-1 ou Epas1 ou même parfois peuvent activer d'autres voies métaboliques que HIF et ont un effet systémique. Les approches génétiques n'étant pas tissu-spécifiques peuvent intégrer par ailleurs des effets cumulés divers de plusieurs types cellulaires. Une approche plus ciblée d'inhibition des PHD, utilisant un analogue de l'oxoglutarate internalisé de façon préférentielle par les cellules tubulaires proximales, ne montre pas d'effet protecteur dans un modèle ischémie-reperfusion chez la souris suggérant des rôles différentiels de HIF en fonction des segments tubulaires étudiés. En effet, l'activation de HIF par l'inactivation sélective génétique de pVHL dans le segment large ascendant de l'anse de Henlé (utilisant l'expression de la recombinaise cre sous contrôle du promoteur du gène de l'uromoduline) a un effet protecteur sur les lésions histologiques tubulaires et la fonction rénale dans le modèle d'ischémie-reperfusion chez la souris³⁰³.

Dans d'autres modèles d'agression tubulaire comme celle induite par le cisplatine chez le rat on note aussi un rôle anti-apoptotique tubulaire de l'activation de HIF³⁰⁴ qui semble être modérée dans ce modèle mais qui peut être induite en préconditionnement hypoxique par le monoxyde de carbone³⁰⁵.

Dans le cas spécifique d'Epas1 une étude utilisant un outil génétique chez la souris a montré que la délétion de Epas1 et non pas de HIF-1 α de l'endothélium aggrave les lésions rénales dans le modèle d'ischémie reperfusion et d'obstruction urétérale unilatérale avec une augmentation des molécules d'adhésion endothéliales comme VCAM-1 et un recrutement inflammatoire accru³⁰⁶. La délétion d'Epas1 de l'endothélium ne s'associe pas, à l'état basal, avec une altération histologique rénale ni avec une augmentation de la perméabilité capillaire comme dans le cas du tissu pulmonaire ou cette délétion induit par ailleurs un tableau d'hypertension pulmonaire³⁰⁷.

L'expression du système HIF est aussi augmentée dans le cadre des néphropathies chroniques chez l'Homme³⁰⁸ et chez l'animal³⁰⁹. Chez l'Homme HIF-1 α et ses gènes cibles sont augmentés dans le compartiment tubulo-interstitiel des patients ayant une diminution du DFG. Chez le

rat, de façon intéressante, même des agressions glomérulaires comme le modèle par injection de PAN (puromycine aminonucléoside) ou des agressions chroniques comme le modèle de réduction néphronique aboutissent à une activation des sites HRE (hypoxia-responsive elements) dans le compartiment tubulo-interstitiel mais aussi au sein du glomérule montrant bien que HIF peut jouer un rôle dans ces deux compartiments du rein. Par ailleurs, une agression glomérulaire peut aussi aboutir, par des mécanismes encore mal élucidés, à une hypoxie locale et à une activation de HIF probablement liée à une action du stress oxydant.

En effet, le stress oxydant aggrave l'hypoxie tissulaire locale mais d'autres études réalisées chez le rat dans un modèle de diabète suggèrent que la diminution du stress oxydatif par un mimétique de la superoxyde dismutase (SOD) restaurerait l'activité de HIF-1 α tubulaire et Epas1 interstitielle^{310,311}. Ceci dit, la diminution des lésions induite par le traitement peut aussi expliquer le maintien de l'expression protéique de HIF. Par ailleurs, les conséquences de l'IRC elle-même avec l'augmentation des taux plasmatiques des toxines urémiques peuvent aussi moduler l'expression de HIF comme le montrent des études sur l'indoxyl sulfate ou l'indol^{312,313}, un de ses précurseur, et des cellules adipeuses de patients dialysés³¹⁴.

Cependant l'activation de HIF-1 α au long cours dans l'épithélium rénal voire dans l'endothélium peut avoir des effets délétères promouvant la dédifférenciation épithéliale tubulaire et la fibrose. En effet, dans le modèle d'hypertension induite par l'infusion continue d'angiotensine II, la surexpression tubulaire de HIF-1 était pro-fibrosante avec une induction de la transition épithélio-mésenchymateuse tubulaire³¹⁵ et sa délétion protectrice³¹⁶. Même si les études précédentes ne montrent pas une expression de HIF-1 α très importante dans l'endothélium rénal une étude affirme que la délétion de HIF-1 α de l'endothélium rénal est protectrice dans le modèle hypertensif par perfusion d'angiotensine II via une activation de la voie pro-inflammatoire NF κ B³¹⁷ et atténue les lésions glomérulaires en particulier. Cependant NF κ B semble être aussi un puissant activateur de HIF-1 α in vitro ce qui fait un lien intéressant entre hypoxie locale et recrutement inflammatoire³¹⁸. Ceci est corroboré par une autre étude montrant que l'IL-1 β et NF κ B activent CEBPD (CCAAT/enhancer-binding protein delta) qui régule la transcription de HIF-1 α dans les cellules tubulaires³¹⁹. Cette même délétion de HIF-1 α endothéliale a aussi un effet protecteur dans d'autres modèles d'athérosclérose (ligature carotidienne partielle et induite par l'alimentation) où on note une diminution du

recrutement inflammatoire et de CXCL1 chez les souris délétées via une modulation de miR-19³²⁰.

Enfin, au sein du podocyte comme on l'a vu précédemment, la délétion podocytaire de pVHL, aboutissant entre autre à une suractivation du système HIF et d'un de ses gènes cibles CXCR4, s'associe avec une prolifération podocytaire spontanée avec des pseudo-croissants à partir de la 4ème semaine de vie chez la souris¹⁷².

La dissection des rôles respectifs de HIF-1 α et Epas1 et de leurs spécificité tissulaires dans la maladie rénale est nécessaire. En effet, chez l'Homme, un polymorphisme transactivateur de HIF-1 α (exon 12, position +85, substitution C par T) est associé avec un pronostic péjoratif (le critère principal composite étant le décès intra-hospitalier et la nécessité de dialyse) dans le cadre d'IRA principalement ischémiques en réanimation dans une étude prospective chez 241 patients³²¹. Cette étude suggère les actions séparées de HIF-1 α et Epas1 et que les effets bénéfiques des inhibiteurs des PHD dans les modèles expérimentaux d'insuffisance rénale aiguë peuvent ne pas passer par l'activation de HIF-1 α mais peut-être d'Epas1 car ces drogues ne sont pas spécifiques. Par ailleurs, cela étaye le rôle délétère de la suractivation au long cours de HIF-1 α .

Par ailleurs, la thérapeutique visant le système HIF dans le rein pourrait venir expliquer certains aspects physiopathologiques. En effet, dans le cadre du développement des stimulants de l'érythropoïèse dans l'IRC de nouvelles molécules activant HIF sont déjà sur le marché³²². Depuis 2006, les inhibiteurs des PHD se développent dans le domaine de l'anémie de l'insuffisant rénal chronique^{323,324}. Actuellement, plusieurs essais cliniques étudient l'intérêt de ces molécules comme le roxadustat dans le traitement de l'anémie de l'IRC avec des résultats prometteurs^{325,326}. L'utilisation de ces médicaments dans d'autres néphropathies avec une validation préalable chez l'animal³²⁷ pourrait faciliter la compréhension du rôle de HIF dans le rein. Cependant, comme on l'a dit, ces interventions thérapeutiques systémiques se heurtent aux effets différentiels de HIF-1 α et de Epas1 et aux rôles du système HIF qui peut être différent dans chaque sous-type cellulaire. Enfin, il faut rester vigilant sur les effets de ces activateurs de HIF dans les pathologies cancéreuses comme le carcinome à cellules claires rénal où le système HIF exprimé par la tumeur est un système facilitant les mécanismes de survie de celle-ci^{328,329}.

Le but des thérapeutiques utilisées dans les HSF primitives ou secondaires est de diminuer le débit de protéinurie. Cette rémission complète ou partielle a montré une amélioration du pronostic rénal³³⁰.

Le traitement des HSF primitives (ou idiopathiques) où on suspecte un facteur circulant de perméabilité est purement empirique et vise à contrôler le système immunitaire qu'on pense à l'origine de la production du ou des facteur(s) circulant(s) que l'on pense aussi éliminer par des échanges plasmatiques. Cependant les immunosuppresseurs peuvent aussi avoir des effets épithéliaux directs, en particulier podocytaires, constituant au moins une partie de leurs effets bénéfiques³³¹.

Chez l'enfant les corticoïdes ont montré leur efficacité dans les syndromes néphrotiques s'ils répondent à 4 à 6 semaines de traitement. Ces cas correspondraient en histologie à des lésions glomérulaires minimales. Ce n'est que dans le cas d'une résistance au traitement par stéroïdes où on réalise une biopsie rénale chez l'enfant. En effet chez l'enfant, dans 80% des cas on note une rémission après corticothérapie. Au contraire, chez les adultes l'histologie est nécessaire au diagnostic d'emblé du fait de la plus grande variété des pathologies incriminées.

Les causes des HSF secondaires doivent par ailleurs être traitées comme dans le cas de l'HIVAN ou les HSF toxiques. Dans le cas général, un traitement bloquant le SRAA et un régime hyposodé est proposé. Cette association est particulièrement efficace dans les HSF dites hémodynamiques par un effet sur la pression artérielle, l'hémodynamique glomérulaire et la toxicité de l'angiotensine sur le podocyte.

Il n'y a pas pour le moment de traitement efficace contre les HSF d'origine génétique par ailleurs résistantes aux stéroïdes. Cependant, il est intéressant de noter que dans certaines formes génétiques les anti-calcineurines peuvent être efficaces et ce probablement à cause de leur effet direct podocytaire sur la stabilisation du cytosquelette d'actine.

IV. LE PODOCYTE: UNE CIBLE THERAPEUTIQUE PARFOIS INSOUPEÇONNEE

Le podocyte est l'acteur principal de nombreuses maladies glomérulaires, la modification de sa structure, la perte des diaphragmes de fente avec l'altération du cytosquelette d'actine sont une des principales causes initiales des glomérulopathies.

Les thérapies immunosuppressives et les glucocorticoïdes sont utilisés souvent de manière empirique dans la plupart des maladies glomérulaires. Classiquement ces maladies ont été vues comme une agression immune sur les glomérules. Cependant, dans certaines glomérulopathies où par exemple les corticoïdes ou les anticalcineurines ont montré leur efficacité comme la maladie à lésions glomérulaires minimes on ne note pas sur le plan histologique une participation immune ni de processus inflammatoire.

Cela suggère que ces thérapies auraient un effet direct sur le maintien de la viabilité podocytaire. En effet, plusieurs études in vitro et in vivo nous prouvent que les effets bénéfiques de certaines drogues utilisées à visée immunomodulatrice peuvent être dus à une action de celles-ci sur le podocyte^{331,332}.

CORTICOÏDES

Les glucocorticoïdes constituent le traitement de première intention dans un grand nombre de glomérulopathies. L'effet anti-inflammatoire et immunomodulateur est recherché dans un grand nombre de pathologies comme les GN inflammatoires mais, de façon intéressante, leur bénéfice est aussi évident dans d'autres glomérulopathies non inflammatoires comme les LGM et les HSF. Dans ces dernières les corticoïdes sont le traitement de première intention et on note 80% de rémission par exemple dans les syndromes néphrotiques de l'enfant après un traitement par cette drogue.

Les glucocorticoïdes se lient à leur récepteur cytoplasmique qui se dimérise et va être transloqué dans le noyau pour promouvoir l'expression des gènes cibles. Les podocytes humains³³³ et murins³³⁴ en culture expriment le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) qui est détecté par ailleurs dans toutes les cellules glomérulaires in vivo chez l'Homme³³⁵. Les glucocorticoïdes ont in vitro un effet protecteur sur le réarrangement du cytosquelette d'actine podocytaire, inhibent l'apoptose et régulent différentes protéines impliquées dans le diaphragme de fente comme la néphrine^{333,334,336-338}.

En effet, dans l'étude Shankland, la dexaméthasone avait un effet anti-apoptotique par inhibition de Bax et de p53 et une augmentation de Bcl-xl dans un modèle *in vitro* d'agression podocytaire par la puromycine utilisant des podocytes de souris immortalisés³³⁷. Dans un modèle utilisant une lignée de podocytaire humaine immortalisée, la dexaméthasone augmentait l'expression des gènes impliqués dans le diaphragme de fente comme la néphrine³³³ et avait un effet sur la survie en diminuant l'expression de p21 et de l'IL-6.

Les glucocorticoïdes pourraient aussi avoir un effet sur la voie du VEGF en diminuant sa production dans des modèles *in vitro*³³³ ce qui, d'après les connaissances actuelles, aurait plutôt un effet délétère. En effet le VEGF est un facteur de survie podocytaire et endothélial. Enfin une étude *in vitro* sur des cellules humaines embryonnaires HEK-293 exprimant la néphrine indique que les glucocorticoïdes auraient un effet protecteur face au stress du réticulum qui altère la glycosylation et donc la stabilisation de la néphrine³³⁹.

De façon intéressante, une étude *in vivo* chez la souris montre le rôle protecteur de la prednisone dans le modèle anti-MBG passif (décrit comme un modèle de HSF dans cette étude) associée à une diminution de l'apoptose podocytaire et pariétale épithéliale avec une activation de la voie ERK. Cependant, le mécanisme exact de cette protection ne peut pas être déterminé par l'étude connaissant les aspects multifactoriels du modèle³⁴⁰.

La plupart des études s'intéressant au rôle des glucocorticoïdes sur le podocyte se basent donc sur des modèles *in vitro* qui comportent comme on le sait des limites importantes. Ils devraient être validés dans d'autres modèles *in vivo* de podocytopathie comme celle induite par l'adriamycine ou le PAN. Le bénéfice de la prednisone dans le modèle anti-MBG peut par ailleurs nous montrer que l'effet des corticoïdes dans les GNEC pourrait aussi passer par un effet protecteur podocytaire mais le mécanisme exact devra être précisé pour déceler une action directe ou indirecte via la modulation des effecteurs de l'immunité innée ou des cytokines.

ANTICALCINEURINES

Le tacrolimus et la ciclosporine sont les deux inhibiteurs de la calcineurine les plus largement commercialisés. La calcineurine est une phosphatase qui déphosphoryle la nuclear factor of activated T cells (NFAT) qui active les lymphocytes T. Leur effet immunosuppresseur utilisé en

transplantation rénale fait des anticalcineurines une des drogues de premier choix dans ce domaine. Cependant, ces deux médicaments sont utilisés de façon empirique dans les cas d'HSF résistantes aux corticoïdes avec une efficacité manifeste dans certains cas.

La calcineurine et NFAT sont présents dans les podocytes et une étude étudiant la surexpression génétique de NFAT dans le podocyte chez la souris a montré que cette surexpression s'associait à des lésions d'HSF et à une glomérulosclérose³⁴¹. Il est intéressant de noter que l'activation de TRPC6 peut, par ailleurs, activer NFAT podocytaire in vitro³⁴². Les anticalcineurines pourraient par ce mécanisme, bloquant NFAT podocytaire, protéger le podocyte. Par ailleurs, dans un modèle de podocytopathie induite par le LPS les anticalcineurines avaient un effet protecteur sur le cytosquelette podocytaire en maintenant l'expression de la synaptopodine et ZO-1³⁴³. Ce modèle de toxicité par le LPS a des limites car il ne peut être comparé à la pathologie humaine.

Les anticalcineurines ont par ailleurs un effet délétère rénal sur les vaisseaux et l'épithélium tubulaire pro-fibrosant qui limite leur utilisation. De plus une étude in vitro montre un effet pro-apoptotique de la ciclosporine sur les podocytes murins en culture ce qui montre que ces travaux doivent être confirmés in vivo³⁴⁴.

INHIBITEURS DE LA MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN (MTOR)

Le switch en transplantation rénale d'une anticalcineurine vers un inhibiteur de mTOR s'accompagne d'une augmentation significative de la protéinurie³⁴⁵. Cette observation peut être due à la perte de l'effet hémodynamique de l'anticalcineurine lors du switch ou à un effet toxique propre des inhibiteurs de mTOR sur le podocyte.

Une étude française de 2007 rapporte 8 cas de HSF chez des patients transplantés rénaux traités par sirolimus³⁴⁶. 3 de ces patients, qui n'avaient pas reçu des anticalcineurines préalablement, ont développé une protéinurie importante >6g/24h. Cette protéinurie diminuait lors du switch aux anticalcineurines évoquant les deux hypothèses précédemment citées. In vitro, les podocytes exposés au sirolimus diminuent la forme phosphorylée d'Akt et les marqueurs de différenciation comme la synaptopodine, nephrine et podocine avec une augmentation de l'apoptose et une réorganisation du cytosquelette d'actine^{347,348} ce qui oriente vers un effet toxique direct de cette thérapie. Une étude génétique chez la souris a

éclaircit le mécanisme car la délétion de mTORC1 seule ou de mTORC1 et mTORC2 du podocyte induit une protéinurie et une glomérulosclérose montrant l'importance des ces deux protéines et de l'activation de PI3 kinase dans l'homéostasie podocytaire. Cependant la surexpression de mTORC1 est observée dans les glomérulopathies et en particulier dans la néphropathie diabétique et aboutit aussi à une dysrégulation podocytaire et une protéinurie³⁴⁹. Cette étude peut peut-être expliquer les effets paradoxaux bénéfiques observés par certaines études des inhibiteurs de mTOR dans l'HSF chez l'Homme³⁵⁰.

RITUXIMAB

Le rituximab, anticorps monoclonal chimérique souris-humain anti-CD20, (glycoprotéine de surface des lymphocytes B) est utilisé en néphrologie dans certaines glomérulopathies que l'on pense médiées par une agression immune. Dans la récurrence d'HSF post-transplantation rénale où on suspecte le rôle pathogène d'un facteur circulant (par ex. anticorps dirigé contre une protéine podocytaire), a fait utiliser avec un certain succès le rituximab³⁵¹. En effet, pour les auteurs le rituximab pourrait interagir directement avec la sphingomyélin phosphodiesterase acid-like 3b (SMPDL-3b) pour stabiliser le cytosquelette d'actine podocytaire. Le taux de réponse du rituximab dans une étude espagnole chez des patients ayant une HSF cortico-résistante est cependant faible (3 malades sur 8 dans cette étude)³⁵² et les résultats sont aussi décevants chez les enfants présentant une HSF résistante à la combinaison prednisone/ciclosporine car l'adjonction de rituximab n'améliore pas la pronostic glomérulaire³⁵³. Dans les HSF récurrentes chez l'enfant une étude japonaise contrôlée randomisée a montré son efficacité par rapport au traitement par corticoïdes dans la prévention de la récurrence³⁵⁴. Cependant les effets secondaires au long cours du rituximab peuvent limiter l'intérêt du traitement. Une étude récente pointe aussi son intérêt dans les HSF récurrentes après transplantation rénale³⁵⁵.

ABATACEPT

L'abatacept est un modulateur du signal de costimulation lymphocytaire qui bloque B7-1 exprimé sur les cellules présentatrice de l'antigène et est utilisé en transplantation rénale. Une équipe a montré l'induction du B7-1 dans les podocytes dans un modèle d'agression médiée par le LPS chez la souris et in vitro sur une lignée immortalisée murine⁴⁸ et dans les HSF chez l'Homme³⁵⁶. Depuis, des observations contradictoires se sont succédées sur l'effet

de l'abatacept dans les glomérulopathies avec atteinte podocytaire. Cette même équipe a montré une induction de B7-1 dans les podocytes dans les glomérulopathies diabétiques³⁵⁷ mais ces résultats n'ont pas pu être reproduits par une autre équipe³⁵⁸. Enfin l'abatacept n'a pas montré son efficacité dans les HSF récidivantes en transplantation rénale³⁵⁹. Ces résultats contradictoires incitent à la prudence et à continuer la recherche quant à l'utilisation de l'abatacept dans les podocytopathies.

ACIDE RETINOÏQUE

Les preuves expérimentales de l'effet bénéfique de l'acide rétinoïque, un dérivé de la vitamine A, et des agonistes du récepteur de l'acide rétinoïque α (RAR α) sur le podocyte sont nombreuses in vivo chez la souris dans plusieurs modèles expérimentaux³⁶⁰⁻³⁶³. Son action de maintien des protéines de différenciation podocytaire passerait par l'induction du facteur de transcription Kruppel-like factor 15 et serait médiée par l'AMP cyclique après action de l'acide rétinoïque sur son récepteur RAR α . Cependant ces effets encourageant in vivo se voient confrontés à la toxicité systémique du produit (hépatotoxicité, neurotoxicité, toxicité muqueuse et sur la spermatogenèse)³⁶⁴ qui limitent les études cliniques étudiant son intérêt dans l'HSF.

INHIBITEURS DU SRAA

Enfin, les inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou les antagonistes du récepteur de l'angiotensine II ont aussi un effet direct sur le podocyte expliquant en partie les observations de Brenner dans les années 1980 sur les effets protecteurs de l'enalapril sur les lésions glomérulaires hypertensives chez le rat²⁵⁴. En effet, il montrait que cet effet était indépendant de l'effet sur le contrôle de la pression artérielle car il n'était pas retrouvé chez des rats ayant la même pression artérielle avec un traitement médicamenteux différent. A l'époque, un effet hémodynamique local était évoqué. L'effet bénéfique des IEC ou ARA2 sur le système cardio-vasculaire peut passer en effet par un contrôle de la pression artérielle systémique mais au niveau local dans le rein il existe des effets hémodynamiques glomérulaires locaux comme on l'a vu précédemment et un effet direct sur le podocyte qui a été observé plus récemment.

Plusieurs études se sont intéressées à la surexpression génétique³⁶⁵ ou au blocage pharmacologique du récepteur AT1R^{366,367} de l'angiotensine II qui est présent dans le podocyte et qui est induit dans plusieurs situations de stress mécanique du podocyte^{365,368}. La surexpression d'AT1R podocytaire s'accompagne de lésions podocytaires, effacement des pédicelles, protéinurie et glomérulosclérose sans modifier le niveau de pression artérielle systémique. Le blocage d'AT1R dans le modèle de néphrectomie des 5/6 chez le rat améliore les lésions de glomérulosclérose et abaisse le niveau de pression artérielle après administration systémique. L'administration d'antagonistes de l'aldostérone comme la spironolactone augmente par ailleurs la phosphorylation d'AKT *in vitro* entraînant une stabilisation du cytosquelette d'actine. L'action de ces drogues n'est pas liée au niveau de pression artérielle chez le rat spontanément hypertensif Ren2³⁶⁹ qui surexprime la rénine. Les anti-aldostérone font, par ailleurs, régresser les lésions glomérulaires induites dans le modèle de néphrectomie des 5/6 chez le rat³⁶⁶. L'inhibiteur de la rénine, aliskiren, a aussi un effet bénéfique comme le blocage d'AT1R sur les lésions glomérulaires induites chez le rat transgénique Ren2 mais un effet plus modeste sur la pression artérielle³⁶⁷.

Les inhibiteurs du SRAA constituent donc une thérapeutique de choix dans les glomérulopathies avec atteinte podocytaire grâce à l'addition des effets sur la pression systémique, l'hémodynamique glomérulaire et l'effet protecteur sur le podocyte.

V. DEUX MODELES DE PODOCYTOPATHIE ACQUISE: LA PERFUSION D'ANGIOTENSINE II ET L'INJECTION D'ADRIAMYCINE

Dans la deuxième et troisième partie de ce travail nous avons utilisé deux modèles de glomérulopathie non inflammatoire et de lésions podocytaires acquises. La première est un modèle de toxicité directe podocytaire chez la souris par injection d'une anthracycline, l'adriamycine et la deuxième est le modèle de perfusion continue d'angiotensine II qui aboutit à une néphropathie hypertensive avec des lésions vasculaires et des lésions glomérulaires épithéliales.

MODELE DE NEPHROPATHIE A L'ADRIAMYCINE: UNE AGRESSION TOXIQUE DU PODOCYTE

La recherche d'un modèle plus pur d'agression glomérulaire chez la souris afin de tester l'effet de la délétion du gène STAT5 du podocyte nous a amené à utiliser le modèle expérimental nommé néphropathie à l'adriamycine³⁷⁰.

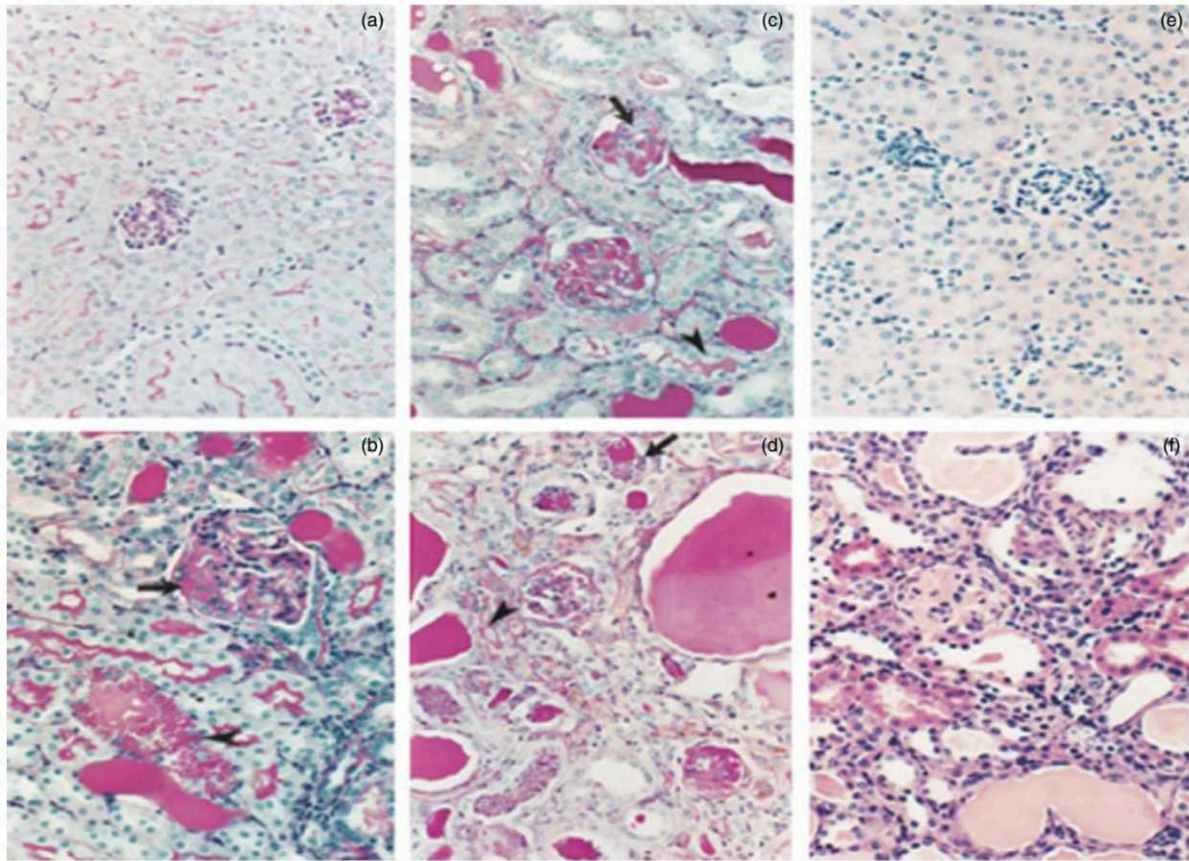


FIGURE 17: LESIONS HISTOLOGIQUES OBSERVEES DANS LA NEPHROPATHIE A L'ADRIAMYCINE CHEZ LE RAT (LEE ET AL. 2011)

L'atteinte rénale des anthracyclines chez le rat a été décrite pour la première fois en 1970³⁷¹ avec la daunomycine puis en 1976 avec la doxorubicine (également appelée Adriamycine®) chez le rat³⁷² et en 1998 chez la souris³⁷³. Un cas clinique chez l'Homme en 1977 a décrit une toxicité rénale de la doxorubicine³⁷⁴ avec des lésions semblables au modèle animal mais cela reste anecdotique car cette toxicité rénale est quasi exclusive aux espèces murines.

Nous retiendrons la dénomination adriamycine car toute la littérature sur le sujet a retenu ce terme même si doxorubicine serait plus adapté.

L'adriamycine est un anticancéreux de la famille des anthracyclines, molécules isolées à partir d'actinobactéries de type *Streptomyces* et découvertes en 1963. Le suffixe "rubicine" rappelle leur couleur rouge vive. Les anthracyclines s'intercalent entre les paires de bases azotées de

l'ADN et inhibent l'activité de la topoisomérase II, d'où le nom d' « intercalants » donné à ce groupe de substances. La plupart d'entre elles forment des radicaux libres oxygénés responsables de leur toxicité, mais sans doute pas de leur activité anticancéreuse. En plus de leur effet sur la lignée hématopoïétique principalement recherché, ces molécules ont une toxicité sur la peau, le tube digestif et le cœur chez l'Homme.

L'adriamycine est principalement métabolisée par le foie et l'excrétion urinaire constitue 4-5% de son élimination. L'adriamycine s'accumule principalement dans le rein mais peut aussi être trouvée dans le foie, le cœur et l'intestin chez l'animal.

Dans les modèles murins, où l'administration de l'adriamycine est par voie intraveineuse (veine caudale ou sinus rétro-orbitaire) il existe deux facteurs pouvant influencer les résultats dans le modèle. D'une part il existe une variabilité des effets dépendante du fonds génétique en particulier chez la souris, avec des souches résistantes comme les C57BL/6J et des souches sensibles comme les BALB/c ou les 129S1/Sv³⁷⁵. Les mâles BALB/c sont injectés avec des doses de 9,9-10,4 mg/kg alors que les C57BL/6J nécessitent des doses beaucoup plus importantes autour de 13-25 mg/kg³⁷⁶. Le sexe peut aussi être une source de variabilité comme dans d'autres modèles expérimentaux (ex: angiotensine II, anti-MBG) ce qui peut être due en partie aux cycles hormonaux des femelles. Les rats mâles sont plus susceptibles à l'adriamycine que les rats femelles. La plupart des études utilisent une seule injection intraveineuse. L'autre source de variabilité est la faible marge "thérapeutique" de l'adriamycine nécessitant une bonne technique d'injection reproductible, et la constitution de lots expérimentaux de taille suffisante pour pallier à cette variabilité parfois inévitable.

Les lésions rénales observées au cours de ce modèle ressemblent à celles notées dans les HSF chez l'Homme. En effet, il existe une atteinte glomérulaire principalement avec des lésions de collapsus des capillaires glomérulaires de façon focale et des synéchies floculo-capsulaires avec des détachements podocytaires et parfois des scléroses glomérulaires globales. Il existe par ailleurs un retentissement tubulo-interstitiel avec des zones d'atrophie tubulaire et de la fibrose interstitielle (**Figure 17**). En microscopie électronique on note des lésions podocytaires avec une fusion des pédicelles et un épaissement des cellules endothéliales. Sur le plan fonctionnel on note une dégradation de la fonction rénale modérée et une protéinurie qui

peut être d'ordre néphrotique. Ces altérations pathologiques sont observées à partir d'une semaine et sont très sévères à 4 semaines de l'injection³⁷⁰.

MECANISMES PATHOGENIQUES DU MODELE

Le mécanisme par lequel l'adriamycine induit des lésions glomérulaires est resté vague jusqu'à très récemment. Le rôle de l'inflammation a été évoqué initialement mais les études récentes montrent un rôle majeur de l'atteinte directe mitochondriale podocytaire dans le modèle.

L'analyse histologique des reins après injection d'adriamycine montre un infiltrat inflammatoire lymphocytaire T/B et macrophagique tubulo-interstitiel et de ce fait le rôle de l'immunité adaptative et/ou innée a été étudié³⁷⁷. Cependant des expériences menées avec des souris SCID (severe combined immunodeficient) sur un fonds BALB/c montrent que celles-ci développent les mêmes lésions rénales que leurs contrôles BALB/c^{378,379}. Ces deux travaux, qui remettent complètement en cause le rôle des lymphocytes dans le modèle révèlent une sensibilité accrue de ces souris immunodéprimées à l'adriamycine et attribuent à la perte des cellules T régulatrices CD4+CD25+Foxp3+ l'effet aggravant observé chez les souris SCID. Cependant, la mutation SCID est une mutation sur le gène *Il2rg* et comme on le verra au cours de ce travail, la délétion d'*Il2rg* chez la souris implique aussi une délétion tissulaire de γ C aggravante par le biais de son effet purement podocytaire. L'aggravation des souris SCID après injection d'adriamycine pourrait donc s'expliquer par cette absence épithéliale podocytaire de γ C. Les macrophages cependant en fonction de leur phénotype pro ou anti-inflammatoire semblent jouer un rôle important dans le modèle.

En 2010, un pas en avant dans la compréhension de la physiopathologie a été fait par l'étude montrant que la variabilité de la susceptibilité à l'adriamycine en fonction du fonds génétique chez la souris (en particulier entre le fonds BALB/c et C57BL6) provenait d'une mutation dans le gène *Pkrdc* (protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide). Ce gène code pour une protéine impliquée dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN et est retrouvée dans les podocytes de la souris. L'adriamycine induirait des altérations dans l'ADN mitochondrial podocytaire via son action d'intercalant ou par la production de ROS qui peuvent être atténuées en cas de fonctionnement normal du complexe de réparation de l'ADN. Dans le cas où *Pkrdc* est muté la souris développe des lésions aggravées²⁰⁰. La mutation

combinée de *Pkrdc* et d'une autre mutation d'un gène impliqué dans la régulation de la synthèse de l'ADN mitochondrial comme *Mpv17* (qui par ailleurs a un rôle anti-apoptotique dans les podocytes³⁸⁰) induit de façon spontanée une déplétion de l'ADN mitochondrial podocytaire et des lésions podocytaires similaires à celles induites par l'adriamycine.

D'autres études plus récentes ont confirmé le rôle essentiel de l'atteinte mitochondriale podocytaire dans le modèle et en particulier des protéines $GSK3\beta$ ^{381,382} et Krüppel-like factor 6³⁸³(KLF6). En effet KLF6, est un facteur de transcription essentiel dans la régulation de la fonction mitochondriale dans l'apoptose podocytaire. La délétion de *Klf6* des podocytes de la souris du fonds génétique résistant C57BL6 entraîne des lésions d'HSF et une protéinurie. L'activation de *Klf6* dans les podocytes après stimulation par l'adriamycine est un facteur de résistance à l'apoptose et diminue la dysfonction mitochondriale. La protéine *Klf6* peut activer la transcription mitochondriale du gene du cytochrome c oxidase assembly gene (*SCO2*) évitant l'activation de l'apoptose podocytaire. De façon très intéressante l'expression de KLF6 est diminuée en immunohistochimie dans les podocytes des patients avec une HSF ou une HIVAN.

AVANTAGES ET LIMITES DU MODELE

Le modèle de néphropathie à l'adriamycine est un modèle reproductible très utilisé pour étudier l'effet d'une délétion génique en particulier podocytaire sur la susceptibilité à la glomérulosclérose ou aux lésions d'HSF^{370,377,384}. Il s'agit d'un modèle reproductible n'ayant recours qu'à une seule injection et qui est rapide puisque les effets sont visibles à J7 ou J14. La mortalité est faible, l'un des effets secondaires fréquents est la perte de poids qui peut être compensée par des apports liquidiens supplémentaires dans le cas où les doses administrées d'adriamycine sont élevées (comme dans notre cas où une souche résistante C57BL6 a été utilisée). Le type de lésions produites est très proche des lésions d'HSF chez l'Homme ou des lésions de néphropathie associée au VIH. Par ailleurs ce modèle est reproductible chez les rats et chez les souris et a ouvert récemment un champ d'étude sur le rôle de l'intégrité mitochondriale dans les pathologies podocytaires.

Cependant, ce modèle a des limites. La limite principale est que cette molécule n'a pas d'effet toxique podocytaire chez l'Homme ce qui nécessite une vision critique des résultats obtenus quant à leur reproductibilité, ce d'autant qu'il existe une leucopenie/neutropénie importante

pouvant impacter le phénotype. Par ailleurs, il faut tenir compte de la variabilité entre sexes et surtout entre les différents fonds génétiques chez la souris en particulier ayant un effet majeur sur le phénotype. Enfin, la faible marge thérapeutique et sa voie d'administration intraveineuse nécessitent des opérateurs expérimentés afin de diminuer la variabilité interindividuelle.

MODELE DE NEPHROPATHIE HYPERTENSIVE PAR PERFUSION CONTINUE D'ANGIOTENSINE II

Comme on l'a vu, une autre cause de lésions glomérulaires secondaires pouvant impliquer des phénomènes hypoxiques locaux est l'hypertension artérielle. Il existe plusieurs modèles de néphropathie hypertensive chez l'animal comme celui par diminution de la disponibilité du monoxyde d'azote par le L-NAME. Cependant le modèle par infusion continue d'angiotensine a plusieurs particularités intéressantes permettant l'analyse de la pathologie glomérulaire. Le L-NAME aboutit à une agression glomérulaire par plusieurs mécanismes: augmentation de la pression artérielle systémique, augmentation de la pression intraglomérulaire et effet toxique direct sur l'épithélium rénal et en particulier le podocyte *via*, entre autre, l'endotheline-1.

L'angiotensine II a été identifiée initialement comme un puissant peptide vasoconstricteur et est un acteur majeur de la physiopathologie de la néphropathie hypertensive. Cette molécule a par ailleurs des actions pléiotropiques sur des multiples organes où il participe de façon centrale aux altérations tissulaires associées à l'hypertension. Elle agit principalement via son récepteur AT1R.

L'angiotensine II est administrée par voie intraveineuse ou par l'intermédiaire d'une minipompe osmotique diffusant à débit continu dans le tissu sous-cutané. C'est ce dernier modèle que nous avons retenu dans la dernière partie de ce travail. La dose de 1µg/kg/min a été administrée pendant une durée de 42 jours.

La perfusion continue d'angiotensine II induit une hypertension artérielle et une protéinurie précoce puis une apparition d'une insuffisance rénale chronique secondaire. L'angiotensine II favorise une hypertension sensible au sel et la sévérité de l'atteinte rénale peut être augmentée par l'adjonction d'un régime riche en NaCl (3%).

VI. OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif global de ce travail est d'étayer le rôle principal joué par des facteurs intra-rénaux tissulaires épithéliaux et endothéliaux dans la genèse des lésions glomérulaires. Ce rôle tissulaire s'oppose au rôle classiquement décrit des effecteurs « systémiques » comme l'immunité ou l'élévation de la pression artérielle. Comparé à ces effecteurs systémiques (cellules inflammatoires infiltrantes par exemple), les cellules épithéliales et/ou endothéliales rénales constitueraient les acteurs principaux propres à l'organisation des lésions glomérulaires et de facto le pronostic rénal.

La première partie de ce travail étudie les rôles respectifs des lymphocytes et des cellules résidentes dans la pathogénie des lésions glomérulaires induites par un modèle de glomérulonéphrite inflammatoire: le modèle anti-membrane basale glomérulaire passif chez la souris.

Au cours du modèle, la détection d'un rôle protecteur d'un récepteur immun comme la chaîne γ commune des récepteurs des interleukines (trouvé de manière inattendue comme exprimée par le podocyte) via l'interleukine-15 nous oriente vers l'étude de certaines protéines transductrices composant le système JAK-STAT. Dans une deuxième partie nous étudierons donc le rôle de la protéine STAT5, classiquement située en aval du récepteur de l'IL-15, au sein du podocyte. Nous avons utilisé deux modèles d'agression glomérulaire: le modèle anti-MBG et la néphropathie à l'adriamycine.

L'étude de l'effet du fonds génétique de la souris auquel j'ai participé (Annexe 1) au cours du modèle anti-MBG a mis l'accent, sur la voie du VEGFA et le complexe de réponse à l'hypoxie (HIF) dans la pathogénie des lésions endothéliales. Dans une troisième partie nous avons donc étudié le rôle d'une protéine du complexe HIF, nommée Epas1. Cette protéine est exprimée par l'endothélium rénal au cours de deux modèles d'agression endothéliale glomérulaire: le modèle anti-MBG et le modèle par perfusion continue d'angiotensine II.

RESULTATS

RESULTATS

PARTIE 1:

ROLE DE LA CHAINE γ COMMUNE GLOMERULAIRE DANS UN MODELE EXPERIMENTAL DE GLOMERULONEPHRITE INFLAMMATOIRE: LE MODELE ANTI- MBG CHEZ LA SOURIS

**Article 1: Glomerular common gamma chain confers B and T cell-independent resistance to
glomerulonephritis**

En révision (25/04/2016). *Kidney International* KI-04-16-0543



Glomerular common gamma chain confers B and T cell-independent resistance to glomerulonephritis

Journal:	<i>Kidney International</i>
Manuscript ID	KI-04-16-0543
Article Type:	Basic Research
Date Submitted by the Author:	08-Apr-2016
Complete List of Authors:	<p>Luque, Yosu; INSERM, UMR_S1155; Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Urgences Néphrologiques et Transplantation rénale; Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06</p> <p>Cathelin, Dominique; INSERM, UMR_S1155; Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06; Imaging and Cytometry Facility of Tenon, UMR_S 1155</p> <p>Inserm</p> <p>Vandermeersch, Sophie; INSERM, UMR_S1155; Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06</p> <p>Xu, Xiaoli; INSERM, UMR_S1155</p> <p>Sohier, Julie; INSERM, UMR_S1155</p> <p>Placier, Sandrine; INSERM, UMR_S1155; Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06</p> <p>Hertig, Alexandre; Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Urgences Néphrologiques et Transplantation rénale; INSERM, UMR_S1155; Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06</p> <p>Bories, Jean-Christophe; Inserm UMR 1126, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital St. Louis</p> <p>Vasseur, Florence; Inserm U1020, Université Paris Descartes</p> <p>Campagne, Fabien; Weill Medical College of Cornell University, Institute of Computational Biomedicine</p> <p>Di Santo, James; Institut Pasteur, Unité Immunité innée and Inserm U668</p> <p>Vosshenrich, Christian; Institut Pasteur, Unité Immunité innée and Inserm U668</p> <p>Rondeau, Eric; Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Urgences Néphrologiques et Transplantation rénale; INSERM, UMR_S1155; Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06</p> <p>Mesnard, Laurent; Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Urgences Néphrologiques et Transplantation rénale; INSERM, UMR_S1155; Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06</p>
Keywords:	glomerulonephritis, lymphocytes, podocyte, cytokines
Subject Area:	Glomerular Disease, Immunology, Acute Kidney Injury

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Glomerular common gamma chain confers B and T cell-independent resistance to glomerulonephritis

Yosu Luque^{1,2,3*}, M.D., Dominique Cathelin^{1,2,8*}, Ph.D., Sophie Vandermeersch^{1,2}, B.S., Xiaoli Xu^{1,2}, M.D., Julie Sohier^{1,2}, M.D., Sandrine Placier^{1,2}, B.S., Alexandre Hertig^{1,2,3}, M.D., Ph.D., Jean-Christophe Bories⁴, Ph.D., Florence Vasseur⁵, B.S., Fabien Campagne⁶, Ph.D., James P. Di Santo⁷, M.D., Ph.D., Christian Vossenhricht⁷, Ph.D., Eric Rondeau^{1,2,3} M.D., Ph.D. and Laurent Mesnard^{1,2,3,6} M.D., Ph.D.

¹ UMR_S 1155 Inserm, Rare and common kidney diseases, matrix remodelling and tissue repair, F-75020, Paris, France

² Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, France

³ Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Urgences Néphrologiques et Transplantation Rénale, Hôpital Tenon, F-75020, Paris, France

⁴ Inserm UMR 1126, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital St. Louis, Paris, France

⁵ Inserm U1020, Université Paris Descartes, 75014 Paris, France

⁶ Weill Medical College of Cornell University, Institute of Computational Biomedicine, New York, NY 10065, USA

⁷ Institut Pasteur, Unité Immunité innée and Inserm U668, 75724 Paris, France

⁸ Imaging and Cytometry Facility of Tenon, UMR_S 1155 Inserm, Rare and common kidney diseases, matrix remodelling and tissue repair, F-75020, Paris, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, France

* YL and DC contributed equally to this work.

Running title: Epithelial common gamma chain attenuates crescentic glomerulonephritis

Abstract word count: 227

Main body word count: 3987

Correspondence to:

Dr Laurent Mesnard, laurent.mesnard@aphp.fr ; Inserm UMR S1155, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France. Phone: 331 56 01 83 17; Fax 331 56 01 66 59

Abstract

Crescentic glomerulonephritis (GN) is a life threatening renal disease that has been extensively studied by the experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis (anti-GBM-GN) model. Although T cells have a significant role in this model, athymic/nude mice and rats still develop severe renal disease. Our aim was to explore further the contribution of intrinsic renal cells in the development of T cell-independent GN lesions. We induced anti-GBM-GN in 3 strains of immunodeficient mice ($Rag2^{-/-}$, $Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$ and $Rag2^{-/-}Il2rb^{-/-}$) which are devoid of either T/B cells or T/B/NK cells. $Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$ or $Rag2^{-/-}Il2rb^{-/-}$ mice harbor an additional deletion of either the common gamma chain (γC) or the interleukin-2 receptor β subunit (IL-2R β) respectively, impairing IL-15 signaling in particular. As expected, all these strains developed severe anti-GBM-GN. In addition, bone marrow replenishment experiments allowed us to deduce a protective role for the glomerular-expressed γC during anti-GBM-GN. Given that IL-15 has been found highly expressed in nephritic kidneys despite the absence of lymphocytes, we then studied this cytokine *in vitro* on primary cultured podocytes from immunodeficient mice ($Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$ and $Rag2^{-/-}Il2rb^{-/-}$) compared to controls. IL-15 induces downstream activation of JAK1/3 and spleen tyrosine kinase (SYK) in primary cultured podocytes. IL-15-dependent JAK/SYK induction was impaired in the absence of γC or IL-2R β . Our study establishes that renal lesions are modulated by intrinsic glomerular cells through the γC /IL-2R β receptor, a response more classically described in immune cells.

Keywords: glomerulonephritis, γC chain, lymphocyte, podocyte, IL-2R β , IL-15

Introduction

Human crescentic glomerulonephritis (CG) and rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN) are life threatening immune-mediated diseases.¹ For many years, the pathogenesis of human RPGN has been studied using the experimental model of passive anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis (anti-GBM-GN) whereby heterologous anti-glomerular basement membrane (GBM) serum is injected into rats or mice.² Following injection, there is a strong inflammatory response, which in a few days leads to severe glomerular and tubulo-interstitial injuries^{3,4}: renal cells become surrounded by lymphocytes, a feature reminiscent of human CG.^{5–}
¹⁰ The development of anti-GBM-GN lesions in mice has been shown to involve a CD4⁺ T cell response through either Th1^{4,11–14} or Th17^{15–17} pathways, while the T cell subset of invariant natural killer T (iNKT) cells exerts a protective role independently of T cell polarization.¹⁸
Interestingly, other studies have reported that mice or rats born athymic or “nude”, i.e. constitutively lacking T cells, still develop classical features of GN after anti-GBM serum injection, which is hypothesis-generating, and provides an opportunity to explore the particular role potentially played by renal cells, independently from T cells,^{19,20} and by intra-renal signaling pathways or local factors normally used by lymphocytes. We thus induced an experimental glomerulonephritis in several immunodeficient mice strains: *Rag2*^{-/-}, *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} and *Rag2*^{-/-}*Il2rb*^{-/-} which are devoid of either T/B cells or T/B/NK cells. Compared to *Rag2*^{-/-} mice, *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} and *Rag2*^{-/-}*Il2rb*^{-/-} strains carry the additional deletion of either the interleukin IL-2 receptor common gamma chain (γ C) gene (*Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-}) or the IL-2 receptor β subunit (IL-2R β) gene (*Rag2*^{-/-}*Il2rb*^{-/-}). Several interleukin receptor complexes share the γ C subunit (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, and IL-21).²¹ Importantly, IL-15 and IL-2, together with an IL-15R α or IL-2R α co-receptor respectively, have their action further restricted to the β subunit. The trimeric IL-15

1
2
3 receptor (IL-15R α , IL-2R β , γ C) is necessary for NK cell ontogeny and explains the absence of
4
5 NK cells in *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* or *Rag2^{-/-}Il2rb^{-/-}* mice. In this paper we show that γ C/ IL-2R β
6
7 complexes expressed at the surface of intrinsic renal cells play an important role in the
8
9 organization of renal lesions during severe immune-mediated glomerulonephritis.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review Only

Results

***Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice are more susceptible than *Rag2^{-/-}* mice to anti-GBM serum**

Experiments were first carried out to test the effect of anti-GBM serum in *Rag2^{-/-}* mice devoid of T/B cells, *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice devoid of T/B/NK cells, and wild type (WT) mice from the same C57BL/6J background. Administration of anti-GBM serum impaired renal function parameters and induced lesions typical of glomerulonephritis in WT, *Rag2^{-/-}* and *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice (**Figure 1A**) evaluated at day 9. No marked differences were observed in the levels of blood urea nitrogen (BUN) and percentage of pathologic glomeruli between anti-GBM treated WT mice and *Rag2^{-/-}* mice (**Figures 1B & 1C**). However, the score of interstitial lesions, assessed by tubular dilations and epithelial atrophy, was lower in anti-GBM treated *Rag2^{-/-}* mice compared to anti-GBM-GN treated WT mice (**Figure 1D**). The levels of BUN and the severity of renal histological lesions were even greater in anti-GBM treated *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice than in anti-GBM treated *Rag2^{-/-}* mice (**Figure 1B**). Anti-GBM-GN treated *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice consistently exhibited more significant tubulo-interstitial lesions and a higher percentage of pathologic glomeruli than anti-GBM treated *Rag2^{-/-}* mice (**Figures 1C & 1D**). Therefore, *Rag2^{-/-}* mice appeared only partially protected against anti-GBM-GN, while *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice were found to be more susceptible to anti-GBM serum than WT or *Rag2^{-/-}* mice.

NK cells have no protective role against renal lesions induced by anti-GBM serum

Rag2^{-/-} mice have been shown to have a significant proportion of circulating NK cells (around 25% vs 5% in WT mice), while *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice totally lack NK cells.²² To determine the role of NK cells in the results shown above, *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice were replenished by NK cells (1×10^6 cells/mouse), isolated from the spleen of WT C57BL/6J mice, and injected together with anti-

1
2
3 GBM serum. At day 7, flow cytometry analysis showed that ~ 2% of circulating cells in *Rag2*^{-/-}
4
5 *Il2rg*^{-/-} mice were NK cells (**Figure 2A**). At day 9, NK cells were also detected in the mice
6
7 kidneys (**Figure 2B**), where an increase in mRNA expression of the *Nkg2b/Cd159a* NK cell
8
9 receptor (**Figure 2C**) was detectable. Despite that, BUN levels and renal lesions were similar to
10
11 non-replenished *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice (**Figures 2D to 2F**). These findings suggest that NK cells do
12
13 not account for the severity of glomerulonephritis in *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice.
14
15
16
17
18
19

20 **The lack of γ C expression in renal cells worsens renal lesions induced by anti-GBM serum**

21
22 Using bone marrow graft experiments we then analyzed the role of kidney-expressed γ C in the
23
24 development of renal lesions in anti-GBM-GN. Bone marrow cells isolated from WT or *Rag2*^{-/-}
25
26 CD45.1⁺ mice were grafted into irradiated *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} CD45.2⁺ (referred to as ep. γ C^{-/-}) mice, in
27
28 order to obtain chimeric mice knockout only for the γ C chain in non-immune cells. Six weeks
29
30 after bone marrow transplantation at least 90% of circulating cells expressed the CD45.1⁺ marker
31
32 in *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} CD45.2⁺ recipients (**Supplemental Figure 1A**). NK cell counts measured after
33
34 bone marrow transplantation are represented in **Supplemental Figure 1B**. In all anti-GBM-GN
35
36 induced ep. γ C^{-/-} chimeric mice, BUN levels were consistently higher than in mice with WT
37
38 epithelia (**Figure 3A**). All ep. γ C^{-/-} chimeric mice exhibited significantly severe glomerular lesions
39
40 with numerous extra-capillary crescents (**Figures 3B and 3D**). In addition, the tubulo-interstitial
41
42 lesions were more severe in ep. γ C^{-/-} mice than in mice with WT epithelia, independent of the
43
44 origin of the bone marrow (WT or *Rag2*^{-/-}) (**Figures 3C and 3D**). These findings suggest that γ C
45
46 expressed on renal cells plays a protective role during anti-GBM-GN.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Despite the absence of lymphocytes, IL-15 appears as the main effective ligand of γ C in the**
4 **renal cortex during glomerulonephritis**
5
6

7
8 We next analyzed relative expression levels of cytokines (*e.g.* IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, and
9 IL-21) acting through receptor complexes containing the common γ C subunit in the renal cortex
10 of WT, *Rag2*^{-/-} or *Rag2*^{-/-} *γ c*^{-/-} mice (**Figure 4A**) after anti-GBM-GN. In all cases, IL-21 and IL-4
11 mRNA were undetectable. The level of IL-2 mRNA remained very low in all mouse strains
12 (**Figure 4A**). IL-7 and IL-9 mRNA were detectable in the renal cortex, but no difference was
13 observed between WT, *Rag2*^{-/-}, or *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice. Interestingly, IL-15 mRNA was found to
14 be highly expressed in the renal cortex after anti-GBM-GN in the absence of T/B lymphocytes
15 (*Rag2*^{-/-} mice) or even in the absence of T/B/NK cells in *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} animals (**Figure 4A**).
16 Thus, and as described by others,²³ IL-15 is abundantly produced by intrinsic renal cells, which
17 we confirmed by immunohistochemistry of the renal cortex (**Figure 4B**). To explore the role of
18 IL-15, we challenged *Rag2*^{-/-}*Il15*^{-/-} and *Rag2*^{-/-} littermates with anti-GBM serum: BUN and
19 proteinuria were found to be higher in *Rag2*^{-/-}*Il15*^{-/-} mice compared to *Rag2*^{-/-} mice
20 (**Supplemental Figures 2 A, B, C**). Next, we induced an anti-GBM-GN in *Rag2*^{-/-}*Il2rb*^{-/-} mice
21 lacking the γ C co-receptor IL-2R β . Again, *Rag2*^{-/-}*Il2rb*^{-/-} mice were found to be highly sensitive
22 to anti-GBM serum when compared to *Rag2*^{-/-} mice. Both strains developed acute renal failure,
23 yet BUN levels (**Figure 4C**), tubulo-interstitial lesions (**Figures 4E/G**) and proteinuria (**Figure**
24 **4F**) were significantly greater in *Rag2*^{-/-}*Il2rb*^{-/-} than in *Rag2*^{-/-} mice (**Figure 4D**). Taken together,
25 these results suggest that in the absence of lymphocytes, IL-15 and its co-receptors γ C and IL-
26 2R β have a protective role during anti-GBM-GN.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

IL-15R α , γ C and IL-2R β receptor subunits are expressed in renal cells during anti-GBM-GN

Immunohistochemical studies evidenced noticeable intra-renal expression of γ C and its co-receptor complexes, IL-2R β and IL-15R α . Interestingly, γ C and IL-15 co-receptors IL-15R α and IL-2R β were not expressed at the basal state in glomeruli. Nevertheless, they are induced during anti-GBM-GN (**Figures 5A to C**). Co-localization studies in *Rag2*^{-/-} mice showed that γ C is mainly induced in podocytes during anti-GBM-GN (**Figure 5D**). These findings indicate that γ C, IL-2R β and IL-15R α are expressed in renal epithelium and in particular by injured glomeruli during anti-GBM-GN. These were not kidney-specific *Il2rg* (γ C) or *Il2rb* splice variants: RNA-Seq analysis revealed that all “classical” transcripts and exons of γ C, originally described in lymphocytes, are expressed in the kidneys of *Rag2*^{-/-} mice (**Supplemental Figures 3 A, B, C**).

Renal epithelial IL-15 signaling is impaired in the absence of γ C or IL-2R β

In vitro experiments were carried out on primary cultured podocytes in which γ C has been demonstrated to be highly expressed. Mice primary podocytes from the *Rag2*^{-/-}*Il2rb*^{-/-}, *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} or WT kidney cortex were cultivated and stimulated by IL-15. To confirm the functionality of IL-15 receptors we studied downstream effectors classically known in lymphocytes: phosphorylated JAK 1/3 and spleen tyrosine kinase (SYK). As described in immune cells, IL-15 induced JAK1/3 and SYK phosphorylation in primary cultured podocytes (**Figures 6A to 6D**). However, despite the absence of γ C, JAK1/3 was still induced in primary podocytes from *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice (**Figures 6A to 6C**), while SYK phosphorylation dramatically decreased (**Figures 6A and 6D**). There was no JAK and SYK phosphorylation in the absence of

1
2
3 IL-2R β (**Figures 6A to 6D**). Thus, IL-15 signaling on primary podocytes appears to be more
4
5 dependent on IL-2R β than on γ C.
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review Only

Discussion

Previous studies have described the role of immune cells during the development of renal injury in the passive experimental model of anti-GBM-GN.^{4,13,17,24,25} To date, many studies support a central role for T lymphocytes in the generation of renal lesions.^{4,26} Because renal lesions are observed despite the absence of B and T lymphocytes in mice, we propose that intrinsic renal cells play a central role in the development of anti-GBM-GN.²⁷⁻³⁰ Our findings are also in agreement with those of earlier studies that evaluated passive anti-GBM-GN lesions in nude animals.^{19,20} Similar observations regarding glomerular injury in the absence of T cells were also made in *Rag1*^{-/-} mice in another experimental model (Alport's Syndrome) in which inflammatory cells are believed to contribute to renal lesions. In this latter study, T cells were not required for the emergence of glomerular injury, but may have contributed to the development of tubular lesions.³¹ In our study we find similar results in the passive anti-GBM-GN model, as tubulo-interstitial lesions appear less severe in *Rag2*^{-/-} mice compared to those observed in WT mice.

When re-examining the role of T lymphocytes during the generation of anti-GBM-GN lesions it appears that several points could in fact reconcile our findings with previous studies.

First, active and passive experimental anti-GBM-GN models are often unintentionally scrambled. The passive form, used in our study, results from the injection of a heterologous anti-GBM serum, whereas the active model is the result of the "active" immunization of the host against glomerular extracts or specific GBM epitopes breaking self-tolerance.³²⁻³⁴ The active model is largely dependent on cell-mediated immunity (CMI) whilst our work demonstrates that the passive model is not dependent in this way. Second, the very first studies demonstrating the role of CMI during passive anti-GBM-GN were made using either depleting antibodies, with

1
2
3 potential off-target effects, or an unstable genetic background.³⁵⁻³⁸ Third, some passive-anti-
4 GBM-GN phenotypes, acquired in mutant mice engineered with defective CMI effectors, could
5 be explained by a defect in renal cells *per se*.^{39,40} This defect would be evident only during the
6 disease state. Our work illustrates this point. Indeed, we demonstrate that γ C plays an important
7 role in epithelial cells only during glomerulonephritis.

8
9
10
11
12
13
14
15 Using double knockout animals (*Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}*) and bone marrow graft experiments, we
16 demonstrate that the expression of γ C in the kidney plays a major role in the development of
17 passive anti-GBM-GN. To our knowledge ours is the first study to show a role of a tissue-
18 expressed γ C chain. This result is obtained in the absence of lymphocytes. Several interleukin
19 receptor complexes (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, and IL-21) share the γ C subunit.²¹ As with γ C,
20 IL-2R β is also part of the co-receptor complex that signals only for IL-2 and IL-15.⁴¹ But IL-2 or
21 IL-15 signaling requires an additional α subunit leading to functional receptor complexes formed
22 with IL-2R α /IL-2R β / γ , or IL-15R α /IL-2R β / γ . To date, γ C or IL-2R β expressions have been
23 reported in primary cultured tubular epithelial cells or renal tumoral cells but not in glomerular
24 cells (*e.g.* endothelial, mesangial or even visceral epithelial cells).^{42,43}

25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Given either their absence or very low level of expression during anti-GBM-GN, we ruled
out any important role for IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 or IL-21. These results and the severity of the
anti-GBM-GN observed in *Rag2^{-/-}Il2rb^{-/-}* mice pointed to IL-15 in particular. We demonstrate
that IL-15 *per se* confers a powerful protective effect against anti-GBM-GN in the absence of
lymphocytes. These results are partially in line with the original study by Shinozaki *et al.*²³ Using
Il15^{-/-} mice in the same model, this study demonstrated that IL-15 produces an important anti-
apoptotic effect in epithelial cells. However, as opposed to the hypothesis of Shinozaki *et al.*, our
study highlights that the IL-15 epithelial protective effect appears marginally T cell driven.

1
2
3 Our *in vitro* data suggest that podocytes use the classical IL-15/JAK/SYK signaling
4 pathways described in immune cells.^{21,42-45} Impaired JAK/SYK activation on epithelial cells
5 could therefore explain the severe renal lesions in mice lacking γ C or IL-2R β compared to their
6 WT counterparts. Some publications suggest a role for SYK during glomerulonephritis.^{46,47}
7
8 Despite the absence of γ C, IL-15 unexpectedly induces JAK phosphorylation. We hypothesize
9 that IL-2R β dimerization could occur in the absence of γ C but yet still lead to JAKs
10 phosphorylation and thus permit beneficial IL-15 downstream events.
11
12

13
14
15
16
17
18
19
20 These findings contribute to our understanding of epithelial-specific IL-15 signaling and
21 suggest that γ C and IL-2R β may modulate different downstream survival events. IL-2R β /JAK
22 interactions have been studied mainly *in vitro* as part of the IL-2 response rather than that of IL-
23 15.⁴⁸ Similar to the observed effects in anti-GBM-GN-induced renal lesions, IL-2/IL-15 receptors
24 have been reported to be a key anti-apoptotic factor in both immune and epithelial mammary
25 cells.⁴⁹ Altogether, the intra-renal expression of IL-15 signaling may represent a key functional
26 *modus operandi* that limits epithelial lesions associated with glomerulonephritis. These effects
27 may be related to STAT5 action or to other signaling proteins such as SYK which are involved in
28 the IL-15 response.^{50,51} Further studies are needed to determine more precisely the intra-renal role
29 of downstream IL-15 signaling effector events in the model of anti-GBM-GN.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43
44 In conclusion we demonstrated that significant renal lesions occur in the absence of T and
45 B or even NK cells during experimental passive anti-GBM-GN. We also showed that epithelial-
46 expressed immune receptors such as γ C and its IL-2R β co-receptor can largely modulate the
47 protective effect of IL-15, an interleukin which is highly expressed by the kidney epithelium.
48
49 Therefore, renal-expressed immune receptors such as γ C/IL-2R β *per se* might represent
50 unsuspected targets during glomerulonephritis.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Methods

Animals

C57BL/6J WT mice were obtained from the Charles Rivers Laboratory (L'Arbresle, France). C57BL/6J *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-}CD45.1 mice were kindly provided by S. Ezine and F.Vasseur (Inserm U1020, Paris, France). C57BL/6J *Rag2*^{-/-}CD45.2 mice and *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice were provided by J.C. Bories (Centre Hayem EA 3963, Paris, France). C57BL6J *Rag2*^{-/-}*Il2rb*^{-/-} mice and *Rag2*^{-/-}*Il15*^{-/-} mice were provided by J. Di Santo (Institut Pasteur, Paris, France). Description of the immunological phenotypic of these different mice strains has been previously described.^{52,53} Mice submitted to sanitary control tests to ensure proper pathogen-free status were housed in the same animal facility before any experiments. All mice were backcrossed at least 12 times into a C57BL/6J background to ensure a similar genetic background.

Experimental anti-GBM glomerulonephritis

Passive experimental anti-GBM-GN was induced using de complemented sheep anti-rat GBM serum prepared as previously described.¹⁸ Passive non-accelerated anti-GBM-GN was induced by daily intravenous administration of 1.5 mg total protein/ g body weight for three consecutive days as previously described.³ Renal injury was evaluated on day 9 following the last injection of anti-GBM serum. As controls, mice were injected with phosphate buffered saline (PBS) or normal sheep serum. BUN, urinary protein and creatinine levels were measured using a Konelab enzymatic-spectrophotometric analyzer (Thermo Scientific).

NK cells isolation and transfer in *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice

NK cells were isolated from C57BL/6J WT mice spleen cell suspension using the NK Cell Isolation Kit, an LS Column, and a MidiMACS™ Separator according to the manufacturer's

1
2
3 instructions (Miltenyi Biotec). The NK cells were then injected intravenously (1.10^6 cells in 100
4 μ l in sterile PBS per mouse) to *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice.
5
6

7 **Bone marrow transplantation**

8
9 CD45.2⁺ WT C57BL/6J mice and *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice were X irradiated (700 rad/mouse) to
10 deplete bone marrow progenitors, and then reconstituted 24 h later by intravenous retro-orbital
11 injection of 10×10^6 bone marrow white cells obtained from flushed femurs and tibias derived
12 from donor CD45.1⁺ mice. Mice were then left for six weeks for bone marrow reconstitution.
13
14
15
16
17
18

19 **Histological and immunohistochemical studies**

20
21 Kidneys were fixed in formalin solution (4%), and embedded in paraffin. Sections (4- μ m thick)
22 were stained by Masson's trichrome to determine proportion of positive glomeruli which were
23 defined by crescent formation (defined as glomeruli exhibiting ≥ 2 layers of cells in Bowman's
24 space, with or without podocyte injury, as indicated by ballooning, necrosis, or cyst formation)
25 and/or fibrin deposition. The proportion of glomeruli affected was determined by a blinded
26 examination on at least 50 glomeruli per section. Tubular lesions were evaluated semi-
27 quantitatively as follows: 0, no tubular dilation; 1, dilation in 1–25% of the tubules analyzed; 2,
28 dilation in 26–50% of the tubules analyzed; 3, dilation in 51–75% of the tubules analyzed; 4,
29 dilation in >76% the tubules analyzed.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Immunohistochemical studies were performed on dewaxed kidney 4- μ m sections which were
44 incubated for 30 minutes at 95°C in the target retrieval solution (Dako), then in peroxidase
45 blocking reagent (Dako), blocked in PBS containing 5% BSA and immunostained against IL-15
46 (R&D Systems), IL-2R β (Cell Signaling) and IL-15R α (Novus Biologicals). Specific staining
47 was revealed using Histofine reagents, which contained anti-rabbit or anti-rat immune-peroxidase
48 polymer.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 For NK cell and IL-2R γ c stainings, 4- μ m kidney cryosections were blocked with 5% BSA-PBS
4
5 for 10 minutes at room temperature. Kidney sections were then incubated with anti-Ly49G2 (BD
6
7 Biosciences Pharmingen) or anti-IL-2R γ c (Biolegend) antibodies overnight. For Ly49G2 staining
8
9 kidney sections were then incubated sequentially with biotinylated secondary antibody, avidin-
10
11 biotin-peroxidase complex (ABC-Elite; Vector Laboratories), and 3,3'-diaminobenzidine (with
12
13 nickel chloride enhancement). For IL2R γ c specific staining was revealed using Histofine anti-rat
14
15 secondary antibody and AEC (Dako). Images were obtained with optical microscopy (Olympus,
16
17 Hamburg, Germany).

21 22 **Immunofluorescence assay and confocal microscopy**

23
24 Rabbit anti-IL2R γ c (Biolegend) and rabbit anti-nephrin (LifeSpan BioSciences Inc.) antibodies
25
26 were incubated overnight on frozen kidney slides after blocking with PBS containing 5% BSA.
27
28 Kidney sections were then incubated with anti-rat Alexa Fluor 488, or anti-rabbit Alexa Fluor
29
30 546 conjugated secondary antibodies (Invitrogen). The nuclei were stained using DAPI
31
32 (Invitrogen). Images were obtained with laser scanning confocal microscopy (TCS SP2 AOBS,
33
34 Leica, Wetzlar, Germany). Acquisition software used was Leica Confocal Software and images
35
36 (x630) were processed using Image J®.

37 38 **Flow cytometry**

39
40 Blood samples (50 μ l) from mice were incubated for 1 h at 4°C with anti-mouse CD45.1, CD45.2
41
42 or Ly49G2 primary antibodies or corresponding isotype controls (BD Biosciences Pharmingen).
43
44 After washing, cells were then incubated with alexa488-coupled anti-rat IgG (Invitrogen) for 30
45
46 min at 4°C. Red cells were then lysed and resuspended cells were analyzed using a FACScanto II
47
48 flow cytometer (BD Biosciences Pharmingen).
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Quantitative RT-PCR

RNA was extracted from whole kidneys using TRIzol solution (Life Technologies). Residual genomic DNA was removed by DNase I treatment (Fermentas). RNA samples (1 μ g) were reverse-transcribed using a Revert Aid H minus First Strand DNA Synthesis kit (Fermentas). *Beta-Glucuronidase (Gusb)* and *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Hprt1)* genes were used as endogenous reference housekeeping genes. The specific PCR primer sequences used are listed in **Supplemental Table 1**. Normalization of the quantitative PCR (qPCR) data PCR analysis obtained using a LightCycler 480 (Roche Diagnostics) was performed using the Roche LightCycler 2.0 software (Roche Diagnostics). Data were expressed as 2^{-DCp} , where Cp corresponds to the cycle threshold number.

In vitro assays in cultured podocytes

Freshly isolated renal cortex from *WT*, *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* or *Rag2^{-/-}Il2rb^{-/-}* mice were mixed and digested by collagenase I (1 mg/ml; Gibco) in RPMI 1640 (Gibco) for 2 minutes at 37°C. Next, collagenase I was inactivated with RPMI 1640 plus 10% FBS (Hyclone). Tissues were then passed through a 100- μ m cell strainer and a 40- μ m cell strainer (BD Falcon) in PBS (Euromedex) with 0.5% BSA (Euromedex). Glomeruli, adherent to the 40- μ m cell strainer, were removed from the cell strainer with PBS with 0.5% BSA injected under pressure, and finally washed twice in PBS. Freshly isolated glomeruli were plated in six-well dishes in RPMI 1640 with 10% FBS, 2% HEPES buffer (Gibco), and 1% penicillin/streptomycin (Gibco). Two days after seeding, glomeruli became adherent to the dish, and podocytes spread out from glomeruli.

Primary podocytes were cultured on RPMI 1640 with 1% FBS for 12 hours and then stimulated 7 days after seeding with mouse recombinant IL-15 (ref. PMP47, Bio-Rad AbD Serotec), at 50 ng/ml for 30 minutes and then mixed in RIPA buffer (Santa Cruz) with orthovanadate, PMSF, protease inhibitor cocktail (Santa Cruz) and NaF and frozen at -80°C for protein extraction.

Western blot analysis from cultured primary podocytes

After extraction from podocytes with lysis buffer, samples were fractionated by SDS-PAGE NuPAGE 4/12% gels (Invitrogen) under reducing conditions and then transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. Membranes were incubated with the appropriate primary antibodies: anti-phosphorylated JAK1 (Cell Signaling), JAK3 (Cell Signaling) or SYK (Novus Biologicals). Protein loading was monitored by using the rabbit anti-GAPDH antibody (Sigma). Secondary antibody was horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Amersham). Antigens were revealed with enhanced chemiluminescence (ECL)-plus (Amersham) on autoradiography films (Fuji). Relative quantification was made using Image J® software.

High throughput RNA-Sequencing, demonstration of absence of specific kidney splice variants

RNA samples from non-nephritic kidneys from *Rag2*^{-/-} (and *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} kidney cortex as a negative control) (n=2 per group) of high quality (RNA Integrity Number >6) were processed to create a mRNA library using TrueSeq reagents (Illumina). Clusters were created for Illumina RNA-Sequencing using a CBot system and sequencing was carried out on one lane of HiSeq2000 to produce paired-end reads (75 bases length, 29 to 35 millions of reads per sample). After demultiplexing, bar-coding removal, quality control and paired-end reads were processed from Fastq Sanger format to compact-reads format and then aligned with STAR (default parameters) to the mouse reference genome (mGC37/mm9) in order to seek putative kidney specific splice variants. Data alignment and analysis were performed using the GobyWeb interface and examined visually at the *Il2rg* locus in the Integrative Genomic Viewer (<http://www.broadinstitute.org/igv/>) respective of Ensembl Annotation (Ensembl version 55).

Statistics

Values are given as means \pm SEM. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism program. The Mann-Whitney test was used to compare two groups. Kruskal-Wallis test analyzed the distribution of three or more groups. A *p* value < 0.05 was considered significant.

Study approval

All mouse studies were submitted to, and approved by, the French Institutional Animal Care and Use Committee (Hôpital Tenon, AP-HP, Paris, France) and the Ethics Committee Charles Darwin (Paris, France) (ref n° 5 ECCD).

Disclosures

The authors have declared that no conflict of interest exists.

References

1. Couser WG. Rapidly progressive glomerulonephritis: classification, pathogenetic mechanisms, and therapy. *Am J Kidney Dis*. 1988;11:449–464.
2. Nahas AM El. Masugi nephritis: a model for all seasons. In: *Experimental and Genetic Rat Models of Chronic Renal Failure*. editor Karger, Basel; 1993. p. 49–67.
3. Salant DJ, Cybulsky AV. Experimental glomerulonephritis. *Methods Enzymol*. 1988;162:421–461.
4. Tipping PG, Holdsworth SR. T cells in crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:1253–1263.
5. Bohle A, Mackensen-Haen S, von Gise H, et al. The consequences of tubulo-interstitial changes for renal function in glomerulopathies. A morphometric and cytological analysis. *Pathol Res Pract*. 1990;186:135–144.
6. Kriz W, Elger M, Hosser H, et al. How does podocyte damage result in tubular damage? *Kidney Blood Press Res*. 1999;22:26–36.
7. Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int*. 2005;67:404–419.
8. Rodríguez-Iturbe B, García García G. The role of tubulointerstitial inflammation in the progression of chronic renal failure. *Nephron Clin Pract*. 2010;116:c81–88.
9. Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Johnson RJ, Rodríguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J. Glomerular hemodynamic changes associated with arteriolar lesions and tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int Suppl*. 2003;(86):S9–14.
10. Scholz J, Lukacs-Kornek V, Engel DR, et al. Renal dendritic cells stimulate IL-10 production and attenuate nephrotoxic nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:527–537.
11. Kitching AR, Holdsworth SR, Tipping PG. Crescentic glomerulonephritis--a manifestation of a nephritogenic Th1 response? *Histol Histopathol*. 2000;15:993–1003.
12. Kitching AR, Tipping PG, Timoshanko JR, Holdsworth SR. Endogenous interleukin-10 regulates Th1 responses that induce crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2000;57:518–525.
13. Kitching AR, Turner AL, Wilson GRA, et al. IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:2023–2033.
14. Tipping PG, Kitching AR. Glomerulonephritis, Th1 and Th2: what's new? *Clin Exp Immunol*. 2005;142:207–215.

15. Paust H-J, Turner J-E, Steinmetz OM, et al. The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:969–979.
16. Steinmetz OM, Summers SA, Gan P-Y, Semple T, Holdsworth SR, Kitching AR. The Th17-defining transcription factor ROR γ t promotes glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:472–483.
17. Turner J-E, Krebs C, Tittel AP, et al. IL-17A production by renal $\gamma\delta$ T cells promotes kidney injury in crescentic GN. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:1486–1495.
18. Mesnard L, Keller AC, Michel M-L, et al. Invariant natural killer T cells and TGF-beta attenuate anti-GBM glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:1282–1292.
19. Kusuyama Y, Nishihara T, Saito K. Nephrotoxic nephritis in nude mice. *Clin Exp Immunol*. 1981;46:20–26.
20. Sato T, Oite T, Nagase M, Shimizu F. Nephrotoxic serum nephritis in nude rats: the roles of host immune reactions. *Clin Exp Immunol*. 1991;84:139–144.
21. Ring AM, Lin J-X, Feng D, et al. Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15. *Nat Immunol*. 2012;13:1187–1195.
22. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*. 1992;68:855–867.
23. Shinozaki M. IL-15, a survival factor for kidney epithelial cells, counteracts apoptosis and inflammation during nephritis. *J Clin Invest*. 2002;109:951–960.
24. Holdsworth SR, Kitching AR, Tipping PG. Th1 and Th2 T helper cell subsets affect patterns of injury and outcomes in glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1999;55:1198–1216.
25. Kurts C, Heymann F, Lukacs-Kornek V, Boor P, Floege J. Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2007;29:317–335.
26. Tan DSY, Gan PY, O'Sullivan KM, et al. Thymic deletion and regulatory T cells prevent antimyeloperoxidase GN. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24:573–585.
27. Akagi Y, Isaka Y, Arai M, et al. Inhibition of TGF-beta 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1996;50:148–155.
28. Couser WG. Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:381–399.
29. Huang XR, Tipping PG, Apostolopoulos J, et al. Mechanisms of T cell-induced glomerular injury in anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis in rats. *Clin Exp Immunol*. 1997;109:134–142.

- 1
2
3 30. Le Hir M. Histopathology of humorally mediated anti-glomerular basement membrane
4 (GBM) glomerulonephritis in mice. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19:1875–1880.
5
6
7 31. Lebleu VS, Sugimoto H, Miller CA, Gattone VH, Kalluri R. Lymphocytes are
8 dispensable for glomerulonephritis but required for renal interstitial fibrosis in matrix
9 defect-induced Alport renal disease. *Lab Invest*. 2008;88:284–292.
10
11 32. Arends J, Wu J, Borillo J, et al. T cell epitope mimicry in antiglomerular basement
12 membrane disease. *J Immunol*. 2006;176:1252–1258.
13
14 33. Reynolds J. Strain differences and the genetic basis of experimental autoimmune anti-
15 glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Int J Exp Pathol*. 2011;92:211–217.
16
17 34. Steblay RW. Glomerulonephritis induced in sheep by injections of heterologous
18 glomerular basement membrane and Freund's complete adjuvant. *J Exp Med*.
19 1962;116:253–272.
20
21 35. Kitching AR, Tipping PG, Huang XR, Mutch DA, Holdsworth SR. Interleukin-4 and
22 interleukin-10 attenuate established crescentic glomerulonephritis in mice. *Kidney Int*.
23 1997;52:52–59.
24
25 36. Kitching AR, Tipping PG, Mutch DA, Huang XR, Holdsworth SR. Interleukin-4
26 deficiency enhances Th1 responses and crescentic glomerulonephritis in mice. *Kidney Int*.
27 1998;53:112–118.
28
29 37. Tipping PG, Huang XR, Qi M, Van GY, Tang WW. Crescentic glomerulonephritis in
30 CD4- and CD8-deficient mice. Requirement for CD4 but not CD8 cells. *Am J Pathol*.
31 1998;152:1541–1548.
32
33 38. Tipping PG, Neale TJ, Holdsworth SR. T lymphocyte participation in antibody-induced
34 experimental glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1985;27:530–537.
35
36 39. Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, et al. Induction of B7-1 in podocytes is associated
37 with nephrotic syndrome. *J Clin Invest*. 2004;113:1390–1397.
38
39 40. Timoshanko JR, Tipping PG. Resident kidney cells and their involvement in
40 glomerulonephritis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4:353–362.
41
42 41. Lin JX, Leonard WJ. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines.
43 *Oncogene*. 2000;19:2566–2576.
44
45 42. Giron-Michel J, Azzi S, Ferrini S, et al. Interleukin-15 is a major regulator of the cell-
46 microenvironment interactions in human renal homeostasis. *Cytokine Growth Factor Rev*.
47 2013;24:13–22.
48
49 43. Tejman-Yarden N, Zlotnik M, Lewis E, Etzion O, Chaimovitz C, Douvdevani A. Renal
50 cells express a functional interleukin-15 receptor. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20:516–
51 523.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 44. Alves NL, Arosa FA, van Lier RAW. Common gamma chain cytokines: dissidence in the
4 details. *Immunol Lett.* 2007;108:113–120.
5
6
7 45. Giron-Michel J, Azzi S, Khawam K, et al. Interleukin-15 plays a central role in human
8 kidney physiology and cancer through the γ c signaling pathway. *PLoS One.*
9 2012;7:e31624.
10
11 46. Smith J, McDaid JP, Bhangal G, et al. A spleen tyrosine kinase inhibitor reduces the
12 severity of established glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2009;21:231–236.
13
14 47. Ryan J, Ma FY, Han Y, et al. Myeloid cell-mediated renal injury in rapidly progressive
15 glomerulonephritis depends upon spleen tyrosine kinase. *J Pathol.* 2016;238:10–20.
16
17 48. Fujii H, Nakagawa Y, Schindler U, et al. Activation of Stat5 by interleukin 2 requires a
18 carboxyl-terminal region of the interleukin 2 receptor beta chain but is not essential for
19 the proliferative signal transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:5482–5486.
20
21 49. Hughes K, Watson CJ. The spectrum of STAT functions in mammary gland development.
22 *JAKSTAT.* 2012;1:151–158.
23
24 50. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease.
25 *Blood.* 2001;97:14–32.
26
27 51. Huntington ND, Legrand N, Alves NL, et al. IL-15 trans-presentation promotes human
28 NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med.* 2009;206:25–34.
29
30 52. DiSanto JP, Müller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in
31 mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad*
32 *Sci.* 1995;92:377–381.
33
34 53. Ranson T, Vosshenrich CAJ, Corcuff E, Richard O, Müller W, Di Santo JP. IL-15 is an
35 essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood.* 2003;101:4887–4893.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgments

This work was supported by Inserm and also in part by the Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie (Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06). Y.L. is a recipient of Fonds d'Etudes et de Recherche du Corps Médical (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris), Société Française de Bienfaisance et d'Enseignement de San Sebastian-Donostia, Espagne and Société de Néphrologie grants. D.C. is a recipient of a European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association (ERA - EDTA) grant and the support from Agence Nationale de la Recherche (ANR) of France. We thank Edith Bouget, Chloe Cakin and Miftah Madi for their technical assistance, Benedita Rocha and Sophie Ezine (Inserm U1020, Hôpital Necker, Paris, France) for providing *Rag2^{-/-}* CD45.1 and *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* CD45.1 mice. We thank Caroline Martin and Claude Kitou for providing animal housing. We thank Enguerran Mouly (Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital St. Louis, Paris, France) for his help during mice irradiation procedures. We thank the Imaging and Cytometry Facility of Tenon, UMR_S 1155 Inserm, Rare and common kidney diseases, matrix remodelling and tissue repair, F-75020, Paris, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, France. We also thank Dr. A Vandewalle (CRI, UMR 1149, Université Denis Diderot – Paris 7, Paris, France) for stimulating discussions.

Figure legends

Figure 1. Mice lacking lymphocytes develop typical lesions of glomerulonephritis following the administration of the anti-glomerular basement membrane (GBM) serum.

(A) Representative images of Masson trichrome stained sections of renal cortex from 8 to 10-week-old wild type (WT), *Rag2*^{-/-} and *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice 9 days after the injection of anti-GBM serum. Lower panels show magnification of glomerular crescentic lesions from upper panels. Scale bar: 50 μ m. (B) Renal function assessed by blood urea nitrogen (BUN) levels at day 9 after the injection of anti-GBM serum. (C & D) Percentage of positive glomeruli presenting crescents and/or fibrin deposition (C), and semi-quantitative score of tubular lesions (tubulo-interstitial score or TIS) (D), in untreated 8 to 10-week-old WT mice (n= 5, control [CTL]), and anti-GBM serum-treated 8 to 10-week-old WT mice (n=20), *Rag2*^{-/-} mice (n=15), and *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} (n=12). Data represent means \pm SEM. *p<0.05.

Figure 2. Natural killer (NK) cells are not sufficient to protect *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice from anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis (GBM-GN) induced by anti-GBM serum.

(A) Representative dot-plots (3 independent experiments) of NK cell population (in red) evidenced by an anti-Ly49G2 staining (right quadrants) in 10-week-old anti-GBM-GN *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice 7 days after i.v. administration of NK cells isolated from the spleens of wild type (WT) mice (lower right quadrant) or from *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice injected with vehicle alone (upper right quadrant). (B) Representative images of Ly49G2⁺ NK cells staining (arrows) by immunohistochemistry on kidney sections from *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice replenished with NK cells, 9 days after the injection of NK cells (right panel), compared to non-replenished *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice

1
2
3 (left panel). Scale bar: 100 μ m. (C) Relative levels of *Nkg2b* mRNA measured by quantitative
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(left panel). Scale bar: 100 μ m. (C) Relative levels of *Nkg2b* mRNA measured by quantitative polymerase chain reaction (PCR) in renal cortex from naïve (control [CTL]) and from anti-GBM-GN WT, *Rag2*^{-/-}, and *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice, which have been replenished (+) or not with NK cells. Data represents means \pm SEM from 3 separate kidneys in each condition tested. * $p < 0.05$ between groups. (D) Blood urea nitrogen (BUN) levels, (E) percentage of positive crescentic glomeruli, (F) semi-quantitative score of tubulo-interstitial lesions 9 days after injection of anti-GBM serum into 8–10-week-old *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice either replenished (+) or not with NK cells. Values are means \pm SEM from 6 mice in each condition tested. In D to F no significant differences were observed between groups.

Figure 3: Tissue common gamma chain (γ C) is required to maintain kidney function and renal tissue integrity after anti-glomerular basement membrane (GBM) serum injection.

Bone marrow (BM) cells from 10-week-old wild type (WT) or *Rag2*^{-/-} mice (WT BM or *Rag2*^{-/-} BM, respectively) were transferred into sub-lethally irradiated 10-week-old WT (WT BM => WT, *Rag2*^{-/-} BM => WT) or into *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice (WT BM => *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-}, *Rag2*^{-/-} BM => *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice). (A to C) Blood urea nitrogen (BUN) levels (A), percentage of crescentic glomeruli (C) and semi-quantitative score of tubulo-interstitial lesions (B) in chimeric mice (n=5 per group) 9 days after the administration of anti-GBM serum. Values are expressed as means \pm SEM (n=5 per group) and * $p < 0.05$. (D) Representative images of Masson trichrome stained sections of renal cortex from 16-week-old WT or *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice grafted with WT BM, 9 days after the last injection of anti-GBM serum. Scale bar: 50 μ m.

Figure 4: IL-15 is highly expressed in kidney cortex in a lymphocyte-free environment and its IL-2R β co-receptor deficiency aggravates anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis (GBM-GN).

(A) Reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of common gamma chain (γ C) ligands (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21) mRNA expression in renal cortex homogenates from wild type (WT), *Rag2*^{-/-}, and *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice analyzed 9 days after anti-GBM serum injection (means \pm SEM of 5 mice per group of two independent experiments). (B) Representative image of the expression of IL-15 by immunohistochemistry in *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice analyzed 9 days after anti-GBM serum injection. Scale bar: 50 μ m. Blood urea nitrogen (BUN) levels in (C), positive glomeruli (D) and semi-quantitative score of tubulo-interstitial lesions (E) in 10–12-week-old *Rag2*^{-/-} mice and *Rag2*^{-/-}*Il2rb*^{-/-} mice, 9 days after the injection of anti-GBM serum. Proteinuria/creatinuria ratios are also expressed in (F). Values are means \pm SEM of 5 10–12-week-old mice per group. (G) Representative illustrations of Masson trichrome stained sections of renal cortex from 10–12- week-old anti-GBM-GN-induced *Rag2*^{-/-} and *Rag2*^{-/-}*Il2rb*^{-/-} mice. Scale bar: 50 μ m.

Figure 5: Expression of IL-15R subunits in the mouse kidney during glomerulonephritis.

Representative images of the expression of IL-15R α (A), IL-2R β (B) or common gamma chain (γ C) (C) by immunohistochemistry in 12-week-old *Rag2*^{-/-} or *Rag2*^{-/-}-glomerular basement membrane (GBM) mice at day 9. Images are representative of at least 5 mice. Scale bar: 50 μ m. IL-15R α has been expressed in some in the tubules during normal conditions, but was largely induced in glomeruli following anti-GBM serum injection. IL-2R β expression was not detected under normal conditions but was observed at day 9 of glomerulonephritis, mainly in glomeruli.

1
2
3 The γ C chain expression has been found in glomeruli after anti-glomerular basement membrane
4 glomerulonephritis (GBM-GN). **(D)** Immunofluorescent staining of nephrin (in red) and γ C chain
5 (in green) on kidney sections from *Rag2^{-/-}* or *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice at day 9 of the anti-GBM-GN.
6 DAPI was used to stain nuclei. The γ C has been found expressed mainly by podocytes. *Rag2^{-/-}*
7 *Il2rg^{-/-}* mice are positive for nephrin (red) but negative for γ C. Representative images from
8 confocal microscopy observations. Scale bar: 50 μ m
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19 **Figure 6: Absence of IL2R γ c or IL2RB impairs IL-15 signaling in primary cultured**
20 **podocytes.**
21
22
23

24
25 **(A)** Western blot analysis of phosphorylated JAK1/3 and spleen tyrosine kinase (SYK) proteins
26 from primary cultured podocytes extracted from kidney of 12-week-old wild type (WT), *Rag2^{-/-}*
27 *Il2rg^{-/-}*, *Rag2^{-/-}Il2rb^{-/-}* mice. GAPDH was chosen as loading control. **(B, C and D)** Ratio of
28 phosphorylated JAK1/3 and SYK on GAPDH is reported with respect to basal conditions using
29 densitometric values from at least 5 mice from each group tested. Values are means \pm SEM* p<
30 0.05 between groups.
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40
41 **Supplemental Figure 1: Bone marrow graft efficiency evaluation by determination of the**
42 **CD45.1/(CD45.2+CD45.1) ratio and natural killer (NK) cells counts after bone marrow**
43 **graft.**
44
45

46
47 Bone marrow (BM) cells from wild type (WT) or *Rag2^{-/-}* mice (WT BM or *Rag2^{-/-}* BM,
48 respectively) were transferred into either sub-lethally irradiated WT (WT BM => WT, *Rag2^{-/-}*
49 BM => WT) or *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice (WT BM => *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}*, *Rag2^{-/-}* BM => *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}*
50 mice). **(A)** Quantification by flow cytometry of the percentage of circulating CD45.1⁺ cells from
51 the donors over the total CD45⁺ cells and **(B)** percentage of circulating NK cells over the total
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 CD45+ cells in blood from chimeric mice was done at day 9 of the anti-glomerular basement
4
5 membrane glomerulonephritis (GBM-GN). Values are means \pm SEM (n=5 per group).
6
7

8
9 **Supplemental Figure 2: IL-15 plays a protective role against anti-glomerular basement**
10 **membrane (GBM) serum in a lymphocyte-free environment.**
11

12
13
14
15 (A) Blood urea nitrogen (BUN) levels at day 9 and (B) protein urinary excretion rate at day 0,
16
17 day 4 and day 9 of the anti- glomerular basement membrane glomerulonephritis (GBM-GN) in
18
19 10 to 12-week-old *Rag2^{-/-}* and *Rag2^{-/-}Il15^{-/-}* mice. Results are expressed as means \pm SEM (5 mice
20
21 per group). (C and D) Representative illustrations of anti-GBM lesions evidenced by Masson's
22
23 trichrome staining in *Rag2^{-/-}* and *Rag2^{-/-}Il15^{-/-}* mice. Scale bar: 50 μ m.
24
25
26

27
28 **Supplemental Figure 3: Annotated Integrative Genomic viewer (IGV) screenshot focused**
29 **on the IL2rg locus following RNA-Seq analysis from mouse kidney cortex.**
30

31
32 (A) *Il2rg* transcripts according to the Ensembl database (v55) at the *Il2rg* gene locus
33
34 (GRCm37/mm9). (B and C) Paired-end reads of naïve *Rag2^{-/-}* (B) and *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* (C) mouse
35
36 kidneys. All "classical" *Il2rg* exons were represented in the kidney of a *Rag2^{-/-}* mouse, while
37
38 exons 2 to 7 were absent in the *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mouse kidney. Despite numerous transcript variants
39
40 described in the Ensembl database for *Il2rg* (represented in blue or red in A), exons belonging to
41
42 *Il2rg* were not shared by other proxy genes, such as Gm20489-001 (red on the left in A),
43
44 excluding any kidney-specific variants with an *Il2rg* similarity. Other processed transcripts, such
45
46 as *Il2rg*-002 or 003 (blue in A), which do not have a computationally predicted protein coding
47
48 expression, were not expressed. Conversely, classical transcripts (in red in A, on the right) were
49
50 expressed at the protein coding level in the kidney of a naïve *Rag2^{-/-}* mouse.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Supplemental Table 1. Polymerase chain reaction (PCR) primer sequences used for**
4 **quantitative PCR.**
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review Only

Figure 1: Luque et al.

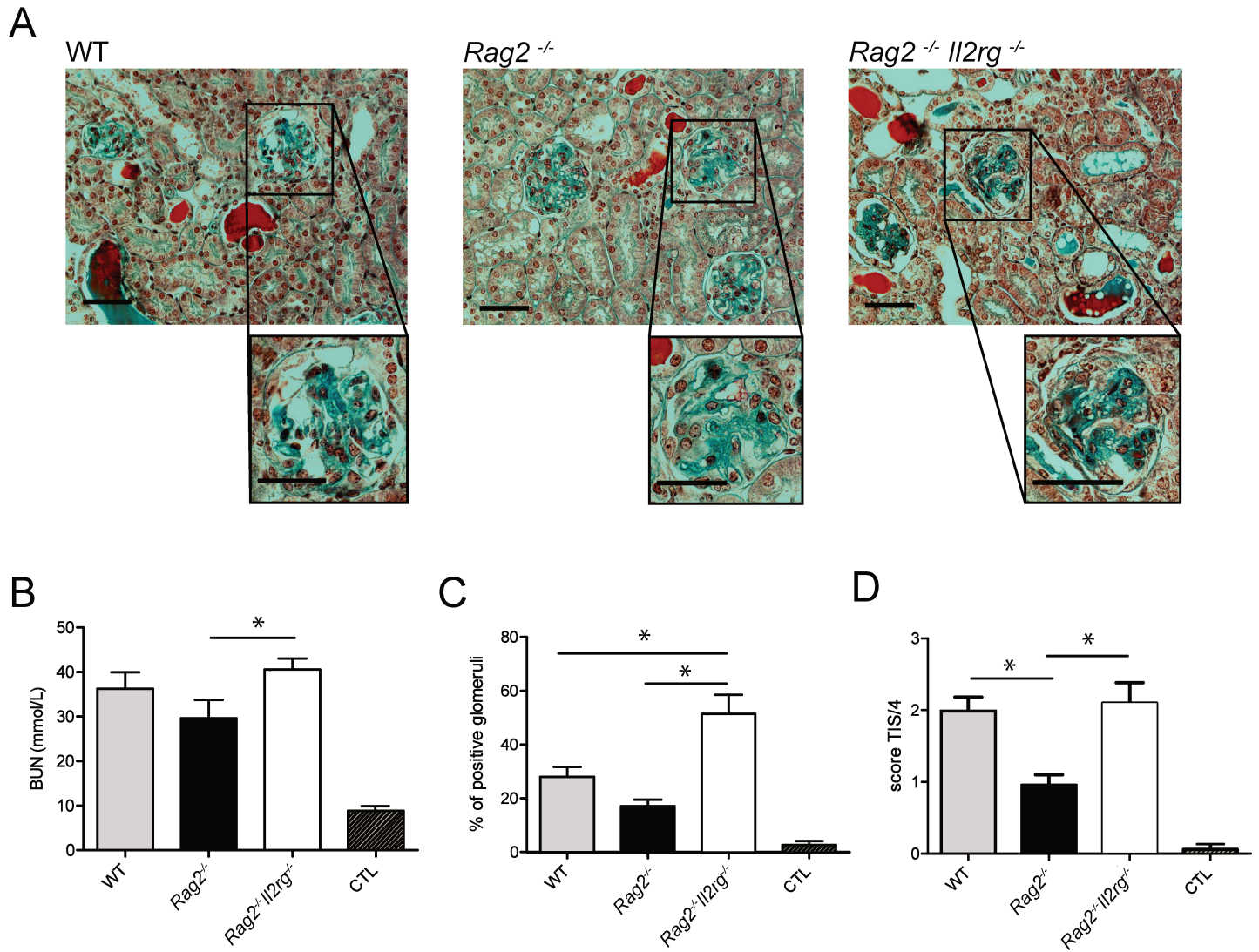
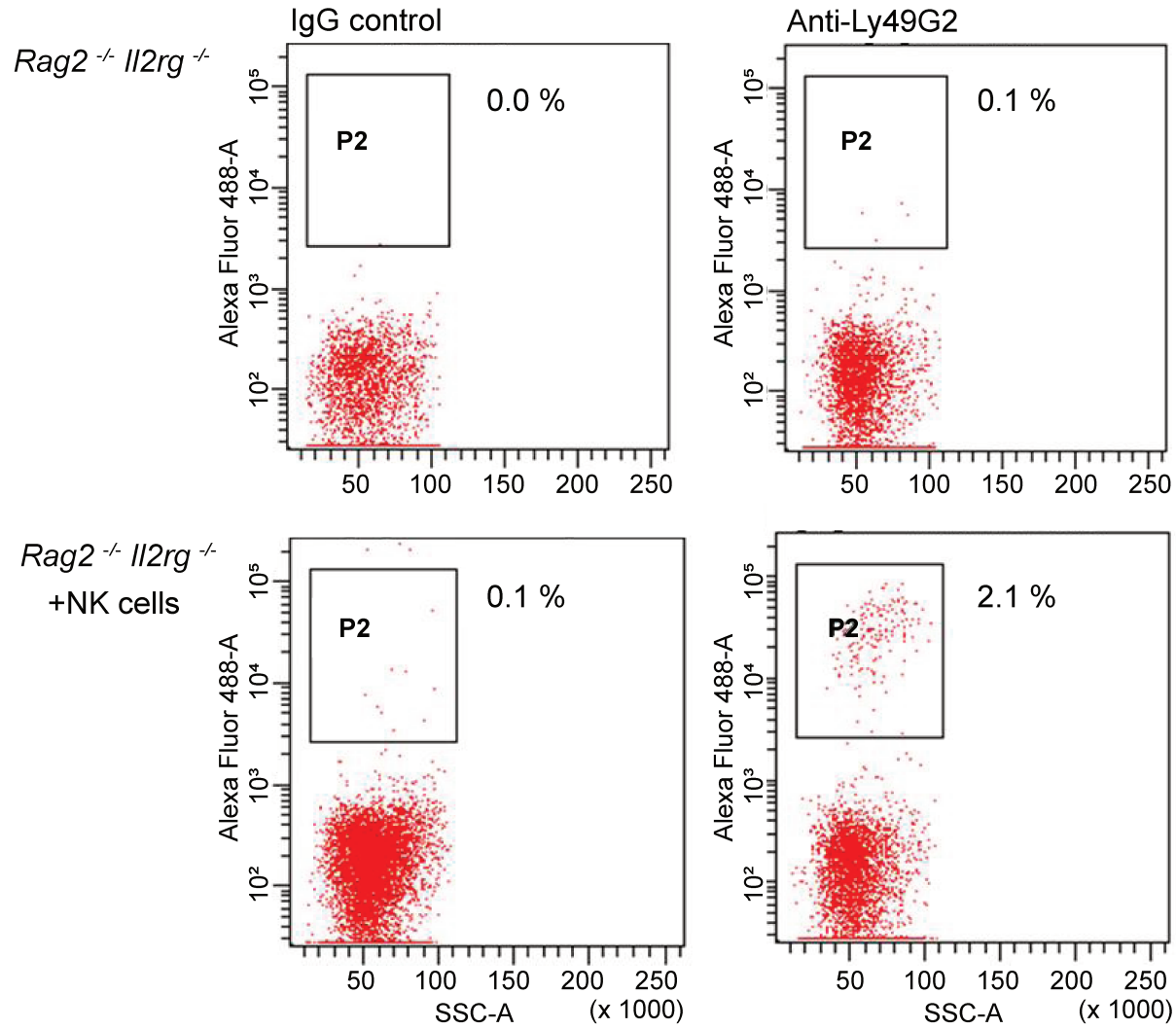
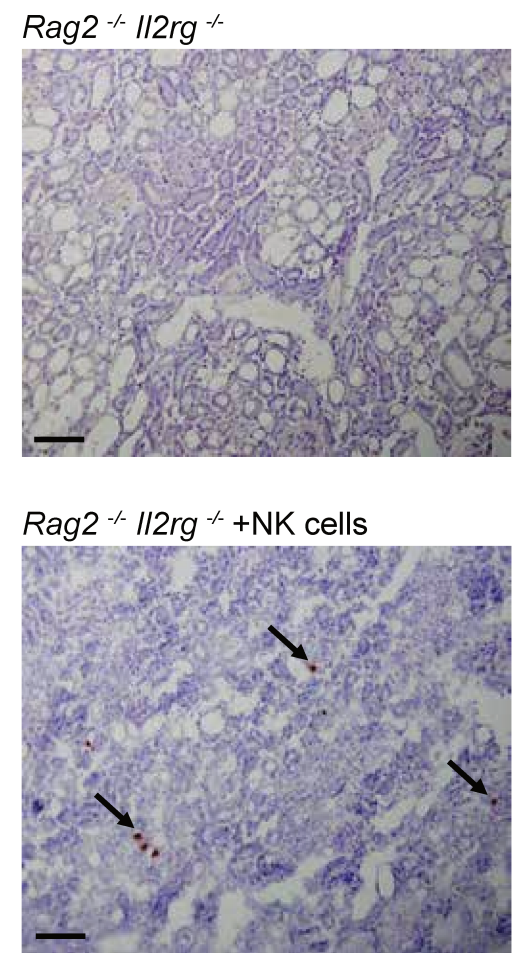


Figure 2 : Luque et al.

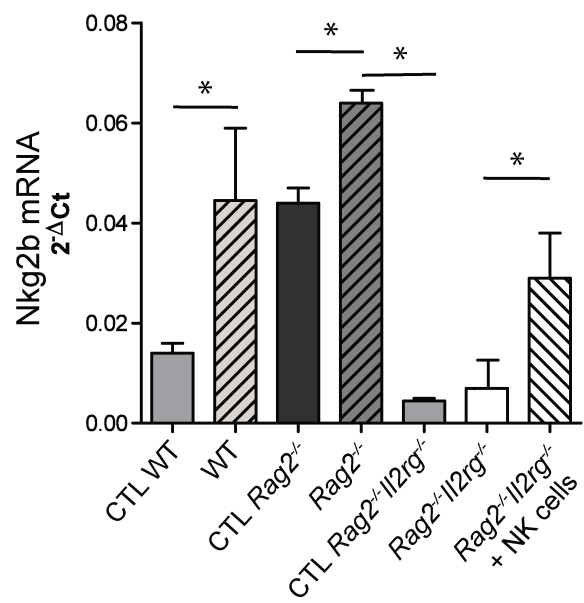
A



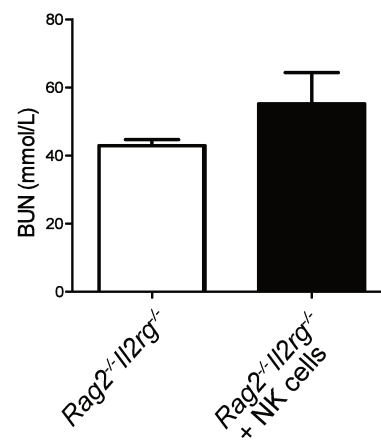
B



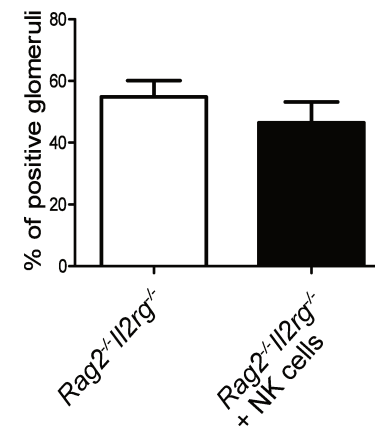
C



D



E



F

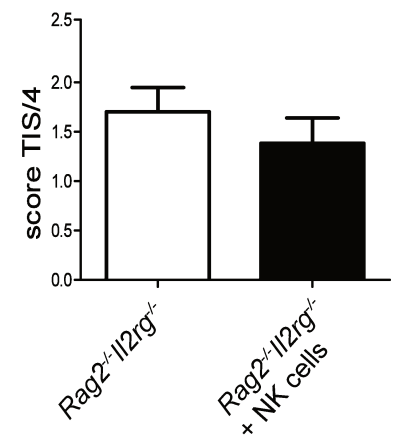


Figure 3: Luque et al.

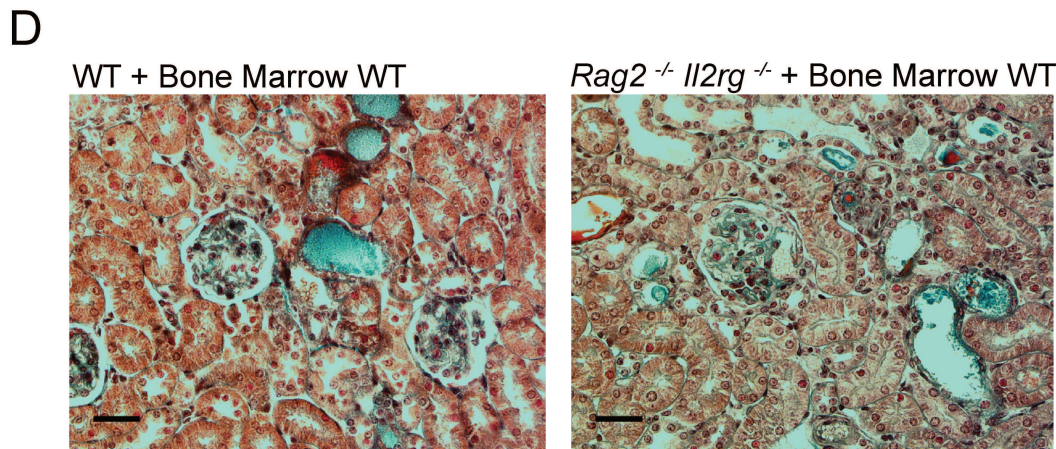
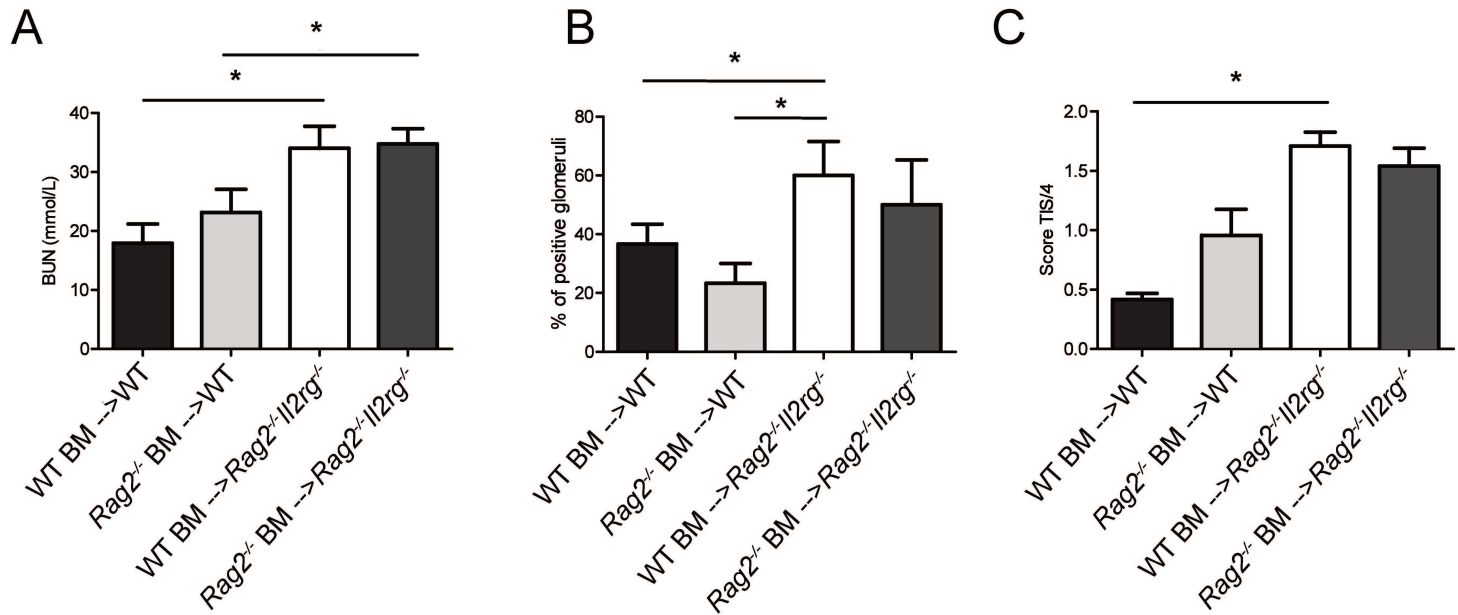


Figure 4: Luque et al.

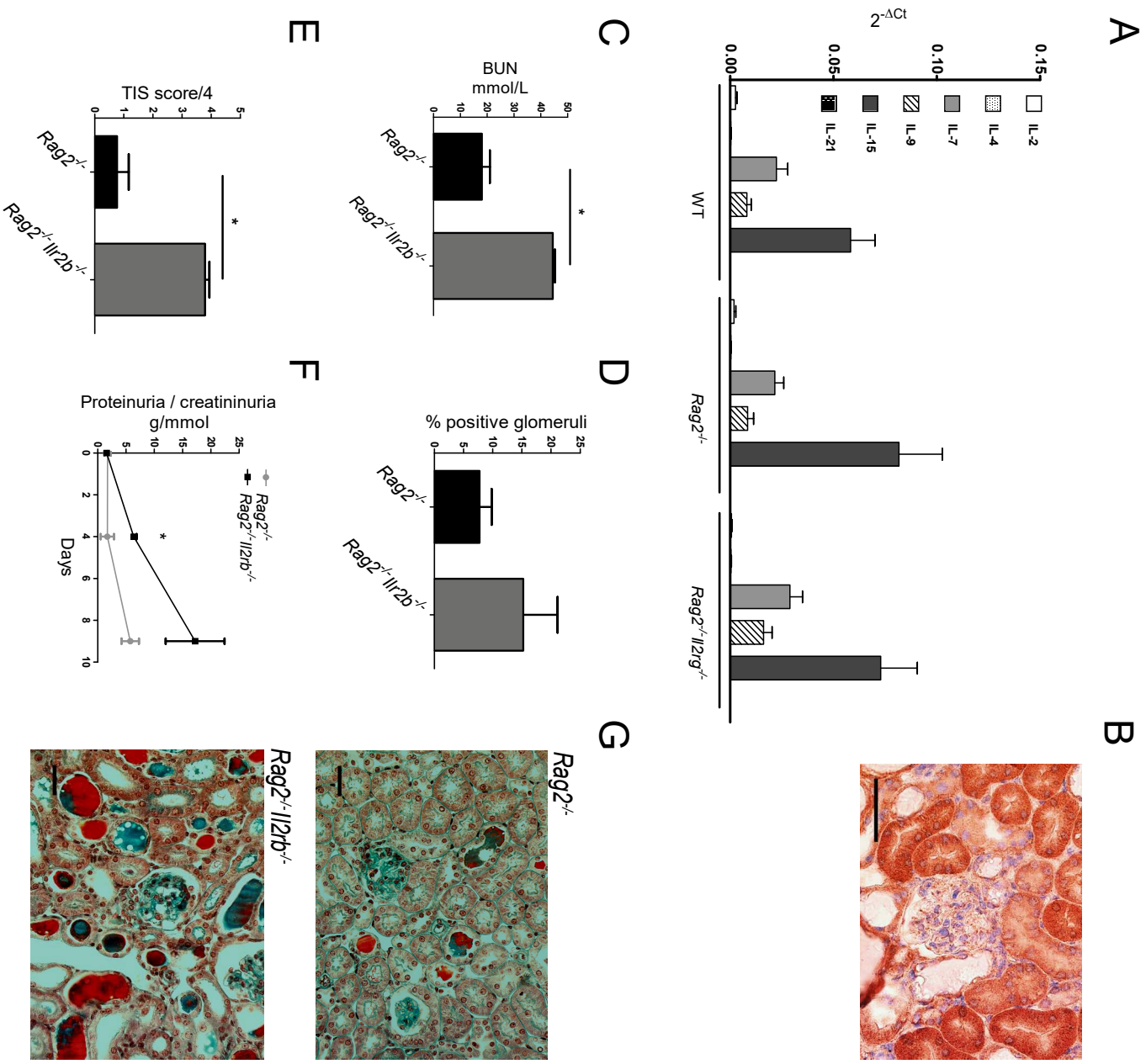
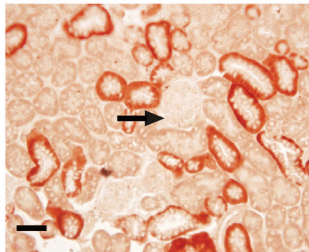


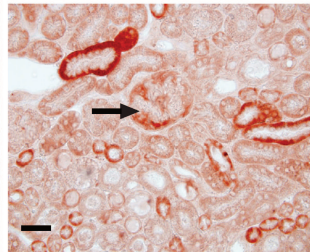
Figure 5: Luque et al.

A

IL-15Ra CTL

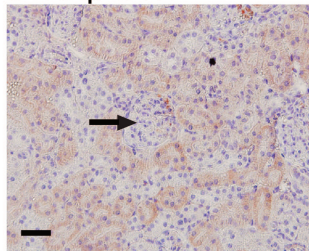


IL-15Ra anti-GBM

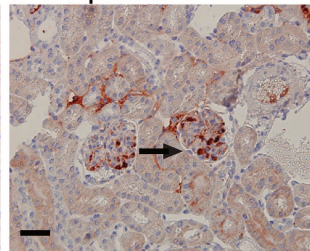


B

IL-2R β CTL

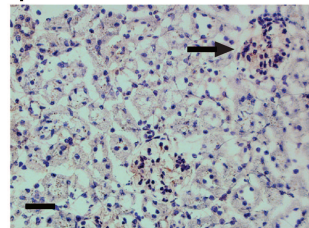


IL-2R β anti-GBM

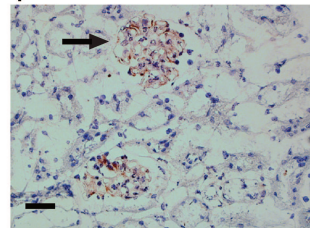


C

γ C Chain CTL



γ C Chain anti-GBM



D

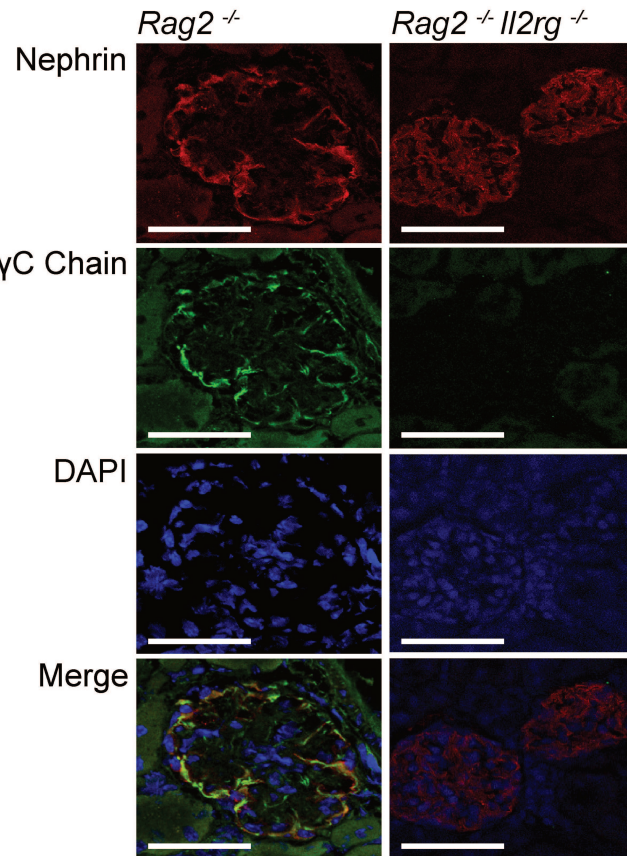
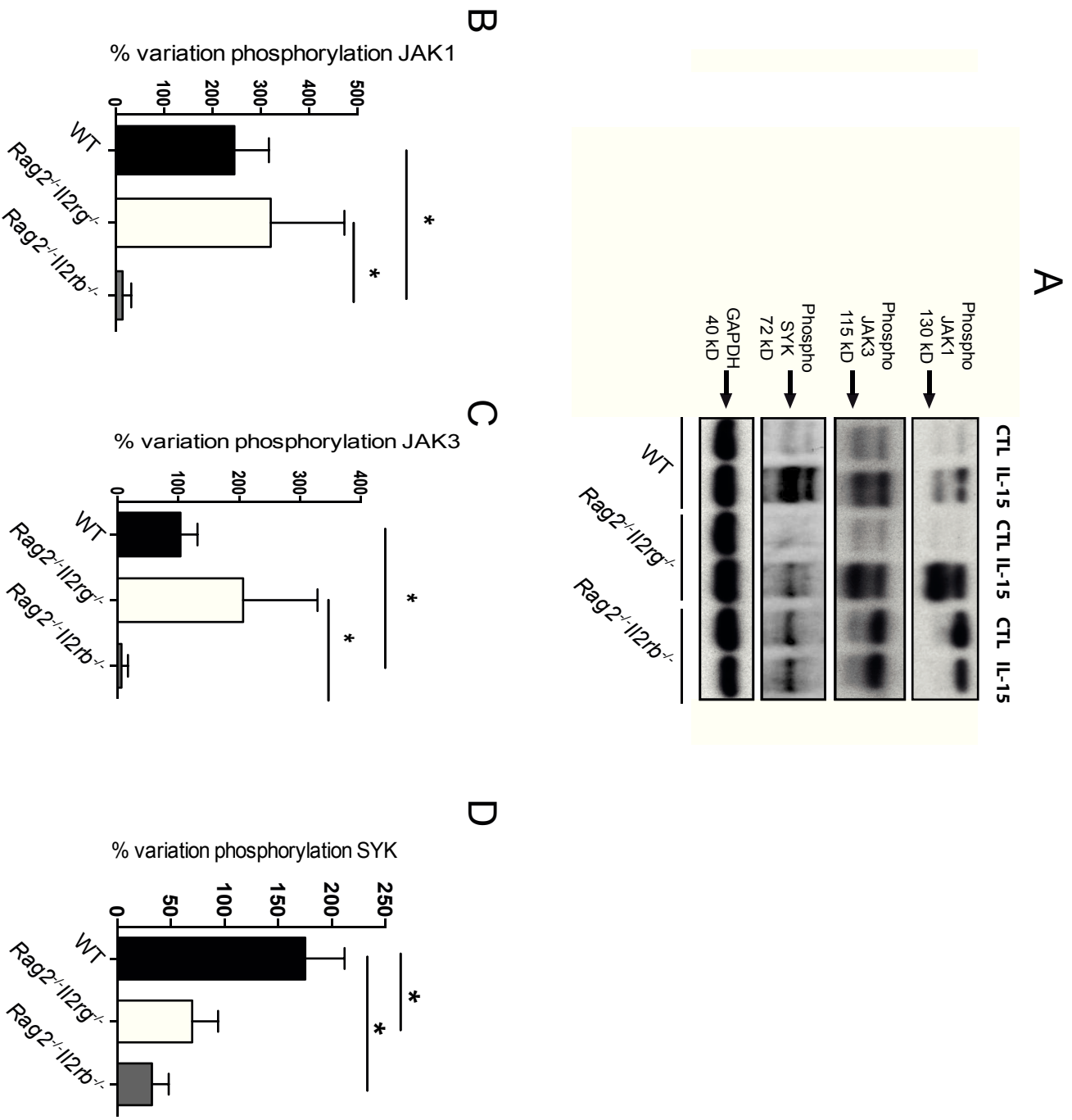


Figure 6: Luque et al.

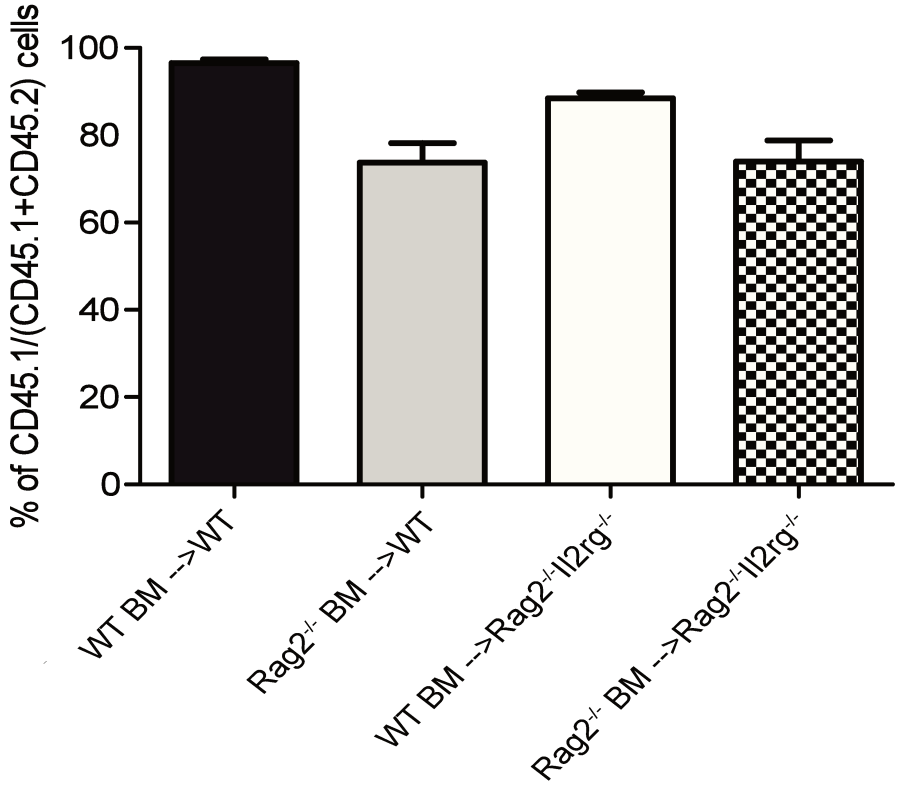


Supplemental Table 1: Luque et al.

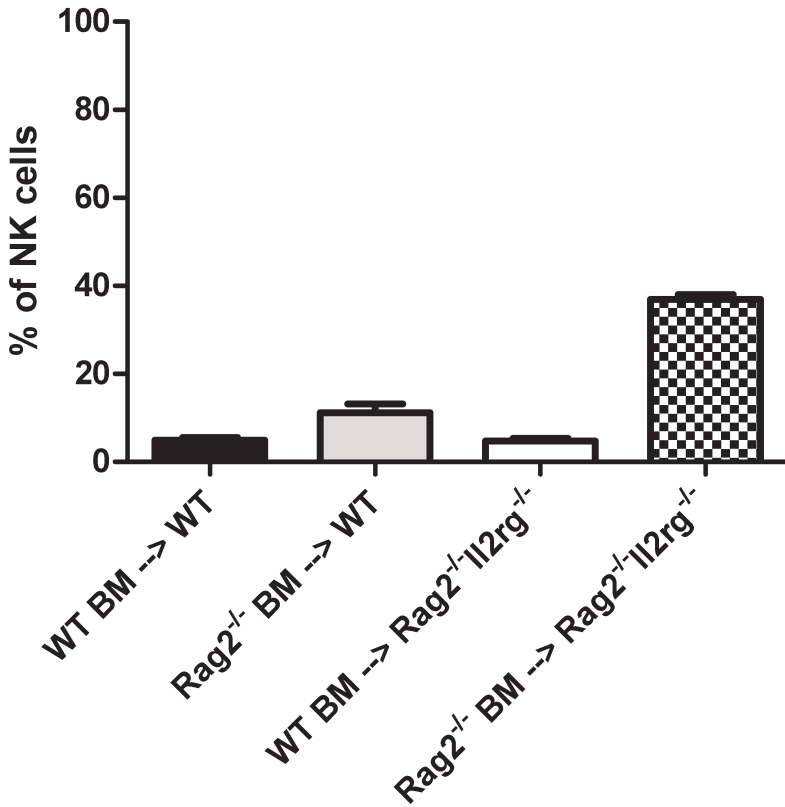
Transcript Name	Primer pairs
IL-2	5'-GCTGTTGATGGACCTACAGGA-3'
	5'-TTCAATTCTGTGGCCTGCTT-3'
IL-4	5'-CCTGCTCTTCTTTCTCGAATGT-3'
	5'-CACATCCATCTCCGTGCAT-3'
IL-7	5'-CGCAGACCATGTTCCATGT-3'
	5'-TCTTTAATGTGGCACTCAGATGAT-3'
IL-9	5'-GCCTCTGTTTTGCTCTTCAGTT-3'
	5'-GCATTTTGACGGTGGATCA-3'
IL-15	5'-CAGCTCAGAGAGGTCAGGAAA-3'
	5'-CATGAAGAGGCAGTGCTTTG-3'
IL-21	5'-GACATTCATCATTGACCTCGTG-3'
	5'-TCACAGGAAGGGCATTTAGC-3'
nkg2d	5'-CTCCTGGCAGTGGGAAGAT-3'
	5'-AAGCTTGAGCCATAGACAGCA- 3'
Gusb	5'-CTCTGGTGGCCTTACCTGAT-3
	5'-CAGTTGTTGTCACCTTCACCTC-3'

Supplemental figure 1: Luque et al.

A

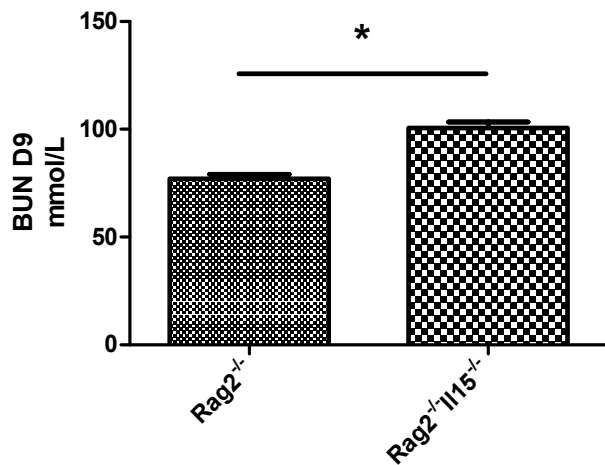


B



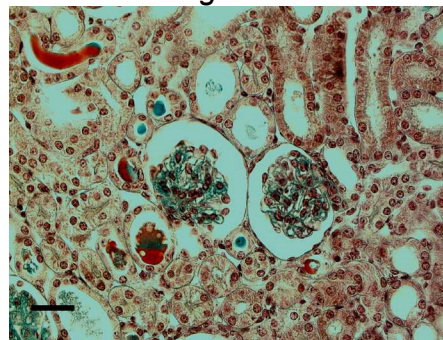
Supplemental figure 2: Luque et al.

A

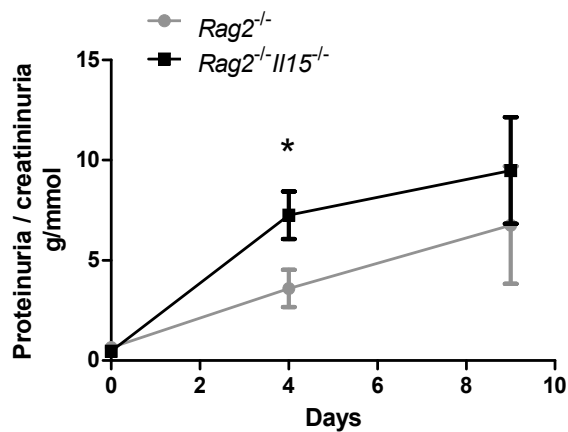


C

Anti-GBM- $Rag2^{-/-}$

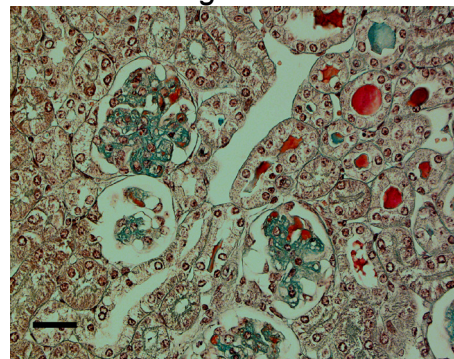


B



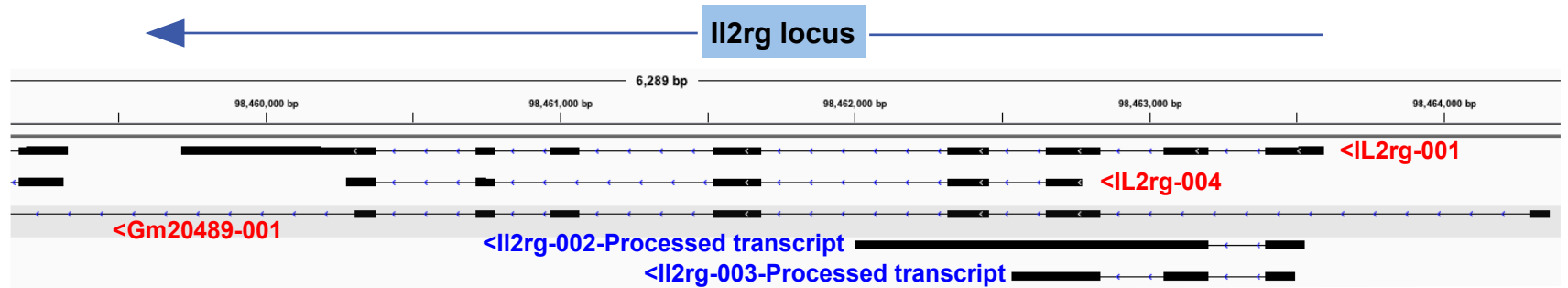
D

Anti-GBM- $Rag2^{-/-} Il15^{-/-}$

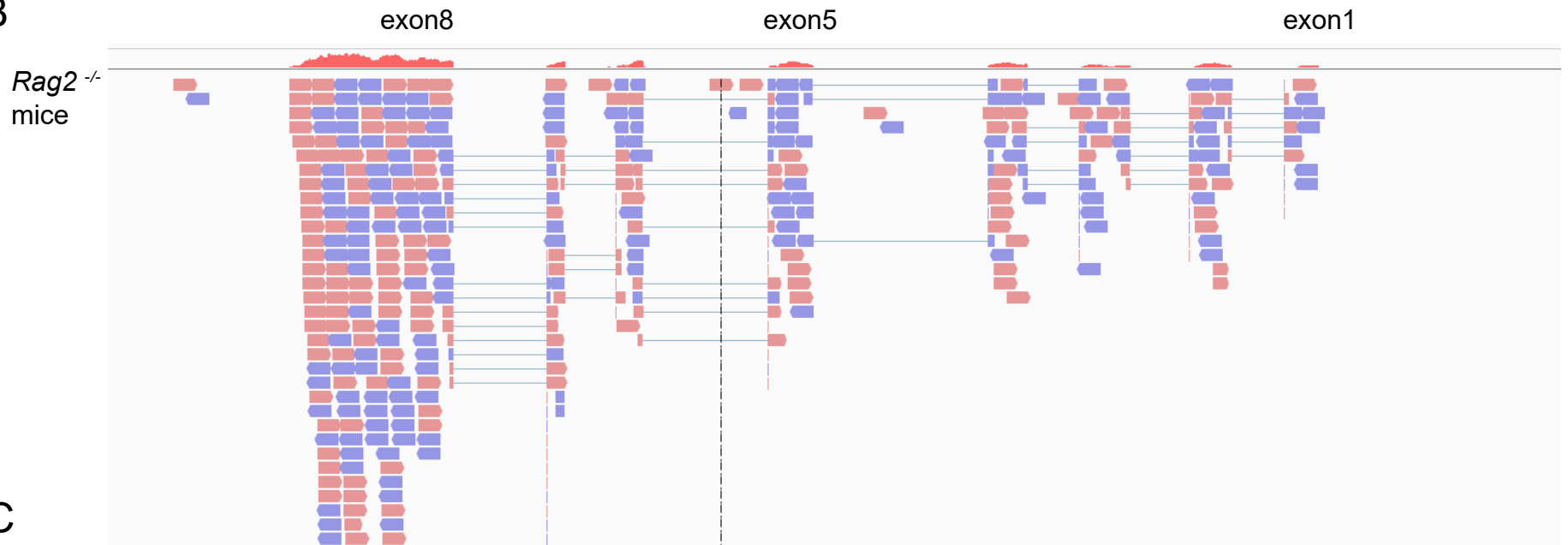


Supplemental figure 3: Luque et al.

A



B



C



PARTIE 2:

ROLE PROTECTEUR DE STAT5 PODOCYTAIRE DANS UN MODELE EXPERIMENTAL DE
GLOMERULONEPHRITE INFLAMMATOIRE ET DE GLOMERULOPATHIE TOXIQUE

Article 2: Manuscrit en préparation

ROLE PROTECTEUR DE STAT5 PODOCYTAIRE DANS UN MODELE EXPERIMENTAL DE GLOMERULONEPHRITE INFLAMMATOIRE ET DE GLOMERULOPATHIE TOXIQUE

INTRODUCTION

Lors de travaux préliminaires nous avons montré chez la souris que les facteurs de transcription STAT5A/B sont très exprimés par le rein, en particulier par le podocyte, en conditions physiologiques. STAT5B est aussi activé par phosphorylation suivant une agression glomérulaire induite par l'injection d'anticorps anti-membrane basale glomérulaire (MBG). STAT5A/B est classiquement décrit dans les cellules immunitaires où il y joue un rôle régulateur, mais il est aussi exprimé dans d'autres types cellulaires comme l'épithélium mammaire où il est activé par la prolactine³⁸⁵. Il existe deux formes de STAT5 chez l'homme et la souris : *STAT5A* et *STAT5B*. Ils sont codés au même locus par deux gènes différents portés par le chromosome 17. L'homologie de ces deux protéines se rapproche de 90%, seuls quelques acides aminés les différencient dans leur site de liaison à l'ADN. L'activation de *STAT5A/B*, principalement étudiée dans les lymphocytes, est médiée par de nombreuses cytokines (cytokines de la famille de l'IL-2 et de l'IL-15) et des hormones (prolactine, érythropoïétine). Ces facteurs lui permettent d'exercer son rôle dans de nombreux types cellulaires en particulier les cellules épithéliales³⁸⁶. Suite à l'activation de protéines kinases d'amont JAK 1 ou JAK 3, STAT5 est phosphorylé sur un résidu tyrosine. Dès lors il se dimérise et transloque dans le noyau où il peut activer de nombreux gènes cibles³⁸⁷. Les gènes cibles de STAT5 A et B ont été décrits principalement dans le lymphocyte T et concernent des voies anti-apoptotiques et prolifératives. STAT5A permet notamment la différenciation en lymphocyte T régulateur et en entrant en compétition avec STAT3 il active les gènes *FOXP3* et *CD25* (IL-2R α). STAT5A active également *BCL2* et participe à la survie des lymphocytes TCD8+ mémoire après stimulation par l'IL-15 et l'IL-7³⁸⁸. Cependant, le rôle de STAT5 dans l'épithélial rénal n'est pas connu.

L'IL-15 est une cytokine très exprimée par l'épithélium rénal³⁸⁹. Une étude précédente a montré que l'IL-15 joue un rôle protecteur dans la glomérulonéphrite inflammatoire³⁸⁹. Notre équipe a montré que, le récepteur trimérique de l'IL-15, en particulier la chaîne gamma commune γ c (IL2R γ), est très fortement induit dans l'épithélium glomérulaire chez la souris au

cours du modèle anti-MBG et chez l'Homme au cours des glomérulonéphrites extracapillaires. La protection rénale n'impliquerait pas les lymphocytes T mais serait médiée par γ c podocytaire ce qui pose la question du rôle de sa signalisation d'aval JAK/STAT.

Le but du travail est d'étudier le rôle de STAT5 dans le podocyte chez la souris. Pour cela, nous avons utilisé des souris spécifiquement délétées pour STAT5 dans le podocyte (*Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}*) sur un fond génétique C57BL6/J. Ces animaux ont été étudiés au cours de deux modèles d'agression glomérulaire/podocytaire inflammatoire et toxique. Le premier modèle expérimental utilisé est le modèle anti-membrane basale glomérulaire (anti-MBG). Le second modèle est la néphropathie toxique à l'adriamycine (doxorubicine), une agression toxique considérée comme d'action plus spécifique du podocyte.

RESULTATS

Le phénotype basal rénal n'est pas modifié par la délétion de STAT5A/B

Tout d'abord nous avons identifié l'expression de la recombinaison CRE qui est bien retrouvée dans les podocytes des souris délétées et non pas chez les souris contrôles (**Figure 1A**). La délétion podocytaire de *Stat5* est vérifiée par immunohistochimie de STAT5a/b sur coupes de reins des souris *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et *Stat5^{lox/lox}* âgées de 10 semaines. STAT5a/b est exprimé à l'état basal dans les podocytes chez les souris WT et absent des glomérules des souris délétées (**Figure 1B**).

La délétion du gène *Stat5* dans les podocytes ne s'accompagne pas d'un phénotype rénal spontané à l'état basal. A poids identique (**Figure 1E**), la fonction rénale mesurée par l'urée plasmatique (**Figure 1G**) ainsi que la protéinurie (**Figure 1H**) ne sont pas différentes comparées aux souris contrôles. Le poids des reins ne diffère également pas (**Figure 1F**). La morphologie des glomérules et de l'ensemble du parenchyme rénal en microscopie optique (trichrome de Masson) (**Figure 1C**) et électronique n'est pas altérée (**Figure 1D**).

La délétion de *Stat5* podocytaire s'accompagne d'une augmentation de la protéinurie au cours du modèle anti-MBG

Des souris mâles *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* (n=10) et leurs contrôles *Stat5^{lox/lox}* (n=8), âgées de 10 semaines ont été injectées avec le sérum anti-MBG. Nous avons constaté deux décès à J4 dans chacun des deux groupes analysés. Le modèle anti-MBG s'accompagne d'une prise de poids liée à une rétention hydro-sodée (**Figure 2A**) et une insuffisance rénale dont la gravité, mesurée par l'urée et la créatinine plasmatique, est similaire entre les deux génotypes (**Figure 2C**). De façon intéressante, la protéinurie normalisée avec l'excrétion urinaire de créatinine est significativement augmentée chez les souris ayant une délétion de *Stat5* podocytaire (**Figure 2B**). Cette différence sur la sévérité de la protéinurie peut s'observer précocement, dès le quatrième jour après injection de sérum anti-MBG, et témoigne d'une atteinte glomérulaire. Les lésions rénales histologiques observées en microscopie optique sont classiques du modèle: croissants glomérulaires, dépôts de fibrine intra-glomérulaires, lésions tubulaires et interstitielles (**Figure 3A**). Il existe une tendance non significative à une gravité histologique glomérulaire (**Figure 2D et 2E**) et tubulo-interstitielle (**Figure 2F**) accrue des souris ayant une délétion podocytaire de *Stat5* par rapport aux contrôles. L'examen des glomérules en microscopie électronique nous permet d'identifier des altérations podocytaires, endothéliales et de la MBG. On note des altérations ultrastructurelles podocytaires avec fusion des pédicelles et vacuolisations cytoplasmiques, un épaississement endothélial, un recrutement de neutrophiles intracapillaires et un épaississement de la MBG. Ces altérations ultrastructurelles sont plus accentuées dans les glomérules des souris ayant une délétion de *Stat5* (**Figure 3B**).

La délétion de STAT5 podocytaire aggrave l'atteinte glomérulaire induite par l'adriamycine

Afin de confirmer le rôle protecteur de *Stat5* dans le podocyte nous avons utilisé un modèle d'agression toxique plus spécifique de ce type cellulaire: la néphropathie induite par l'adriamycine (doxorubicine). Nous avons donc injecté par voie intraveineuse l'adriamycine (25 mg/kg) aux souris *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* (n=19) et leurs contrôles *Stat5^{lox/lox}* (n=21). Par ailleurs, des souris témoins des deux génotypes (*Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* CTL n=5 et *Stat5^{lox/lox}* CTL n=4) ont reçu le même volume de NaCl 0,9%. Nous avons noté deux décès à J5 uniquement dans le groupe *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* ayant reçu l'adriamycine. Comme décrit dans d'autres études³⁷⁶, l'adriamycine induit un amaigrissement significatif chez tous les animaux injectés, aussi bien dans le groupe *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* que *Stat5^{lox/lox}* (**Figure 4A**).

La fonction rénale n'est pas significativement altérée dans le modèle à J7 (**Figure 4C**). Le taux d'albumine plasmatique est significativement diminué à J7 chez les souris ayant reçu l'adriamycine quel que soit le génotype (**Figure 4D**). Afin d'établir l'atteinte glomérulaire et plus particulièrement podocytaire dans le modèle, nous avons décidé de mesurer l'excrétion urinaire d'albumine normalisée par l'excrétion urinaire de créatinine. L'injection d'adriamycine induit une albuminurie significative à J7 chez les souris ayant une délétion podocytaire de *Stat5* (99 ± 157 vs. 0 ± 0 mg/mmol) et non pas chez les souris contrôle (19 ± 34 vs. 0 ± 0 mg/mmol) (**Figure 4B**). Comme référence, les seuils de microalbuminurie et macroalbuminurie chez l'Homme sont fixés à 2 mg/mmol et 20 mg/mmol respectivement (source Haute Autorité de Santé).

L'analyse histologique des reins de ces souris en microscopie optique révèle des discrets dépôts hyalins et quelques synéchies floculo-capsulaires (zones de fusion entre podocytes et cellules pariétales glomérulaires) témoignant de lésions type hyalynose segmentaire et focale et une atteinte tubulo-interstitielle focale (**Figure 5A**). Etant donné la difficulté de caractérisation de ces lésions discrètes nous avons décidé de ne pas réaliser une quantification. Cependant, ces lésions apparaissent aggravées chez les souris ayant une délétion podocytaire de *Stat5* par rapport aux contrôles (**Figure 5A**). Une analyse complémentaire en microscopie électronique est en cours afin de mettre en évidence les altérations podocytaires ultrastructurelles induites par l'adriamycine en regard de la délétion de STAT5.

La délétion de STAT5 induit une dédifférenciation et une prolifération podocytaire dans le modèle par injection d'adriamycine

Au cours du modèle de néphropathie à l'adriamycine la délétion podocytaire de *Stat5* s'associe avec une perte accrue des marqueurs de différenciation podocytaire comme la néphrine suggérant un rôle de STAT5 dans le maintien de la structure podocytaire (**Figure 5D**).

Par ailleurs, les glomérules des souris *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* présentent plus de podocytes exprimant le facteur de prolifération Ki67 que leurs contrôles à J7 de l'injection d'adriamycine (**Figure 5B et 5C**). La délétion *Stat5* pourrait donc être impliquée dans la dédifférenciation et la

prolifération podocytaire. Des expériences sont en cours actuellement *in vivo* et *in vitro* afin de tester le rôle de la délétion sur les voies anti-apoptotiques.

L'infiltrat inflammatoire n'est pas modifié par la déficience podocytaire de STAT5 dans le modèle par injection d'adriamycine

La toxicité hématologique de l'adriamycine, peu décrite dans la littérature expérimentale mais bien connue des cliniciens, se porte sur les lignées leucocytaires (polynucléaires neutrophiles et lymphocytes) (**Figure 6C et 6D** respectivement) et plaquettaire (**Figure 6B**), de façon similaire dans les deux génotypes sans atteindre la lignée érythrocytaire (**Figure 6A**). Par ailleurs, on ne note pas de différence hématologique entre les deux génotypes à l'état basal.

Enfin, malgré la baisse des leucocytes circulants liée à la toxicité hématologique de l'adriamycine le modèle induit un recrutement intra-rénal de cellules inflammatoires de type lymphocytaire T (**Figure 6E**) et macrophagique (**Figure 6F**). Cet infiltrat, mis en évidence par un immunomarquage CD3 et F4/80 respectivement, n'est pas différent entre les groupes *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et *Stat5^{lox/lox}* à J7 de l'injection d'adriamycine (**Figures 6G et 6H**) suggérant que la différence phénotypique est indépendante de la composante immunitaire.

DISCUSSION

Dans ce travail nous montrons que STAT5 joue un rôle protecteur au sein du podocyte chez la souris au cours de deux modèles de glomérulopathie inflammatoire et toxique. Dans le modèle inflammatoire anti-MBG, la délétion de *Stat5* podocytaire s'accompagne d'une majoration de la protéinurie sans une majoration significative des lésions histologiques. En effet, le sérum néphrotoxique a des cibles antigéniques variées et l'agression rénale n'est donc pas seule restreinte aux podocytes. Le glomérule étant composé de différents types cellulaires (podocytes, cellules endothéliales, cellules mésangiales, cellules pariétales épithéliales...), l'agression médiée par les anticorps anti-MBG pourrait être hétérogène au sein du glomérule. On peut donc supposer que l'absence de STAT5 dans le podocyte n'a pas eu un retentissement suffisant à l'échelle du glomérule pour permettre une aggravation histologique mais elle aggrave les lésions podocytaires pour aboutir à une majoration de la protéinurie.

Dans le modèle de néphropathie toxique à l'adriamycine, bien que le mécanisme exact de toxicité podocytaire ne soit pas complètement élucidé, la participation d'un gène podocytaire *Prkdc*, a été récemment démontré³⁹⁰. Ce gène semble maintenir l'intégrité de l'ADN mitochondrial. A côté de cela, plusieurs études suggèrent un mécanisme lésionnel additionnel et indirect, impliquant des cellules immunes. Notamment, après injection d'adriamycine il existerait une importante infiltration rénale lymphocytaire T et macrophagique avec surexpression rénale de CCL3 (MIP α) et CLL5 (RANTES). Un traitement par antagoniste de CCR1 (récepteur de CCL3 et CCL5), diminuerait les lésions rénales³⁹¹. De plus, le blocage pharmacologique de CD40L diminue les lésions glomérulaires dans ce même modèle en bloquant interaction lymphocytes T et podocytes (exprimant CD40)³⁹².

Dans notre travail, nous mettons en évidence une aggravation du phénotype podocytaire mesuré par une majoration de l'albuminurie et la perte d'expression de la néphrine liée à la délétion de *Stat5*. Les conséquences de la délétion de *Stat5* podocytaire ne seraient pas liées à un effet sur le recrutement inflammatoire local. En effet, nous ne mettons pas en évidence d'excès de cellules inflammatoires dans le rein des souris délétées.

La délétion podocytaire de *Stat5* n'affecte pas non plus les populations leucocytaires totales circulantes par rapport au groupe contrôle après injection d'adriamycine. La lymphodéplétion sévère induite par ce modèle pourrait également plaider contre un rôle pathogène des lymphocytes compte tenu de leur faible nombre circulant et leur faible recrutement rénal suite à l'agression par l'adriamycine. Par contre STAT5 pourrait agir in situ dans les podocytes sur des voies de prolifération et d'apoptose. En effet, le podocyte est connu pour être une cellule en différenciation terminale sans potentiel de prolifération en conditions normales. En revanche, sa prolifération en situation d'agression est démontrée dans notre travail en particulier chez les animaux *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}*. STAT5 pourrait avoir un effet anti-prolifératif épithélial sur le podocyte qui devra être confirmé par la suite.

Comme on l'a vu précédemment, l'action toxique de l'adriamycine sur le podocyte s'exercerait via une atteinte du fonctionnement mitochondrial³⁹⁰. La mitochondrie est l'organelle responsable de la voie intrinsèque de l'apoptose cellulaire qui est contrôlée par les gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. STAT5 contrôlant l'expression de Bcl-2/Bcl-xl dans le lymphocyte³⁸⁷, notre hypothèse mécanistique donnerait à STAT5 un rôle anti-apoptotique

podocytaire protégeant la cellule de l'agression toxique de l'adriamycine. L'activation de cette voie de signalisation dans le podocyte *in vivo* et *in vitro* est actuellement en cours d'étude par notre équipe.

Nos résultats et d'autres travaux de recherche récents montrent que des voies de signalisation comme JAK/STAT sont partagées par les cellules immunitaires et les cellules épithéliales, en particulier les podocytes. Ces données pourraient permettre de mieux comprendre l'action épithéliale propres des traitements réputés comme ciblant uniquement les cellules immunitaires, comme les immunosuppresseurs. En effet, l'action podocytaire propre des corticoïdes, des inhibiteurs de mTOR et des inhibiteurs de la calcineurine ont déjà été décrits³⁹³. Les inhibiteurs de la voie JAK-STAT étant actuellement en développement dans le traitement des maladies auto-immunes³⁹⁴ et en transplantation rénale³⁹⁵, il paraît important de mieux décrire cette signalisation au sein de l'épithélium rénal afin d'envisager leur éventuel rôle thérapeutique en néphrologie et comprendre leur mécanisme d'action tissulaire spécifique.

CONCLUSION

En utilisant deux modèles expérimentaux de glomérulopathie chez la souris nous montrons que STAT5 exerce un rôle protecteur dans le podocyte lors d'une agression inflammatoire ou toxique. Ce facteur de transcription commun aux cellules immunitaires et aux podocytes pourrait constituer un facteur de survie podocytaire inattendu dont les mécanismes régulateurs restent à identifier.

MATERIELS ET METHODES

Animaux

Toutes les souris ont été placées dans des conditions d'élevage standard et contrôlées. Les animaux ont bénéficié durant toute la durée de l'expérimentation d'un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les protocoles utilisés sont approuvés par le comité d'éthique de l'UPMC et de l'Inserm (Charles Darwin). La délétion podocytaire de *Stat5* est réalisée grâce au système

Cre/Lox en croisant des souris *Stat5*^{lox/lox} (gracieusement fournies par L. Hennighausen)³⁹⁶ aux souris *Nphs2.cre*, les deux souches ayant un fond génétique C57BL6/J. Les deux gènes *Stat5a* et *Stat5b* sont flanqués par les séquences loxP. Des animaux issus des mêmes portées (« littermates ») mais n'exprimant pas la recombinaison CRE ont été utilisés dans toutes les expériences comme contrôles.

Modèle anti-MBG passif

Le modèle est réalisé sur des souris congéniques sus-décrites âgées de 10 semaines. Le sérum hétérologue a été produit par immunisation de brebis à partir de glomérules de rat isolés. L'injection de sérum néphrotoxique est réalisée à J0 à la dose de 25µl, à J1 et J2, à la dose totale de 18µL/g par voie intraveineuse rétro-orbitaire. Les souris sont pesées et les urines sont recueillies manuellement à J0 J4 et J9 avec un sacrifice à J9 où on récupère les plasmas et les 2 reins.

Modèle de néphropathie à l'adriamycine

Le protocole suivi a été décrit précédemment³⁹⁷. Brièvement, une dose unique de 25mg/kg par voie intraveineuse rétro-orbitaire est injectée à J0. Les souris contrôles ont été injectées avec le même volume de NaCl 0,9%. Pour éviter la dénutrition, due à une perte d'appétit, une injection intrapéritonéale de 2mL d'un soluté riche en glucose (soluté de dialyse péritonéale Baxter®) est injectée quotidiennement. Les urines sont recueillies à J0 et J6 pour un dosage de l'albuminurie qui est rapportée à l'excrétion urinaire de créatinine. Les souris sont sacrifiées une semaine après l'injection d'adriamycine avec prélèvement des reins et du plasma.

Isolement des glomérules

Les glomérules sont isolés à partir de fragments de rein total recueillis dans du milieu de culture RPMI, puis digérés avec une solution de collagénase de type I (Gibco® ThermoFischer Scientific USA). La collagénase est inactivée par la suite par une solution de RPMI complétée par du sérum de veau foetal (10%). Puis on réalise une double filtration avec des tamis de 100 µm et de 40 µm. Une solution de PBS-BSA0.5% est injectée sous pression afin de récupérer les glomérules restés au-dessus du tamis de 40 µm. Les glomérules en solution sont centrifugés et le culot est récupéré. Les protéines sont extraites avec un tampon RIPA et une

partie des glomérules est récupérée dans un tampon RLT lysis Buffer (Qiagen® Germany) afin d'extraire les ARN.

Histopathologie, immunohistochimie et immunomarquage

Les reins sont fixés dans l'AFA, inclus en paraffine et coupés au microtome pour obtenir une épaisseur de coupe de 4 µm. Une coloration par le trichrome de Masson (coloration en bleu des noyaux, en rose du cytoplasme des cellules et en vert de la matrice extracellulaire) est réalisée après déparaffinage.

Les mesures histologiques suivantes ont été réalisées en aveugle:

- Pourcentage de glomérules avec croissants cellulaires (définis par au moins 2 couches cellulaires dans l'espace de Bowman)
- Pourcentage de glomérules avec dépôts de fibrine témoignant d'une activation de la coagulation locale.
- Score d'atteinte tubulo-interstitielle (tubulointerstital score noté TIS) qui évalue sur une échelle de 1 à 4 l'intensité des lésions des tubules : dilatation du tubule avec amincissement de l'épithélium tubulaire (score 0 ; pas de lésions, 1 ; <25% lésions, 2 ; 25-50% lésions, 3 ; 50-75% lésions, 4 ; > 75% lésions du parenchyme rénal).

Les anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages sont :

- Anti-STAT5A/B (Abcam AB16276) incubé une nuit à 4°C, puis incubé avec un anticorps secondaire polyclonal anti-lapin (Histofine) couplé à une peroxidase pendant 30 min puis enfin révélé avec AEC (Histofine) pendant 15 min.
- Anti-CD3 (Dako) incubé une nuit à 4°C puis avec un anticorps anti-lapin puis révélé à l'AEC
- Anti-F4/80 (BioRad MCA497G) incubé une nuit à 4°C puis avec un anticorps anti-rat puis révélé à l'AEC
- Anti-Ki67 (Abcam AB 15580) incubé une nuit à 4°C puis avec un anticorps anti-lapin puis révélé à l'AEC
- Anti-néphrine (RD Systems) incubé une nuit à 4°C puis révélé avec un anti-goat couplé à un Alexa Fluor-488
- Anti-CRE (Merck-Millipore 69050-3) incubé une nuit à 4°C puis révélé avec un anti-lapin puis révélé à l'AEC

Les fragments congelés de reins sont coupés au cryostat (épaisseur de 4 μm) et fixés 6 minutes dans l'acétone pour analyse en immunofluorescence ou immunohistochimie.

Dosage des paramètres biologiques

L'urée, la créatininémie plasmatique, la protéinurie et la créatininurie sont réalisés par un automate (Konelab, Institut de recherche des Cordeliers, Paris France). Le dosage de l'albumine plasmatique et urinaire est réalisé par un automate Olympus, plate forme de biochimie de l'hôpital Bichat, Paris).

Les hémogrammes sont réalisés à l'institut Imagine (hôpital Necker, Paris), par un automate dédié au petit animal.

Analyses statistiques

Les résultats sont analysés par un test non paramétrique bilatéral non apparié (Mann Whitney Test), ou par un test ANOVA dans le cas de comparaisons multiples avec test de Bonferroni pour comparer les différents groupes. Les graphiques ont été obtenus par le logiciel GraphPad Prism 5.0. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM sur les figures et moyenne \pm SD dans le texte de la partie « résultats ». Les protéinuries au cours du temps sont comparées grâce à un test de régression linéaire. Une différence est considérée comme significative si p est inférieur à 0,05.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Le phénotype basal rénal n'est pas modifié par la délétion de STAT5A/B

Images représentatives de l'expression de la recombinaison CRE (A) et de la protéine STAT5 (B) en immunohistochimie dans le cortex rénal (barre d'échelle: 50 μm) et de l'histologie rénale analysée par le Trichrome de Masson (grossissement x40) (C) des souris âgées de 10 semaines *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et leurs contrôles *Stat5^{lox/lox}*. (D) Images représentatives de glomérules des souris *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et *Stat5^{lox/lox}* âgées de 10 semaines en microscopie électronique de transmission montrant une ultrastructure podocytaire et endothéliale conservée dans les deux génotypes. (E) Poids corporel, (F) poids des reins rapporté au poids corporel de la souris, (G) urée plasmatique et (H) rapport protéinurie sur créatininurie des

souris âgées de 10 semaines *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et leurs contrôles *Stat5^{lox/lox}*. Les données représentent les moyennes et les écart-types standardisés d'au minimum 9 souris par groupe. Il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes.

Figure 2 : La délétion de *Stat5* podocytaire s'accompagne d'une augmentation de la protéinurie au cours du modèle anti-MBG

Evolution du poids corporel des souris (A) et du rapport protéinurie sur créatininurie (B) à J0, J4, J7 et J9 après injection du sérum anti-MBG à des souris mâles *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et leurs contrôles *Stat5^{lox/lox}* âgées de 10 semaines. Fonction rénale (C) mesurée par le taux d'urée plasmatique (BUN) 9 jours après l'injection de sérum anti-MBG ou de NaCl 0,9% à des souris mâles *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et leurs contrôles *Stat5^{lox/lox}* âgées de 10 semaines. Analyse histologique des reins des souris mâles *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et leurs contrôles *Stat5^{lox/lox}* âgées de 10 semaines avec analyse du pourcentage de croissants glomérulaires (D), de glomérules contenant des dépôts de fibrine (E) et du score tubulo-interstitiel (F). Les données représentent les moyennes et les écart-types standardisés d'au minimum 9 souris par groupe. * exprime la comparaison entre deux conditions expérimentales différentes au sein du même génotype. * $p < 0.05$. # exprime la comparaison entre deux génotypes avec les mêmes conditions expérimentales. # $p < 0.05$.

Figure 3 : Impact histologique de la délétion de *Stat5* podocytaire au cours du modèle anti-MBG de glomérulonéphrite

(A) Images représentatives de l'histologie rénale analysée à J9 par le Trichrome de Masson (grandissement x400) chez des souris mâles *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et leurs contrôles *Stat5^{lox/lox}* âgées de 10 semaines injectées ou non avec le sérum anti-MBG. (B) Images représentatives de glomérules des souris *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et *Stat5^{lox/lox}* âgées de 10 semaines injectées ou non avec le sérum anti-MBG en microscopie électronique de transmission. L'injection de sérum anti-MBG aboutit à des lésions podocytaires avec fusion des pédicelles et à une altération de la MBG ainsi qu'à une altération du cytoplasme des cellules endothéliales qui est plus marqué chez les souris *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}*.

Figure 4 : La délétion podocytaire de *Stat5* sur un fond génétique naturellement résistant C57BL6J induit une albuminurie de fort débit dans le modèle de néphropathie à l'adriamycine

(A) Evolution du poids corporel des souris entre J0, J2, J3, J4, J6 et J7 après injection d'adriamycine (25 mg/kg) à des souris *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et leurs contrôles *Stat5^{lox/lox}* âgées de 10 semaines. (B) Albuminurie rapportée à la créatininurie, (C) urée plasmatique et (D) albumine plasmatique sept jours après injection d'adriamycine ou de NaCl0,9% à des souris *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et leurs contrôles *Stat5^{lox/lox}* âgées de 10 semaines. Les données représentent les moyennes et les écart-types standardisés d'au minimum 4 souris par groupe contrôle et 15 souris minimum par groupe adriamycine. * exprime la comparaison entre deux conditions expérimentales différentes au sein du même génotype. * $p < 0.05$. *** $p < 0.001$.

Figure 5 : La délétion podocytaire de *Stat5* sur un fond génétique naturellement résistant C57BL6J induit des lésions de HSF avec une dédifférenciation et une prolifération podocytaire dans le modèle de néphropathie à l'adriamycine

(A) Images représentatives de l'histologie rénale analysée à J7 par le Trichrome de Masson (grandissement x400) chez des souris mâles *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et leurs contrôles *Stat5^{lox/lox}* âgées de 10 semaines injectées ou non avec l'adriamycine. La flèche indique une lésion de HSF avec synéchie floculo-capsulaire. (B) Images représentatives du marquage Ki67 (flèche) analysant la prolifération cellulaire analysée à J7 (grandissement x400) chez des souris mâles *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et leurs contrôles *Stat5^{lox/lox}* âgées de 10 semaines injectées ou non avec l'adriamycine. (C) Quantification à J7 du marquage Ki67, mesuré par le nombre de glomérules ayant au moins un noyau marqué, et du marquage (D) néphrine, mesuré par le pourcentage de l'aire glomérulaire marquée, chez des souris *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et leurs contrôles *Stat5^{lox/lox}* âgées de 10 semaines injectées ou non avec l'adriamycine. Les données représentent les moyennes et les écart-types standardisés d'au moins 5 souris par groupe. * exprime la comparaison entre deux conditions expérimentales différentes au sein du même génotype. * $p < 0.05$. *** $p < 0.001$. # exprime la comparaison entre deux génotypes avec les mêmes conditions expérimentales. # $p < 0.05$.

Figure 6 : La délétion podocytaire de *Stat5* ne module pas l'infiltrat inflammatoire ni les effets myélosuppresseurs de l'adriamycine chez la souris

Taux sanguin (A) d'hémoglobine, (B) plaquettes, (C) polynucléaires neutrophiles et (D) lymphocytes sept jours après injection d'adriamycine ou de NaCl0,9% à des souris *Nphs2.cre Stat5^{lox/lox}* et leurs contrôles *Stat5^{lox/lox}* âgées de 10 semaines. Images représentatives du

marquage (E) CD3 (flèches) et (F) F4/80 (flèches) dans le cortex rénal des souris *Nphs2.cre* *Stat5*^{lox/lox} et leurs contrôles *Stat5*^{lox/lox} âgées de 10 semaines injectées ou non avec l'adriamycine et analysées à J7 de l'injection. Quantification à J7 du marquage (G) CD3 et (H) F4/80, mesuré par le nombre de cellules marquées par champ chez des souris *Nphs2.cre* *Stat5*^{lox/lox} et leurs contrôles *Stat5*^{lox/lox} âgées de 10 semaines injectées ou non avec l'adriamycine. Les données représentent les moyennes et les écart-types standardisés de 5 souris par groupe. * exprime la comparaison entre deux conditions expérimentales différentes au sein du même génotype. * p<0.05. ** p<0.01. *** p<0.001.

Figure 1

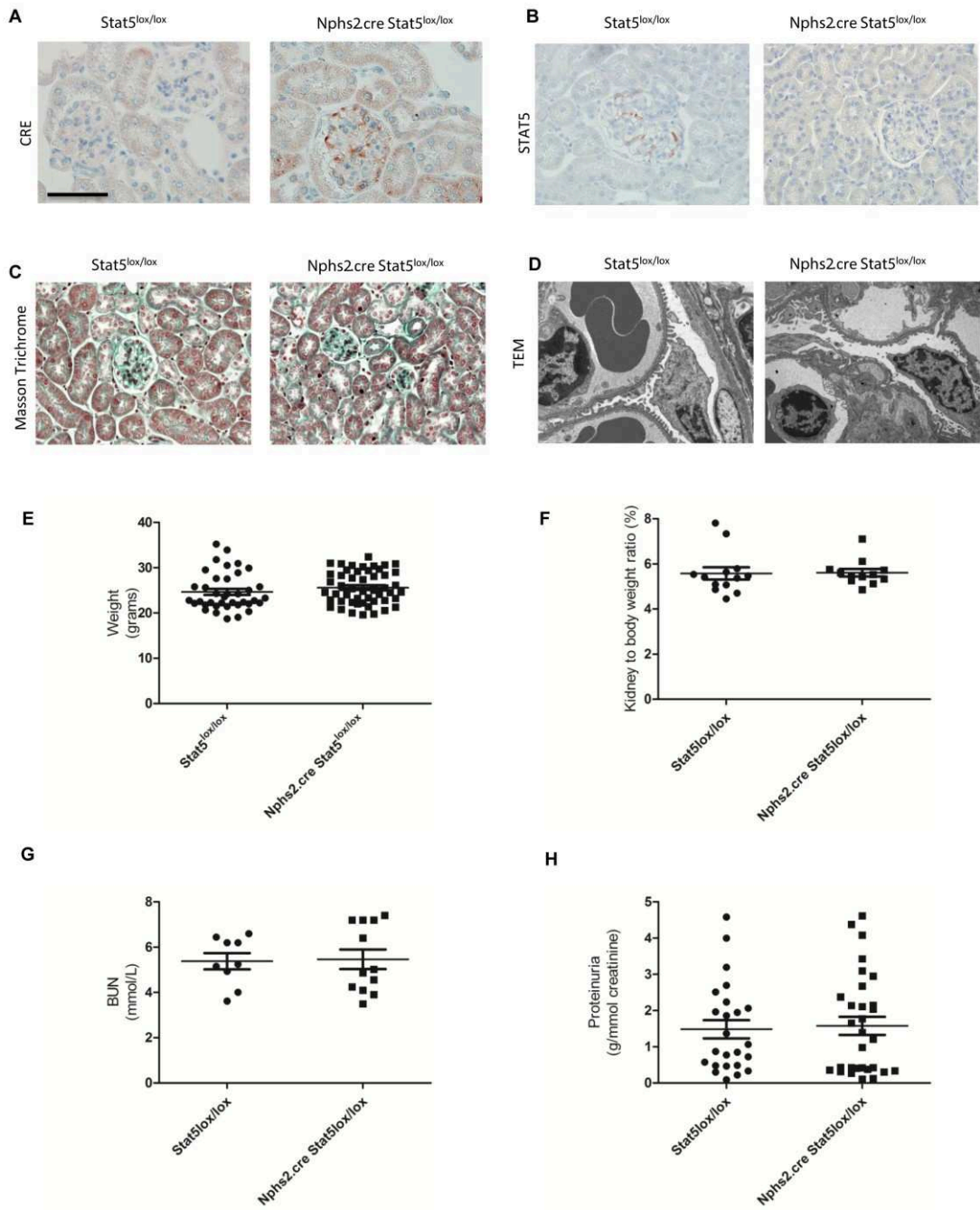


Figure 2

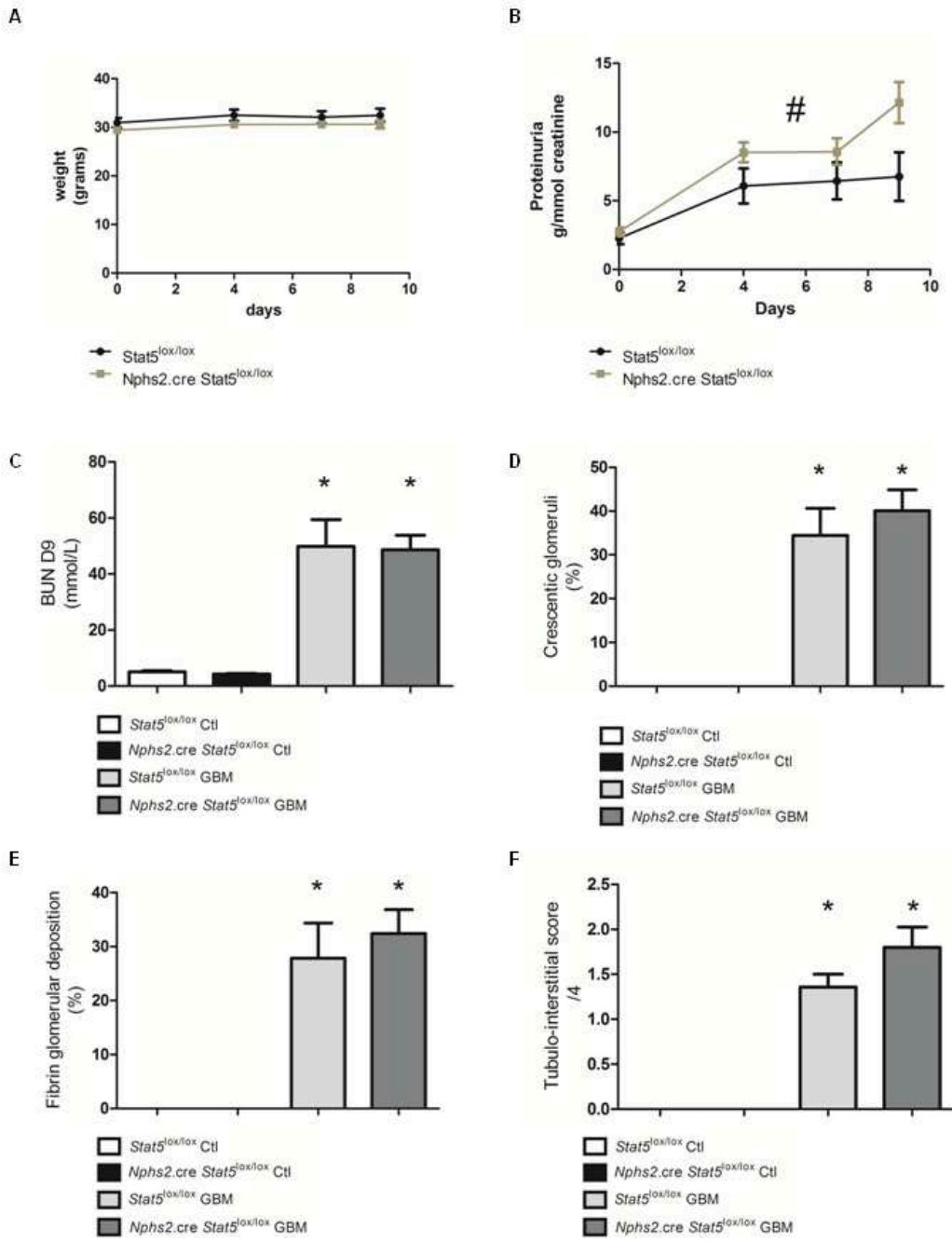


Figure 3

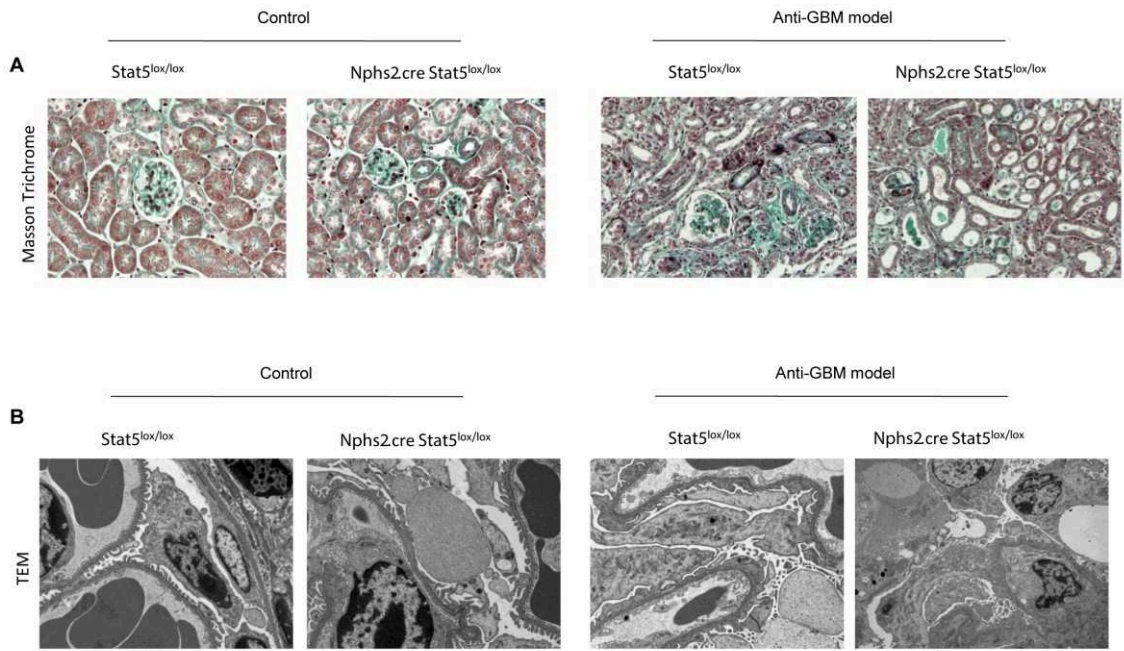


Figure 4

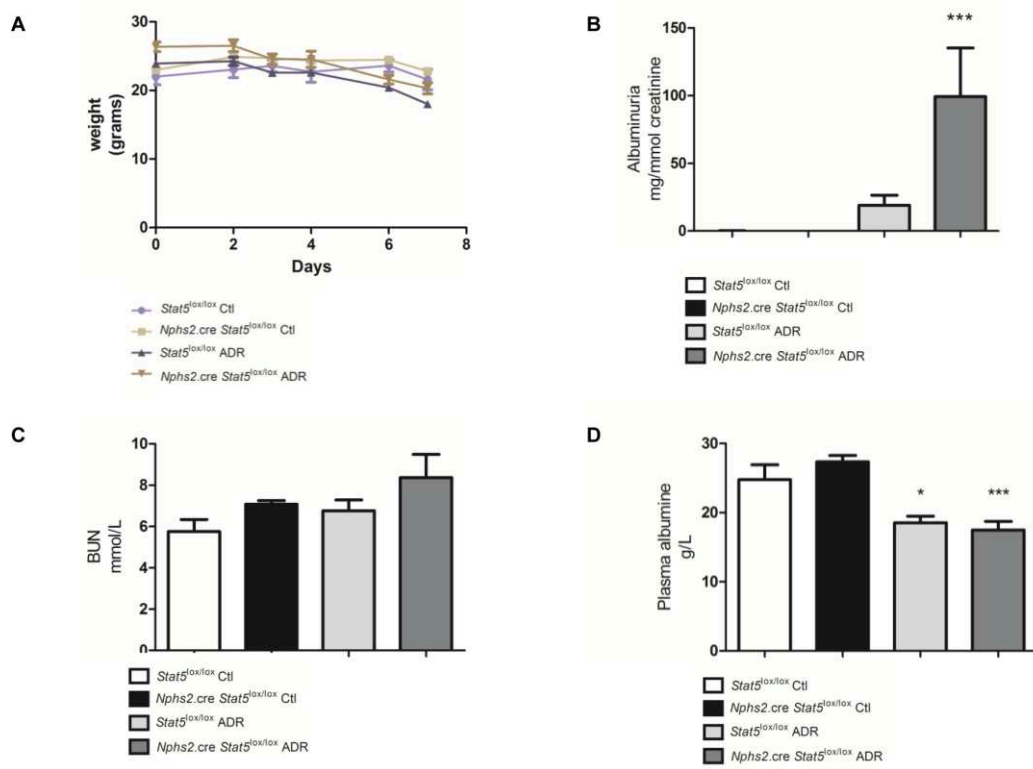
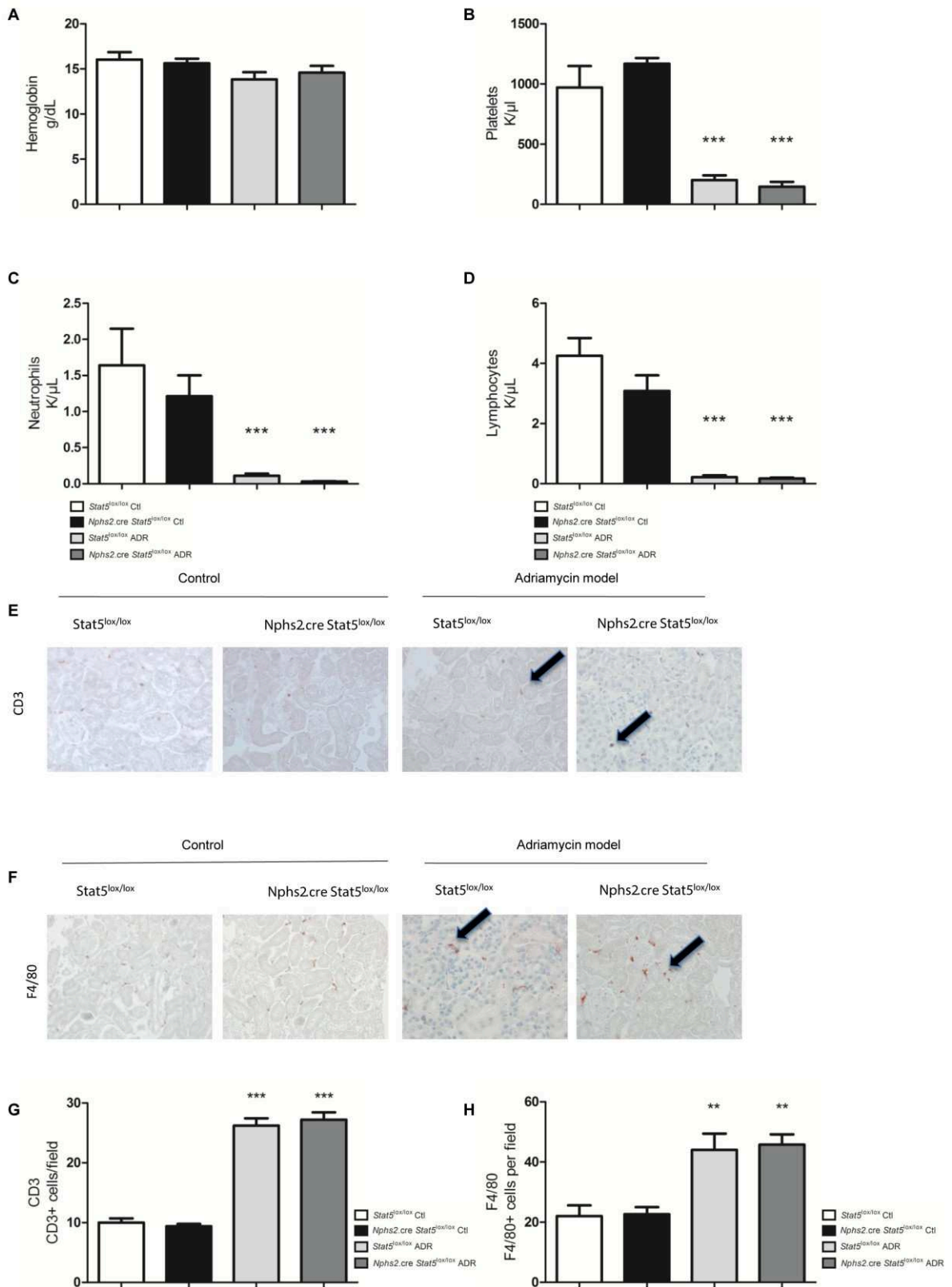


Figure 6



PARTIE 3:

ROLE DU FACTEUR DE REPONSE A L'HYPOXIE, EPAS1, DANS L'ENDOTHELIUM AU COURS DE LA GLOMERULONEPHRITE INFLAMMATOIRE ET LA GLOMERULOPATHIE HYPERTENSIVE

Sous-partie A:

Rôle de Epas1 endothélial dans un modèle expérimental de glomérulonéphrite inflammatoire (résultats non publiés)

Sous-partie B:

Article 3: Endothelial Epas1 deficiency is sufficient to promote parietal epithelial cell activation and FSGS in experimental hypertension

En révision. *Journal of the American Society of Nephrology*. JASN-2016-09-0960

Le modèle anti-MBG se caractérise par une variabilité lésionnelle liée, en particulier, au fond génétique de la souris comme démontré par notre équipe⁴⁶ (**Annexe 2**). En effet, dans ce modèle on note des lésions endothéliales sévères de micro-angiopathie thrombotique (MAT) qui sont plus importantes dans le fond génétique 129S2SvPas que chez les souris C57BL/6J. Ce travail a débouché sur la mise en évidence de différences en terme d'expression et de réponse de la voie du VEGF/VEGFR2 entre ces deux lignées (**Figure 18**). Une dysfonction du système VEGFA/VEGFR2 glomérulaire expliquerait la majoration des lésions de MAT chez la 129S2SvPas. En effet, une diminution de l'expression de VEGFR2 chez cette souris empêcherait l'action du VEGFA sur l'endothélium et favoriserait les lésions de MAT dans le modèle anti-MBG. Le système du VEGF est un facteur de survie clé pour l'endothélium glomérulaire. Le VEGFA est majoritairement produit par l'épithélium glomérulaire et a un effet trophique sur l'endothélium glomérulaire doté en particulier du récepteur VEGFR2. Le rôle pathologique d'une carence de VEGF a été largement étudiée. Par exemple, une carence en VEGF induite par des anticorps bloquants est un facteur de risque de survenue de microangiopathie rénale chez l'Homme³⁹⁸.

Variable	Canonical pathway	Pathway ID	P value
186 Transcripts found only in C57BL/6J	Polo-like kinase 1	PW_PLK11_MUS_MUSCULUS	1.18×10^{-4}
	Polo-like kinase 3	PW_PLK13_MUS_MUSCULUS	1.39×10^{-4}
	Aurora kinase	PW-AURORA_MUS_MUSCULLUS	1.56×10^{-4}
	Cell division cycle 2	PW-CDC2_MUS_MUSCULUS	1.71×10^{-4}
	Signal transducer and activator of transcription	PW-STAT_MUS_MUSCULUS	3.84×10^{-3}
	Granzyme B	PW-GZMB_MUS_MUSCULUS	9.75×10^{-3}
504 Transcripts found in both strains	Matrix metalloproteinase	PW_MMP_MUS_MUSCULUS	7.56×10^{-13}
	VEGFR	PW_VEGF_MUS_MUSCULUS	9.05×10^{-11}
	NF-κB	PW_NFKB_MUS_MUSCULUS	5.21×10^{-9}
	Mitogen-activated protein kinase	PW_MAPK_MUS_MUSCULUS	2.12×10^{-8}
	Focal adhesion kinase	PW_FAK_MUS_MUSCULUS	3.71×10^{-8}
	Tissue inhibitor of metalloproteinase	PW_TIMP_MUS_MUSCULUS	4.75×10^{-8}
	Rho Ras homologue	PW_RHOA_MUS_MUSCULUS	9.37×10^{-8}
	Caveolin 1	PW_CAVEOLIN_MUS_MUSCULUS	5.64×10^{-7}
	Small GTP-binding protein Rac	PW_RAC_MUS_MUSCULUS	5.92×10^{-7}
	IL-1	PW_IL1_MUS_MUSCULUS	8.19×10^{-7}
907 Transcripts found only in 129S2SvPas	VEGFR	PW_VEGF_MUS_MUSCULUS	5.77×10^{-7}
	Hypoxia-inducible factor, α subunit (basic helix loop helix transcription factor)	PW_HIF1A_MUS_MUSCULUS	2.74×10^{-6}
	Integrin	PW_INTEGRIN_MUS_MUSCULUS	2.75×10^{-5}
	Matrix metalloproteinase	PW_MMP_MUS_MUSCULUS	3.02×10^{-5}
	Peroxisome proliferator-activated receptor γ	PW_PPARG_MUS_MUSCULUS	8.73×10^{-4}
	Integrin-linked kinase	PW_ILK_MUS_MUSCULUS	1.25×10^{-4}
	Nitric oxide synthase	PW_NOS_MUS_MUSCULUS	1.26×10^{-4}
	Cyclin D1	PW_CCND1_MUS_MUSCULUS	1.62×10^{-4}
	Protein kinase C	PW_PKC_MUS_MUSCULUS	1.84×10^{-4}
	FK506 binding protein 12 and rapamycin-associated protein, mTor	PW_MTOR_MUS_MUSCULUS	2.96×10^{-4}

FIGURE 18: ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE COMPARANT LA LIGNEE C57BL6J ET 129S2SVPAS DANS LE MODELE ANTI-MBG (RESULTATS DU DR MESNARD)

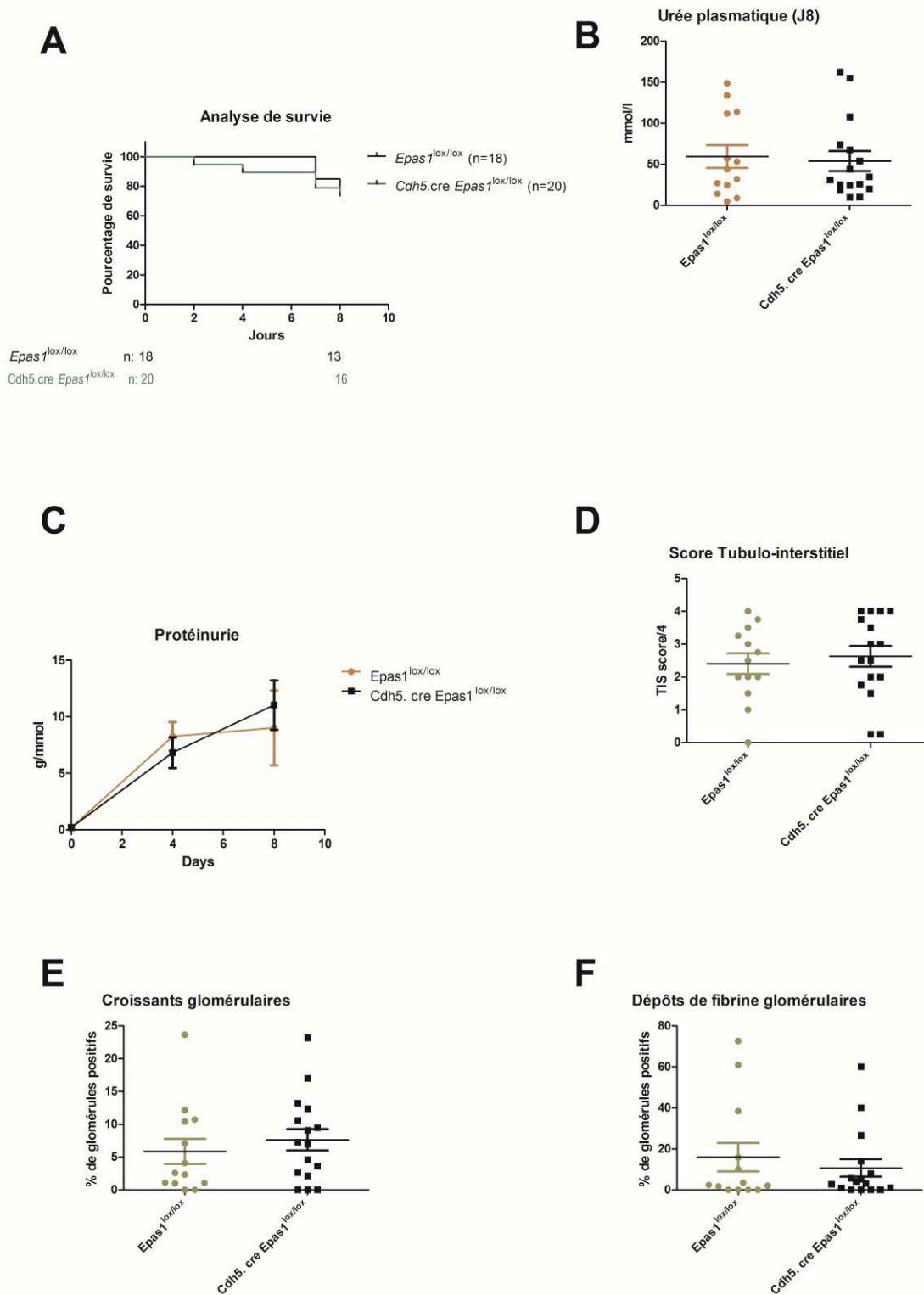
L'étude génétique de ces deux souches de souris a par ailleurs révélé que la lignée 129S2SvPas présente des différences génétiques sein du gène *Epas1* codant pour un facteur de réponse à l'hypoxie (*Epas1* aussi appelé HIF2 α) (**Figure 19**). Ces mutations, pour la plupart faux sens pourraient aboutir à une différence de fonction de la voie de réponse à l'hypoxie chez les animaux 129S2SvPas. De façon intéressante on sait que *Epas1* contrôle l'expression des gènes de la voie du VEGF, en particulier du VEGFA³⁹⁹.

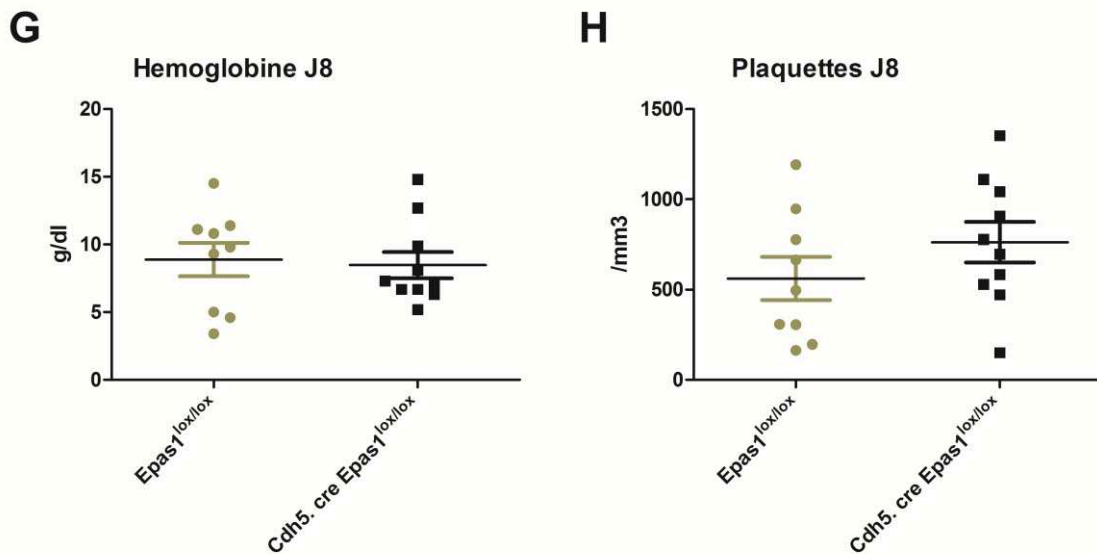
	Uploaded Variation	Allele	Gene	Position in protein	Consequence	Amino acid	Co-located Variation
1	17_87204681_T/C	C	ENSMUSG00000024140	122	SYNONYMOUS_CODING	T	rs45844322
2	17_87208768_G/A	A	ENSMUSG00000024140	175	SYNONYMOUS_CODING	T	rs33645844
3	17_87208824_T/G	G	ENSMUSG00000024140	-	SPLICE_SITE,INTRONIC	-	rs33202557
4	17_87224986_T/C	C	ENSMUSG00000024140	439	NON_SYNONYMOUS_CODING	V/A	rs33122370
5	17_87224988_T/G	G	ENSMUSG00000024140	440	NON_SYNONYMOUS_CODING	S/A	rs33556579
6	17_87225058_A/G	G	ENSMUSG00000024140	463	NON_SYNONYMOUS_CODING	D/G	rs49708917
7	17_87227173_A/G	G	ENSMUSG00000024140	631	SYNONYMOUS_CODING	G	rs33116264
8	17_87228252_C/G	G	ENSMUSG00000024140	-	INTRONIC	-	rs33580130
9	17_87228731_G/A	A	ENSMUSG00000024140	794	NON_SYNONYMOUS_CODING	S/N	rs46127650

FIGURE 19: VARIANTES GÉNÉTIQUES AU SEIN DU GÈNE EPAS1 CHEZ LA SOURIS COMPARANT LA SOUCHE C57BL6J ET 129S2SVPAS (RESULTATS DU DR MESNARD)

Les systèmes du VEGF et de la réponse à l'hypoxie étant étroitement liés, nous avons donc voulu mettre en évidence le rôle de *Epas1* dans l'endothélium (où il est majoritairement exprimé) par une méthode d'inactivation génétique tissu-spécifique. L'objectif étant de déterminer si sa délétion reproduisait les lésions de MAT dans le modèle anti-MBG.

Délétion endothéliale de *Epas1*: modèle anti-MBG





Nous avons donc induit un modèle anti-MBG passif (12 μ L/g de sérum néphrotoxique en 3 injections (J0, J1, J2)) à des souris femelles âgées de 10-12 semaines ayant une délétion endothéliale de *Epas1* et nous les avons comparé à leurs contrôles. Ces derniers sont constitués d'animaux n'ayant pas la délétion EPAS1 mais issues des mêmes portées. Le sacrifice des souris s'est effectué à J8 et non à J9 du fait de la mortalité précoce observée dans cette expérience.

La délétion endothéliale de *Epas1* est obtenue chez les souris *Cdh5. cre Epas1^{lox/lox}*. L'absence d'*Epas* au sein de l'endothélium ne modifie pas de façon significative les paramètres fonctionnels et histopathologiques induits par le modèle anti-MBG. En effet, ni la mortalité per-procédure (A), ni la fonction rénale (évaluée par l'urée plasmatique) (B), ni la protéinurie (C) apparaissent significativement différentes entre les deux groupes. Les lésions histologiques tubulo-intersitiales (D) ainsi que les lésions glomérulaires évaluées par le nombre de croissants extracellulaires (E) tout comme le nombre de dépôts de fibrine intraglomérulaires (F) sont similaires entre les deux groupes. Enfin, la mesure de l'hémoglobine (G) et du nombre de plaquettes (H) dosé à la fin de l'expérience ne décelent pas de différence significative en terme d'anémie hémolytique. Un signe biologique de micro-angiopathie thrombotique.

Nous concluons donc à l'absence d'effet significatif de la délétion de *Epas1* endothéliale dans le modèle anti-MBG chez la souris.

Epas1 endothélial a par ailleurs été montré comme jouant un rôle protecteur dans les modèles d'ischémie-reperfusion et d'obstruction urétérale chez la souris. HIF-1 α endothélial semble avoir un rôle aggravant sur les lésions glomérulaires induites par perfusion continue d'angiotensine II.

L'hypertension artérielle et l'augmentation des niveaux plasmatiques d'angiotensine II aboutissent à des phénomènes d'hypoxie locale et à une agression endothéliale. Dans cette situation le rôle d'Epas1 endothéliale n'est pas élucidé. Cette partie du travail s'attache à étudier le rôle d'Epas1 dans le modèle de glomérulopathie hypertensive.

JASN

Endothelial Epas1 deficiency is sufficient to promote parietal epithelial cell activation and FSGS in experimental hypertension

Journal:	<i>Journal of the American Society of Nephrology</i>
Manuscript ID	JASN-2016-09-0960
Manuscript Type:	Original Article - Basic Research
Date Submitted by the Author:	09-Sep-2016
Complete List of Authors:	<p>Luque, Yosu; Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Urgences Néphrologiques et Transplantation Rénale, Hôpital Tenon; INSERM, UMR_S1155; UPMC</p> <p>Lenoir, Olivia; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Paris Cardiovascular Center - PARCC; Université Paris Descartes</p> <p>Bonnin, Philippe; Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Service de Physiologie, Hôpital Lariboisière; Université Paris Diderot UFR de Médecine Site Xavier-Bichat; INSERM, U965</p> <p>Hardy, Lise; INSERM, UMR_S1155</p> <p>Chipont, Anna; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Paris Cardiovascular Center</p> <p>Placier, Sandrine; Inserm, UMRS_1155</p> <p>Vandermeersch, Sophie; INSERM, UMR_S1155</p> <p>Xu-Dubois, Yi-Chun; Inserm, UMRS_1155</p> <p>Souyri, Michèle; INSERM, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis; Université Paris Diderot</p> <p>baudrie, Veronique; INSERM, Paris Cardiovascular Centre - PARCC</p> <p>Rondeau, Eric; Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Urgences Néphrologiques et Transplantation rénale, Hôpital Tenon; UPMC; INSERM, UMR_S1155</p> <p>Mesnard, Laurent; Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Urgences Néphrologiques et Transplantation rénale, Hôpital Tenon; Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06; INSERM, UMR_S1155</p> <p>Tharaux, Pierre-Louis; INSERM, Paris Cardiovascular Centre - PARCC; Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris Cardiovascular Centre - PARCC; Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Division of Nephrology, Hôpital Européen Georges Pompidou</p>
Keywords:	endothelial cells, focal segmental glomerulosclerosis, glomerular endothelial cells, glomerular epithelial cells, hypertension, Pathophysiology of Renal Disease and Progression

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review



8th September 2016

Dear Editors of the JASN,

We would be grateful if you would consider the above manuscript for publication in the *Journal of the American Society of Nephrology*. These data could represent a significant shift in our understanding of the interaction between the endothelium and glomerular epithelial cells in hypertensive condition.

As well known by the readership of the *JASN*, focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) is the most common primary glomerular disorder causing end-stage renal disease. FSGS is still a complex, only partially understood disease. A unifying pathophysiological concept has not been identified and might not even exist. Besides the loss of podocytes, progressive sclerosis caused by glomerular parietal epithelial cells (PECs) represents a hallmark of FSGS. FSGS lesions are often observed in some hypertensive patients but the mechanisms associating high blood pressure and glomerular lesions are still elusive.

We studied the role of the endothelial PAS domain protein 1, a regulatory α subunit of the Hypoxia Inducible Factor complex, during angiotensin II-induced hypertensive nephropathy. We infused angiotensin II to mice with endothelial-selective *Epas1* deficiency and their littermate controls for 42 days. The glomerular endothelial cell is not typically considered to play a major role in the development of FSGS. However, while both groups presented identical high blood pressure we found that endothelial EPAS1 response could be a key factor linking endothelial injury and glomerular epithelial cell pathogenic phenotype switch. Whereas wild-type mice displayed classic angiosclerosis and glomerulosclerosis with mesangial deposition of fibronectin and few CD44 expressing PECs, mice with endothelial-specific *Epas1* deficiency exhibited *de novo* CD44 expression in PECs, PEC to glomerular tuft bridges and extensive fibronectin deposition in these FSGS lesions.

Beyond the widespread accentuation of the renal capillary rarefaction that endothelial-specific *Epas1* deficiency caused, these results indicate that endothelial EPAS1 strongly influences the type of glomerular injury induced by Ang II.



Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Overall, our results show that the EPAS1/HIF2 α pathway is intimately involved in the maintenance of the renal capillary network in glomeruli and the interstitium. It also has critical regulatory functions for the homeostasis of *non-endothelial* cells in glomeruli supporting proof of principle that endothelial-derived signal can trigger FSGS. This also suggests that endothelial EPAS1 dysfunction could be a susceptibility factor for hypertension-associated FSGS lesions and CKD progression with endothelial EPAS1 functional variants or interacting pathways being potential key modifiers to understand secondary FSGS-lesions. We trust this would be of interest to your readership, shedding new light on one of the commonest causes of kidney disease in the world.

On behalf of all co-authors and myself, thank you for considering our manuscript.

Sincerely,

Pierre-Louis Tharaux, MD, PhD

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Endothelial *Epas1* deficiency is sufficient to promote parietal epithelial cell activation and FSGS in experimental hypertension

Yosu Luque^{1,2,3*}, Olivia Lenoir^{4,5*}, Philippe Bonnin^{6,7}, Lise Hardy², Anna Chipont^{4,5}, Sandrine Placier², Sophie Vandermeersch², Yi-chun Xu-Dubois^{1,2}, Michèle Souyri^{8,9}, Véronique Baudrie⁴, Eric Camerer^{4,5}, Eric Rondeau^{1,2,3}, Laurent Mesnard^{1,2,3}, Pierre-Louis Tharaux^{4,5,10}

(1) Urgences Néphrologiques et Transplantation Rénale, Hôpital Tenon, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

(2) UMR_S1155, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Paris, France

(3) University Pierre and Marie Curie, France

(4) Paris Cardiovascular Center - PARCC, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Paris, France.

(5) Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

(6) Hôpital Lariboisière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

(7) U965, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Paris, France

(8) Institut Universitaire d'Hématologie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Paris, France

(9) Université Paris Diderot, Sorbonne-Paris-Cité, Paris, France

(10) Renal Division, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

* YL and OL contributed equally to this work

Abstract word count: 246

Main body word count: 5269

Correspondence to: Dr Pierre-Louis Tharaux, Paris Cardiovascular Center - PARCC, 56 rue Leblanc, Paris, France. E-mail: pierre-louis.tharaux@inserm.fr Phone: +33 1 89 50 29 48. Fax: +33 1 53 98 79 53

Abstract

Focal segmental glomerulosclerosis is the most common primary glomerular disorder causing end-stage renal disease. It is still a complex, only partially understood disease. Progressive sclerosis represents a hallmark of focal segmental glomerulosclerosis. Genetic tracing studies showed that parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions. The loss of podocytes triggers a focal activation of parietal epithelial cells, which subsequently form cellular adhesions with the capillary tuft. Meanwhile, in the absence of intrinsic podocyte alteration, the origin of the pathogenic signal that could trigger parietal epithelial cells recruitment is elusive.

We studied the role of the endothelial PAS domain protein 1, a regulatory α subunit of the Hypoxia Inducible Factor complex, during angiotensin II-induced hypertensive nephropathy. We infused angiotensin II to endothelial-selective *Epas1* knock-out mice and their littermate controls. Although both groups presented identical high blood pressures, endothelial-specific *Epas1* gene deletion accentuated albuminuria with severe podocyte lesions and recruitment of pathogenic parietal glomerular epithelial cells. These lesions and dysfunction of the glomerular filtration barrier were associated with focal and segmental glomerulosclerosis in endothelial *Epas1* deficient mice only.

In conclusion, our study indicates that endothelial EPAS1 plays a global protective role during glomerular hypertensive injuries. EPAS1 does not influence the hypertensive effect of angiotensin II. However, endothelial *Epas1* gene deficiency promoted focal segmental glomerulosclerosis, supporting proof of principle that endothelial-derived signal can trigger FSGS. These results illustrate the potential importance of the *Epas1* endothelial transcription factor as a new element for understanding secondary focal segmental glomerulosclerosis.

Introduction

Hypertension is one of the most common causes of renal complications and hypertensive nephropathy is second only to diabetes as a leading cause of progressive chronic kidney disease (CKD). According to the 2011 US Renal Data System (USRDS) data, in the year 2009, hypertensive nephrosclerosis accounted for 28% of patients reaching end-stage renal disease (ESRD). Hypertensive nephrosclerosis is reportedly the second most common cause of ESRD in white people (23%) and is the leading cause of ESRD in black people (46%) although; a large contribution of apolipoprotein L1 (APOL1) and other pathogenic variants is involved in the latter case¹. During hypertension, the role of angiotensin II (Ang II) in promoting progression of glomerular disease with altered glomerular filtration barrier, podocytes loss and sclerotic scarring of glomeruli is well established². Interestingly, chronic infusion of Ang II to mice provokes arterio-nephrosclerosis, with pathology in the terminal branches of the interlobular arteries, together with global glomerulosclerosis without focal segmental glomerulosclerosis (FSGS)³⁻⁵.

Glomerular hypertension results in glomerular capillary stretching, endothelial damage and elevated glomerular protein filtration causing glomerular collapse and/or focal segmental glomerulosclerosis^{2,6-8}. Moreover, the endothelium itself is a main player in the pathophysiology of hypertensive CKD, as it plays a main role in the regulation of vascular tone, inflammatory cells recruitment, delivery of oxygen to surrounding cells and tissue repair. Hypoxia-response pathway activation has been shown recently to play a main role in the pathophysiology of acute kidney injury and CKD. Furthermore, several studies correlate cortical hypoxia measured by magnetic resonance imaging^{9,10} and activation of hypoxia response genes with CKD in humans¹¹. Besides, loss of peri-tubular capillaries¹² and activation of hypoxic responses are a common feature found in many kidney diseases and in experimental models of CKD¹³. During hypertension, the induction of vasoconstrictors¹⁴, the increased oxygen consumption due to elevated sodium transport¹⁵ and Ang II-induced oxydative stress^{16,17} result in lower renal oxygenation¹⁸, thus suggesting that the hypoxia inducible factor (HIF) pathway could play a role in hypertensive nephropathy.

HIF is a heterodimeric transcription factor composed of an oxygen-sensitive α subunit and a constitutively expressed β -subunit (also referred as aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator subunit, ARNT)¹⁹. Both subunits belong to a family of basic helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim

1
2
3 (bHLH-PAS) transcriptional factors. Under normoxic conditions, the proline residues of HIF- α
4 are hydroxylated by prolyl hydroxylases (PHDs), which triggers recruitment of the von Hippel-
5 Lindau (pVHL) protein, leading HIF- α to undergo ubiquitination and rapid proteasomal
6 degradation. Under hypoxia, PHDs are inactivated and HIF- α forms a complex with HIF- β and
7 translocate to the nucleus binding to hypoxia response elements in regulatory regions of the target
8 genes²⁰. HIF activates the transcription of a variety of genes promoting erythropoiesis,
9 angiogenesis, glycolysis and cell survival²¹. To date three isoforms of HIF have been reported,
10 HIF-1, HIF-2 (also known as epithelial cells and endothelial PAS domain-containing protein 1
11 (EPAS1)) and HIF-3. HIF-2 α and HIF-3 α appear to be expressed in a cell-specific manner, when
12 compared with the ubiquitously expressed HIF-1 α . In the kidney, HIF-1 α is induced by hypoxia
13 mainly in tubular epithelial cells while EPAS1 is expressed essentially in the endothelial cells, in
14 particular in the glomerular endothelium^{22,23}, as well as in interstitial fibroblasts and podocytes²⁴.
15 The expression and function of HIF-3 remain largely elusive²⁵. Increased expression of HIF-1 α
16 and EPAS1 were found in both acute and chronic kidney injury^{20,26}.

17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29 Interestingly, recent studies showed that HIF-1 α levels are elevated in kidneys of patients with
30 hypertensive CKD and Ang II-treated mice^{27,28}. In particular, one recent study showed that Ang
31 II induced endothelial HIF-1 α in mice *via* NF κ B and aggravated hypertension-induced
32 glomerular lesions²⁹. Regarding EPAS1, recent studies showed that endothelial EPAS1, and not
33 HIF-1 α , confers protection during ischemic acute kidney injury and ischemia induced oxydative
34 stress in mice³⁰⁻³². In humans, EPAS1 single nucleotide polymorphisms have demonstrated an
35 association with performance-related blood parameters (e.g., alterations in erythropoietin,
36 hemoglobin and hematocrit), adaptation to high altitude³³⁻³⁵ and elite endurance performance³⁶.
37 However, the role of EPAS1 in the pathogenesis of renal diseases is not completely elucidated.

38
39
40
41
42
43
44
45
46 Here, we hypothesized that endothelial EPAS1 could drive protection against Ang II-induced
47 hypertension and glomerular injury leading to CKD. To understand the role of endothelial
48 EPAS1 during hypertensive nephropathy, we used a genetic approach to abrogate EPAS1 from
49 endothelial cells in Ang II-induced hypertension in mice. We found that endothelial EPAS1
50 protects from glomerular injury induced by chronic hypertension. We also observed that
51 endothelial EPAS1 abrogation aggravates podocyte and parietal epithelial cell (PEC) injury in a
52 blood pressure-independent manner and impairs renal local vasoreactivity to Ang II. Our study
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 suggests that endothelial EPAS1 dysfunction could be a susceptibility factor for hypertension-
4 associated FSGS lesions and CKD progression.
5
6
7
8
9

10 Results

11 Endothelial-specific deletion of *Epas1* does not modify blood pressure, kidney structure and 12 function 13 14 15 16

17 To determine the role of endothelial EPAS1 during hypertensive CKD, we generated endothelial-
18 specific *Epas1* knock-out mice by mating *Epas1*-floxed mice (*Epas1*^{lox/lox})³⁷ with mice expressing
19 Cre recombinase under the control of the VE-cadherin promoter *Cdh5*³⁸ (**Figure 1A**).
20 Characterization of *Cdh5*.Cre activity in glomerular endothelial cells *in vivo* was previously
21 described³⁹. RT-PCR analysis on isolated glomeruli and lung extracts from *Cdh5*.Cre-*Epas1*^{lox/lox}
22 showed a significant reduction in *Epas1* mRNA expression when compared with control animals
23 (*Epas1*^{lox/lox}) (**Figure 1B and C**), thus demonstrating efficient endothelial *Epas1* deletion in
24 *Cdh5*.Cre-*Epas1*^{lox/lox} mice. To note, other cell populations in the lungs and glomeruli may
25 express EPAS1^{40,41}, thus explaining that *Epas1* mRNA is still present in lungs and glomeruli
26 from *Cdh5*.Cre-*Epas1*^{lox/lox} mice. Similarly, we confirmed endothelial EPAS1 deficiency by
27 western blotting on isolated glomeruli (**Figure 1D and E**). *Cdh5*.Cre-*Epas1*^{lox/lox} mice were born
28 at a Mendelian ratio and were indiscernible from their *Epas1*^{lox/lox} control littermates regarding
29 weight and size, up to 40 weeks of age. Moreover, adult *Cdh5*.Cre-*Epas1*^{lox/lox} mice had normal
30 cardiac and renal function and normal blood pressure (**Figure 3A-H and Supplementary Table**
31 **1**) when compared with control *Epas1*^{lox/lox} littermates. These results showed that endothelial
32 EPAS1 is dispensable for mouse development and renal and cardiac function at basal state.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 As endothelial EPAS1 has been previously associated with altered vasoreactivity and local
47 hypertension in the lung⁴², we then investigated the role of endothelial EPAS1 in renal vascular
48 response to vasoconstrictors and vasodilators. For that purpose, we administered intravenous
49 bolus of vasoconstrictors (norepinephrine, Ang II) and vasodilators (acetylcholine and sodium
50 nitroprusside) to *Cdh5*.Cre-*Epas1*^{lox/lox} mice and their control littermates. Of note, at basal state
51 we did not observe any difference between *Cdh5*.Cre-*Epas1*^{lox/lox} mice and controls in mean
52 arterial pressure (**Figure 2A**), renal artery blood flow (**Figure 2C**) and renal vascular resistance
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 (Figure 2E). Interestingly, vasoconstrictor-induced hypertension and vasodilator-induced
4 hypotension were similar in both groups (Figure 2B). However, endothelial *Epas1* deficiency
5 was associated with a marked decrease in renal vascular response to Ang II in *Cdh5.Cre-*
6 *Epas1*^{lox/lox} mice when compared to that in their control littermates (Figure 2D and F). Indeed,
7 *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice renal blood flow and renal vascular resistance were less decreased
8 after Ang II bolus than in controls. We did not observe a significant difference in renal artery
9 vasoreactivity when using norepinephrin or vasodilators, thus suggesting that endothelial *Epas1*
10 abrogation induces a specific altered response to Ang II. Taken together these results suggest that
11 EPAS1 functionally influences the renal endothelium in normal mice and is involved in the
12 vasoconstriction response to Ang II in the kidney.
13
14
15
16
17
18
19
20

21
22 We then examined the effect of endothelial EPAS1 deficiency during hypertension. To this end,
23 Ang II was infused in *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice and *Epas1*^{lox/lox} control littermates for 6 weeks.
24 Interestingly, EPAS1 expression was upregulated in glomeruli from *Epas1*^{lox/lox} mice after 6
25 weeks of chronic Ang II infusion, while EPAS1 induction was less important in *Cdh5.Cre-*
26 *Epas1*^{lox/lox} hypertensive mice (Figure 1D and E), thus suggesting that EPAS1 is, at least partly,
27 overexpressed by glomerular endothelial cells upon hypertensive stimuli.
28
29
30
31
32
33
34
35

36 Endothelial *Epas1* deletion aggravates Ang II-induced albuminuria in a blood pressure 37 independent manner. 38

39
40 In both groups, Ang II infusion induced a similar gradual increase of systolic and diastolic blood
41 pressure (Figure 3A and B). Importantly, heart rate, cardiac function and cardiac parameters
42 were similar between the two groups. Ang II-associated interventricular septum hypertrophy and
43 decrease of cardiac output were observed in both groups after 6 weeks of Ang II infusion (Figure
44 3C, G and H and Supplementary Table 1). After 6 weeks of Ang II infusion, when compared
45 to hypertensive controls, the selective *Epas1* endothelial deletion was associated with a
46 significantly increase in albuminuria-to-creatinine ratio (Figure 3E) and kidney hypertrophy
47 estimated by kidney-to-body weight ratio (Figure 3F) while the renal function, as estimated by
48 blood urea nitrogen levels, was similarly altered between the two groups (Figure 3D).
49 Interestingly, albuminuria-to-creatinine ratio was significantly increased in *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox}
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 mice as early as 7 days of Ang II infusion (**Supplementary Figure S1**), prior to the development
4 of histological damage. Dysfunction of the glomerular filtration barrier was associated with a
5 similar increase in glomerular surface (**Figure 3I**) and nephron number (not shown) in both
6 groups. Taken together, these results demonstrated that EPAS1 protects the glomerular filtration
7 barrier integrity during Ang II-induced hypertension.
8
9
10
11
12
13
14

15 **Deletion of *Epas1* specifically in endothelial cells favors hypertension-induced** 16 **glomerulosclerosis.** 17

18
19 We then performed histological analysis of kidneys from hypertensive *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice
20 and *Epas1^{lox/lox}* hypertensive littermates. As expected, 6 weeks of Ang II infusion revealed the
21 presence of common hypertensive lesions in all renal compartments such as interstitial
22 inflammatory infiltrates (**Supplementary Figure S2**), glomerulosclerosis (**Figure 4A, B and D**)
23 and tubular dilation (**Figure 4F**). Hypertension-induced fibrosis was determined by red Sirius
24 staining (**Figure 4C and E**) and collagen IV interstitial and perivascular deposition
25 (**Supplementary Figure S3**). Extra-glomerular renal compartments were similarly affected in
26 both hypertensive groups. Interestingly, *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice demonstrated more severe
27 glomerular injury with glomerular sclerotic lesions increased two- to three-fold compared to
28 hypertensive *Epas1^{lox/lox}* mice (**Figure 4A, B and D**). Particularly, *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}*
29 hypertensive mice displayed glomerular podocyte-parietal epithelial cell bridges and focal and
30 segmental glomerulosclerosis (FSGS) that were rarely observed in hypertensive *Epas1^{lox/lox}*
31 controls (**Figure 4A and B**). These results indicate that endothelial EPAS1 strongly influences
32 the type of glomerular injury induced by Ang II.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 **Endothelial EPAS1 deficiency promotes hypertension-induced endothelial damage.** 50

51 The endothelium plays a key role in the glomerular filtration barrier and endothelial intercellular
52 junctions modulate glomerular permeability. We observed that endothelial *Epas1* abrogation was
53 associated with decreased CD31/PECAM-1 protein expression in glomeruli (**Figure 5A**) from
54 hypertensive *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice when compared to hypertensive control littermates.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Furthermore, hypertension-associated capillary rarefaction in the tubular interstitium was more
4 pronounced in *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice than in *Epas1^{lox/lox}* mice (**Figure 5B and C**).
5 Interestingly, ultrastructural analyses revealed more severe endothelial alterations, as shown by
6 the loss of fenestrations, cytoplasmic thickening and vacuolizations, in hypertensive *Cdh5.Cre-*
7 *Epas1^{lox/lox}* mice than in hypertensive controls (**Figure 5D**) confirming increased endothelial
8 injury in glomeruli with an endothelial *Epas1* deficiency. Thus, endothelial EPAS1 promotes
9 renal endothelial survival during hypertensive nephropathy.
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19 **Endothelial *Epas1* deletion accentuates podocyte dedifferentiation and loss, glomerular**
20 **PEC activation and extracellular matrix deposition mimicking FSGS lesions during Ang II-**
21 **induced hypertension.**
22
23

24
25 We then investigated the role of endothelial EPAS1 in podocyte and PEC structure and
26 phenotype after Ang II infusion. Immunofluorescence showed that the abundance of the slit
27 diaphragm proteins, NPHS2/podocin and NPHS1/nephrin and of PODXL/podocalyxin, were
28 strongly reduced in glomeruli from hypertensive *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice, while the expression
29 of these proteins was only slightly decreased in hypertensive control mice when compared to
30 non-hypertensive mice (**Figure 6A**). Ultrastructural observations revealed a more intense
31 podocyte foot process broadening and effacement in hypertensive *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}*
32 glomeruli (**Figure 6B, C**). Finally, TEM observations also showed that *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}*
33 hypertensive glomeruli displayed more glomerular podocyte-PEC bridges and FSGS than
34 hypertensive controls (**Figure 6D**).
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 Interestingly, endothelial *Epas1* deletion also specifically affected glomerular PEC during
45 hypertensive CKD. We observed in the FSGS lesions, an increased activation of PEC in
46 glomeruli from hypertensive *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice when compared to hypertensive controls,
47 as measured by CD44 immunohistochemistry (**Figure 7A, D**). CD44 induction was associated
48 with down-regulation of claudin-1 expression in activated PEC, which were surrounded by
49 fibronectin extracellular matrix deposition (**Figure 7A and Supplementary Figure S4**). Two
50 distinct fibronectin deposition patterns were observed after Ang II-induced hypertension. First,
51 basal mesangial fibronectin staining was expanded after Ang II infusion in every group, and that
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 increase was more intense in *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} hypertensive mice than in hypertensive
4 controls (**Figure 7A, B**). Second, we observed a different fibronectin peripheral deposition
5 pattern following the parietal layer of the Bowman's capsule associated with CD44 expression
6 and FSGS lesions. This latter pattern was significantly more frequently observed in glomeruli
7 from *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} hypertensive mice than in hypertensive controls (**Figure 7A-D**).
8 Altogether, these data suggest that endothelial EPAS1 deficiency exhibits global disturbance of
9 the glomerular cells homeostasis, promoting hypertension-associated secondary FSGS.
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19 Discussion

20
21 In the present study, we used a genetic approach to elucidate the role of endothelial EPAS1
22 during Ang II-induced hypertensive nephropathy. This model shows that endothelial EPAS1
23 mediates glomerular protection against hypertensive injury and Ang II elevated levels without
24 any effect observed on systemic blood pressure. We further found that endothelium-specific
25 EPAS1 abrogation aggravated not only hypertension-induced endothelial injury but also
26 glomerular epithelial damage leading to FSGS lesions.
27
28
29
30
31
32

33 Hypertension is the second leading cause of ESRD in the USA after diabetes and is also
34 consequence of CKD progression⁴³. Hypertensive nephrosclerosis is a common disorder
35 associated with hypertension. However, independently to blood pressure levels many studies
36 show that individual susceptibility, as *APOL1* gene variants⁴⁴, is involved in the diversity of the
37 kidney lesions observed. Hypertensive nephrosclerosis is characterized by vascular, glomerular,
38 and tubulointerstitial lesions⁴⁵. Glomerular lesions are composed of both global and focal
39 glomerular sclerosis^{46,47}. Global sclerosis is thought to be related to ischemic injury and focal
40 lesions are classically associated to hyperfiltration due to nephron loss^{48,49} and to a rise in intra-
41 capillary pressure^{46,50}. However, local glomerular factors promoting or protecting from
42 glomerular injury during hypertension are poorly understood. In the glomeruli there is a close
43 interaction between endothelial cells and epithelial cells (podocytes and parietal cells) only
44 separated by the glomerular basement membrane. Some local factors such as VEGF pathway,
45 endothelin-1 or nitric oxide has been showed to represent key mediators in epithelio-endothelial
46 crosstalk into the glomeruli^{2,51,52}. Hypoxia is a key mediator in CKD progression and is induced
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 by hypertension and particularly by Ang II elevated levels^{27,29}. Meanwhile, it is likely that the
4 glomerular endothelium is not hypoxic and that other pathways are involved in the constitutive
5 endothelial EPAS1 expression^{22,23}.
6
7

8
9 The protective role of endothelial EPAS1 during acute ischemic kidney injury has been suggested
10 to be linked to an anti-inflammatory effect as EPAS1 deficiency was associated with increased
11 adhesion molecule expression and leukocyte recruitment³². Nevertheless, even if aggravated
12 endothelial injury and decreased PECAM1 expression was observed in the hypertensive
13 *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice, we did not observe any significant difference in the recruitment of
14 macrophages and T cells or in interstitial fibrosis suggesting a local glomerular role of
15 endothelial EPAS1 deficiency (not shown).
16
17
18
19
20
21

22
23 Our data support a role for EPAS1 in the endothelial protection against hypertensive kidney
24 injury. Interestingly, this protection does not act through an effect on blood pressure. Recent
25 conflicting studies showed that EPAS1 deficiency is a key factor promoting or limiting
26 pulmonary arterial hypertension in adult mice^{42,53}. In one report, it was suggested that pulmonary
27 hypertension developed following lung edema secondary to increased capillary permeability⁵³.
28 We found no evidence of renal edema as measured by histology and as also suggested by normal
29 renal vascular resistance in the *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice. In another report, endothelial EPAS1
30 deficiency sensitized mice to hypoxia-induced pulmonary hypertension, likely *via* increased
31 expression of vasoconstrictor molecule endothelin 1 and a concomitant decrease in vasodilatory
32 apelin receptor signaling⁴². These data may not be applicable to the renal microcirculation as we
33 rather measured blunted vasoconstrictive acute response to AngII in the kidney. Moreover,
34 telemetry measurements of blood pressure and hemodynamic ultrasound studies showed that
35 chronic elevation of blood pressure and Ang II-induced cardiac hypertrophy are not affected by
36 endothelial EPAS1 deficiency.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 However, peri-tubular capillary rarefaction is aggravated in *Epas1*-deleted hypertensive mice and
49 consistently renal blood flow is diminished, indicating a crucial role of the EPAS1 pathway in the
50 maintenance of the renal microcirculation, in glomeruli and in the interstitium under AngII-
51 induced stress condition. This may be consistent with a defect of angiogenic signals produced by
52 EPAS1/HIF-2 α -deficient endothelial cells in these setting. For example, Skuli et al. found that
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 hypoxic induction of the Dll4/Notch pathway target gene expression was blunted in by EPAS1-
4 deficient cultured endothelial cells⁵⁴.
5
6

7
8 One of the main finding of our study is that EPAS1 deficiency in endothelial cells not only
9 accentuated glomerular injury and proteinuria but also caused a different kind of glomerular
10 damage in hypertensive mice. Focal segmental glomerulosclerosis is still a complex, only
11 partially understood disease. A unifying pathophysiological concept has not been identified and
12 might not even exist. Elegant genetic tracing studies showed that parietal epithelial cells
13 participate in the formation of sclerotic lesions⁵⁵. Here we showed that endothelial EPAS1
14 response could be a key factor linking endothelial injury and epithelial glomerular cell activation.
15 Whereas wild-type mice displayed classic angiosclerosis and glomerulosclerosis with mesangial
16 deposition of fibronectin and few CD44 expressing PECs, endothelial-specific *Epas1* deleted
17 mice exhibited *de novo* CD44 expression in PECs, PEC to glomerular tuft bridges and extensive
18 fibronectin deposition in these FSGS lesions. FSGS lesions are often observed in some
19 hypertensive patients but the mechanisms associating high blood pressure and glomerular lesions
20 are still elusive. The glomerular endothelial cell is not typically considered to play a major role in
21 the development of FSGS. At early stages, even in glomeruli with extensive foot process
22 effacement, endothelial injury is not prominent. However, at later stages of disease, often
23 associated with hyalinosis and sclerosis, endothelial injury becomes more obvious, but is usually
24 considered a secondary phenomenon. The mechanisms leading to endothelial injury in FSGS are
25 not well defined. Endothelial derived factors may contribute to podocyte injury. It should also be
26 recognized that diseases that cause primary glomerular endothelium injury such as thrombotic
27 microangiopathy or ANCA associated vasculitis can lead to segmental thrombosis or glomerular
28 injury with the development of fibrotic segmental lesions with features that fulfill the criteria for
29 FSGS⁵⁶⁻⁵⁸. This serves to highlight that FSGS is a morphological pattern of injury that can be
30 derived from a diverse range of initiating insults and on different glomerular cell types.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 Three main mechanistic hypotheses may explain our results. First, endothelial EPAS1 could have
50 a direct effect on endothelial vasoreactivity and modulate glomerular pressure. Mechanical stress
51 is believed to play a role in the progression of FSGS^{46,59}. This hyperfiltration results in
52 hypertrophy of glomeruli. The hypertrophy exacerbates the mismatch between the glomerular
53 basement membrane and the decreased numbers of podocytes, resulting in further mechanical
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 stress and injury. We could rule out a difference in nephrons number between the two groups (not
4 shown). Interestingly, hemodynamic studies unraveled an impaired vasoconstrictive response of
5 the renal circulation after Ang II bolus injection suggesting that endothelial EPAS1 modulates
6 local but not systemic vasoreactivity. If such altered capability to increase the renal vascular
7 resistances would affect the pre-glomerular circulation, one could speculate that the glomerular
8 capillaries would then be exposed to higher hydrostatic pressure, a risk factor for podocyte
9 mechanical stress and shedding leading to secondary FSGS. Unfortunately, we could not measure
10 single nephron glomerular filtration rate and the glomerular capillary pressure in our mice. This
11 hypothesis may be consistent with the significant early increase in albuminuria in the *Cdh5.Cre-*
12 *Epas1*^{lox/lox} group at day 7 after AngII infusion, prior to the development of histopathological
13 damage. However *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice did not displayed increased glomerular area
14 compared to controls that would have otherwise suggested difference in capillary pressure, which
15 support a non-hemodynamic role for endothelial EPAS1 in glomerular protection. For example,
16 endothelial EPAS1 deficiency may impair defense against AngII-induced endothelial
17 dysfunction, promoting loss of endothelial permselectivity and dysfunction of the glomerular
18 filtration barrier. Likewise, endothelial EPAS1 has been previously associated with intercellular
19 junction integrity⁶⁰ and vascular permeability⁵³ in the lung. In fact, EPAS1 deficiency
20 accentuated AngII-induced capillary rarefaction not only in glomeruli but also in the interstitium
21 of the kidney cortex. This finding suggests that EPAS1-driven control of interstitial changes in
22 the renal specimen may have contributed to progression of global kidney disease in addition to
23 glomerular features. Finally, we cannot exclude that EPAS1 abrogation-induced endothelial
24 dysfunction may influence secretion of endothelial-secreted factors acting on epithelial
25 glomerular cells causing podocyte injury and recruitment of pathogenic fibrogenic PECs.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 In conclusion, the murine Ang II-induced hypertension developed in this study revealed a
46 protective role of endothelial EPAS1 maintaining glomerular integrity during the hypertensive
47 chronic insult. Interestingly, endothelial *Epas1* gene deficiency promoted podocyte damage and
48 parietal epithelial cells activation and segmental sclerosis, supporting proof of principle that
49 endothelial-derived signal can trigger FSGS. This also suggests that endothelial EPAS1
50 dysfunction could be a susceptibility factor for hypertension-associated FSGS lesions and CKD
51 progression with endothelial *Epas1* functional variants or interacting pathways being potential
52 key modifiers to understand secondary FSGS-lesions.
53
54
55
56
57
58
59
60

Concise Methods

Animals

Mice with an endothelial-specific disruption of the *Epas1* gene (*Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}*) were generated by crossing *Cdh5.Cre* mice³⁸ with *Epas1^{lox/lox}* mice³⁷. Mice were bred on C57Bl/6J genetic background. Littermates *Epas1^{lox/lox}* mice with no *Cre* gene were used as controls in all studies. Characterization of *Cdh5.Cre* activity in glomerular endothelial cells *in vivo* was previously described, showing a Cre efficiency of around 70% in endothelial microvascular cells^{37,39}. Experiments were conducted according to the French veterinary guidelines and those formulated by the European Community for experimental animal use (L358-86/609EEC), and were approved by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and local University Research Ethics Committee (file 12-62, Comité d’Ethique en matière d’Expérimentation Animale, Paris Descartes). Mice were submitted to sanitary control tests to ensure proper pathogen-free status and were housed in the same animal facility before any experiments.

Angiotensin II - induced hypertension

Hypertensive model was induced by subcutaneous infusion of Ang II (Sigma-Aldrich) at a dose of 1 µg/kg/min for 42 days *via* osmotic minipumps (Model2006, Alzet Corp) in 12-to-14 weeks-old males. Pumps were implanted subcutaneously on the back between the shoulder blades and hips. Control mice were sham operated. Mice received salt supplementation (3%) in food and were sacrificed 6 weeks after the minipumps implantation.

Telemetry blood pressure measurement

Mice were anesthetized with isoflurane and a blood pressure telemeter (model TA11PA□C10; Data Sciences International) was implanted in the left femoral artery. A single dose of amoxicillin (20 mg/kg i.p., Clamoxyl; SmithKlineBeecham) and ketoprofen (5mg/kg i.p., Profenid; Aventis) was administered after the surgery. Mice were adapted for 1 week, and blood pressure values from the last three days of the adaptation period were averaged to define the basal blood pressure. The morning of day 1, Ang II filled osmotic mini□pumps (Alzet Corp) were implanted subcutaneously as described.

Assessment of renal function and albuminuria

Blood urea nitrogen concentrations were quantified spectrophotometrically by colorimetric methods. Urinary albumin excretion was measured with a specific ELISA assay (BIOTREND Chemikalien GmbH).

Histopathology and immunohistochemistry

Kidneys were immersed in 10% formalin and embedded in paraffin. Sections (4- μ m thick) were processed for histopathology study or immunohistochemistry. Sections were stained with hematoxylin/eosin, Masson's trichrome or Sirius red. For immunohistochemistry, paraffin-embedded sections were stained with the following primary antibodies: rat anti-PECAM1 (Dianova, 1:50), rat anti-CD44 (Abcam, 1:100), rabbit anti-CLAUDIN-1 (Abcam, 1:50), rabbit anti-FIBRONECTIN (Dako, 1:1000), rabbit anti-CD3 (Dako, 1:200), rat anti-F4/80 (AbD Serotec, 1:500), rabbit anti-COL4A (Abcam, 1:), goat anti-PODXL (R&D Systems, 1:500), goat anti-NPHS2 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100) and goat anti-NPHS1 (R&D Systems, 1:200), CD3, F4/80, CD44, COL4A and FIBRONECTIN staining were revealed by Histofine® reagent (Nichirei Biosciences). For immunofluorescence, the following secondary antibodies were used: rabbit anti-goat IgG AF594-conjugated antibody (1:400), donkey anti-rat AF594-conjugated (1:400) and donkey anti-rat IgG AF488-conjugated antibody (1:500), all from Invitrogen. The nuclei were stained with DAPI. Photomicrographs were taken with an Axiophot Zeiss photomicroscope.

ImageJ software (NIH) was used for assessment of capillary area, FIBRONECTIN deposition in glomeruli, glomerular area and Sirius red staining.

The proportion of sclerotic glomeruli, CD44 and FIBRONECTIN positive glomeruli was evaluated by examination of at least 50 glomeruli per cortical section for each mouse, by an examiner (Y.L.) who was blinded to the experimental conditions. Sclerotic glomeruli were defined as glomeruli with focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS)-like lesions including podocyte-parietal epithelial cells (PEC) cell bridges evaluated on kidney sections stained by Masson's trichrome. The proportion of tubular casts was measured on kidney sections stained with Masson's trichrome evaluating at least 5 mice per condition.

1
2
3 Glomerular mean surface was evaluated on Masson's trichrome stained kidney sections by
4 examination of at least 30 glomeruli per animal for at least 5 different animals per condition.
5
6

7 8 **Isolation of glomeruli**

9
10 Decapsulated glomeruli were isolated as described previously⁶¹. Briefly, freshly isolated renal
11 cortex was mixed and digested by collagenase I (2mg/mL, Gibco) in RPMI 1640
12 (Lifetechnologies) for 2 min at 37°C, then collagenase I was inactivated with RPMI 1640 + 10%
13 FCS (Abcys). Tissues were then passed through 70µm cell strainer and 40µm cell strainer (BD
14 falcon) in PBS (Lifetechnologies) + 0,5% BSA (Euromedex). Glomeruli, adherent to the 40µm
15 cell strainer, were taken off from the cell strainer with PBS + 0,5% BSA injected under pressure,
16 then washed twice in PBS. Isolated glomeruli were then picked up in RIPA extraction buffer
17 containing phosphatase and proteinase inhibitors (Roche) and freezed at -80°C for protein
18 extraction or picked up in RLT extraction buffer (Qiagen) and freezed at -80°C for total RNA
19 extraction.
20
21
22
23
24
25
26
27

28 29 **Western blot analyses**

30
31 Equal amounts of proteins were loaded onto sodium dodecyl sulfate -PAGE NuPAGE 4/12%
32 electrophoresis gels (Invitrogen) under reducing conditions for separation and transferred onto
33 poly(vinylidenedifluoride) membranes. The membranes were blocked with milk and probed with
34 different antibodies: EPAS1 (Novus Biological, 1:500) and GAPDH (Sigma Aldrich, 1:50000).
35 The membranes were then probed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies
36 (Amersham, 1:5000) and the bands were detected by enhanced chemiluminescence (ECL)-plus
37 (Amersham). PXi (Syngen) imaging system was used to reveal bands and densitometric analysis
38 was used for quantification.
39
40
41
42
43
44
45

46 47 **Quantitative RT-PCR**

48
49 Total RNA extraction of mice glomeruli and lung tissue was performed using an Rneasy Microkit
50 (Qiagen) and reverse transcribed using the Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen)
51 according to the manufacturer's protocol. The Maxima SYBR Green/Rox qPCR mix
52 (Thermoscientific Fermentas) was used to amplify cDNA for 40 cycles on an ABI PRISM
53 thermo cycler. The comparative method of relative quantification (2- $\Delta\Delta$ CT) was used to
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 calculate the expression level of each target gene, normalized to *Ppia*. The oligonucleotide
4 sequences are available upon request. The data are presented as the fold change in gene
5 expression.
6
7

8 9 **Electron microscopy**

10 Small pieces of renal cortex were fixed in trump's fixative (EMS) and embedded in Araldite M
11 (Sigma Aldrich). Ultrathin sections were counter-stained with uranyl acetate and lead citrate and
12 examined with a transmission electron microscope (JEM, JEOL 1011).
13
14
15
16

17 18 **Noninvasive ultrasound study of cardiac and renal hemodynamics**

19
20 Cardiac output, cardiac morphometry parameters and renal hemodynamics at basal state and after
21 Ang II chronic infusion were obtained by noninvasive ultrasound technique as previously
22 described⁶². The same *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* and control mice were evaluated before Ang II
23 treatment and at day 35 after Ang II infusion initiation. Ultrasound examination was carried out
24 under light anesthesia, such that mice could be restrained without ligature. Isoflurane (2.5%
25 isoflurane in ambient air) was administered through a vaporizer (model 100-F; Ohio Medical
26 Instruments). Isoflurane induction was performed by over a 2-minute period in an isolation
27 chamber and anesthesia was maintained by spontaneous breathing of the same mixture at a flow
28 rate of 5 l/min through a small nose cone. We used an echocardiograph (Acuson S3000;
29 Siemens®) equipped with a 14MHz linear transducer (14L5 SP). After sedation, the mice were
30 shaved to improve probe contact. The mouse was placed in the left lateral decubitus position and
31 the ultrasound device placed on the anterior part of the chest for cardiac output acquisition. The
32 mouse was laid on a heating blanket (38°C) to avoid hypothermia induced by anesthesia affecting
33 cardiac function and heart rate.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 *Measurement of cardiac parameters and cardiac output (CO).*

46
47 A parasternal long-axis B-mode image of the chest allowed measurement of the pulmonary artery
48 diameter. The imaging depth was set at 1.5 to 2 cm, and frame rate was 60 frames/s. Blood flow
49 velocity (BFV) were measured with correction of the angle between the long axis of the
50 pulmonary artery and the Doppler beam. The steering mode of the Doppler beam helped to avoid
51 having to use an angle correction greater than 10°. CO was calculated with the following
52 formula: $CO = [(V_{mean} \times 60)(p \times (Dpa/2)^2)]$, where CO is expressed in ml/min, *Vmean* is the
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 time-averaged mean BFV in cm/s, and Dpa is the pulmonary artery diameter in cm. Heart
4 dimensions measured in both systole (s) and diastole (d) were left ventricular posterior wall
5 thickness (LVPW), left ventricular internal diameter (LVD), and interventricular septum
6 thickness (IVS). Heart rates were obtained with an electrocardiogram.
7
8
9

10 *Measurements of kidney size and BFV in renal arteries.*

11
12 Two-dimensional ultrasound imaging was used to measure kidney size. A left sided longitudinal
13 B-mode image of the abdomen showed the aorta between the two renal arteries, allowing
14 measurements of the width and the height of the right and left kidneys; the transducer was
15 slightly displaced from one kidney to the other. Imaging depth was set at 2 to 3 cm. Color
16 Doppler mode was activated and the renal arteries were drawn and localized on the screen by
17 their color-coded blood flow. Time-averaged mean BFV was calculated by the echograph after
18 placing calipers at the beginning of a systolic peak to 5 to 10 following once. All BFVs were
19 measured with correction of the angle between the long axis of each vessel and the Doppler
20 beam.
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 **Renal hemodynamics, renal vasoreactivity experiments**

31
32 Experiments were performed on 2 months-old males $Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}$ and $Epas1^{lox/lox}$ mice.
33 Animal surgery and renal blood flow (RBF) measurements were performed according to
34 previously established methodology⁶³. Briefly, after anesthesia by pentobarbital sodium (50–60
35 mg/kg body weight ip, Nembutal), animals were placed on a servo-controlled table kept at 37°C.
36 The left femoral artery was catheterized for measurement of arterial pressure, and a femoral
37 venous catheter was used for infusion of volume replacement. Bovine serum albumin (4.75 g/dl
38 of saline solution) was infused initially at 50 μ l/min to replace surgical losses, and then at 10
39 μ l/min for maintenance. Arterial pressure was measured via a pressure transducer (Statham P23
40 DB); RBF was measured by a flowmeter (0.5v probe, Transonic systems TS420). RBF values
41 were controlled for zero offset determined at the end of an experiment after cardiac arrest. Data
42 were recorded, stored and analyzed using DataTranslation analog-to-digital converter and the
43 IOX software (EMKA Technologies). RBF and blood pressure were measured at basal state and
44 during intravenous bolus injections of angiotensin II (0.5, 1 and 2 ng) (Sigma Aldrich),
45 norepinephrine (2, 4 and 10 ng) (Sigma Aldrich), acetylcholine (1, 5 and 25 ng) (Sigma Aldrich)
46 and sodium nitroprusside (100 and 200 ng) (Sigma Aldrich). Maximum changes in arterial
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 pressure, RBF, and RVR produced by vasoconstrictors and vasodilators compared to the basal
4 state of each mouse were recorded.
5
6

7 **Statistical analyses**

8
9
10 Data are expressed as mean +/- SEM. Statistical analyses were calculated with the Prism software
11 (GraphPad). Comparison between 2 groups was performed with a 2-tailed Student *t* test.
12 Comparisons between multiple groups were performed with one-way ANOVA followed by
13 Newman-Keuls test. A P value < 0.05 was considered statistically significant.
14
15
16

17 **Acknowledgments**

18
19
20 This study was supported by Inserm, the “VASCULOPHAGY” grant from the Fondation de
21 France and the “SWITCHES” project from the Agence Nationale de la Recherche (to P-L.T.).
22 Y.L. is a recipient of Fonds d'Etudes et de Recherche du Corps Médical (Assistance Publique des
23 Hôpitaux de Paris, Paris, France), Société Française de Bienfaisance et d'Enseignement de San
24 Sebastian-Donostia (Spain) and Société de Néphrologie grants. O.L held post-doctoral
25 fellowships from Société Francophone de Diabète (SFD) and the Institut de France “Lefoulon-
26 Delalande fellowship”. We thank Elizabeth Huc and the ERI970 team for assistance in animal
27 care and handling. We thank Véronique Oberweiss, Annette De Rueda, Martine Autran, Bruno
28 Pillard and Philippe Coudol for administrative support. We thank Alain Schmitt from Plateforme
29 de Microscopie Electronique de l'Institut Cochin for transmission electronic microscopy
30 microphotograph acquisition.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 **Disclosure**

42
43 The authors declare no competing financial interests.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Freedman BI, Sedor JR: Hypertension-associated kidney disease: perhaps no more. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 19: 2047–2051, 2008
2. Huby A-C, Rastaldi M-P, Caron K, Smithies O, Dussaule J-C, Chatziantoniou C: Restoration of podocyte structure and improvement of chronic renal disease in transgenic mice overexpressing renin. *PLoS One* 4: e6721, 2009
3. Strupler M, Hernest M, Fligny C, Martin J-L, Tharaux P-L, Schanne-Klein M-C: Second harmonic microscopy to quantify renal interstitial fibrosis and arterial remodeling. *J. Biomed. Opt.* 13: 054041, 2008
4. Crowley SD, Song Y-S, Sprung G, Griffiths R, Sparks M, Yan M, Burchette JL, Howell DN, Lin EE, Okeiyi B, Stegbauer J, Yang Y, Tharaux P-L, Ruiz P: A role for angiotensin II type 1 receptors on bone marrow-derived cells in the pathogenesis of angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 55: 99–108, 2010
5. Crowley SD, Frey CW, Gould SK, Griffiths R, Ruiz P, Burchette JL, Howell DN, Makhanova N, Yan M, Kim H-S, Tharaux P-L, Coffman TM: Stimulation of lymphocyte responses by angiotensin II promotes kidney injury in hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 295: F515–524, 2008
6. Nijenhuis T, Sloan AJ, Hoenderop JGJ, Flesche J, van Goor H, Kistler AD, Bakker M, Bindels RJM, de Boer RA, Möller CC, Hamming I, Navis G, Wetzels JFM, Berden JHM, Reiser J, Faul C, van der Vlag J: Angiotensin II contributes to podocyte injury by increasing TRPC6 expression via an NFAT-mediated positive feedback signaling pathway. *Am. J. Pathol.* 179: 1719–1732, 2011
7. Casare FAM, Thieme K, Costa-Pessoa JM, Rossoni LV, Couto GK, Fernandes FB, Casarini DE, Oliveira-Souza M: Renovascular remodeling and renal injury after extended angiotensin II infusion. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 310: F1295–1307, 2016
8. Rennke HG, Klein PS: Pathogenesis and significance of nonprimary focal and segmental glomerulosclerosis. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 13: 443–456, 1989
9. Inoue T, Kozawa E, Okada H, Inukai K, Watanabe S, Kikuta T, Watanabe Y, Takenaka T, Katayama S, Tanaka J, Suzuki H: Noninvasive evaluation of kidney hypoxia and fibrosis using magnetic resonance imaging. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 1429–1434, 2011
10. Yin W-J, Liu F, Li X-M, Yang L, Zhao S, Huang Z-X, Huang Y-Q, Liu R-B: Noninvasive evaluation of renal oxygenation in diabetic nephropathy by BOLD-MRI. *Eur. J. Radiol.* 81: 1426–1431, 2012
11. Rudnicki M, Perco P, Enrich J, Eder S, Heining D, Bernthaler A, Wiesinger M, Sarközi R, Noppert S-J, Schramek H, Mayer B, Oberbauer R, Mayer G: Hypoxia response and VEGF-A expression in human proximal tubular epithelial cells in stable and progressive renal disease. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 89: 337–346, 2009

12. Kang D-H, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschki D, Schreiner GF, Johnson RJ: Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 13: 806–816, 2002
13. Eckardt K-U, Bernhardt WM, Weidemann A, Warnecke C, Rosenberger C, Wiesener MS, Willam C: Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Kidney Int. Suppl.* S46–51, 2005
14. Johnson RJ, Feig DI, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Rodriguez-Iturbe B: Pathogenesis of essential hypertension: historical paradigms and modern insights. *J. Hypertens.* 26: 381–391, 2008
15. Welch WJ, Baumgärtl H, Lübbers D, Wilcox CS: Renal oxygenation defects in the spontaneously hypertensive rat: role of AT1 receptors. *Kidney Int.* 63: 202–208, 2003
16. Welch WJ, Mendonca M, Aslam S, Wilcox CS: Roles of oxidative stress and AT1 receptors in renal hemodynamics and oxygenation in the postclipped 2K,1C kidney. *Hypertension* 41: 692–696, 2003
17. Welch WJ, Blau J, Xie H, Chabrashvili T, Wilcox CS: Angiotensin-induced defects in renal oxygenation: role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288: H22–28, 2005
18. Adler S, Huang H: Impaired regulation of renal oxygen consumption in spontaneously hypertensive rats. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 13: 1788–1794, 2002
19. Gunaratnam L, Bonventre JV: HIF in kidney disease and development. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20: 1877–1887, 2009
20. Nangaku M, Rosenberger C, Heyman SN, Eckardt K-U: Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 40: 148–157, 2013
21. Schofield CJ, Ratcliffe PJ: Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 343–354, 2004
22. St John PL, Abrahamson DR: LacZ transgenic mice and immunoelectron microscopy: an ultrastructural method for dual localization of beta-galactosidase and horseradish peroxidase. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 55: 1207–1211, 2007
23. Steenhard BM, Freeburg PB, Isom K, Stroganova L, Borza D-B, Hudson BG, St John PL, Zelenchuk A, Abrahamson DR: Kidney development and gene expression in the HIF2alpha knockout mouse. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 236: 1115–1125, 2007
24. Rosenberger C, Mandriota S, Jürgensen JS, Wiesener MS, Hörstrup JH, Frei U, Ratcliffe PJ, Maxwell PH, Bachmann S, Eckardt K-U: Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 13: 1721–1732, 2002
25. Duan C: Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 310: C260–269, 2016
26. Tanaka T, Yamaguchi J, Shoji K, Nangaku M: Anthracycline inhibits recruitment of hypoxia-inducible transcription factors and suppresses tumor cell migration and cardiac angiogenic response in the host. *J. Biol. Chem.* 287: 34866–34882, 2012

- 1
2
3 27. Zhu Q, Wang Z, Xia M, Li P-L, Van Tassell BW, Abbate A, Dhaduk R, Li N: Silencing of hypoxia-
4 inducible factor-1 α gene attenuated angiotensin II-induced renal injury in Sprague-Dawley rats.
5 *Hypertension* 58: 657–664, 2011
6
- 7
8 28. Neusser MA, Lindenmeyer MT, Moll AG, Seeger S, Edenhofer I, Sen K, Stiehl DP, Kretzler M, Gröne
9 H-J, Schlöndorff D, Cohen CD: Human nephrosclerosis triggers a hypoxia-related glomerulopathy.
10 *Am. J. Pathol.* 176: 594–607, 2010
11
- 12
13 29. Luo R, Zhang W, Zhao C, Zhang Y, Wu H, Jin J, Zhang W, Grenz A, Eltzschig HK, Tao L, Kellems RE, Xia
14 Y: Elevated Endothelial Hypoxia-Inducible Factor-1 α Contributes to Glomerular Injury and Promotes
15 Hypertensive Chronic Kidney Disease. *Hypertension* 66: 75–84, 2015
16
- 17
18 30. Hill P, Shukla D, Tran MGB, Aragonés J, Cook HT, Carmeliet P, Maxwell PH: Inhibition of hypoxia
19 inducible factor hydroxylases protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc.*
20 *Nephrol. JASN* 19: 39–46, 2008
21
- 22
23 31. Kojima I, Tanaka T, Inagi R, Kato H, Yamashita T, Sakiyama A, Ohneda O, Takeda N, Sata M, Miyata
24 T, Fujita T, Nangaku M: Protective role of hypoxia-inducible factor-2 α against ischemic damage
25 and oxidative stress in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18: 1218–1226, 2007
26
- 27
28 32. Kapitsinou PP, Sano H, Michael M, Kobayashi H, Davidoff O, Bian A, Yao B, Zhang M-Z, Harris RC,
29 Duffy KJ, Erickson-Miller CL, Sutton TA, Haase VH: Endothelial HIF-2 mediates protection and
30 recovery from ischemic kidney injury. *J. Clin. Invest.* 124: 2396–2409, 2014
31
- 32
33 33. Beall CM, Cavalleri GL, Deng L, Elston RC, Gao Y, Knight J, Li C, Li JC, Liang Y, McCormack M,
34 Montgomery HE, Pan H, Robbins PA, Shianna KV, Tam SC, Tsering N, Veeramah KR, Wang W,
35 Wangdui P, Weale ME, Xu Y, Xu Z, Yang L, Zaman MJ, Zeng C, Zhang L, Zhang X, Zhaxi P, Zheng YT:
36 Natural selection on EPAS1 (HIF2 α) associated with low hemoglobin concentration in Tibetan
37 highlanders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 11459–11464, 2010
38
- 39
40 34. Gale DP, Harten SK, Reid CDL, Tuddenham EGD, Maxwell PH: Autosomal dominant erythrocytosis
41 and pulmonary arterial hypertension associated with an activating HIF2 α mutation. *Blood* 112:
42 919–921, 2008
43
- 44
45 35. Percy MJ: Familial erythrocytosis arising from a gain-of-function mutation in the HIF2A gene of the
46 oxygen sensing pathway. *Ulster Med. J.* 77: 86–88, 2008
47
- 48
49 36. Henderson J, Withford-Cave JM, Duffy DL, Cole SJ, Sawyer NA, Gulbin JP, Hahn A, Trent RJ, Yu B:
50 The EPAS1 gene influences the aerobic-anaerobic contribution in elite endurance athletes. *Hum.*
51 *Genet.* 118: 416–423, 2005
52
- 53
54 37. Gruber M, Hu C-J, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC: Acute postnatal ablation of Hif-2 α
55 results in anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 2301–2306, 2007
56
- 57
58 38. Oberlin E, El Hafny B, Petit-Cocault L, Souyri M: Definitive human and mouse hematopoiesis
59 originates from the embryonic endothelium: a new class of HSCs based on VE-cadherin expression.
60 *Int. J. Dev. Biol.* 54: 1165–1173, 2010

- 1
2
3 39. Lenoir O, Jasiek M, Hénique C, Guyonnet L, Hartleben B, Bork T, Chipont A, Flosseau K, Bensaada I,
4 Schmitt A, Massé J-M, Souyri M, Huber TB, Tharaux P-L: Endothelial cell and podocyte autophagy
5 synergistically protect from diabetes-induced glomerulosclerosis. *Autophagy* 11: 1130–1145, 2015
6
7
8 40. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y: A novel bHLH-PAS factor with
9 close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is
10 potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 4273–4278,
11 1997
12
13 41. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S,
14 Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt K-U: Widespread
15 hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.*
16 *Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17: 271–273, 2003
17
18
19 42. Kapitsinou PP, Rajendran G, Astleford L, Michael M, Schonfeld MP, Fields T, Shay S, French JL, West
20 J, Haase VH: The endothelial PHD2/HIF-2 axis regulates pulmonary artery pressure in mice. *Mol.*
21 *Cell. Biol.* 2016
22
23 43. Foley RN, Collins AJ: End-stage renal disease in the United States: an update from the United States
24 Renal Data System. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18: 2644–2648, 2007
25
26
27 44. Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, Lecordier L, Uzureau P, Freedman BI, Bowden DW, Langefeld
28 CD, Oleksyk TK, Uscinski Knob AL, Bernhardt AJ, Hicks PJ, Nelson GW, Vanhollebeke B, Winkler CA,
29 Kopp JB, Pays E, Pollak MR: Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in
30 African Americans. *Science* 329: 841–845, 2010
31
32 45. Freedman BI, Iskandar SS, Appel RG: The link between hypertension and nephrosclerosis. *Am. J.*
33 *Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 25: 207–221, 1995
34
35
36 46. Harvey JM, Howie AJ, Lee SJ, Newbold KM, Adu D, Michael J, Beevers DG: Renal biopsy findings in
37 hypertensive patients with proteinuria. *Lancet Lond. Engl.* 340: 1435–1436, 1992
38
39 47. Thadhani R, Pascual M, Nickleit V, Tolckoff-Rubin N, Colvin R: Preliminary description of focal
40 segmental glomerulosclerosis in patients with renovascular disease. *Lancet Lond. Engl.* 347: 231–
41 233, 1996
42
43 48. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K: Nephron number in patients with primary
44 hypertension. *N. Engl. J. Med.* 348: 101–108, 2003
45
46
47 49. Marcantoni C, Ma L-J, Federspiel C, Fogo AB: Hypertensive nephrosclerosis in African Americans
48 versus Caucasians. *Kidney Int.* 62: 172–180, 2002
49
50 50. Kriz W, Gretz N, Lemley KV: Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney*
51 *Int.* 54: 687–697, 1998
52
53 51. Ollero M, Sahali D: Inhibition of the VEGF signalling pathway and glomerular disorders. *Nephrol.*
54 *Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 2014
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 52. Ito S, Arima S, Ren YL, Juncos LA, Carretero OA: Endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide
4 modulates angiotensin II action in the isolated microperfused rabbit afferent but not efferent
5 arteriole. *J. Clin. Invest.* 91: 2012–2019, 1993
6
7
8 53. Skuli N, Liu L, Runge A, Wang T, Yuan L, Patel S, Iruela-Arispe L, Simon MC, Keith B: Endothelial
9 deletion of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) alters vascular function and tumor
10 angiogenesis. *Blood* 114: 469–477, 2009
11
12 54. Skuli N, Majmundar AJ, Krock BL, Mesquita RC, Mathew LK, Quinn ZL, Runge A, Liu L, Kim MN, Liang
13 J, Schenkel S, Yodh AG, Keith B, Simon MC: Endothelial HIF-2 α regulates murine pathological
14 angiogenesis and revascularization processes. *J. Clin. Invest.* 122: 1427–1443, 2012
15
16 55. Smeets B, Kuppe C, Sicking E-M, Fuss A, Jirak P, van Kuppevelt TH, Endlich K, Wetzels JFM, Gröne H-
17 J, Floege J, Moeller MJ: Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in
18 focal segmental glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 1262–1274, 2011
19
20 56. Noone DG, Twilt M, Hayes WN, Thorner PS, Benseler S, Laxer RM, Parekh RS, Hebert D: The new
21 histopathologic classification of ANCA-associated GN and its association with renal outcomes in
22 childhood. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 9: 1684–1691, 2014
23
24 57. Jefferson JA, Shankland SJ: The pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Adv. Chronic*
25 *Kidney Dis.* 21: 408–416, 2014
26
27 58. Berden AE, Ferrario F, Hagen EC, Jayne DR, Jennette JC, Joh K, Neumann I, Noël L-H, Pusey CD,
28 Waldherr R, Bruijn JA, Bajema IM: Histopathologic classification of ANCA-associated
29 glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 21: 1628–1636, 2010
30
31 59. Hostetter TH: Hyperfiltration and glomerulosclerosis. *Semin. Nephrol.* 23: 194–199, 2003
32
33 60. Gong H, Rehman J, Tang H, Wary K, Mittal M, Chaturvedi P, Zhao YY, Chatturvedi P, Zhao Y,
34 Komarova YA, Komorova YA, Vogel SM, Malik AB: HIF2 α signaling inhibits adherens junctional
35 disruption in acute lung injury. *J. Clin. Invest.* 125: 652–664, 2015
36
37 61. Henique C, Bollee G, Lenoir O, Dhaun N, Camus M, Chipont A, Flosseau K, Mandet C, Yamamoto M,
38 Karras A, Thervet E, Bruneval P, Nochy D, Mesnard L, Tharaux P-L: Nuclear Factor Erythroid 2-
39 Related Factor 2 Drives Podocyte-Specific Expression of Peroxisome Proliferator-Activated
40 Receptor γ Essential for Resistance to Crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 27: 172–188, 2016
41
42 62. Sabaa N, de Franceschi L, Bonnin P, Castier Y, Malpeli G, Debbabi H, Galaup A, Maier-Redelsperger
43 M, Vandermeersch S, Scarpa A, Janin A, Levy B, Girot R, Beuzard Y, Leboeuf C, Henri A, Germain S,
44 Dussaule J-C, Tharaux P-L: Endothelin receptor antagonism prevents hypoxia-induced mortality and
45 morbidity in a mouse model of sickle-cell disease. *J. Clin. Invest.* 118: 1924–1933, 2008
46
47 63. Boulous N, Helle F, Dussaule J-C, Placier S, Milliez P, Djudjaj S, Guerrot D, Joutel A, Ronco P, Boffa J-J,
48 Chatziantoniou C: Notch3 is essential for regulation of the renal vascular tone. *Hypertens. Dallas*
49 *Tex* 1979 57: 1176–1182, 2011
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure Legends

Figure 1: Generation of mice with a selective endothelial EPAS1 deficiency. (A) Schematic representation of the generation of mice with EPAS1-deficient endothelial cells obtained by mating mice expressing the CRE recombinase under the VE-cadherin promoter (*Cdh5.Cre* mice) with mice expressing *Epas1* alleles with loxP sites flanking exon (*Epas1^{lox/lox}* mice). (B) qPCR analysis of *Epas1* mRNA expression in glomeruli extracts from 12 weeks-old *Epas1^{lox/lox}* and *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice. Data represent means \pm SEM of 6 mice. # $p < 0.05$ (C) qPCR analysis of *Epas1* mRNA expression in lung extracts from 12 weeks-old *Epas1^{lox/lox}* and *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice. Data represent means \pm SEM from 6 mice. # $p < 0.05$ (D) Western blot analysis of EPAS1 expression in glomeruli isolated from 20 weeks-old *Epas1^{lox/lox}* and *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice treated or not with angiotensin II for 42 days. GAPDH is used as loading control. (E) Quantification of western blot bands for EPAS1 normalized to GAPDH band intensity (means \pm SEM of 3-6 mice per group). # $p < 0.05$, # different genotype same treatment.

Figure 2: Endothelial EPAS1 deficiency is associated with a blunted renal vascular response to angiotensin II with a similar hypertensive effect. (A) Mean arterial pressure, (C) renal blood flow and (E) renal vascular resistance at basal state in pentobarbital anesthetized 10-to-12 weeks-old *Epas1^{lox/lox}* and *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}*. Maximum changes in mean arterial pressure (B), renal blood flow (D), and renal vascular resistance (F) produced by 2, 4, or 10 ng of norepinephrine, 0.5, 1 or 2 ng of angiotensin II, 1, 5 or 25 ng of acetylcholine or 100 or 200 ng of sodium nitroprusside in 10-to-12 weeks-old *Epas1^{lox/lox}* and *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice. * ξ # $p < 0.05$, ** $\xi\xi$ ## $p < 0.01$, *** $\xi\xi\xi$ $p < 0.001$. * *Epas1^{lox/lox}* genotype compared to basal state, ξ *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* genotype compared to basal state, # different genotype same treatment.

Figure 3: Endothelial EPAS1 deficiency aggravates angiotensin II induced albuminuria in a blood pressure independent manner. (A) Systolic blood pressure, (B) diastolic blood pressure and (C) heart rate were recorded by radiotelemetry over 35 days in *Epas1^{lox/lox}* (n=5) and *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* (n=3) mice at baseline and under AngII subcutaneous infusion (1 μ g/kg/min). For all panels, data correspond to the 12-h night period mean \pm SEM. (D) Blood urea nitrogen (BUN) concentration, (E) urinary albumin excretion rate and (F) kidney to body weight ratio in 20 weeks-old *Epas1^{lox/lox}* and *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice after AngII infusion for 6

1
2
3 weeks and from untreated *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice. (G) Cardiac output
4 measured by noninvasive ultrasound method in *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice at
5 baseline and after 5 weeks of AngII subcutaneous infusion. (H) Heart to body weight ratio and (I)
6 glomerular mean surface in kidney cortex from 20 weeks-old *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-*
7 *Epas1*^{lox/lox} mice after 6 weeks of AngII infusion and from untreated *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-*
8 *Epas1*^{lox/lox} mice. Data represent mean \pm SEM of n=10-15 mice for D-H and of n=5 mice for I. #
9 * p<0.05, ## p<0.001, *** p<0.001, * same genotype different treatment, # different genotype
10 same treatment.
11
12
13
14
15
16
17

18 **Figure 4: Deletion of EPAS1 specifically in endothelial cells favors hypertension induced**
19 **glomerulosclerosis.** Representative images of (A) hematoxylin/eosin stained sections, (B)
20 Masson trichrome stained sections and (C) Sirius red staining of renal cortex from 20 weeks-old
21 *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice after 6 weeks of AngII infusion and from untreated
22 *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice. Images are representative of at least 6 mice per group.
23 Scale bar: 50 μ m. (D) Quantification of the percentage of sclerotic glomeruli, (E) the percentage
24 of cortical Sirius red staining and (F) the tubular casts per section in renal cortex from 20 weeks-
25 old *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice after 6 weeks of AngII infusion and from untreated
26 *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice. Data represent means \pm SEM of at least 6 mice. *
27 p<0.05, ** p<0.01, ### *** p<0.001, * same genotype different treatment, # different genotype
28 same treatment.
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **Figure 5: Endothelial EPAS1 deficiency promotes hypertension-induced endothelial**
39 **damage.** (A) Representative images of the expression of PECAM1 by immunofluorescence (red)
40 in glomeruli and (B) in renal cortex (white) in 20 weeks-old *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox}
41 mice after 6 weeks of AngII infusion and from untreated *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox}
42 mice. Nuclei in (A) were counterstained with DAPI stain (blue). Scale bar: 50 μ m. (C)
43 Quantification of PECAM1 staining in renal cortex from 20 weeks-old *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-*
44 *Epas1*^{lox/lox} mice after 6 weeks of AngII infusion and from untreated *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-*
45 *Epas1*^{lox/lox} mice. Data represent means \pm SEM of at least 5 mice per group. # p<0.05, ** p<0.01,
46 * same genotype different treatment, # different genotype same treatment. (D) Representative
47 photomicrographs of transmission electron microscopy sections of glomeruli from 20 weeks-old
48 *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice after 6 weeks of AngII infusion and from untreated
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice showing disappearance of endothelial fenestration,
4 sub-endothelial inclusions (*), aggravated endothelial swelling and cytoplasmic vacuolizations
5 (arrows) in endothelial cells from *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice after AngII infusion. Scale bar:
6 0.5µm. Images are representative of at least 6 mice.
7
8
9

10
11 **Figure 6: Endothelial EPAS1 deletion accelerates podocyte dedifferentiation, glomerular**
12 **parietal epithelial cell (PEC) activation and extracellular matrix deposition mimicking**
13 **FSGS lesions during angiotensin II-induced hypertension.** (A) Representative images of the
14 expression of NPHS2/podocin (white, upper panel), PODXL/podocalyxin (white, middle panel)
15 and NPHS1/nephrin (white, lower panel) by immunofluorescence in glomeruli from 20 weeks-
16 old *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice after 6 weeks of AngII infusion and from untreated
17 *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice. (B) Representative photomicrographs of transmission
18 electron microscopy sections of glomeruli showing cellular bridges between Bowman's capsule
19 and glomerular tuft (*) in *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice after 6 weeks of AngII infusion. Scale bar: 2
20 µm (C) Representative photomicrographs of transmission electron microscopy sections of
21 glomeruli showing foot process effacement (arrows) in *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice after 6 weeks
22 of AngII infusion. Scale bar: 0.5 µm. (D) Representative photomicrographs of transmission
23 electron microscopy sections of glomeruli showing cellular communication between parietal
24 epithelial cell (Pec) and podocyte (P) (*) in *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice after 6 weeks of AngII
25 infusion. Scale bar: 0.5 µm. Images are representative of at least 6 mice.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 **Figure 7: Endothelial EPAS1 deficiency promotes hypertension-induced podocyte and**
40 **glomerular parietal epithelial cell ultrastructural alterations.** (A) Representative images of
41 CD44 (brown, upper panel), and fibronectin (brown, lower panel) expression in glomeruli from
42 20 weeks-old *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice after 6 weeks of AngII infusion and
43 from untreated *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice showing increased PEC activation and
44 glomerular peripheral fibronectin deposition in *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} AngII mice. Scale bar: 50
45 µm. (B) Quantification of the percentage of fibronectin staining per glomerular area, (C) the
46 percentage of glomeruli with peripheric fibronectin staining and (D) the percentage of CD44
47 positive glomeruli in renal cortex from 20 weeks-old *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice
48 after 6 weeks of AngII infusion and from untreated *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Data represent means \pm SEM of at least 6 mice. # * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * same genotype different
4 treatment, # different genotype same treatment.
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Mice	<i>Epas1</i> ^{lox/lox}	<i>Cdh5.cre Epas1</i> ^{lox/lox}	<i>Epas1</i> ^{lox/lox}	<i>Cdh5.cre Epas1</i> ^{lox/lox}
Treatment	Control (n=9)	Control (n=7)	AngII (n=11)	AngII (n=9)
Body weight (g)	24.8 ± 3.1	26.2 ± 2.5	27.3 ± 4.6	26.7 ± 5.4
Fractional shortening (%)	28,8 ± 6.2	31,3 ± 8.3	22,3 ± 2.8	25,3 ± 6.7
IVSd (mm)	0.73 ± 0.10	0.84 ± 0.14	0.93 ± 0.10 ^b	1.00 ± 0.12 ^b
LVDd (mm)	4.59 ± 0.55	4.30 ± 0.26	4.48 ± 0.49	4.44 ± 0.60
LVPWd (mm)	0.67 ± 0.13	0.67 ± 0.08	0.78 ± 0.09	0.88 ± 0.10
IVSs (mm)	1.03 ± 0.21	1.14 ± 0.19 ^a	1.22 ± 0.18 ^b	1.31 ± 0.16 ^{b,c}
LVDs (mm)	3.36 ± 0.40	3.21 ± 0.29	3.49 ± 0.42	3.49 ± 0.64
LVPWs (mm)	0.97 ± 0.17	0.91 ± 0.12	1.04 ± 0.15	1.06 ± 0.16
Cardiac output (CO) (ml/min)	10,3 ± 0.7	10,2 ± 1.7	7,1 ± 1.1 ^b	7,3 ± 1.8 ^b
Renal mBFV /CO ratio	1,43 ± 0.3	1,44 ± 0.4	1,13 ± 0.7	0,84 ± 0.3 ^b

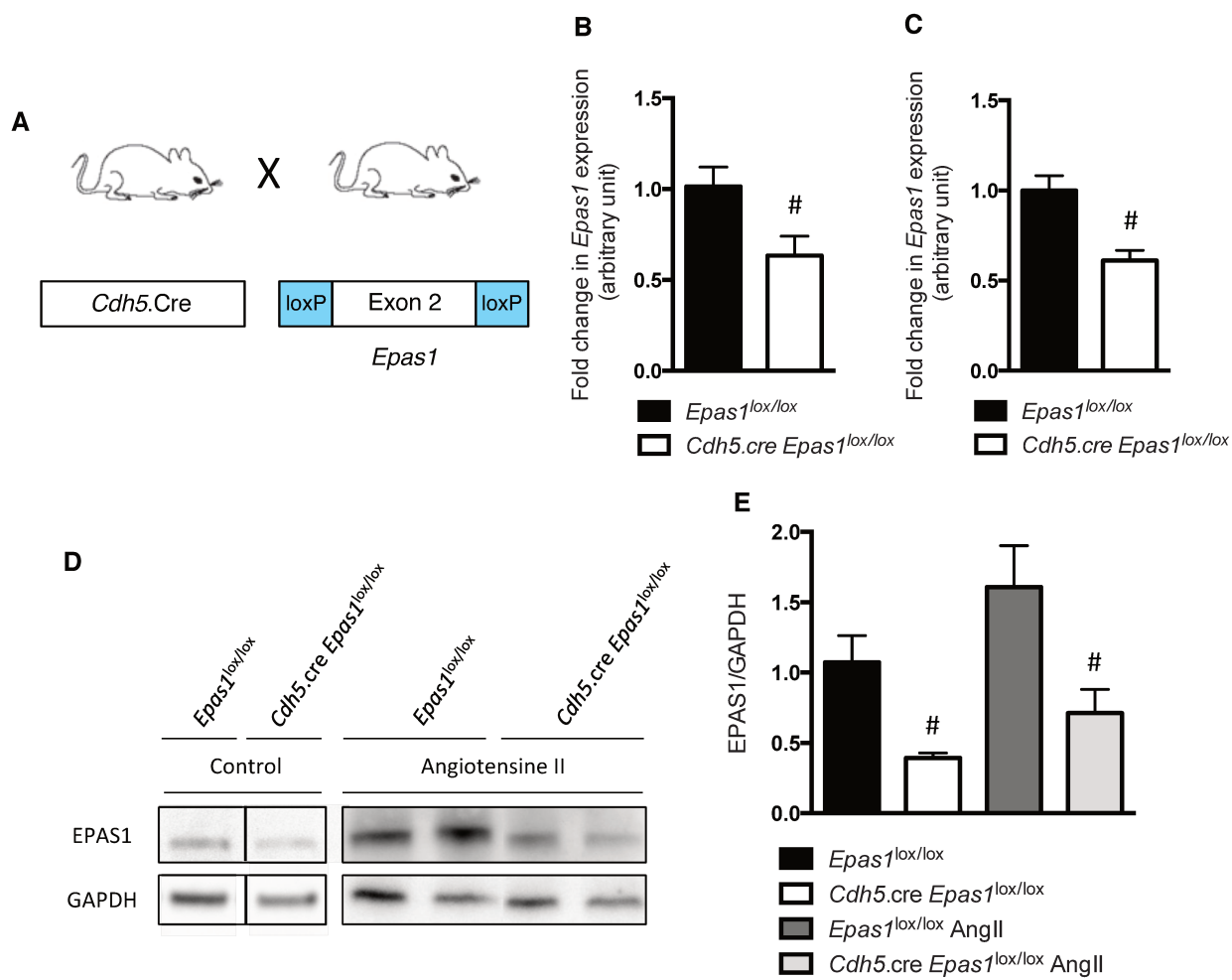
^a p<0.05 vs. *Epas1*^{lox/lox} control

^b p<0.05 vs. respective non hypertensive condition

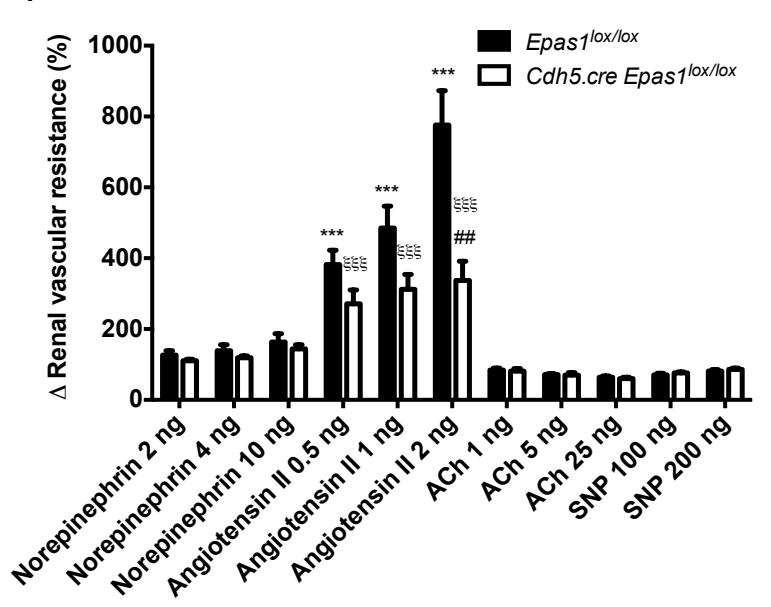
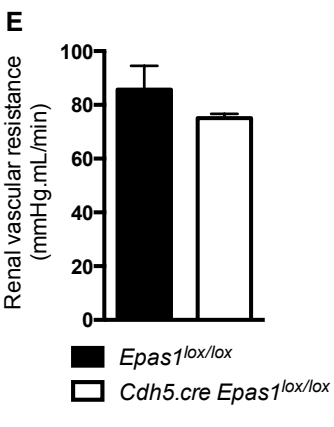
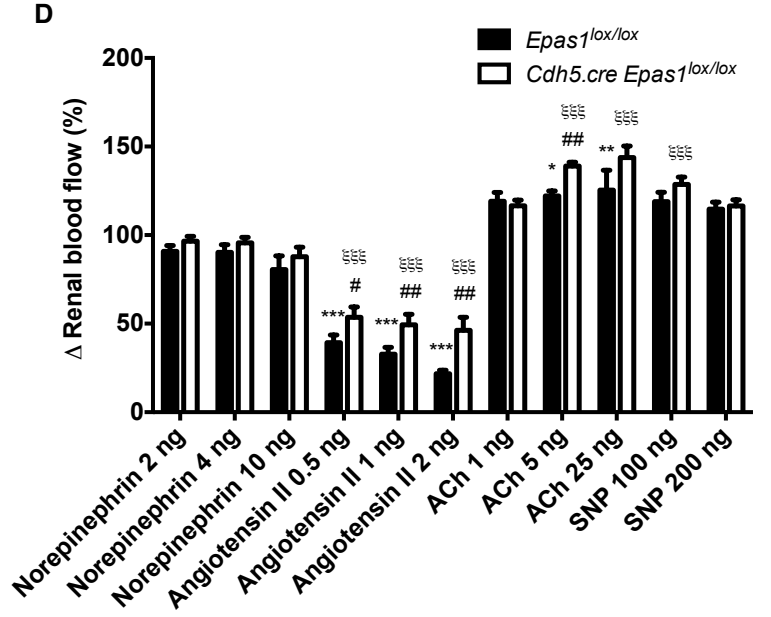
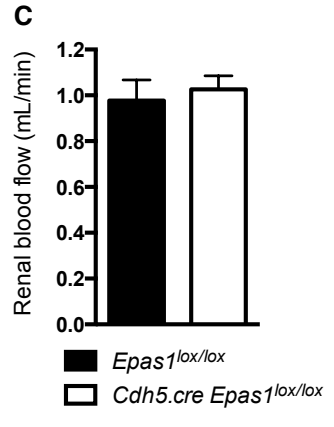
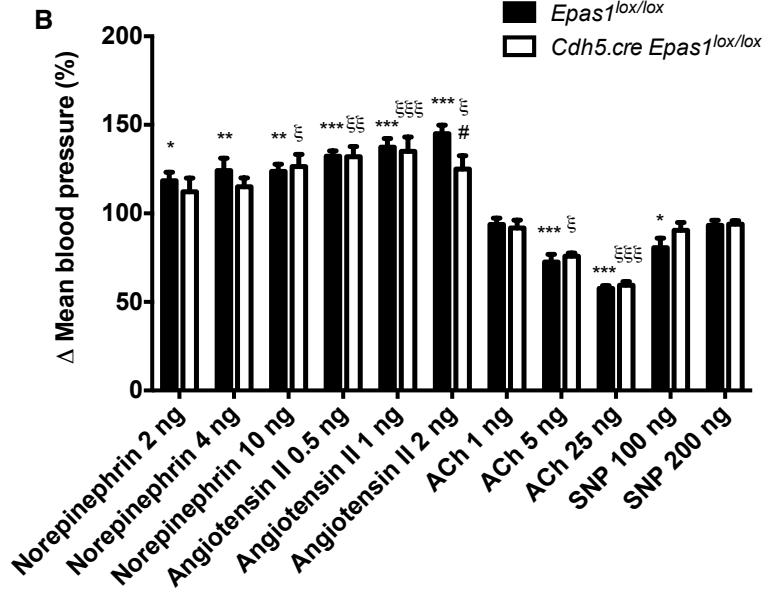
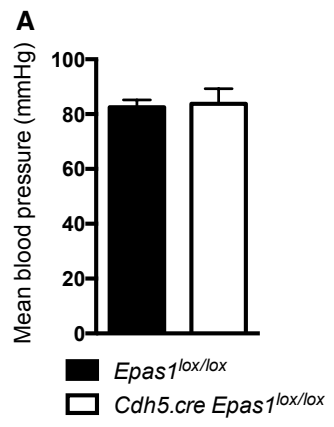
^c p<0.05 vs. *Epas1*^{lox/lox} AngII

Supplemental Table 1: Effects on cardiac and renal hemodynamic parameters of AngII chronic infusion in *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice. Noninvasive ultrasound studies of cardiac and renal hemodynamics were performed in untreated 10 weeks-old *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice and after 35 days of AngII infusion. Data represents means ± SEM of at least 7 mice from two independent experiments. *p<0.05, **p<0.01, * same genotype different treatment, #p<0.05, # different genotype same treatment.

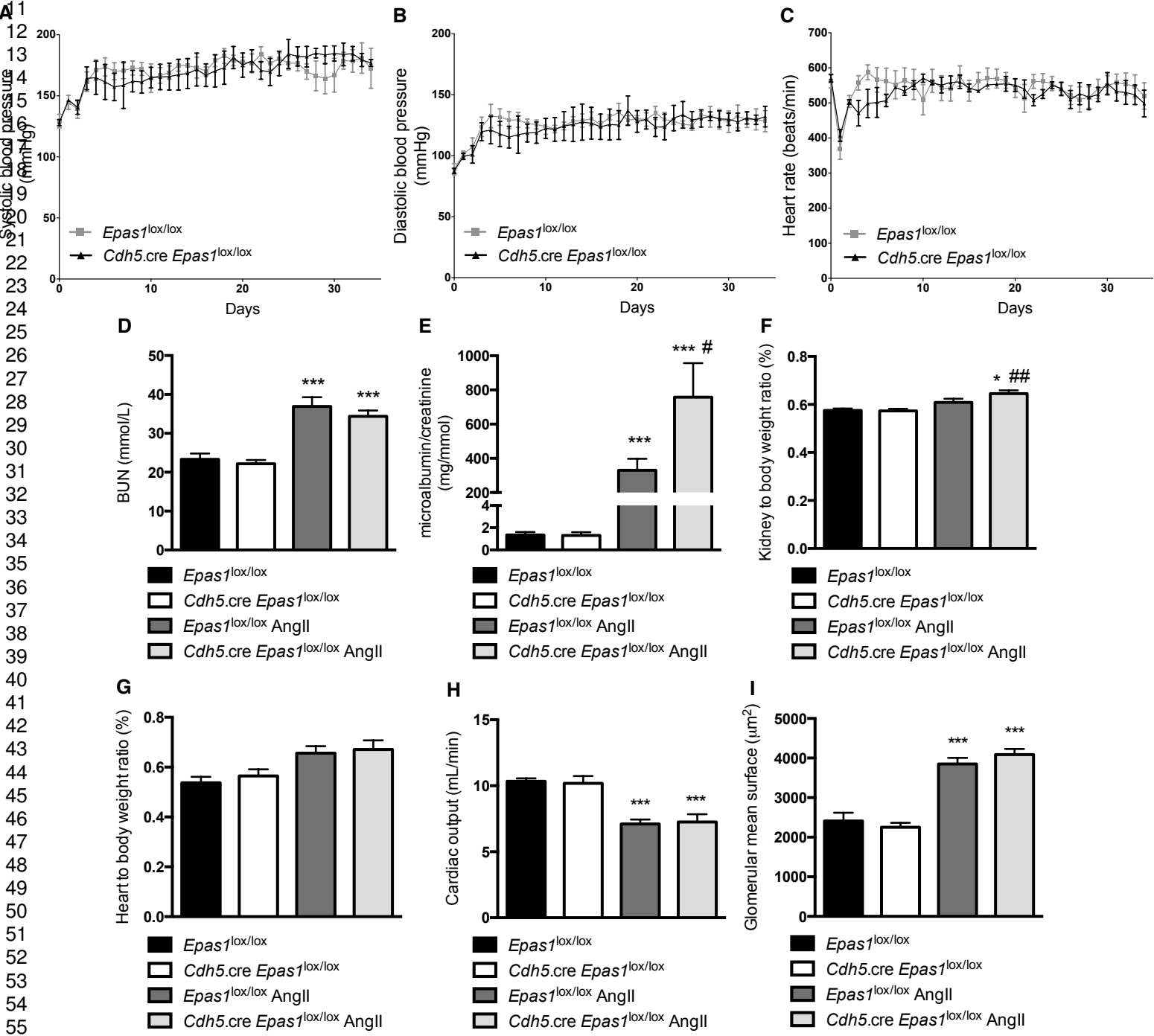
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



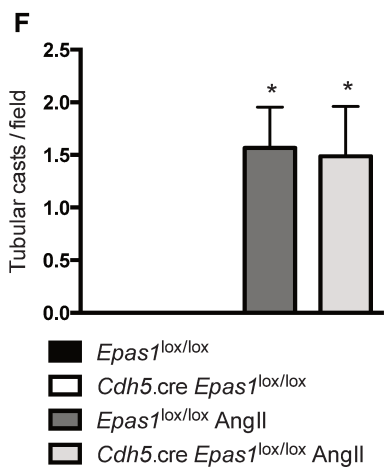
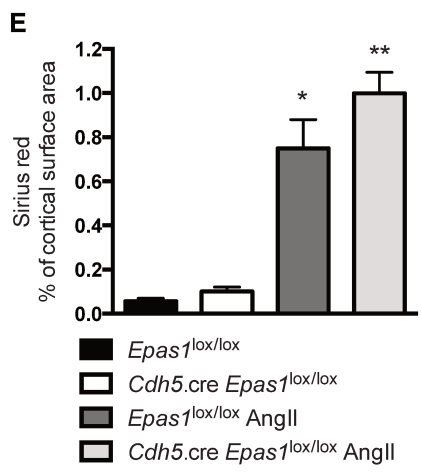
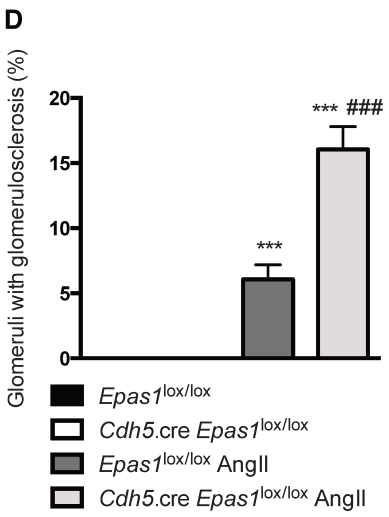
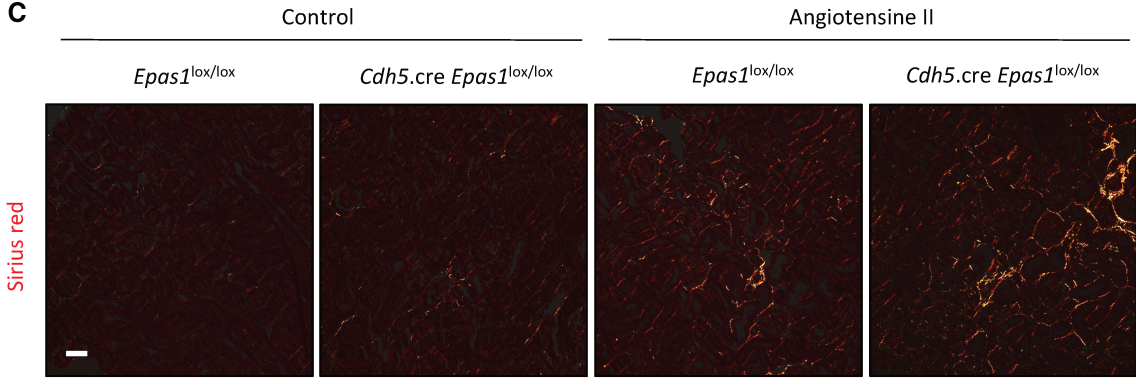
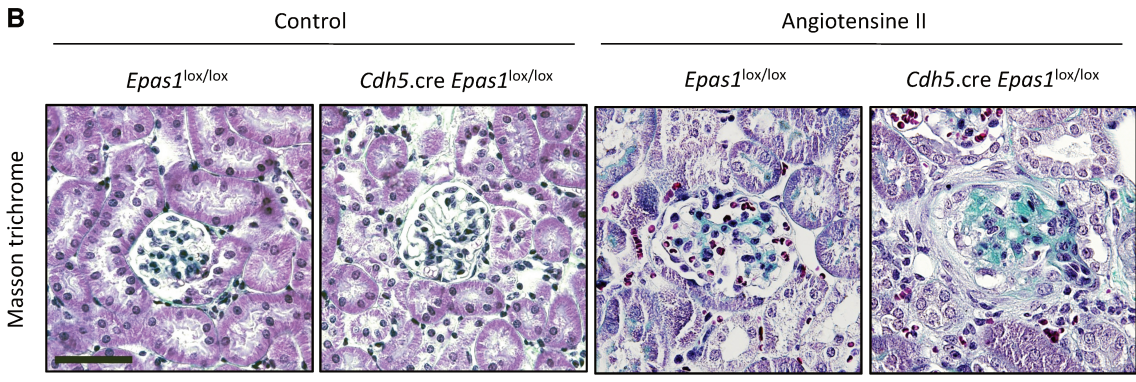
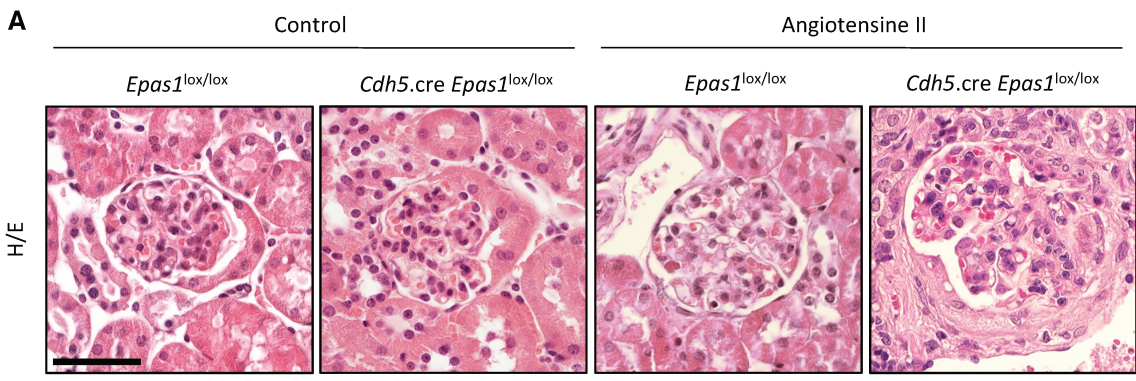
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



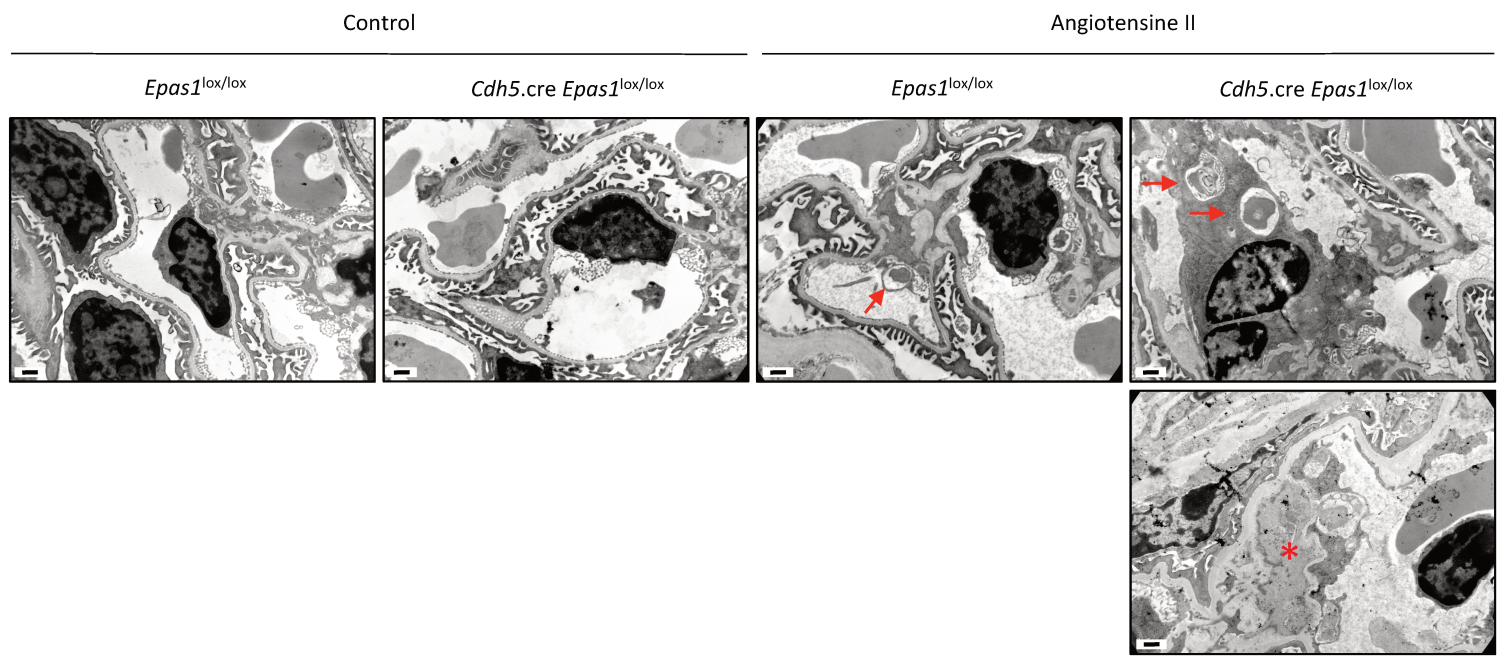
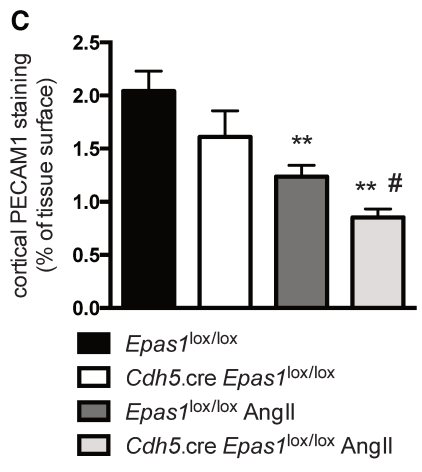
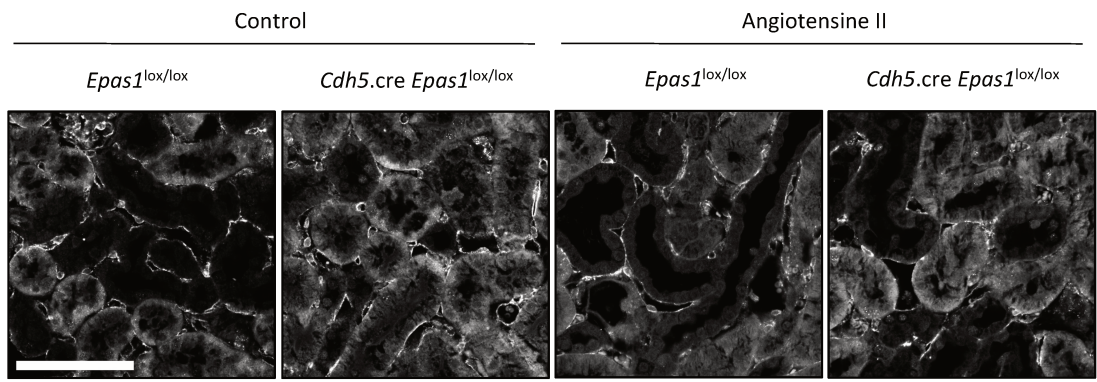
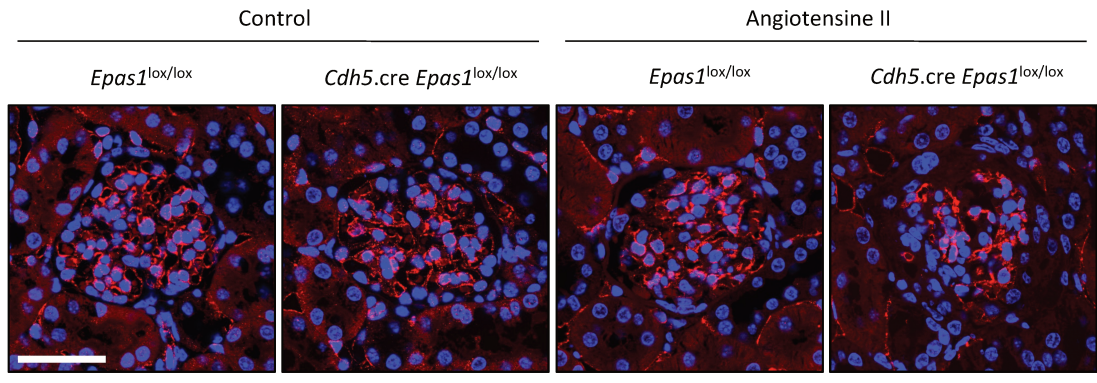
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



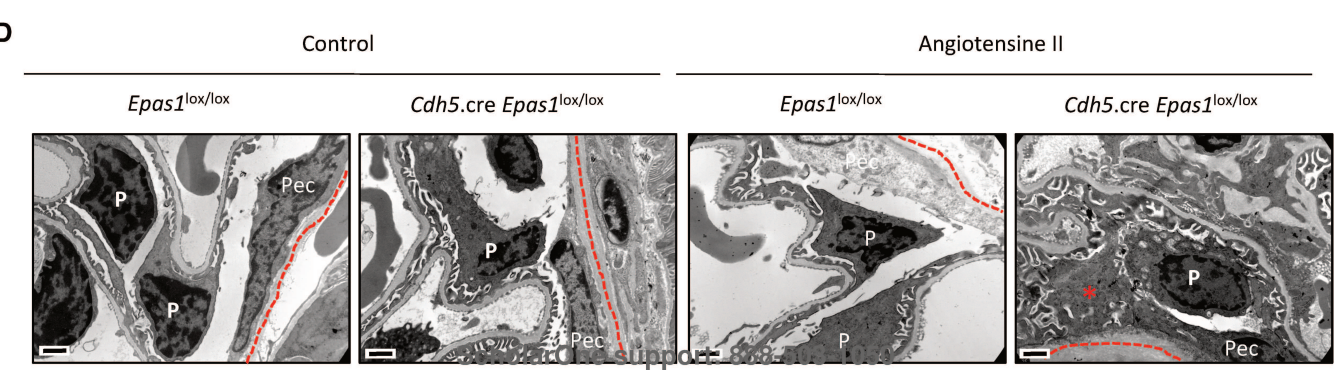
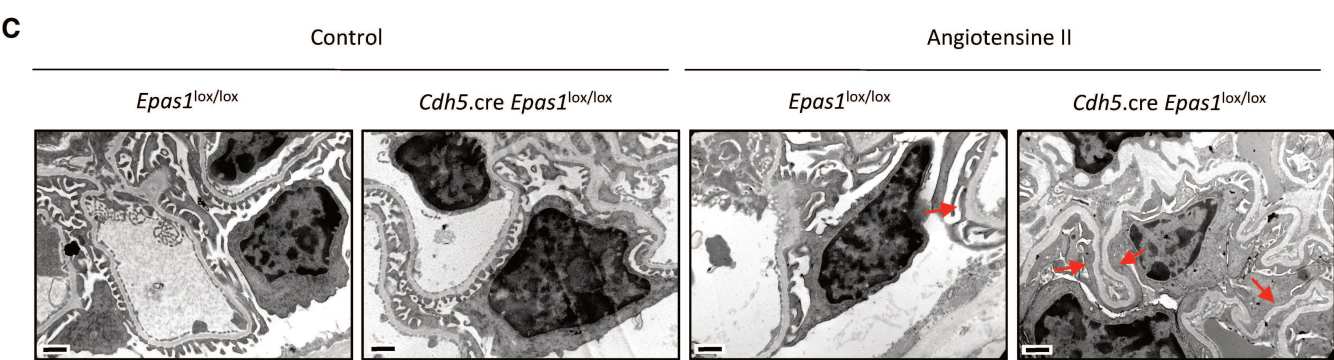
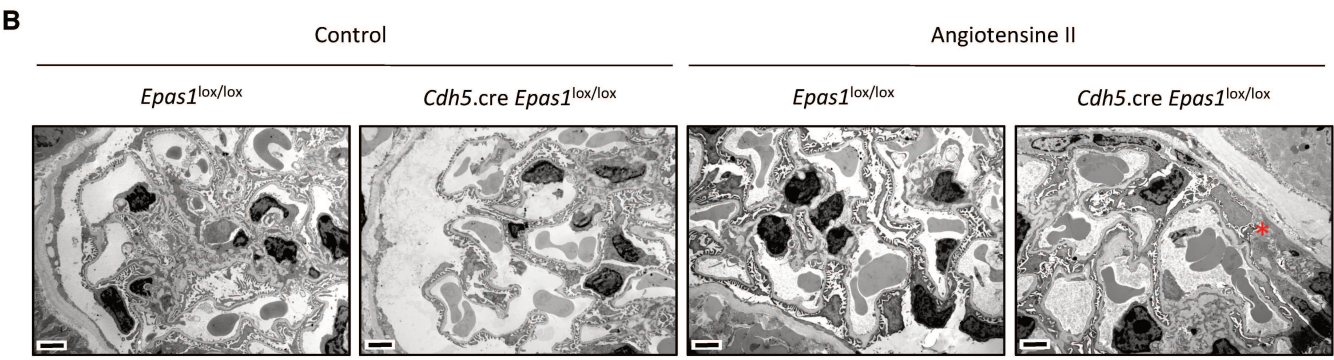
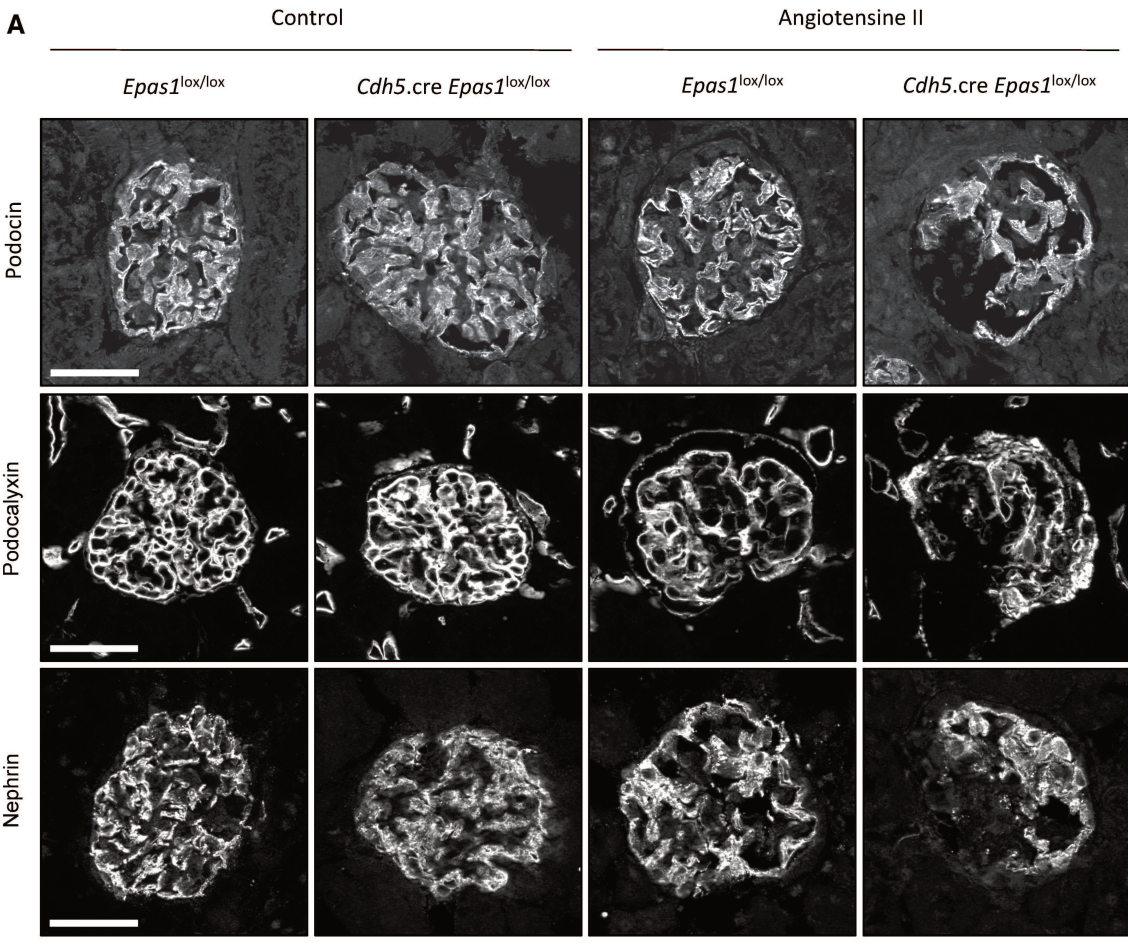
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



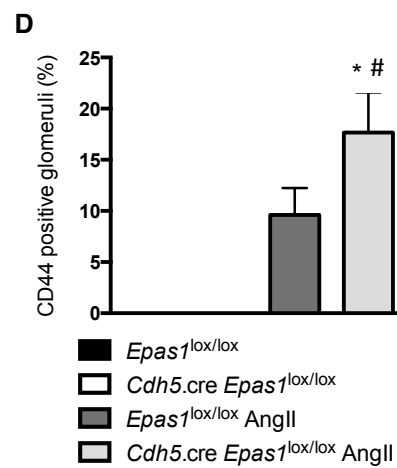
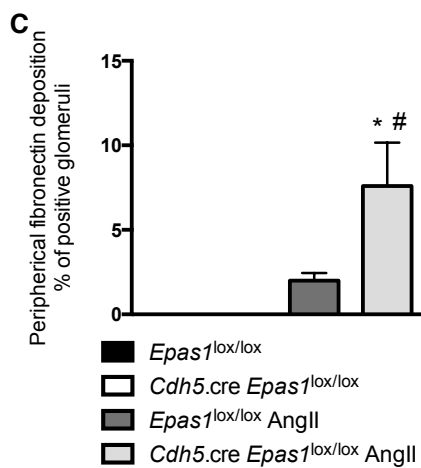
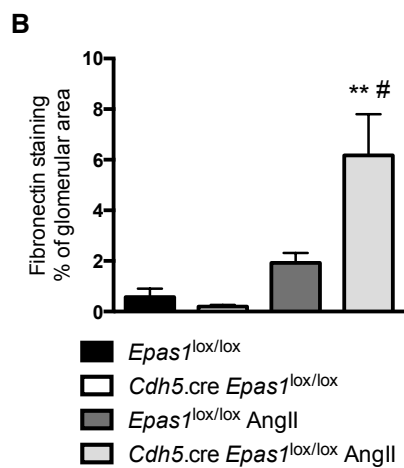
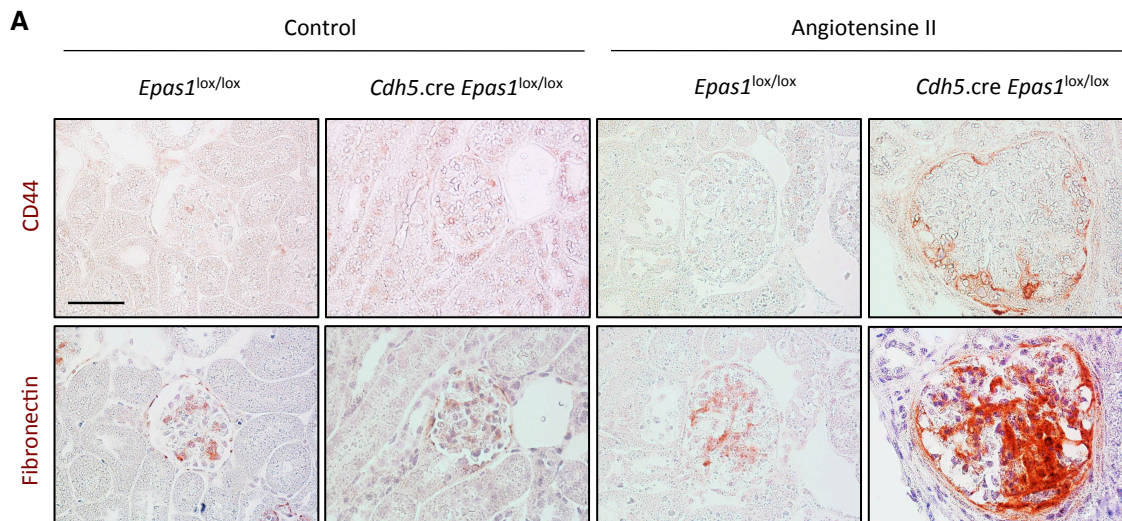
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

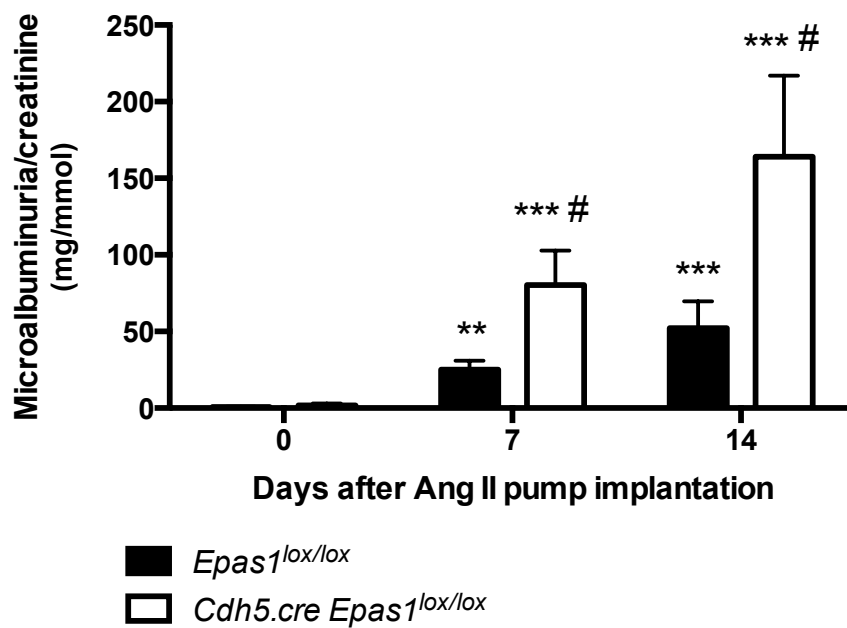


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

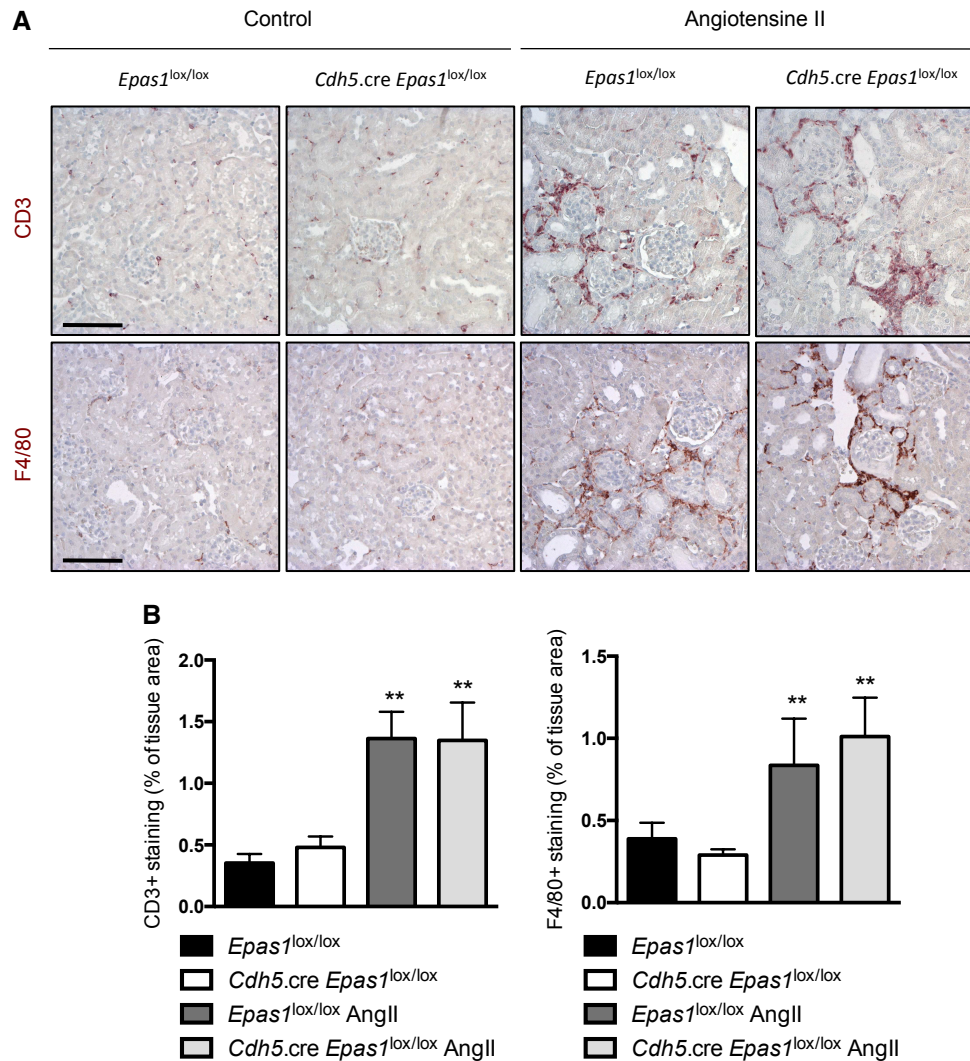


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

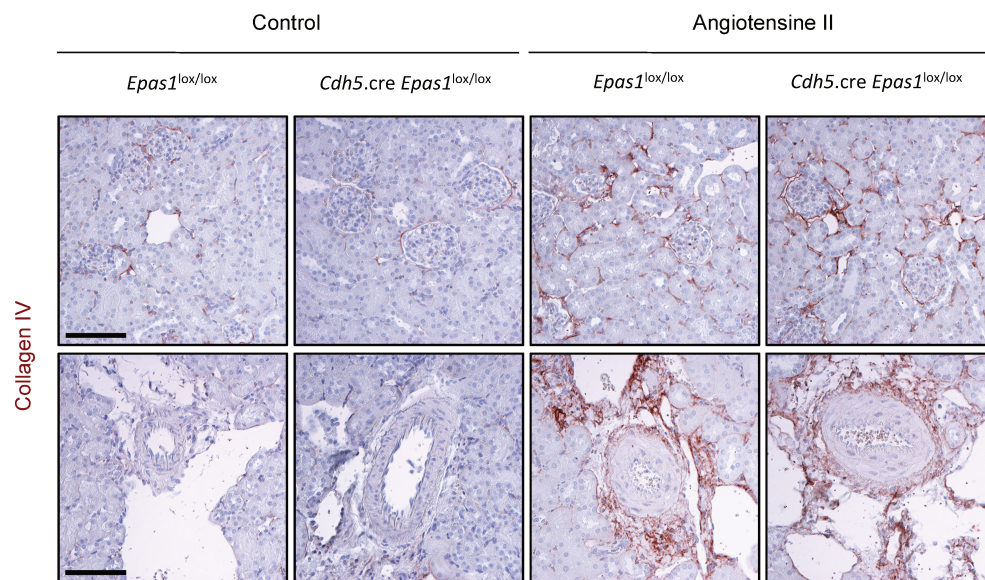




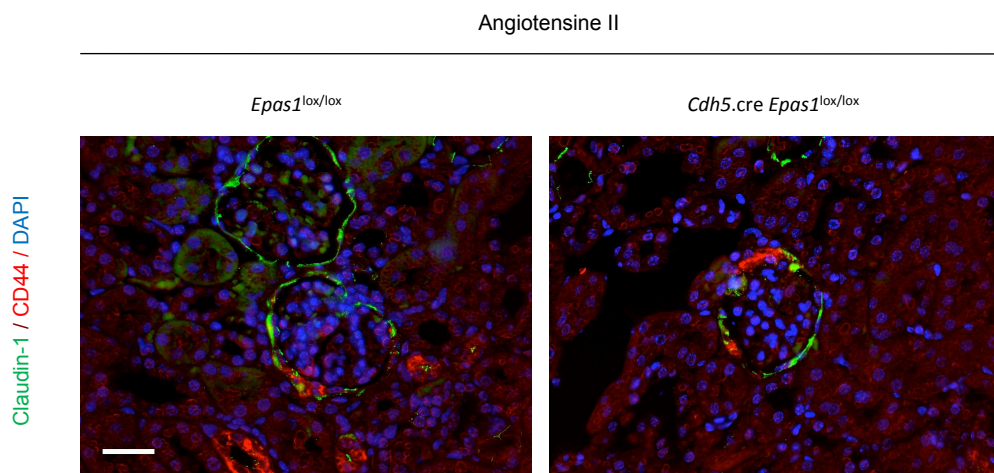
Supplementary Figure S1: Endothelial EPAS1 abrogation aggravates angiotensin II induced albuminuria from 7 days of Ang II infusion. Urinary albumin excretion rate in 20 weeks-old *Epas1^{lox/lox}* and *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice after AngII infusion for 7 or 14 days. Data represent mean \pm SEM of $n=7$ mice. # $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** ### $p<0.001$, # different genotype same treatment, * same genotype, different treatment.



Supplementary Figure S2: Renal interstitial inflammatory infiltrate is not modified by endothelial EPAS1 deficiency during angiotensin II-induced hypertension. (A) Representative images of the expression of CD3 (upper panel) and F4/80 (lower panel) by immunohistochemistry in 20 weeks-old *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice after 6 weeks of chronic AngII infusion and from 20 weeks-old untreated *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice. Nuclei were counterstained with hematoxylin (blue). Scale bar: 50 μ m. (B) Quantification of the percentage of CD3- and F4/80- positive tissue area in renal cortex from 20 weeks-old *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice after 6 weeks of chronic AngII infusion and from 20 weeks-old untreated *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice. Data represent means \pm SEM of at least 5 mice. ** $p < 0.01$, * same genotype different treatment.



Supplementary Figure S3: Effect of chronic angiotensin II infusion on collagen deposition in kidney. Representative images of collagen IV deposition (brown) by immunohistochemistry in kidney cortex (upper panel) and arteries (lower panel) from 20 weeks-old *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice after 6 weeks of chronic AngII infusion and from 20 weeks-old untreated *Epas1*^{lox/lox} and *Cdh5.Cre-Epas1*^{lox/lox} mice. Nuclei were counterstained with hematoxylin (blue). Scale bar: 50 μ m. Images are representative of at least 6 mice.



Supplementary Figure S4: Effect of chronic angiotensin II infusion on PEC activation and differentiation. Representative images of claudin-1 (green) by immunofluorescence and CD44 (red) by immunohistochemistry in glomeruli from 20 weeks-old *Epas1^{lox/lox}* and *Cdh5.Cre-Epas1^{lox/lox}* mice after 6 weeks of chronic AngII infusion. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar: 50 μ m. Images are representative of at least 6 mice.

DISCUSSION

DISCUSSION GENERALE

Au cours de ce travail nous avons étudié certains mécanismes menant à la formation des lésions glomérulaires en pathologie rénale. Notre intérêt s'est porté sur le rôle des cellules résidentes épithéliales et endothéliales rénales, en particulier glomérulaires, jouant un rôle déterminant dans la physiopathologie des glomérulopathies. En effet, dans le glomérule, des agressions diverses, immunologiques, toxiques ou hypertensives, aboutissent à des réponses tissulaires communes qui déterminent la gravité et la progression des lésions. Le dépôt de matrice-extracellulaire et la modification de la MBG, l'altération de l'architecture podocytaire et endothéliale, la prolifération des cellules épithéliales dans la chambre urinaire et les lésions dites de hyalinose segmentaire et focale sont, en effet, des caractéristiques histologiques retrouvées dans plusieurs types de glomérulopathies et dans de nombreux modèles expérimentaux les étudiant. Ces lésions s'accompagnent aussi sur le plan fonctionnel d'éléments cliniques communs comme une fuite protéique glomérulaire composée majoritairement d'albumine et par la suite d'une atteinte tubulo-interstitielle progressive et plus ou moins inflammatoire qui aboutit à une dégradation de la fonction rénale.

Trois modèles expérimentaux de glomérulopathies chez la souris avec des types d'agression différents nous ont permis de montrer le rôle de ces facteurs tissulaires intra-rénaux et de revisiter le rôle classiquement attribué à l'immunité adaptative: le modèle anti-MBG passif (agression immune), le modèle de néphropathie à l'adriamycine (agression toxique) et enfin le modèle par perfusion continue d'angiotensine II (agression hypertensive).

Dans la première partie de ce travail, face à des observations contradictoires sur le rôle des lymphocytes T dans la glomérulonéphrite inflammatoire, nous avons voulu étudier la genèse des lésions rénales dans un environnement dépourvu de lymphocytes T/B voire NK. Nous avons utilisé des souris immunodéficientes chez lesquelles nous avons induit le modèle anti-MBG passif. De manière surprenante, l'absence de lymphocytes T/B et T/B/NK n'empêche pas la formation des lésions glomérulaires remettant en cause le rôle principal attribué à l'immunité cellulaire T CD4+. La gravité accrue des souris dépourvues de lymphocytes T/B/NK nous a fait d'abord exclure un rôle protecteur des cellules NK dans le modèle puis nous intéresser à une sous-unité commune aux récepteurs des interleukines 2,4,7,9,15 et 21 nommé γC et codé par le gène *Il2rg*. Ce gène est délété chez les souris immunodéficientes

dépourvues de lymphocytes T/B et NK (*Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}*). Un rôle protecteur de γ C tissulaire a été montré par des expériences de greffe de moelle osseuse. Cette sous-unité a été localisée, ainsi que les autres récepteurs de l'interleukine 15 dans le podocyte après induction du modèle anti-MBG. La voie de signalisation classique de l'IL-15 impliquant le système JAK-STAT est activé dans les podocytes alors que l'absence de γ C altère cette réponse. Ceci pourrait expliquer le phénotype aggravant observé lorsque γ C est délété. Enfin, ce récepteur immun est aussi retrouvé dans les podocytes humains soumis à une agression comme dans les glomérulonéphrites extracapillaires.

La découverte du rôle protecteur de l'axe IL-15/ γ C/JAK-STAT dans le podocyte, ainsi que les observations récentes sur le rôle de STAT3 podocytaire dans certaines glomérulopathies, nous a mené à étudier la fonction podocytaire de STAT5 qui est une protéine d'aval de l'IL-15 et a des effets parfois opposés à STAT3 dans les cellules immunitaires. Cette protéine, activée par phosphorylation a été localisée par notre équipe dans les podocytes de souris et est activée dans le modèle anti-MBG. Dans la deuxième partie du travail, nous avons montré que la délétion de STAT5 du podocyte aggrave la protéinurie et tend à aggraver les lésions histologiques dans le modèle anti-MBG suggérant son rôle protecteur. Ce rôle protecteur de STAT5 dans le podocyte a été validé par un modèle d'agression podocytaire toxique comme la néphropathie à l'adriamycine où la délétion de STAT5 induit une majoration très significative de l'albuminurie et de l'altération de l'architecture podocytaire par un mécanisme non-immunologique. Dans ce modèle on note aussi des lésions endothéliales sévères de micro-angiopathie thrombotique (MAT) qui sont plus importantes dans le fond génétique 129S2Sv que C57BL/6. Au sein du gène *Epas1* des mutations peuvent aboutir à un dysfonctionnement de la voie de réponse à l'hypoxie chez les 129S2Sv. Nous avons donc voulu mettre en évidence le rôle de *Epas1* dans l'endothélium (où il est majoritairement exprimé) par une méthode d'inactivation génétique tissu-spécifique pour déterminer si sa délétion reproduisait les lésions de MAT dans le modèle anti-MBG. Dans la troisième partie nous n'avons pas pu mettre en évidence un rôle aggravant de la délétion de *Epas1* endothéliale dans le modèle anti-MBG. Le système HIF fait l'objet, depuis une quinzaine d'années, d'un grand intérêt en médecine et en biologie car il permet l'adaptation des cellules à un milieu hypoxique. Nous avons par ailleurs étudié le rôle de *Epas1* dans un autre modèle de glomérulopathie, la néphropathie hypertensive par perfusion continue d'angiotensine II. Nos résultats montrent

que la délétion d'Epas1 endothéliale, sans affecter la pression artérielle systémique ni l'infiltrat inflammatoire, aggrave notablement la protéinurie et les lésions glomérulaires induites par l'angiotensine II. En particulier, la délétion de Epas1 de l'endothélium augmente l'activation et la dédifférenciation des cellules épithéliales glomérulaires (podocytes et cellules pariétales glomérulaires) avec une majoration des dépôts de matrice extracellulaire et des lésions de hyalinose segmentaire et focale. Ces résultats font de Epas1 endothélial un acteur des lésions d'HSF secondaires dans la néphropathie hypertensive et soulignent l'interaction étroite entre endothélium et épithélium glomérulaire en pathologie rénale.

ROLE DES LYMPHOCYTES T DANS LE MODELE ANTI-MBG

Le premier résultat marquant est le fait qu'en l'absence de lymphocytes T on observe un taux similaire de lésions glomérulaires extracapillaires et une altération marquée de la fonction rénale. Ces résultats viennent corroborer des études anciennes et peu citées : les unes étudiant la réponse des souris athymiques au modèle anti-MBG passif^{99,100} et une étude australienne utilisant le modèle passif accéléré⁸⁵. Ces études semblent a priori contradictoires car opposées à un très grand nombre d'études ayant identifié l'immunité cellulaire T CD4+ Th1/Th17 comme responsable des lésions glomérulaires extracapillaires⁴⁰⁰. Comment réconcilier ces résultats expérimentaux qui semblent fondamentalement contradictoires?

Tout d'abord nous avons vu dans l'introduction que sous le nom du modèle anti-MBG ou néphrite toxique se cachent différents variants avec des mécanismes lésionnels initiateurs différents. Le modèle utilisé dans notre étude est le modèle passif. Il fait suite à la reconnaissance d'épitopes de la MBG et/ou du podocyte de la souris par les immunoglobulines hétérologues de mouton. Au contraire le modèle actif est la conséquence de l'immunisation de l'animal contre des épitopes du soi visant à briser la tolérance immunitaire. A la différence du modèle passif, dans ce dernier modèle le rôle des lymphocytes T est clairement démontré⁶⁵. A contrario, le modèle passif accéléré, très utilisé par les équipes de Tipping et Panzer, met en jeu l'adjuvant de Freund, une solution lipidique avec des fragments de Mycobactérie dans sa version complète, promouvant la réaction immunitaire cellulaire T. Il est fort possible que la participation de l'immunité cellulaire soit influencée par l'utilisation de l'adjuvant dans ce modèle comme le suggère la divergence des résultats observés par une équipe japonaise utilisant les souris nude dans le modèle passif et

passif accéléré^{100,401}. Il faut donc être vigilant sur l'interprétation des résultats car la différence observée entre certaines souches comme les souris IFN γ ^{-/-} et leurs contrôles pourrait être dues à une réponse différentielle à l'adjuvant de Freund lui-même⁶¹. Ce dernier pouvant être à l'origine d'une induction d'IFN γ ⁴⁰² et de TNF α . D'autres études remettent en cause le rôle des lymphocytes T dans la genèse des croissants glomérulaires dans un modèle combinant la surexpression d'une xénoprotéine dans le tissu rénal et des cellules T activées dirigés contre cet antigène^{403,404}. En effet, la surexpression d'ovalbumine par les podocytes chez la souris combinée à l'injection répétée de lymphocytes T activés et dirigés contre l'ovalbumine ne parvient pas à générer des lésions extracapillaires ni des dépôts de fibrine intra-glomérulaires⁴⁰⁴.

Enfin, les études ayant montré un rôle des lymphocytes T en utilisant un modèle anti-MBG passif ont parfois utilisé des anticorps déplétants, des délétions génétiques globales ou voire des fonds génétiques jugés aujourd'hui instables^{66,157,405}. Les voies de signalisation communes des cellules résidentes et circulantes font qu'il y a des effets hors-cible de ces anticorps déplétants qui peuvent expliquer en partie les résultats obtenus. Les délétions globales peuvent affecter aussi les mécanismes de défense tissulaire^{48,76}. Ce dernier point est illustré dans notre étude où la délétion d'*Il2rg* abolissant la production de lymphocytes NK va aussi empêcher la production de γ C par le podocyte avec des effets aggravants sur les lésions glomérulaires. Cet effet n'est observable qu'en pathologie où le podocyte en particulier voire l'endothélium vont exprimer ces molécules et récepteurs "immuns".

Comme vu précédemment le fonds génétique de la souris détermine de façon majeure les lésions dans le modèle anti-MBG et celui-ci n'est parfois pas précisé pour les souris contrôles où le nombre de backcross peut être insuffisant aboutissant à une variabilité phénotypique importante.

Enfin, la sévérité des lésions rénales a été souvent quantifiée par la densité de l'infiltrat lymphocytaire T^{98,406}. Dans notre étude nous montrons que les lymphocytes T et B ne jouent pas un rôle principal dans la genèse des lésions mais par ailleurs l'étude sur le fonds génétique de la souris (annexe) a aussi remarqué que l'infiltrat T n'est pas corrélé à la gravité des lésions⁴⁶.

Cependant, dans notre étude les souris *Rag2*^{-/-} ont de façon intéressante une atteinte tubulo-interstitielle, évaluée sur les lésions de nécrose tubulaire aigue, moins sévère que les souris contrôles. L' hypothèse est que dans le modèle anti-MBG passif les lymphocytes T peuvent jouer un rôle dans la phase tardive et dans la progression des lésions en particulier dans le compartiment tubulo-interstitiel. Un autre modèle expérimental de lésions glomérulaires (syndrome d'Alport), utilisant des souris *Rag1*^{-/-} (dépourvues de lymphocytes T et B) ayant une délétion de la chaîne $\alpha 4$ du collagène 3, a montré que les lymphocytes T n'étaient pas indispensables dans la genèse des lésions glomérulaires mais participaient aux lésions tubulaires⁴⁰⁷.

ROLE DES LYMPHOCYTES NK

Nos résultats montrent que la réplétion en lymphocytes NK des souris *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} n'affecte pas significativement la fonction rénale et n'impacte pas le degré des lésions histologiques dans le modèle anti-MBG. Ceci suggère que ces cellules ont un rôle limité dans ce contexte. On peut noter quelques limites à ces résultats acquis. Les souris *Rag2*^{-/-} ont un taux circulant de NK élevé avoisinant 50%. Ce taux n'a pas pu être atteint par l'adjonction de NK exogène laissant par la place à une possible participation modérée des NK. Par ailleurs les cellules NK sont des cellules productrices d'IL-15, leur recrutement dans le modèle anti-MBG pourrait participer à la production locale d'IL-15 avec des effets bénéfiques qui pourraient participer à la diminution de l'atteinte tubulo-interstitielle observée chez les souris *Rag2*^{-/-}.

ROLE DES CELLULES DENDRITIQUES ET AUTRES CELLULES IMMUNITAIRES RESIDENTES

Les expériences de greffe de moelle osseuse ont montré qu'il existe un rôle protecteur de la protéine γC tissulaire de façon indépendante des cellules circulantes. La localisation de γC par immunomarquage dans les podocytes est argument fort défendant le rôle protecteur de γC podocytaire. Cependant, au cours de la réalisation de ce travail nous ne disposons pas d'un outil pouvant valider définitivement cette affirmation: la souris ayant une délétion podocytaire spécifique de γC . Cette souris nous permettrait d'affirmer le rôle protecteur de l'induction podocytaire de γC dans le modèle. L'irradiation totale administrée aux souris avant la greffe de moelle n'élimine que les cellules T et B circulantes. L'irradiation n'a cependant que peu d'effet sur les cellules résidentes intra-rénales comme les cellules dendritiques ou

lymphocytes intra-épithéliaux (peu étudiés jusqu'à présent dans le rein mais surtout décrits dans l'intestin grêle). Or les cellules dendritiques sont en mesure d'exprimer γC^{408} et on sait que celles-ci ont un rôle important dans le modèle anti-MBG^{135,137,138,404,409}. Contre cette hypothèse est le marquage essentiellement podocytaire de γC chez les animaux sauvages. L'hypothèse d'une altération du phénotype des cellules dendritiques par l'absence de γC ne peut donc être complètement écartée. JAK3, protéine transductrice de γC régule négativement la production cytokinique des cellules dendritiques⁴¹⁰ suggérant que l'absence de γC et de facto la diminution de l'activation de JAK3 puissent avoir l'effet inverse voire un effet pro-inflammatoire. Finalement deux éléments plaident pour un effet principalement podocytaire de la signalisation γC dans le modèle: comme dit plus haut nous ne détectons pas une induction de γC interstitielle dans notre modèle et enfin la délétion podocytaire de STAT5, voie d'aval de γC aggrave le phénotype glomérulaire dans ce modèle anti-MBG. La réponse définitive pourrait venir des souris ayant une délétion de γC podocytaire qui seront générées prochainement dans notre laboratoire par croisement des souris *Il2rg^{lox/lox}* avec les souris *Nphs2.cre*.

CHAINE γ COMMUNE EPITHELIALE RENALE ET SIGNALISATION IL-15

La détection de γC dans l'épithélium rénal et plus particulièrement dans le podocyte ainsi que son rôle protecteur dans le modèle anti-MBG est la première observation, à notre connaissance, d'un rôle de γC exprimée par un tissu. En effet, jusqu'à présent le rôle de γC , sous-unité commune aux récepteurs des interleukines 2,4,7,9,15 et 21, était limité aux cellules immunitaires et à la transduction du signal intracellulaire suite à la fixation du ligand sur son récepteur⁴¹¹ (**Figure 20**). Dans notre modèle, l'absence des lymphocytes T/B/NK chez les différentes souris immunodéficientes créé un environnement propice à l'étude du rôle des effecteurs "immuns" tissulaires. La signalisation de ces interleukines γC dépendantes est bien connue dans les cellules immunitaires⁴¹² mais on ne connaît pas leurs spécificités tissulaires rénales. D'après les études sur les lymphocytes, l'IL-15 et l'IL-2 partagent la sous-unité γC mais aussi la sous-unité IL2R β , que nous localisons aussi au sein de l'épithélium glomérulaire après induction du modèle anti-MBG. Les récepteurs de l'IL-15 et de l'IL-2 sont hétéro-trimériques et comportent en plus une sous-unité α qui est spécifique à chacune des deux interleukines (IL2R α pour l'IL-2 et IL15R α pour l'IL-15)⁴¹³⁻⁴¹⁵. L'expression de γC et de IL2R β a été identifiée principalement in vitro dans les cellules tubulaires proximales^{140,416,417} et dans une étude

récente dans une lignée murine de podocytes⁴¹⁸. Des marquages tissulaires ont été réalisés par l'équipe de Giron-Michel^{416,419} dans le rein humain et dans le tissu cancéreux rénal⁴²⁰. La détection de γ C n'a jamais été mise en évidence précédemment dans les podocytes *in vivo* comme dans notre étude. Le manque d'anticorps utilisables, dont nous avons l'opportunité de vérifier la spécificité grâce à nos souris knock-out, et les conditions strictes de la préparation de l'échantillon (tissus congelés avec une très courte fixation préalable) avant le marquage ont probablement réduit les chances de détecter γ C dans le glomérule jusqu'à présent.

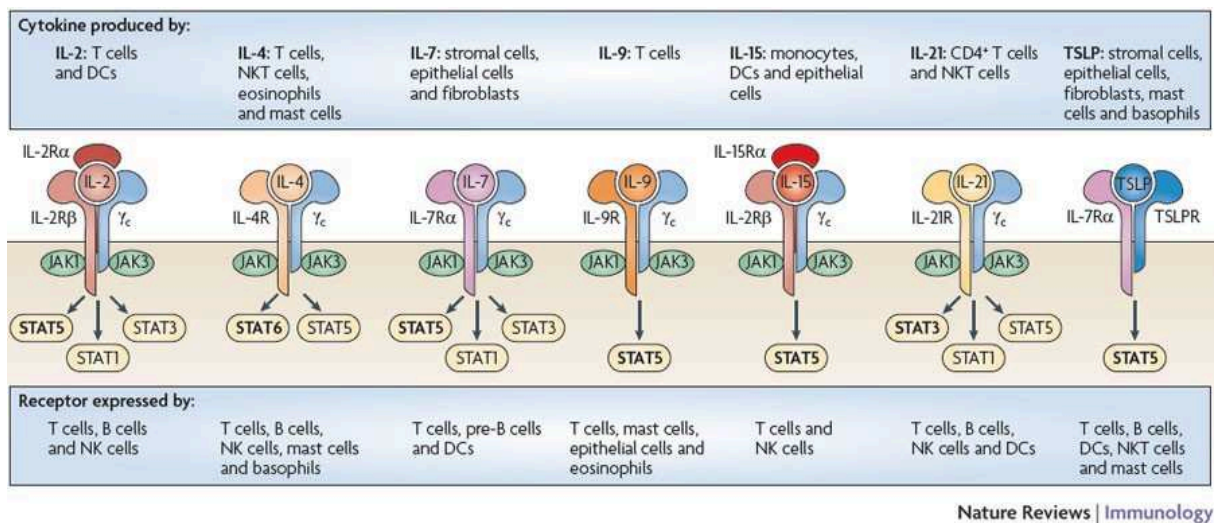


FIGURE 20: RECEPTEURS AUX INTERLEUKINES UTILISANT LA CHAÎNE GAMMA COMMUNE (ROCHMAN ET AL. 2009. NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY)

Notre intérêt s'est aussi porté vers l'IL-15, comme agoniste local de γ C, pour plusieurs raisons. Tout d'abord l'expression de l'IL-15 est très forte au sein du tissu rénal de la souris anti-MBG et même à l'état basal et ce même en absence de lymphocytes chez les souris immunodéficientes. Cette forte expression est corroborée par d'autres études ayant montré une production locale principalement tubulaire d'IL-15 *in vivo*¹⁴⁰. En effet, cette cytokine a la particularité d'être produite par les épithélia dont l'épithélium rénal, mammaire³⁹⁶ et digestif^{414,421}. D'autres études montrent que la production d'IL-15 existe à l'état basal et diminue avec la mort cellulaire tubulaire au cours du modèle anti-MBG¹⁴⁰ (Annexe). Les cellules tubulaires saines et principalement proximales expriment fortement l'IL-15. Cette expression est diminuée avec l'apparition des lésions de nécrose tubulaire. Dans notre équipe on note par ailleurs une faible expression podocytaire *in vivo* corroborée par une expression du gène de l'IL-15 dans les podocytes primaires en culture. L'IL-15 joue un rôle local

important dans le maintien du phénotype épithélial et favorise des mécanismes anti-apoptotiques épithéliaux⁴¹⁶. En 2002, Shinozaki et al. ont montré que la délétion globale d'IL-15, certes affecte les lymphocytes tout comme les cellules résidentes. L'absence d'IL-15 aggraverait les lésions histologiques tubulaires et glomérulaires sans affecter la protéinurie au cours du modèle anti-MBG passif accéléré¹⁴⁰. On notait dans l'étude de Shinozaki une augmentation de l'apoptose tubulaire en cas de délétion d'IL-15. Des marqueurs pro-inflammatoires comme MCP-1 sont aussi retrouvés. L'effet anti-apoptotique est corroboré *in vitro* par l'adjonction d'IL-15 à des cellules tubulaires en culture soumises à une agression comme l'adriamycine. Notre étude complète ces résultats et suggère que les lymphocytes participent peu à cet effet anti-apoptotique local de l'IL-15. Enfin les récepteurs de cette cytokine sont aussi localisés au sein de l'épithélium glomérulaire sur lesquels l'IL-15 peut avoir une signalisation.

Nous n'écartons pas par ailleurs que d'autres interleukines agissent aussi sur γ C podocytaire, même si leur faible expression rénale rend cette hypothèse peu probable. Une étude récente montre l'expression du récepteur α de l'IL-2 dans les podocytes *in vitro* et sur des glomérules de patients atteints d'HSF. Mais cette étude accorde à cette activation un effet cette fois délétère sur le devenir podocytaire⁴¹⁸. Notre hypothèse, au contraire plaide pour l'induction bénéfique de γ C dans le podocyte, probablement une défense du podocyte face à une agression qui peut être immune. Nous observons dans les biopsies humaines de GNEC une induction de γ C sur les lésions précoces semblant s'amender lorsque le croissant cellulaire est finalement constitué (**Annexe 1**). Les biopsies rénales humaines systématiques faites à 3 mois post- transplantation rénale d'aspect histologique normal ne montrent qu'une très faible expression glomérulaire de γ C. Nous observons aussi une forte induction de γ C dans les podocytes dans le cas de HSF. Le mécanisme de défense podocytaire semble précocement induit. γ C pourrait donc constituer un marqueur histologique d'agression podocytaire précoce.

Etant donné le manque de données sur la signalisation épithéliale de l'IL-15 et de γ C nous avons testé l'activation de la voie canonique de l'IL-15, connue dans les lymphocytes, sur des podocytes issus de cultures primaires et des lignées immortalisées de podocytes^{26,422}. Ces dernières lignées facilitent l'étude des mécanismes cellulaires podocytaires. Elles comportent de nombreuses limites à cause de la perte des caractéristiques phénotypiques podocytaires

et de leur possible instabilité génétique. Nous avons finalement fait le choix d'utiliser des podocytes issus de cultures primaires réalisées à partir des glomérules de souris. Cette technique, plus longue et consommatrice d'animaux, permet cependant d'obtenir des podocytes bien différenciés qui n'ont pas subi de multiplication, avec probablement des résultats d'un plus grande fiabilité¹⁷⁵. La pureté et la différenciation des podocytes a été vérifiée en utilisant des marqueurs comme la néphrine. L'étude *in vitro* nous a permis de montrer que les cellules podocytaires primaires activent, après stimulation par l'IL-15, et sans autre agression surajouté que celle induite par la culture cellulaire, la voie canonique JAK et SYK.

Dans le lymphocyte, l'IL-15 a un effet anti-apoptotique et pro-prolifératif en agissant sur le récepteur trimérique IL15R α /IL2R β / γ C⁴¹³. L'activation de ce récepteur qui peut être en trans, aboutit à l'activation par phosphorylation des protéines JAK1 ou JAK3 et SYK⁴²³⁻⁴²⁵. Les protéines JAK phosphorylées vont aboutir à la phosphorylation de protéines STAT comme STAT3 et en particulier STAT5⁴²⁶. Ces protéines STAT sont phosphorylées et en se dimérisant peuvent être transloquées dans le noyau et activer des gènes cibles⁴²⁷.

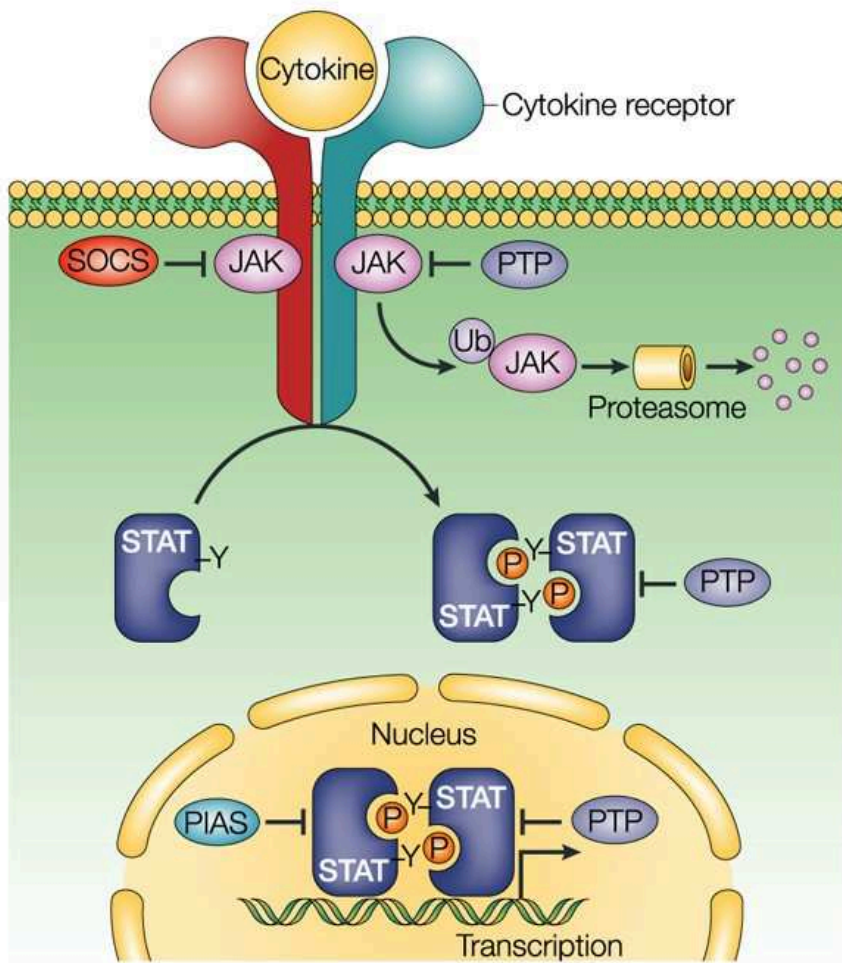
L'activation de cette voie par les podocytes lors de l'agression induite par le modèle anti-MBG activerait un signal de survie podocytaire. Ceci expliquerait l'augmentation des lésions glomérulaires des souris *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}*. De façon intéressante nous avons observé qu'*in vitro* la réponse à l'interleukine 15 semble plus dépendante de IL2R β que de γ C. En effet, en absence de IL2R β la phosphorylation de JAK1/3 et SYK n'est plus induite par l'IL-15 alors qu'en l'absence de γ C uniquement il n'y a que la phosphorylation de SYK qui est abolie. La protéine SYK a été récemment identifiée dans l'épithélium tubulaire^{428,429}. Des études proposent aussi un rôle pour SYK au cours des glomérulonéphrites^{428,429}. Leurs résultats peuvent paraître paradoxaux car les inhibiteurs de SYK sont par exemple associés à une amélioration des lésions de glomérulonéphrite. L'activité de SYK est proportionnelle à la gravité de la maladie. Cependant, il faut être conscient que ces études portent sur une inhibition globale de SYK affectant à la fois le compartiment circulant et résident et que même s'ils partagent les mêmes protéines, l'épithélium rénal et les cellules de l'immunité peuvent finalement avoir leurs actions propres de SYK d'effets différents.

Par ailleurs, la persistance d'une activation des protéines JAK même après une délétion de γC peut paraître surprenante mais une étude a déjà montré que la sous-unité IL2R β peut se dimériser^{430,431} et aboutir à une signalisation intracellulaire même en absence de γC .

Globalement, ces résultats montrent que la production locale épithéliale d'IL-15 et son action sur son récepteur épithélial trimérique constituent un système de protection local rénal face aux agressions immunes. L'activation du système JAK/STAT/SYK épithélial activerait des signaux de survie anti-apoptotiques et de prolifération qui restent encore à élucider.

SYSTEME JAK/STAT ET REIN

L'intérêt pour le rôle du système Janus kinase (JAK)/Signal transducers and activators (STAT) dans le rein est croissant ces dernières années et, sur le plan thérapeutique, depuis 2003, des inhibiteurs de JAK3, comme le tofacitinib, sont à l'essai en transplantation rénale⁴³².



Nature Reviews | Immunology

FIGURE 21: SCHEMA DE L'ACTIVATION JAK/STAT (SHUAI ET AL. 2003. NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY)

Ce système est essentiel à la transduction intracellulaire de signaux cytokiniques régulant l'expression de gènes impliqués dans l'activation cellulaire, la prolifération, la survie cellulaire et la différenciation⁴³³. 4 protéines JAK (JAK1, JAK2, JAK3, JAK4) et sept protéines STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) constituent ce système complexe où les combinaisons de différentes protéines JAK/STAT sont associées aux différents récepteurs cytokiniques. La fixation du ligand sur le récepteur active les protéines JAK qui y sont associées par phosphorylation (**Figure 21**). Elles vont à leur tour recruter et phosphoryler les résidus tyrosine de STAT. STAT activée se dimérise et sera transportée dans le noyau de la cellule pour activer les différents gènes cibles. Le système JAK/STAT est régulé négativement à son tour par plusieurs mécanismes comme l'internalisation du récepteur, des protéines tyrosine phosphatases, les protéines inhibitrices des STAT activées (PIAS) et les suppressors of

cytokine signaling (SOCS)⁴³⁴. Les protéines SOCS sont composées de 8 protéines intracellulaires nommées CIS et SOCS1 à SOCS7. SOCS1 et SOCS3 en particulier sont activées par de nombreux stimuli pathologiques autres que les cytokines comme l'angiotensine II, les chimiokines, l'insuline, les immunoglobulines et les lipoprotéines ce qui les rend particulièrement intéressantes dans l'étude des processus biologiques dans le rein⁴³⁵.

En pathologie rénale, le système JAK/STAT a été particulièrement étudié dans la néphropathie diabétique^{436,437} et certaines autres glomérulopathies comme la néphropathie lupique^{435,438,439}, la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA⁴⁴⁰ ou la glomérulonéphrite¹⁷⁷. Dans le cas de la néphropathie diabétique, l'activation JAK/STAT semble être glomérulaire dans les stades précoces de la maladie et tubulo-interstitielle dans les néphropathies diabétiques plus avancées chez l'Homme⁴³⁶. Une étude transcriptomique retrouve une amplification de la signalisation JAK/STAT dans deux modèles murins de néphropathie diabétique⁴⁴¹. Par ailleurs, les niveaux élevés de glucose plasmatique et l'angiotensine II activent la voie JAK/STAT dans les cellules mésangiales glomérulaires. Ces effets peuvent aboutir à l'activation des voies de prolifération, la production de TGF β , de collagène IV et de fibronectine qui sont associés avec la formation des lésions d'HSF. Enfin leur rôle a aussi été évoqué dans des modèles expérimentaux d'HSF. L'inhibition de JAK2 par un agent pharmacologique chez des souris néphrotiques diminue l'expression de α -SMA et de MCP-1 ainsi que les lésions de glomérulosclérose⁴⁴². Dans une étude japonaise étudiant la voie JAK/STAT lors d'un modèle d'HSF par injection d'adriamycine associée à une néphrectomie unilatérale chez le rat, les niveaux de STAT3 activée augmentaient à une semaine du début lésionnel et étaient suivis par une élévation de STAT1 plus tardivement⁴⁴³. Ces protéines présentes sur tout l'épithélium rénal étaient particulièrement présentes sur l'épithélium tubulaire. Cependant la plupart de ces études utilisant des inhibiteurs pharmacologiques ne peuvent pas trancher entre les effets immunitaires et les effets sur les cellules résidentes de la voie JAK/STAT. D'autre part ces études se sont particulièrement centrées sur certaines protéines JAK et STAT que sont JAK1/JAK2/JAK3 et STAT1/STAT3. Le rôle des autres protéines STAT restant complètement à élucider.

Dans le podocyte cependant, c'est le rôle de la protéine STAT3 dans le podocyte qui a été plus largement étudiée ces dernières années. STAT3 peut être activé par différents stimuli cytokiniques ou autres comme LIF, l'IL-6 ou l'EGFR^{444,445}. En effet, STAT3 podocytaire a

montré un rôle pathologique dans le modèle de néphropathie induite par le HIV^{215,216}, dans la néphropathie diabétique⁴⁴⁶ et dans le modèle anti-MBG chez la souris⁷⁹. En effet, STAT3, peut être activée par la protéine virale nef et induire à son tour la dédifférenciation podocytaire et la prolifération²¹⁷. Par ailleurs STAT3 pourrait aussi être activé par l'IL-18 et avoir un effet profibrosant dans les cellules épithéliales tubulaires⁴⁴⁷.

Notre étude est cependant la première à proposer un rôle de la protéine STAT5 dans le podocyte. STAT5A et B, qui peuvent être activés par différentes interleukines comme l'IL-15⁴²⁶ ou l'IL-6⁴⁴⁸, la prolactine ou l'hormone de croissance, pourraient avoir un effet bénéfique podocytaire par plusieurs mécanismes. Ce rôle serait protecteur, à la différence de STAT3. Ceci nous rappelle la balance STAT3/STAT5 existant dans la signalisation lymphocytaire T⁴⁴⁹. En effet, au cours du développement lymphocytaire STAT5a/b participent à la différenciation et la survie des lymphocytes T régulateurs et inhibent la différenciation Th17. STAT3 au contraire est indispensable pour la différenciation des lymphocytes Th17 et inhibe la différenciation Treg. La délétion conjointe de STAT5a et STAT5b dans les podocytes de nos souris transgéniques *Nphs2.Cre-Stat5^{lox/lox}* ne permet pas de disséquer le rôle respectif de STAT5a et STAT5b dans le podocyte. On peut cependant affirmer que STAT5 a un rôle protecteur favorisant la survie du podocyte au cours de deux modèles d'agression glomérulaire comme le modèle anti-MBG et la néphropathie à l'adriamycine. Ce rôle protecteur est donc opposé à celui de STAT3 observé dans le même modèle anti-MBG⁷⁹ ou dans les modèles de néphropathie associée au VIH (souris Tg26)²¹⁶. En absence de travaux sur STAT5 dans le podocyte nos hypothèses de travail sur le rôle de STAT5 peuvent s'aider des travaux réalisés par L. Hennighausen sur le rôle de STAT5 dans le tissu hépatique.

L'activation directe de voies anti-apoptotiques comme BCLXL ou Bcl2, la modulation du stress oxydant ou l'inhibition de STAT3 pourraient être en cause dans l'effet protecteur de STAT5 podocytaire en cas d'agression.

Les études réalisées sur le tissu hépatique nous montrent que la perte d'expression de STAT5 du tissu hépatique s'accompagne d'une stéatose hépatique inflammatoire et d'une perte de l'inhibition de STAT3 et du TGFβ^{450,451}. STAT5 exerce par ailleurs un rôle de gène suppresseur de tumeurs dans le foie. Cependant, l'effet bénéfique de STAT5 sur le tissu hépatique ne semble pas s'exercer via un effet anti-apoptotique comme le montre une étude chez la souris

utilisant le modèle par injection de CCl₄ et montrant que STAT5 est nécessaire à l'activation de voies pro-apoptotiques Puma et Bim et au stress oxydatif via l'activation de NOX4⁴⁵². Etant donné le rôle démontré de STAT3 et de TGFβ dans le podocyte, STAT5 pourrait, avoir cet effet protecteur via un contrôle de l'expression de STAT3 et du TGF mais aussi modulant le stress oxydatif podocytaire qui est un des mécanismes de toxicité de la néphropathie à l'adriamycine. Les effets de STAT5 sur les voies pro et anti-apoptotiques podocytaires reste à élucider. En effet, STAT5, lors de sa translocation nucléaire après phosphorylation, active l'expression de gènes anti-apoptotiques comme Bcl2 ou Bclxl, qui sont importants pour le maintien de l'intégrité du podocyte⁴⁵³.

En thérapeutique néphrologique, à ce jour, la modulation du système JAK/STAT est passé au stade d'essai clinique dans deux domaines: la transplantation rénale et la néphropathie diabétique. Très brièvement les inhibiteurs de JAK3 et en particulier le tofacitinib (déjà commercialisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde en deuxième ligne en cas d'intolérance au méthotrexate) a montré son efficacité dans la prévention du rejet en transplantation rénale^{454,455} de part son action visant le système immunitaire. Des résultats cependant discordants ont été présentés quant à l'effet du tofacitinib sur la fonction rénale. D'après une étude il ne présente pas d'effet délétère sur la fonction rénale⁴⁵⁶ mais des doses élevées peuvent avoir un sur-risque infectieux et sur la survenue de PTLD par rapport à la ciclosporine⁴⁵⁷. Une autre étude révèle que dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde le tofacitinib s'associe à une dégradation du DFG réversible à son arrêt⁴⁵⁸. Par ailleurs, d'après les résultats expérimentaux sur le rôle de JAK3 dans le glomérule, il faudra rester vigilants au long cours sur les effets podocytaires de la molécule car, dans ces études, la protéinurie n'était pas un paramètre analysé.

Dans la néphropathie diabétique, une étude clinique de phase 2 multicentrique contrôlée versus placebo a démarré en 2012 pour tester un inhibiteur combiné de JAK1 et JAK2, le baricitinib, chez les patients ayant un diabète de type 2 compliqué d'une néphropathie diabétique (NCT01683409)⁴³⁷ et déjà traités par inhibiteurs du SRAA. Les résultats préliminaires semblent être encourageants avec une diminution de l'albuminurie significative chez les patients recevant le baricitinib et une moindre dégradation de la fonction rénale à 6 mois. Cependant, même si les inclusions ont terminé fin 2014 cette étude n'est toujours pas

publiée à ce jour. Le principal effet secondaire observé était une anémie car JAK2 joue un rôle dans la transduction du signal de l'érythropoïétine.

Tenant compte de nos résultats, une activation ciblée podocytaire du système γ C/JAK3/STAT5 pourrait être bénéfique dans le maintien de l'intégrité podocytaire au cours des lésions d'HSF ou dans les glomérulonéphrites inflammatoires. En parallèle, des études physiopathologiques un développement des thérapies ciblées comme celles utilisant des nanoparticules dirigées pourrait permettre de stimuler cette voie podocytaire sans affecter pour autant le rôle de JAK/STAT immunitaire.

LE SYSTEME DE REPONSE A L'HYPOXIE: UN MECANISME CLE DANS LA GENESE DES LESIONS RENALES ET LA PROGRESSION DES NEPHROPATHIES

Dans la troisième partie de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés au système de réponse à l'hypoxie, une voie de signalisation locale qui d'après plusieurs études semble diriger la progression des néphropathies chroniques. On a vu dans l'introduction que l'activation de ce système de réponse à l'hypoxie utilisant les protéines HIF participe non seulement à la progression de la maladie rénale chronique mais est aussi présente à l'initiation car, par différents mécanismes, les agressions locales ou systémiques se compliquent d'une hypoxie cellulaire. Cette hypoxie cellulaire épithéliale ou endothéliale va activer le complexe HIF (HIF-1 α dans l'épithélium tubulaire principalement et Epas1 dans l'endothélium, les fibroblastes interstitiels et l'épithélium glomérulaire) avec des effets cellule-spécifiques.

PAS DE ROLE DE EPAS1 ENDOTHELIAL DANS LE MODELE ANTI-MBG

La détection d'une mutation hypomorphe de Epas1 chez les souris 129/Sv développant des lésions sévères de MAT dans le modèle anti-MBG et ayant une expression du VEGFR2 déficiente nous a conduit à tester le rôle de Epas1 endothélial dans le modèle. En effet, même si le VEGF est sécrété majoritairement par le podocyte dans le glomérule, les expressions de VEGFR2 et de Epas1 sont majoritairement endothéliales.

Cependant, nos observations montrent que la délétion de Epas1 endothéliale ne modifie pas significativement le phénotype rénal des souris dans le modèle passif anti-MBG. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces résultats.

Les premières raisons d'ordre expérimental doivent être évoquées en premier lieu. En effet, dans ces expériences anti-MBG le sérum néphrotoxique utilisé était issu d'un lot ayant une forte toxicité et aboutissant à une mortalité non négligeable (autour de 20% à J8) qui n'a pas été utilisé ni dans la partie 1 ni dans la partie 2 du manuscrit. Les lésions glomérulaires (prolifération extracapillaire et dépôts de fibrine) observés dans les deux souches (knock-out et contrôle) étaient très importantes ainsi que le degré d'insuffisance rénale (urée plasmatique moyenne à 50 mmol/L dans les deux groupes). La sévérité du modèle a pu masquer le rôle éventuel aggravant d'une délétion d'*Epas1* endothélial dans le modèle. En effet, en expérimentation animale démasquer le rôle aggravant d'une modification génétique est difficile à obtenir si le modèle induit des altérations très importantes tant fonctionnelles comme histologiques. Une deuxième considération technique nous fait évoquer l'efficacité de la recombinaise afin d'exciser le gène *Epas1* de l'endothélium. On sait que l'efficacité de cette construction est d'environ 60% dans les glomérules ce qui implique que la différence génétique peut être atténuée par ce mécanisme. Enfin, et même si cela n'est pas évoqué par un grand nombre d'articles étudiant la construction *Cdh5.cre* utilisant le promoteur de la cadhérine 5 (ou VE-cadhérine) comme moyen de ciblage de l'endothélium, ce promoteur peut aussi être actif dans la lignée hématopoïétique. En effet, ces deux lignées endothéliale et hématopoïétique ont des progéniteurs communs⁴⁵⁹ et la VE-cadhérine peut être exprimée par certaines cellules hématopoïétiques⁴⁶⁰. Des expériences de greffe de moelle osseuse n'ayant pas encore été réalisées, un rôle éventuel de la délétion d'*Epas1* de ces cellules hématopoïétiques ne peut être écarté. Cette remarque peut d'ailleurs s'appliquer à toute la partie 3 de ce manuscrit.

Par ailleurs, on peut aussi conclure que s'il existe une différence liée au génotype celle-ci est faible. Pour le moment, donc, le seul rôle de *Epas1* tissulaire démontré dans la prolifération extracapillaire glomérulaire vient de l'étude de S. Quaggin ayant montré que la délétion de *pVhl* podocytaire a pour conséquence une prolifération podocytaire et une induction de *Cxcr4* dans la chambre urinaire glomérulaire chez la souris de façon spontanée mimant les lésions extracapillaires et dépendant de *Epas1*¹⁷². *Epas1* pourrait donc avoir un rôle principal aggravant dans le podocyte au cours de la glomérulonéphrite inflammatoire. Cependant le mécanisme d'activation d'*Epas1* podocytaire au cours de la GNEC reste à élucider. Afin de valider le rôle propre d'*Epas1* dans le podocyte une délétion podocyte spécifique d'*Epas1* a

été envisagée dans notre équipe au cours de ces trois dernières années et n'a pas pu aboutir pour des raisons techniques.

Enfin, la multiplicité des cibles potentielles (MBG, podocyte, endothélium) dans le modèle anti-MBG passif peut expliquer une atténuation de la différence induite par une délétion endothéliale face à une agression qui reste majoritairement podocytaire. Même si l'administration de VEGF, facteur de survie endothélial, a montré son efficacité dans le modèle anti-MBG^{46,184} et que les marqueurs endothéliaux sont diminués au cours des glomérulonéphrites¹⁸⁵, à notre connaissance, il n'y a pas d'étude expérimentale ayant montré un impact d'une modification génétique endothéliale dans le modèle.

EPAS1 ENDOTHELIAL ET LESIONS EPITHELIALES RENALES DANS LA NEPHROPATHIE HYPERTENSIVE: MECANISME LIANT AGRESSION ENDOTHELIALE ET HSF?

Notre étude sur le rôle endothélial s'est ensuite portée sur un modèle différent de glomérulopathie qui met en jeu les effets hypertensifs et locaux d'une molécule majeure dans le mécanisme lésionnel de l'hypertension artérielle: l'angiotensine II. L'angiotensine II est une molécule ayant des effets hypertensifs systémiques mais aussi des effets multiples tissulaires rénaux aboutissant à des lésions glomérulaires épithéliales comme on l'a vu précédemment. Dans cette partie de l'étude de façon très intéressante nous avons démontré que la délétion d'Epas1 de l'endothélium, sans affecter l'élévation attendue de la pression artérielle systémique au cours de la perfusion chronique d'angiotensine II, aggrave de façon notable la fuite urinaire d'albumine et les lésions épithéliales glomérulaires. Cette délétion endothéliale induit une modification du phénotype épithélial glomérulaire avec une activation des cellules pariétales exprimant le CD44¹⁶⁸ et perdant l'expression de la claudine-1 associée à une perte d'expression des marqueurs de différenciation podocytaire et une accumulation de matrice extracellulaire comme la fibronectine. L'association de ces lésions constitue histologiquement des lésions d'HSF suggérant que Epas1 endothélial pourrait représenter un facteur endothélial protecteur face au développement des lésions d'HSF secondaires hypertensives. Il est intéressant de noter le rôle important du complexe HIF localement dans le tissu rénal. Il contrôle la sécrétion d'érythropoïétine dans les fibroblastes interstitiels mais représente pour l'endothélium et l'épithélium rénal des facteurs de protection ou de progression des lésions. En effet, HIF-1 α semble avoir un rôle majeur épithélial et son activation aigüe pourrait être protectrice mais son activation chronique en particulier dans l'épithélium tubulaire peut

aboutir à la fibrose et au phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse qui sont délétères. Epas1 activé dans l'endothélium aurait au contraire un rôle protecteur dans l'ischémie-reperfusion, le modèle d'obstruction urétérale et dans notre cas la néphropathie hypertensive. Les mécanismes ne semblent pas être les mêmes dans tous les cas. En effet, dans l'étude de Kapitsinou et al. la délétion d'Epas1 endothéliale aboutissait à une activation endothéliale avec une surexpression des molécules pro-inflammatoires et d'adhésion leucocytaire³⁰⁶. Dans notre modèle le rôle protecteur de Epas1 semble indépendant de l'inflammation et pourrait passer par différents mécanismes.

L'hypothèse hémodynamique locale est peu probable à cause de l'absence de différence entre les tailles glomérulaires des deux génotypes. Même si à l'état basal, la réponse hémodynamique à un bolus d'angiotensine II est différente entre les deux souches, la perfusion continue d'angiotensine II ne semble pas induire des différences hémodynamiques locales qui impliqueraient les mécanismes locaux de vasorégulation touchant le monoxyde d'azote ou l'endothéline. Ceci est peu probable mais cette hypothèse ne pourra être formellement écartée que par des mesures de pression glomérulaire par microponction, malheureusement plus réalisées de nos jours.

Une deuxième hypothèse impliquerait le rôle de Epas1 sur l'intégrité vasculaire et la perméabilité de l'endothélium glomérulaire. Même si l'étude des souris ayant une délétion d'Epas1 à l'état basal n'a pas montré une différence de perméabilité vasculaire rénale³⁰⁷, l'agression par l'angiotensine II pourrait démasquer un déficit structurel endothélial. Celui-ci pourrait aboutir à un passage accru de flux à travers la membrane basale glomérulaire et une augmentation du stress cellulaire épithélial glomérulaire aggravant les lésions.

La troisième hypothèse fait d'Epas1 endothélial un facteur régulant le cross-talk épithélio-endothélial et les facteurs de survie locaux. En effet Epas1 contrôlant la voie du VEGF⁴⁶¹, un endothélium déficient en Epas1 pourrait diminuer l'expression de VEGFR2 et donc aggraver le phénotype endothélial. Par ailleurs, un excès relatif de VEGFA glomérulaire en absence de son récepteur endothélial peut avoir un effet délétère épithélial⁴⁶².

Par ailleurs HIF-1 α aurait un rôle inverse et aggravant sur les lésions glomérulaires dans la néphropathie hypertensive³¹⁷ corroborant les effets non redondants de ces deux sous-unités

alpha du complexe HIF dans un même type cellulaire. Cependant cette dernière étude est limitée par le fait que HIF-1 α n'est pas détectée dans l'endothélium dans d'autres études⁴⁶³.

La plupart des études étudiant l'hypoxie tissulaire rénale et sa participation à la progression de la néphropathie chronique se sont intéressés au compartiment tubulo-interstitiel issus de la théorie hypoxique de Fine et al²⁶⁶. Notre étude et les observations récentes sur la délétion podocytaire de VHL¹⁷² et la délétion endothéliale de HIF-1 α ³¹⁷ montrent que dans la genèse des lésions glomérulaires cette voie de signalisation a aussi une importance majeure et peut être un déterminant par exemple de la susceptibilité aux lésions d'HSF secondaires dans la néphropathie hypertensive ou dans la glomérulonéphrite extracapillaire. En effet, les mécanismes des HSF secondaires dans le cadre de l'hypertension artérielle restent à ce jour mal compris.

Sur le plan thérapeutique, les inhibiteurs des PHD utilisés à ce jour ne ciblent pas spécifiquement HIF-1 α ou Epas1. De part la différence des effets des ces deux protéines dans les différents compartiments cellulaires et au sein d'une même cellule il est difficile de conclure quelle est la voie qui aboutit à l'effet de ces drogues. Par ailleurs elles pourraient avoir dans des situations pathologiques des effets délétères, par exemple pro-fibrosants au long cours par un effet inducteur de HIF-1 α épithélial et nécessitent une surveillance rapprochée et surtout de développer des thérapies plus ciblées.

En effet, actuellement les inhibiteurs des PHD, comme le roxadustat, sont en train d'être développés^{322,325,326} dans le but de stimuler la production d'érythropoïétine dans le cadre de l'anémie de l'insuffisance rénale chronique. Chez les patients dialysés un éventuel effet délétère rénal n'est pas envisageable mais dans le cadre de l'IRC modérée ou sévère non dialysée ces drogues pourraient avoir des effets délétères sur la progression fibreuse de la néphropathie par exemple. Cet effet péjoratif pourra-t-il être contre balancé par un effet bénéfique endothélial d'après nos résultats expérimentaux? Au contraire, l'utilisation de ces produits dans le cadre de l'insuffisance rénale aiguë pourrait être envisagée d'après les résultats expérimentaux encourageants dans ce cadre. Les effets pléiotropiques de ces drogues du fait de la présence ubiquitaire de HIF devrait nous conduire à une utilisation prudente en particulier à cause des effets cardio-vasculaires ou dans le cadre du cancer⁴⁶⁴.

Globalement, on a vu que face à une même agression systémique hypertensive la seule délétion endothéliale d'un facteur de réponse à l'hypoxie aboutit à une aggravation significative des lésions glomérulaires épithéliales. Ceci corrobore encore le rôle déterminant de ces facteurs tissulaires dans la genèse et la progression des glomérulopathies et suggère que le développement de thérapies ciblées améliorerait le pronostic rénal dans cette pathologie hypertensive, 2ème cause d'IRCT dans le monde.

CONCLUSIONS

Les différents résultats expérimentaux présentés dans ce travail ont permis de détailler le rôle épithélial de systèmes classiquement décrit dans les cellules immunitaires. Nous avons étudié γ C/JAK/STAT dans la glomérulonéphrite inflammatoire et la glomérulopathie toxique et nous avons évalué le rôle du système de réponse à l'hypoxie endothélial dans la genèse des lésions glomérulaires hypertensives. Nous avons donc montré dans trois modèles de glomérulopathies (inflammatoire, toxique et hypertensive) que des facteurs épithéliaux ou endothéliaux sont des acteurs essentiels organisant les lésions glomérulaires. Face à un même niveau d'agression systémique, ces différences tissulaires peuvent moduler en grande partie les lésions glomérulaires. Ceci souligne l'intérêt de cibler ce compartiment tissulaire en thérapeutique.

Les thérapeutiques actuelles en néphrologie visent à moduler l'agression systémique et non les voies de signalisation tissulaires. Ces dernières sont pourtant des éléments essentiels organisant la genèse et la progression des lésions rénales et in fine le pronostic rénal. Corticoïdes et immunosuppresseurs sont administrés avec des preuves expérimentales et cliniques parfois faibles, sans qu'on puisse comprendre complètement les mécanismes d'action associés. Une partie de leur action pourrait passer par un effet épithélial direct..

Cependant, cette recherche sur les mécanismes physiopathologiques locaux des maladies glomérulaires doit s'accompagner en parallèle du développement des thérapies ciblant ces voies. Une complexité accrue est amenée par le fait que ces voies sont parfois partagées par d'autres types cellulaires et en particulier le système immunitaire. Ceci a deux conséquences principales. D'une part, nous devrions prendre en compte que les effets des thérapies immunosuppressives actuelles pourraient passer par un effet "off-target" sur l'épithélium ou l'endothélium. Cela implique aussi que de nouvelles molécules voulant cibler l'épithélium auront à faire face aussi à des effets immunitaires qui peuvent eux aussi être délétères. Une meilleure connaissance de ces voies épithéliales et endothéliales permettra d'anticiper d'éventuels effets indésirables. rénaux des thérapeutiques récentes.

Le développement des thérapies ciblées tissulaires nécessiterait d'identifier des voies de signalisation impliquées dans le développement des lésions glomérulaires et n'étant pas partagées par d'autres types cellulaires. La nanovectorisation thérapeutique, qui consiste à

encapsuler une molécule active dans une nanoparticule que l'on peut décorer d'anticorps ou de molécule d'adressage pourrait également ouvrir de nouveaux horizons. En effet, dans le domaine de la cancérologie et grâce à une collaboration étroite entre physiciens, chimistes et médecins, le développement de cette technique a montré son intérêt⁴⁶⁵. Cette technique, dont l'applicabilité en néphrologie est actuellement en train d'être testée par une autre équipe de notre laboratoire, représenterait, en association avec la recherche physiopathologique, une grande avancée thérapeutique dans ce domaine⁴⁶⁶.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Luque Y , Cathelin D, Vandermeersch S, Xu X, Sohier J, Placier S, Hertig A, Bories JC, Vasseur F, Campagne F, Di Santo JP, Vosshenrich C, Rondeau E, Mesnard L: **Glomerular common gamma chain confers B and T cell-independent resistance to glomerulonephritis**. Under review (25/04/2016). *Kidney International* KI-04-16-0543

Luque Y, Lenoir O, Bonnin P, Hardy L, Chipont A, Placier S, Vandermeersch S, Xu-Dubois YC, Souyri M, Baudrié V, Rondeau E, Mesnard L, Tharaux PL: **Endothelial Epas1 deficiency is sufficient to promote parietal epithelial cell activation and FSGS in experimental hypertension**. Under review (09/09/16). *Journal of the American Society of Nephrology* JASN-2016-09-0960.

Mesnard L, Cathelin D, Vandermeersch S, Rafat C, Luque Y, Sohier J, Nochy D, Garcon L, Callard P, Jouanneau C, Verpont M-C, Tharaux P-L, Hertig A, Rondeau E: **Genetic background-dependent thrombotic microangiopathy is related to vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling during anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice**. *Am. J. Pathol.* 184: 2438–2449, 2014

Autres publications réalisées pendant la durée de la thèse (2013-2016):

Luque Y, Louis K, Jouanneau C, Placier S, Esteve E, Bazin D, Rondeau E, Letavernier E, Wolfrohm A, Gosset C, Boueilh A, Burbach M, Frère P, Verpont MC, Vandermeersch S, Langui D, Daudon M, Frochot V, Mesnard L: **Vancomycin-associated cast nephropathy**. Under review (12/08/2016). *Journal of the American Society of Nephrology* JASN-2016-08-0867.

Luque Y, Anglicheau D, Rabant M, El Karoui K, Jamme M, Aubert O, et al. **Renal safety of high-dose, sucrose-free intravenous immunoglobulin in kidney transplant recipients: an observational study**. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2016 Aug 16

Luque Y, Bataille A, Taldir G, Rondeau É, Ridel C. **[Cardiac arrest in dialysis patients: Risk factors, preventive measures and management in 2015]**. *Nephrol Ther.* 2015 Nov 4

Luque Y, Jamme M, Rabant M, DeWolf S, Noël L-H, Thervet E, et al. **Long-term CD4 lymphopenia is associated with accelerated decline of kidney allograft function**. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2015 Oct 22

Cathelin D, Placier S, Ploug M, Verpont M-C, Vandermeersch S, Luque Y, et al. **Administration of Recombinant Soluble Urokinase Receptor Per Se Is Not Sufficient to Induce Podocyte Alterations and Proteinuria in Mice**. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2014 May 1

BIBLIOGRAPHIE

1. Benedek TG: History of the development of corticosteroid therapy. *Clin. Exp. Rheumatol.* 29: S-5-12, 2011
2. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C: Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N. Engl. J. Med.* 351: 1296–1305, 2004
3. Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, Lecordier L, Uzureau P, Freedman BI, Bowden DW, Langefeld CD, Oleksyk TK, Uscinski Knob AL, Bernhardt AJ, Hicks PJ, Nelson GW, Vanhollebeke B, Winkler CA, Kopp JB, Pays E, Pollak MR: Association of trypanolytic Apol1 variants with kidney disease in African Americans. *Science* 329: 841–845, 2010
4. Parsa A, Kao WHL, Xie D, Astor BC, Li M, Hsu C, Feldman HI, Parekh RS, Kusek JW, Greene TH, Fink JC, Anderson AH, Choi MJ, Wright JT, Lash JP, Freedman BI, Ojo A, Winkler CA, Raj DS, Kopp JB, He J, Jensvold NG, Tao K, Lipkowitz MS, Appel LJ, AASK Study Investigators, CRIC Study Investigators: APOL1 risk variants, race, and progression of chronic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 369: 2183–2196, 2013
5. Kanji Z, Powe CE, Wenger JB, Huang C, Ankers E, Sullivan DA, Collerone G, Powe NR, Tonelli M, Bhan I, Bernhardt AJ, Dibartolo S, Friedman D, Genovese G, Pollak MR, Thadhani R: Genetic variation in APOL1 associates with younger age at hemodialysis initiation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 2091–2097, 2011
6. Friedman DJ, Kozlitina J, Genovese G, Jog P, Pollak MR: Population-based risk assessment of APOL1 on renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 2098–2105, 2011
7. Madhavan SM, O’Toole JF, Konieczkowski M, Ganesan S, Bruggeman LA, Sedor JR: APOL1 localization in normal kidney and nondiabetic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 2119–2128, 2011
8. Kopp JB, Nelson GW, Sampath K, Johnson RC, Genovese G, An P, Friedman D, Briggs W, Dart R, Korbet S, Mokrzycki MH, Kimmel PL, Limou S, Ahuja TS, Berns JS, Fryc J, Simon EE, Smith MC, Trachtman H, Michel DM, Schelling JR, Vlahov D, Pollak M, Winkler CA: APOL1 genetic variants in focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 2129–2137, 2011
9. Papeta N, Kiryluk K, Patel A, Sterken R, Kacak N, Snyder HJ, Imus PH, Mhatre AN, Lawani AK, Julian BA, Wyatt RJ, Novak J, Wyatt CM, Ross MJ, Winston JA, Klotman ME, Cohen DJ, Appel GB, D’Agati VD, Klotman PE, Gharavi AG: APOL1 variants increase risk for FSGS and HIVAN but not IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 1991–1996, 2011
10. Kopp JB, Smith MW, Nelson GW, Johnson RC, Freedman BI, Bowden DW, Oleksyk T, McKenzie LM, Kajiyama H, Ahuja TS, Berns JS, Briggs W, Cho ME, Dart RA, Kimmel PL, Korbet SM, Michel DM, Mokrzycki MH, Schelling JR, Simon E, Trachtman H, Vlahov D, Winkler CA: MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Genet.* 40: 1175–1184, 2008
11. Couser WG: Glomerulonephritis. *Lancet Lond. Engl.* 353: 1509–1515, 1999
12. Whitworth JA, Morel-Maroger L, Mignon F, Richet G: The significance of extracapillary proliferation. Clinicopathological review of 60 patients. *Nephron* 16: 1–19, 1976

13. El Nahas AM: Masugi nephritis: a model for all seasons. In: *Experimental and Genetic Rat Models of Chronic Renal Failure*, pp 49–67, 1993
14. Unanue ER, Mardiney MR, Dixon FJ: Nephrotoxic serum nephritis in complement intact and deficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 98: 609–617, 1967
15. Lerner RA, Glassock RJ, Dixon FJ: The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 126: 989–1004, 1967
16. Steblay RW: Glomerulonephritis induced in sheep by injections of heterologous glomerular basement membrane and Freund's complete adjuvant. *J. Exp. Med.* 116: 253–272, 1962
17. Salant DJ, Cybulsky AV: Experimental glomerulonephritis. *Methods Enzymol.* 162: 421–461, 1988
18. Yaar M, Foidart JM, Brown KS, Rennard SI, Martin GR, Liotta L: The Goodpasture-like syndrome in mice induced by intravenous injections of anti-type IV collagen and anti-laminin antibody. *Am. J. Pathol.* 107: 79–91, 1982
19. Chugh S, Yuan H, Topham PS, Haydar SA, Mittal V, Taylor GA, Kalluri R, Salant DJ: Aminopeptidase A: a nephritogenic target antigen of nephrotoxic serum. *Kidney Int.* 59: 601–613, 2001
20. O'Meara YM, Natori Y, Minto AW, Goldstein DJ, Manning EC, Salant DJ: Nephrotoxic antiserum identifies a beta 1-integrin on rat glomerular epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 262: F1083-1091, 1992
21. Borza D-B, Zhang J-J, Beck LH, Meyer-Schwesinger C, Luo W: Mouse models of membranous nephropathy: the road less travelled by. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 2: 135–145, 2013
22. Farquhar MG, Saito A, Kerjaschki D, Orlando RA: The Heymann nephritis antigenic complex: megalin (gp330) and RAP. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 6: 35–47, 1995
23. Heymann W, Hackel DB, Harwood S, Wilson SG, Hunter JL: Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 100: 660–664, 1959
24. Pietromonaco S, Kerjaschki D, Binder S, Ullrich R, Farquhar MG: Molecular cloning of a cDNA encoding a major pathogenic domain of the Heymann nephritis antigen gp330. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 1811–1815, 1990
25. Edgington TS, Glassock RJ, Dixon FJ: Autologous immune complex nephritis induced with renal tubular antigen. I. Identification and isolation of the pathogenetic antigen. *J. Exp. Med.* 127: 555–572, 1968
26. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, Xing CY, Ni L, Mathieson PW, Mundel P: A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 13: 630–638, 2002
27. Meyer TN, Schwesinger C, Wahlefeld J, Dehde S, Kerjaschki D, Becker JU, Stahl R a. K, Thaiss F: A new mouse model of immune-mediated podocyte injury. *Kidney Int.* 72: 841–852, 2007

28. Sado Y, Okigaki T, Takamiya H, Seno S: Experimental autoimmune glomerulonephritis with pulmonary hemorrhage in rats. The dose-effect relationship of the nephritogenic antigen from bovine glomerular basement membrane. *J. Clin. Lab. Immunol.* 15: 199–204, 1984
29. Sado Y, Naito I, Akita M, Okigaki T: Strain specific responses of inbred rats on the severity of experimental autoimmune glomerulonephritis. *J. Clin. Lab. Immunol.* 19: 193–199, 1986
30. Bolton WK, May WJ, Sturgill BC: Proliferative autoimmune glomerulonephritis in rats: a model for autoimmune glomerulonephritis in humans. *Kidney Int.* 44: 294–306, 1993
31. Reynolds J, Mavromatidis K, Cashman SJ, Evans DJ, Pusey CD: Experimental autoimmune glomerulonephritis (EAG) induced by homologous and heterologous glomerular basement membrane in two substrains of Wistar-Kyoto rat. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 13: 44–52, 1998
32. Reynolds J, Moss J, Duda MA, Smith J, Karkar AM, Macherla V, Shore I, Evans DJ, Woodrow DF, Pusey CD: The evolution of crescentic nephritis and alveolar haemorrhage following induction of autoimmunity to glomerular basement membrane in an experimental model of Goodpasture's disease. *J. Pathol.* 200: 118–129, 2003
33. Ryan JJ, Reynolds J, Norgan VA, Pusey CD: Expression and characterization of recombinant rat alpha 3(IV)NC1 and its use in induction of experimental autoimmune glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 16: 253–261, 2001
34. Reynolds J, Prodromidi EI, Juggapah JK, Abbott DS, Holthaus KA, Kalluri R, Pusey CD: Nasal administration of recombinant rat alpha3(IV)NC1 prevents the development of experimental autoimmune glomerulonephritis in the WKY rat. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 16: 1350–1359, 2005
35. Reynolds J, Albouainain A, Duda MA, Evans DJ, Pusey CD: Strain susceptibility to active induction and passive transfer of experimental autoimmune glomerulonephritis in the rat. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 21: 3398–3408, 2006
36. Reynolds J, Cook PR, Ryan JJ, Norsworthy PJ, Glazier AM, Duda MA, Evans DJ, Aitman TJ, Pusey CD: Segregation of experimental autoimmune glomerulonephritis as a complex genetic trait and exclusion of Col4a3 as a candidate gene. *Exp. Nephrol.* 10: 402–407, 2002
37. Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, Mangion J, Robertson-Lowe C, Marshall AJ, Petretto E, Hodges MD, Bhangal G, Patel SG, Sheehan-Rooney K, Duda M, Cook PR, Evans DJ, Domin J, Flint J, Boyle JJ, Pusey CD, Cook HT: Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* 439: 851–855, 2006
38. Behmoaras J, Bhangal G, Smith J, McDonald K, Mutch B, Lai PC, Domin J, Game L, Salama A, Foxwell BM, Pusey CD, Cook HT, Aitman TJ: Jund is a determinant of macrophage activation and is associated with glomerulonephritis susceptibility. *Nat. Genet.* 40: 553–559, 2008
39. Chen L, Hellmark T, Wieslander J, Bolton WK: Immunodominant epitopes of alpha3(IV)NC1 induce autoimmune glomerulonephritis in rats. *Kidney Int.* 64: 2108–2120, 2003
40. Kohda T, Okada S-I, Hayashi A, Kanzaki S, Ninomiya Y, Taki M, Sado Y: High nephritogenicity of monoclonal antibodies belonging to IgG2a and IgG2b subclasses in rat anti-GBM nephritis. *Kidney Int.* 66: 177–186, 2004

41. Wu J, Hicks J, Borillo J, Glass WF, Lou Y-H: CD4(+) T cells specific to a glomerular basement membrane antigen mediate glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* 109: 517–524, 2002
42. Hopfer H, Maron R, Butzmann U, Helmchen U, Weiner HL, Kalluri R: The importance of cell-mediated immunity in the course and severity of autoimmune anti-glomerular basement membrane disease in mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17: 860–868, 2003
43. Hopfer H, Holzer J, Hünemörder S, Paust H-J, Sachs M, Meyer-Schwesinger C, Turner J-E, Panzer U, Mittrücker H-W: Characterization of the renal CD4+ T-cell response in experimental autoimmune glomerulonephritis. *Kidney Int.* 82: 60–71, 2012
44. Hopfer H, Hünemörder S, Treder J, Turner J-E, Paust H-J, Meyer-Schwesinger C, Hopfer U, Sachs M, Peters A, Bucher-Kocaoglu B, Ahrens S, Panzer U, Mittrücker H-W: Glomerulopathy induced by immunization with a peptide derived from the goodpasture antigen α 3IV-NC1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194: 3646–3655, 2015
45. Zhang J-J, Malekpour M, Luo W, Ge L, Oлару F, Wang X-P, Bah M, Sado Y, Heidet L, Kleinau S, Fogo AB, Borza D-B: Murine membranous nephropathy: immunization with α 3(IV) collagen fragment induces subepithelial immune complexes and Fc γ R-independent nephrotic syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188: 3268–3277, 2012
46. Mesnard L, Cathelin D, Vandermeersch S, Rafat C, Luque Y, Sohier J, Nochy D, Garcon L, Callard P, Jouanneau C, Verpont M-C, Tharaux P-L, Hertig A, Rondeau E: Genetic background-dependent thrombotic microangiopathy is related to vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling during anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *Am. J. Pathol.* 184: 2438–2449, 2014
47. Lippman RW, Jacobs EE: Nephrotoxic globulin nephritis. III. Prompt death after administration of nephrotoxic globulin to the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 81: 586–590, 1952
48. Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, Oh J, Asanuma K, Giardino L, Rastaldi MP, Calvaresi N, Watanabe H, Schwarz K, Faul C, Kretzler M, Davidson A, Sugimoto H, Kalluri R, Sharpe AH, Kreidberg JA, Mundel P: Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.* 113: 1390–1397, 2004
49. Comper WD: Is the LPS-mediated proteinuria mouse model relevant to human kidney disease? *Nat. Med.* 15: 133; author reply 133-134, 2009
50. Naruse T, Tsuchida A, Ogawa S, Yano S, Maekawa T: Selective glomerular thrombosis in rats induced by combined injections of nephrotoxic antiserum and lipopolysaccharide. *J. Lab. Clin. Med.* 105: 146–156, 1985
51. Savige JA, Evans DJ, Rees AJ: Kinetics of glomerular neutrophil influx after lipopolysaccharide in antibody-mediated injury. *Clin. Exp. Immunol.* 73: 134–138, 1988
52. Fu Y, Xie C, Chen J, Zhu J, Zhou H, Thomas J, Zhou XJ, Mohan C: Innate stimuli accentuate end-organ damage by nephrotoxic antibodies via Fc receptor and TLR stimulation and IL-1/TNF-alpha production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176: 632–639, 2006
53. Shirato I, Hossler H, Kimura K, Sakai T, Tomino Y, Kriz W: The development of focal segmental glomerulosclerosis in masugi nephritis is based on progressive podocyte damage. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 429: 255–273, 1996

54. Moeller MJ, Soofi A, Hartmann I, Le Hir M, Wiggins R, Kriz W, Holzman LB: Podocytes populate cellular crescents in a murine model of inflammatory glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 15: 61–67, 2004
55. Bariéty J, Bruneval P, Meyrier A, Mandet C, Hill G, Jacquot C: Podocyte involvement in human immune crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 68: 1109–1119, 2005
56. Fanciulli M, Norsworthy PJ, Petretto E, Dong R, Harper L, Kamesh L, Heward JM, Gough SCL, de Smith A, Blakemore AIF, Froguel P, Owen CJ, Pearce SHS, Teixeira L, Guillevin L, Graham DSC, Pusey CD, Cook HT, Vyse TJ, Aitman TJ: FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nat. Genet.* 39: 721–723, 2007
57. Bhan AK, Schneeberger EE, Collins AB, McCluskey RT: Evidence for a pathogenic role of a cell-mediated immune mechanism in experimental glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 148: 246–260, 1978
58. Rogers PR, Croft M: Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163: 1205–1213, 1999
59. Huang XR, Tipping PG, Shuo L, Holdsworth SR: Th1 responsiveness to nephritogenic antigens determines susceptibility to crescentic glomerulonephritis in mice. *Kidney Int.* 51: 94–103, 1997
60. Kitching AR, Tipping PG, Kurimoto M, Holdsworth SR: IL-18 has IL-12-independent effects in delayed-type hypersensitivity: studies in cell-mediated crescentic glomerulonephritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 165: 4649–4657, 2000
61. Kitching AR, Holdsworth SR, Tipping PG: IFN-gamma mediates crescent formation and cell-mediated immune injury in murine glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 10: 752–759, 1999
62. Timoshanko JR, Sedgwick JD, Holdsworth SR, Tipping PG: Intrinsic renal cells are the major source of tumor necrosis factor contributing to renal injury in murine crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 14: 1785–1793, 2003
63. Kitching AR, Tipping PG, Holdsworth SR: IL-12 directs severe renal injury, crescent formation and Th1 responses in murine glomerulonephritis. *Eur. J. Immunol.* 29: 1–10, 1999
64. Haas C, Ryffel B, Le Hir M: Crescentic glomerulonephritis in interferon-gamma receptor deficient mice. *J. Inflamm.* 47: 206–213, 1995
65. Kitching AR, Turner AL, Semple T, Li M, Edgtton KL, Wilson GR, Timoshanko JR, Hudson BG, Holdsworth SR: Experimental autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis: a protective role for IFN-gamma. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 15: 1764–1774, 2004
66. Kitching AR, Tipping PG, Mutch DA, Huang XR, Holdsworth SR: Interleukin-4 deficiency enhances Th1 responses and crescentic glomerulonephritis in mice. *Kidney Int.* 53: 112–118, 1998
67. Kitching AR, Tipping PG, Timoshanko JR, Holdsworth SR: Endogenous interleukin-10 regulates Th1 responses that induce crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 57: 518–525, 2000

68. Tipping PG, Kitching AR, Huang XR, Mutch DA, Holdsworth SR: Immune modulation with interleukin-4 and interleukin-10 prevents crescent formation and glomerular injury in experimental glomerulonephritis. *Eur. J. Immunol.* 27: 530–537, 1997
69. Kitching AR, Tipping PG, Huang XR, Mutch DA, Holdsworth SR: Interleukin-4 and interleukin-10 attenuate established crescentic glomerulonephritis in mice. *Kidney Int.* 52: 52–59, 1997
70. Higuchi N, Maruyama H, Kuroda T, Kameda S, Iino N, Kawachi H, Nishikawa Y, Hanawa H, Tahara H, Miyazaki J, Gejyo F: Hydrodynamics-based delivery of the viral interleukin-10 gene suppresses experimental crescentic glomerulonephritis in Wistar-Kyoto rats. *Gene Ther.* 10: 1297–1310, 2003
71. Cook HT, Singh SJ, Wembridge DE, Smith J, Tam FW, Pusey CD: Interleukin-4 ameliorates crescentic glomerulonephritis in Wistar Kyoto rats. *Kidney Int.* 55: 1319–1326, 1999
72. Kitching AR, Turner AL, Wilson GRA, Edgton KL, Tipping PG, Holdsworth SR: Endogenous IL-13 limits humoral responses and injury in experimental glomerulonephritis but does not regulate Th1 cell-mediated crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 15: 2373–2382, 2004
73. Li S, Holdsworth SR, Tipping PG: B7.1 and B7.2 co-stimulatory molecules regulate crescentic glomerulonephritis. *Eur. J. Immunol.* 30: 1394–1401, 2000
74. Odobasic D, Kitching AR, Tipping PG, Holdsworth SR: CD80 and CD86 costimulatory molecules regulate crescentic glomerulonephritis by different mechanisms. *Kidney Int.* 68: 584–594, 2005
75. Okano K, Nitta K, Ogawa S, Horita S, Habiro K, Nihei H, Abe R: Effects of double blockade of CD28 and inducible-costimulator signaling on anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *J. Lab. Clin. Med.* 144: 183–192, 2004
76. Odobasic D, Kitching AR, Semple TJ, Timoshanko JR, Tipping PG, Holdsworth SR: Glomerular expression of CD80 and CD86 is required for leukocyte accumulation and injury in crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 16: 2012–2022, 2005
77. Ruth A-J, Kitching AR, Li M, Semple TJ, Timoshanko JR, Tipping PG, Holdsworth SR: An IL-12-independent role for CD40-CD154 in mediating effector responses: studies in cell-mediated glomerulonephritis and dermal delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173: 136–144, 2004
78. Ruth A-J, Kitching AR, Semple TJ, Tipping PG, Holdsworth SR: Intrinsic renal cell expression of CD40 directs Th1 effectors inducing experimental crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 14: 2813–2822, 2003
79. Dai Y, Gu L, Yuan W, Yu Q, Ni Z, Ross MJ, Kaufman L, Xiong H, Salant DJ, He JC, Chuang PY: Podocyte-specific deletion of signal transducer and activator of transcription 3 attenuates nephrotoxic serum-induced glomerulonephritis. *Kidney Int.* 84: 950–961, 2013
80. Kim YS, Zheng S, Yang SH, Kim HL, Lim CS, Chae DW, Chun R, Lee JS, Kim S: Differential expression of various cytokine and chemokine genes between proliferative and non-proliferative glomerulonephritides. *Clin. Nephrol.* 56: 199–206, 2001
81. Cairns LS, Phelps RG, Bowie L, Hall AM, Saweirs WWM, Rees AJ, Barker RN: The fine specificity and cytokine profile of T-helper cells responsive to the alpha3 chain of type IV collagen in Goodpasture's disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 14: 2801–2812, 2003

82. Cunningham MA, Huang XR, Dowling JP, Tipping PG, Holdsworth SR: Prominence of cell-mediated immunity effectors in “pauci-immune” glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 10: 499–506, 1999
83. Paust H-J, Turner J-E, Steinmetz OM, Peters A, Heymann F, Hölscher C, Wolf G, Kurts C, Mittrücker H-W, Stahl RAK, Panzer U: The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20: 969–979, 2009
84. Summers SA, Steinmetz OM, Li M, Kausman JY, Semple T, Edgerton KL, Borza D-B, Braley H, Holdsworth SR, Kitching AR: Th1 and Th17 cells induce proliferative glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20: 2518–2524, 2009
85. Steinmetz OM, Summers SA, Gan P-Y, Semple T, Holdsworth SR, Kitching AR: The Th17-defining transcription factor ROR γ t promotes glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 472–483, 2011
86. Turner J-E, Krebs C, Tittel AP, Paust H-J, Meyer-Schwesinger C, Bennstein SB, Steinmetz OM, Prinz I, Magnus T, Korn T, Stahl RAK, Kurts C, Panzer U: IL-17A production by renal $\gamma\delta$ T cells promotes kidney injury in crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 23: 1486–1495, 2012
87. Disteldorf EM, Krebs CF, Paust H-J, Turner J-E, Nouailles G, Tittel A, Meyer-Schwesinger C, Stege G, Brix S, Velden J, Wiech T, Helmchen U, Steinmetz OM, Peters A, Bennstein SB, Kaffke A, Llanto C, Lira SA, Mittrücker H-W, Stahl RAK, Kurts C, Kaufmann SHE, Panzer U: CXCL5 drives neutrophil recruitment in TH17-mediated GN. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 26: 55–66, 2015
88. Riedel J-H, Paust H-J, Krohn S, Turner J-E, Kluger MA, Steinmetz OM, Krebs CF, Stahl RAK, Panzer U: IL-17F Promotes Tissue Injury in Autoimmune Kidney Diseases. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 2016
89. Krebs CF, Kapffer S, Paust H-J, Schmidt T, Bennstein SB, Peters A, Stege G, Brix SR, Meyer-Schwesinger C, Müller R-U, Turner J-E, Steinmetz OM, Wolf G, Stahl RAK, Panzer U: MicroRNA-155 drives TH17 immune response and tissue injury in experimental crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 24: 1955–1965, 2013
90. Loof T, Krämer S, Gaedeke J, Neumayer H-H, Peters H: IL-17 Expression in the Time Course of Acute Anti-Thy1 Glomerulonephritis. *PLoS One* 11: e0156480, 2016
91. Hamour S, Gan P-Y, Pepper R, Florez Barros F, Wang H-H, O’Sullivan K, Iwakura Y, Cook T, Pusey C, Holdsworth S, Salama A: Local IL-17 Production Exerts a Protective Role in Murine Experimental Glomerulonephritis. *PLoS One* 10: e0136238, 2015
92. Odobasic D, Gan P-Y, Summers SA, Semple TJ, Muljadi RCM, Iwakura Y, Kitching AR, Holdsworth SR: Interleukin-17A promotes early but attenuates established disease in crescentic glomerulonephritis in mice. *Am. J. Pathol.* 179: 1188–1198, 2011
93. Braun GS, Nagayama Y, Maruta Y, Heymann F, van Roeyen CR, Klinkhammer BM, Boor P, Villa L, Salant DJ, Raffetseder U, Rose-John S, Ostendorf T, Floege J: IL-6 Trans-Signaling Drives Murine Crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 27: 132–142, 2016
94. Ooi JD, Snelgrove SL, Engel DR, Hochheiser K, Ludwig-Portugall I, Nozaki Y, O’Sullivan KM, Hickey MJ, Holdsworth SR, Kurts C, Kitching AR: Endogenous foxp3(+) T-regulatory cells suppress anti-glomerular basement membrane nephritis. *Kidney Int.* 79: 977–986, 2011

95. Paust H-J, Ostmann A, Erhardt A, Turner J-E, Velden J, Mittrücker H-W, Sparwasser T, Panzer U, Tiegs G: Regulatory T cells control the Th1 immune response in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 80: 154–164, 2011
96. Wolf D, Hohegger K, Wolf AM, Rumpold HF, Gastl G, Tilg H, Mayer G, Gunsilius E, Rosenkranz AR: CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 16: 1360–1370, 2005
97. Paust H-J, Riedel J-H, Krebs CF, Turner J-E, Brix SR, Krohn S, Velden J, Wiech T, Kaffke A, Peters A, Bennisstein SB, Kapffer S, Meyer-Schwesinger C, Wegscheid C, Tiegs G, Thaiss F, Mittrücker H-W, Steinmetz OM, Stahl RAK, Panzer U: CXCR3+ Regulatory T Cells Control TH1 Responses in Crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 27: 1933–1942, 2016
98. Li S, Holdsworth SR, Tipping PG: Antibody independent crescentic glomerulonephritis in mu chain deficient mice. *Kidney Int.* 51: 672–678, 1997
99. Kusuyama Y, Nishihara T, Saito K: Nephrotoxic nephritis in nude mice. *Clin. Exp. Immunol.* 46: 20–26, 1981
100. Sato T, Oite T, Nagase M, Shimizu F: Nephrotoxic serum nephritis in nude rats: the roles of host immune reactions. *Clin. Exp. Immunol.* 84: 139–144, 1991
101. Cochrane CG, Unanue ER, Dixon FJ: A ROLE OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES AND COMPLEMENT IN NEPHROTOXIC NEPHRITIS. *J. Exp. Med.* 122: 99–116, 1965
102. Segerer S, Schlöndorff D: Role of chemokines for the localization of leukocyte subsets in the kidney. *Semin. Nephrol.* 27: 260–274, 2007
103. Devi S, Li A, Westhorpe CLV, Lo CY, Abeynaike LD, Snelgrove SL, Hall P, Ooi JD, Sobey CG, Kitching AR, Hickey MJ: Multiphoton imaging reveals a new leukocyte recruitment paradigm in the glomerulus. *Nat. Med.* 19: 107–112, 2013
104. De Vriese AS, Endlich K, Elger M, Lameire NH, Atkins RC, Lan HY, Rupin A, Kriz W, Steinhausen MW: The role of selectins in glomerular leukocyte recruitment in rat anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 10: 2510–2517, 1999
105. Ito I, Yuzawa Y, Mizuno M, Nishikawa K, Tashita A, Jomori T, Hotta N, Matsuo S: Effects of a new synthetic selectin blocker in an acute rat thrombotic glomerulonephritis. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 38: 265–273, 2001
106. Johnson RJ, Couser WG, Chi EY, Adler S, Klebanoff SJ: New mechanism for glomerular injury. Myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. *J. Clin. Invest.* 79: 1379–1387, 1987
107. Xiao H, Heeringa P, Liu Z, Huugen D, Hu P, Maeda N, Falk RJ, Jennette JC: The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. *Am. J. Pathol.* 167: 39–45, 2005
108. Kumar SVR, Kulkarni OP, Mulay SR, Darisipudi MN, Romoli S, Thomasova D, Scherbaum CR, Hohenstein B, Hugo C, Müller S, Liapis H, Anders H-J: Neutrophil Extracellular Trap-Related Extracellular Histones Cause Vascular Necrosis in Severe GN. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 26: 2399–2413, 2015

109. Suzuki Y, Gómez-Guerrero C, Shirato I, López-Franco O, Gallego-Delgado J, Sanjuán G, Lázaro A, Hernández-Vargas P, Okumura K, Tomino Y, Ra C, Egido J: Pre-existing glomerular immune complexes induce polymorphonuclear cell recruitment through an Fc receptor-dependent respiratory burst: potential role in the perpetuation of immune nephritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170: 3243–3253, 2003
110. Shashidharamurthy R, Hennigar RA, Fuchs S, Palaniswami P, Sherman M, Selvaraj P: Extravasations and emigration of neutrophils to the inflammatory site depend on the interaction of immune-complex with Fcγ receptors and can be effectively blocked by decoy Fcγ receptors. *Blood* 111: 894–904, 2008
111. Nakamura A, Yuasa T, Ujike A, Ono M, Nukiwa T, Ravetch JV, Takai T: Fcγ receptor IIB-deficient mice develop Goodpasture's syndrome upon immunization with type IV collagen: a novel murine model for autoimmune glomerular basement membrane disease. *J. Exp. Med.* 191: 899–906, 2000
112. Mayadas TN, Tsokos GC, Tsuboi N: Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. *Circulation* 120: 2012–2024, 2009
113. Summers SA, Steinmetz OM, Ooi JD, Gan P, O'Sullivan KM, Visvanathan K, Akira S, Kitching AR, Holdsworth SR: Toll-like receptor 9 enhances nephritogenic immunity and glomerular leukocyte recruitment, exacerbating experimental crescentic glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* 177: 2234–2244, 2010
114. Summers SA, van der Veen BS, O'Sullivan KM, Gan P-Y, Ooi JD, Heeringa P, Satchell SC, Mathieson PW, Saleem MA, Visvanathan K, Holdsworth SR, Kitching AR: Intrinsic renal cell and leukocyte-derived TLR4 aggravate experimental anti-MPO glomerulonephritis. *Kidney Int.* 78: 1263–1274, 2010
115. Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC: Local macrophage proliferation in the pathogenesis of glomerular crescent formation in rat anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 110: 233–240, 1997
116. Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC: Involvement of activated periglomerular leukocytes in the rupture of Bowman's capsule and glomerular crescent progression in experimental glomerulonephritis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 67: 743–751, 1992
117. Boucher A, Droz D, Adafer E, Noël LH: Relationship between the integrity of Bowman's capsule and the composition of cellular crescents in human crescentic glomerulonephritis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 56: 526–533, 1987
118. Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TN, Salant DJ, Gutierrez-Ramos JC: RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J. Exp. Med.* 185: 1371–1380, 1997
119. Wada T, Furuichi K, Segawa-Takaeda C, Shimizu M, Sakai N, Takeda SI, Takasawa K, Kida H, Kobayashi KI, Mukaida N, Ohmoto Y, Matsushima K, Yokoyama H: MIP-1α and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 56: 995–1003, 1999
120. Segerer S, Cui Y, Hudkins KL, Goodpaster T, Eitner F, Mack M, Schlöndorff D, Alpers CE: Expression of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor chemokine

- receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 11: 2231–2242, 2000
121. Lan HY, Yu XQ, Yang N, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Pichler R, Johnson RJ, Atkins RC: De novo glomerular osteopontin expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 53: 136–145, 1998
 122. Hudkins KL, Giachelli CM, Eitner F, Couser WG, Johnson RJ, Alpers CE: Osteopontin expression in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 57: 105–116, 2000
 123. Nishikawa K, Guo YJ, Miyasaka M, Tamatani T, Collins AB, Sy MS, McCluskey RT, Andres G: Antibodies to intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 prevent crescent formation in rat autoimmune glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 177: 667–677, 1993
 124. Adler S, Brady HR: Cell adhesion molecules and the glomerulopathies. *Am. J. Med.* 107: 371–386, 1999
 125. Tipping PG, Erlich JH, Apostolopoulos J, Mackman N, Loskutoff D, Holdsworth SR: Glomerular tissue factor expression in crescentic glomerulonephritis. Correlations between antigen, activity, and mRNA. *Am. J. Pathol.* 147: 1736–1748, 1995
 126. Khan SB, Cook HT, Bhangal G, Smith J, Tam FWK, Pusey CD: Antibody blockade of TNF-alpha reduces inflammation and scarring in experimental crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 67: 1812–1820, 2005
 127. Isaka Y, Akagi Y, Ando Y, Tsujie M, Sudo T, Ohno N, Border WA, Noble NA, Kaneda Y, Hori M, Imai E: Gene therapy by transforming growth factor-beta receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 55: 465–475, 1999
 128. Song CY, Kim BC, Hong HK, Lee HS: TGF-beta type II receptor deficiency prevents renal injury via decrease in ERK activity in crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 71: 882–888, 2007
 129. Isaka Y, Nakamura H, Mizui M, Takabatake Y, Horio M, Kawachi H, Shimizu F, Imai E, Hori M: DNase for TGF-beta suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 66: 586–590, 2004
 130. Chavele K-M, Martinez-Pomares L, Domin J, Pemberton S, Haslam SM, Dell A, Cook HT, Pusey CD, Gordon S, Salama AD: Mannose receptor interacts with Fc receptors and is critical for the development of crescentic glomerulonephritis in mice. *J. Clin. Invest.* 120: 1469–1478, 2010
 131. Moussa L, Apostolopoulos J, Davenport P, Tchongue J, Tipping PG: Protease-activated receptor-2 augments experimental crescentic glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* 171: 800–808, 2007
 132. Lelongt B, Bengatta S, Delauche M, Lund LR, Werb Z, Ronco PM: Matrix metalloproteinase 9 protects mice from anti-glomerular basement membrane nephritis through its fibrinolytic activity. *J. Exp. Med.* 193: 793–802, 2001
 133. Hyodo T, Oda T, Kikuchi Y, Higashi K, Kushiyaama T, Yamamoto K, Yamada M, Suzuki S, Hokari R, Kinoshita M, Seki S, Fujinaka H, Yamamoto T, Miura S, Kumagai H: Voltage-gated potassium channel Kv1.3 blocker as a potential treatment for rat anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 299: F1258–1269, 2010

134. Krüger T, Benke D, Eitner F, Lang A, Wirtz M, Hamilton-Williams EE, Engel D, Giese B, Müller-Newen G, Floege J, Kurts C: Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 15: 613–621, 2004
135. Riedel J-H, Paust H-J, Turner J-E, Tittel AP, Krebs C, Disteldorf E, Wegscheid C, Tiegs G, Velden J, Mittrücker H-W, Garbi N, Stahl RAK, Steinmetz OM, Kurts C, Panzer U: Immature renal dendritic cells recruit regulatory CXCR6(+) invariant natural killer T cells to attenuate crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 23: 1987–2000, 2012
136. Mesnard L, Keller AC, Michel M-L, Vandermeersch S, Rafat C, Letavernier E, Tillet Y, Rondeau E, Leite-de-Moraes MC: Invariant natural killer T cells and TGF-beta attenuate anti-GBM glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20: 1282–1292, 2009
137. Scholz J, Lukacs-Kornek V, Engel DR, Specht S, Kiss E, Eitner F, Floege J, Groene H-J, Kurts C: Renal dendritic cells stimulate IL-10 production and attenuate nephrotoxic nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 19: 527–537, 2008
138. Hochheiser K, Engel DR, Hammerich L, Heymann F, Knolle PA, Panzer U, Kurts C: Kidney Dendritic Cells Become Pathogenic during Crescentic Glomerulonephritis with Proteinuria. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 306–316, 2011
139. Hochheiser K, Heuser C, Krause TA, Teteris S, Ilias A, Weisheit C, Hoss F, Tittel AP, Knolle PA, Panzer U, Engel DR, Tharaux P-L, Kurts C: Exclusive CX3CR1 dependence of kidney DCs impacts glomerulonephritis progression. *J. Clin. Invest.* 123: 4242–4254, 2013
140. Shinozaki M: IL-15, a survival factor for kidney epithelial cells, counteracts apoptosis and inflammation during nephritis. *J. Clin. Invest.* 109: 951–960, 2002
141. Noris M, Remuzzi G: Overview of complement activation and regulation. *Semin. Nephrol.* 33: 479–492, 2013
142. Botto M, Kirschfink M, Macor P, Pickering MC, Würzner R, Tedesco F: Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Mol. Immunol.* 46: 2774–2783, 2009
143. Pickering MC, Warren J, Rose KL, Carlucci F, Wang Y, Walport MJ, Cook HT, Botto M: Prevention of C5 activation ameliorates spontaneous and experimental glomerulonephritis in factor H-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 9649–9654, 2006
144. Sheerin NS, Springall T, Carroll MC, Hartley B, Sacks SH: Protection against anti-glomerular basement membrane (GBM)-mediated nephritis in C3- and C4-deficient mice. *Clin. Exp. Immunol.* 110: 403–409, 1997
145. Sogabe H, Nangaku M, Ishibashi Y, Wada T, Fujita T, Sun X, Miwa T, Madaio MP, Song WC: Increased susceptibility of decay-accelerating factor deficient mice to anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167: 2791–2797, 2001
146. Hébert MJ, Takano T, Papayianni A, Rennke HG, Minto A, Salant DJ, Carroll MC, Brady HR: Acute nephrotoxic serum nephritis in complement knockout mice: relative roles of the classical and alternate pathways in neutrophil recruitment and proteinuria. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 13: 2799–2803, 1998

147. Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, Schneider W, Luft FC, Kettritz R: C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20: 289–298, 2009
148. Thurman JM, Tchepeleva SN, Haas M, Panzer S, Boackle SA, Glogowska MJ, Quigg RJ, Holers VM: Complement alternative pathway activation in the autologous phase of nephrotoxic serum nephritis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 302: F1529-1536, 2012
149. Bao L, Haas M, Quigg RJ: Complement factor H deficiency accelerates development of lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 285–295, 2011
150. Naish P, Penn GB, Evans DJ, Peters DK: The effect of defibrination on nephrotoxic serum nephritis in rabbits. *Clin. Sci.* 42: 643–646, 1972
151. Thomson NM, Moran J, Simpson IJ, Peters DK: Defibrination with ancrod in nephrotoxic nephritis in rabbits. *Kidney Int.* 10: 343–347, 1976
152. Cunningham MA, Kitching AR, Tipping PG, Holdsworth SR: Fibrin independent proinflammatory effects of tissue factor in experimental crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 66: 647–654, 2004
153. Erlich JH, Apostolopoulos J, Wun TC, Kretzmer KK, Holdsworth SR, Tipping PG: Renal expression of tissue factor pathway inhibitor and evidence for a role in crescentic glomerulonephritis in rabbits. *J. Clin. Invest.* 98: 325–335, 1996
154. Cunningham MA, Ono T, Hewitson TD, Tipping PG, Becker GJ, Holdsworth SR: Tissue factor pathway inhibitor expression in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 55: 1311–1318, 1999
155. Cunningham MA, Rondeau E, Chen X, Coughlin SR, Holdsworth SR, Tipping PG: Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 191: 455–462, 2000
156. Kitamoto Y, Arizono K, Fukui H, Tomita K, Kitamura H, Taguma Y, Imamura T: Urinary thrombin: a novel marker of glomerular inflammation for the diagnosis of crescentic glomerulonephritis (prospective observational study). *PLoS One* 10: e0118704, 2015
157. Kitching AR, Holdsworth SR, Ploplis VA, Plow EF, Collen D, Carmeliet P, Tipping PG: Plasminogen and plasminogen activators protect against renal injury in crescentic glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 185: 963–968, 1997
158. Kitching AR, Kong YZ, Huang XR, Davenport P, Edgton KL, Carmeliet P, Holdsworth SR, Tipping PG: Plasminogen activator inhibitor-1 is a significant determinant of renal injury in experimental crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 14: 1487–1495, 2003
159. Rondeau E, Mougenot B, Lacave R, Peraldi MN, Kruithof EK, Sraer JD: Plasminogen activator inhibitor 1 in renal fibrin deposits of human nephropathies. *Clin. Nephrol.* 33: 55–60, 1990
160. Xu Y, Berrou J, Chen X, Fouqueray B, Callard P, Sraer JD, Rondeau E: Induction of urokinase receptor expression in nephrotoxic nephritis. *Exp. Nephrol.* 9: 397–404, 2001
161. Hertig A, Berrou J, Allory Y, Breton L, Commo F, Costa De Beauregard M-A, Carmeliet P, Rondeau E: Type 1 plasminogen activator inhibitor deficiency aggravates the course of experimental

- glomerulonephritis through overactivation of transforming growth factor beta. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17: 1904–1906, 2003
162. Marudamuthu AS, Shetty SK, Bhandary YP, Karandashova S, Thompson M, Sathish V, Florova G, Hogan TB, Pabelick CM, Prakash YS, Tsukasaki Y, Fu J, Ikebe M, Idell S, Shetty S: Plasminogen activator inhibitor-1 suppresses profibrotic responses in fibroblasts from fibrotic lungs. *J. Biol. Chem.* 290: 9428–9441, 2015
 163. Koda R, Yoshino A, Imanishi Y, Kawamoto S, Ueda Y, Yaoita E, Kazama JJ, Narita I, Takeda T: Expression of tight junction protein claudin-1 in human crescentic glomerulonephritis. *Int. J. Nephrol.* 2014: 598670, 2014
 164. Hamatani H, Hiromura K, Sakairi T, Takahashi S, Watanabe M, Maeshima A, Ohse T, Pippin JW, Shankland SJ, Nojima Y: Expression of a novel stress-inducible protein, sestrin 2, in rat glomerular parietal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 307: F708-717, 2014
 165. Smeets B, Uhlig S, Fuss A, Mooren F, Wetzels JFM, Floege J, Moeller MJ: Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20: 2604–2615, 2009
 166. Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ, Song Q, Lan HY: Modulators of crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 7: 2271–2278, 1996
 167. Djudjaj S, Lue H, Rong S, Papisotiriou M, Klinkhammer BM, Zok S, Klaener O, Braun GS, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Bucala R, Tittel AP, Kurts C, Moeller MJ, Floege J, Ostendorf T, Bernhagen J, Boor P: Macrophage Migration Inhibitory Factor Mediates Proliferative GN via CD74. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 27: 1650–1664, 2016
 168. Smeets B, Kuppe C, Sicking E-M, Fuss A, Jirak P, van Kuppevelt TH, Endlich K, Wetzels JFM, Gröne H-J, Floege J, Moeller MJ: Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 1262–1274, 2011
 169. Bariety J, Hill GS, Mandet C, Irinopoulou T, Jacquot C, Meyrier A, Bruneval P: Glomerular epithelial-mesenchymal transdifferentiation in pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 18: 1777–1784, 2003
 170. Appel D, Kershaw DB, Smeets B, Yuan G, Fuss A, Frye B, Elger M, Kriz W, Floege J, Moeller MJ: Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20: 333–343, 2009
 171. Le Hir M, Keller C, Eschmann V, Hähnel B, Hosser H, Kriz W: Podocyte bridges between the tuft and Bowman's capsule: an early event in experimental crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 12: 2060–2071, 2001
 172. Ding M, Cui S, Li C, Jothy S, Haase V, Steer BM, Marsden PA, Pippin J, Shankland S, Rastaldi MP, Cohen CD, Kretzler M, Quaggin SE: Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nat. Med.* 12: 1081–1087, 2006
 173. Bollée G, Flamant M, Schordan S, Fligny C, Rumpel E, Milon M, Schordan E, Sabaa N, Vandermeersch S, Galaup A, Rodenas A, Casal I, Sunnarborg SW, Salant DJ, Kopp JB, Threadgill DW, Quaggin SE, Dussaule J-C, Germain S, Mesnard L, Endlich K, Boucheix C, Belenfant X, Callard P, Endlich N, Tharaux P-L: Epidermal growth factor receptor promotes glomerular injury and

- renal failure in rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Nat. Med.* 17: 1242–1250, 2011
174. Flamant M, Bollée G, Hénique C, Tharaux P-L: Epidermal growth factor: a new therapeutic target in glomerular disease. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 27: 1297–1304, 2012
175. Henique C, Bollee G, Lenoir O, Dhaun N, Camus M, Chipont A, Flosseau K, Mandet C, Yamamoto M, Karras A, Thervet E, Bruneval P, Nochy D, Mesnard L, Tharaux P-L: Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Drives Podocyte-Specific Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Essential for Resistance to Crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 27: 172–188, 2016
176. Agrawal S, Chanley MA, Westbrook D, Nie X, Kitao T, Guess AJ, Benndorf R, Hidalgo G, Smoyer WE: Pioglitazone Enhances the Beneficial Effects of Glucocorticoids in Experimental Nephrotic Syndrome. *Sci. Rep.* 6: 24392, 2016
177. Arakawa T, Masaki T, Hirai T, Doi S, Kuratsune M, Arihiro K, Kohno N, Yorioka N: Activation of signal transducer and activator of transcription 3 correlates with cell proliferation and renal injury in human glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 23: 3418–3426, 2008
178. Ronconi E, Sagrinati C, Angelotti ML, Lazzeri E, Mazzinghi B, Ballerini L, Parente E, Becherucci F, Gacci M, Carini M, Maggi E, Serio M, Vannelli GB, Lasagni L, Romagnani S, Romagnani P: Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20: 322–332, 2009
179. Smeets B, Angelotti ML, Rizzo P, Dijkman H, Lazzeri E, Mooren F, Ballerini L, Parente E, Sagrinati C, Mazzinghi B, Ronconi E, Becherucci F, Benigni A, Steenbergen E, Lasagni L, Remuzzi G, Wetzels J, Romagnani P: Renal progenitor cells contribute to hyperplastic lesions of podocytopathies and crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20: 2593–2603, 2009
180. Yuan HT, Tipping PG, Li XZ, Long DA, Woolf AS: Angiopoietin correlates with glomerular capillary loss in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Kidney Int.* 61: 2078–2089, 2002
181. Kühn K, Ryan GB, Hein SJ, Galaske RG, Karnovsky MJ: An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in rat nephrotoxic nephritis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 36: 375–387, 1977
182. Bazari H, Guimaraes AR, Kushner YB: Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 20-2012. A 77-year-old man with leg edema, hematuria, and acute renal failure. *N. Engl. J. Med.* 366: 2503–2515, 2012
183. Stave GM, Croker BP: Thrombotic microangiopathy in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 108: 747–751, 1984
184. Masuda Y, Shimizu A, Mori T, Ishiwata T, Kitamura H, Ohashi R, Ishizaki M, Asano G, Sugisaki Y, Yamanaka N: Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* 159: 599–608, 2001

185. Hohenstein B, Colin M, Foellmer C, Amann KU, Brekken RA, Daniel C, Hugo CPM: Autocrine VEGF-VEGF-R loop on podocytes during glomerulonephritis in humans. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 25: 3170–3180, 2010
186. Rauen T, Eitner F, Fitzner C, Sommerer C, Zeier M, Otte B, Panzer U, Peters H, Benck U, Mertens PR, Kuhlmann U, Witzke O, Gross O, Vielhauer V, Mann JFE, Hilgers R-D, Floege J, STOP-IgAN Investigators: Intensive Supportive Care plus Immunosuppression in IgA Nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 373: 2225–2236, 2015
187. Couser WG: Rapidly progressive glomerulonephritis: classification, pathogenetic mechanisms, and therapy. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 11: 449–464, 1988
188. Johnson JP, Moore J, Austin HA, Balow JE, Antonovych TT, Wilson CB: Therapy of anti-glomerular basement membrane antibody disease: analysis of prognostic significance of clinical, pathologic and treatment factors. *Medicine (Baltimore)* 64: 219–227, 1985
189. Cui Z, Zhao J, Jia X, Zhu S, Jin Q, Cheng X, Zhao M: Anti-glomerular basement membrane disease: outcomes of different therapeutic regimens in a large single-center Chinese cohort study. *Medicine (Baltimore)* 90: 303–311, 2011
190. Levy JB, Turner AN, Rees AJ, Pusey CD: Long-term outcome of anti-glomerular basement membrane antibody disease treated with plasma exchange and immunosuppression. *Ann. Intern. Med.* 134: 1033–1042, 2001
191. Kitiyakara C, Kopp JB, Eggers P: Trends in the epidemiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin. Nephrol.* 23: 172–182, 2003
192. D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ: Focal segmental glomerulosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 365: 2398–2411, 2011
193. Wiggins RC: The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.* 71: 1205–1214, 2007
194. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jennette JC: Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 43: 368–382, 2004
195. Thomas DB, Franceschini N, Hogan SL, Ten Holder S, Jennette CE, Falk RJ, Jennette JC: Clinical and pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants. *Kidney Int.* 69: 920–926, 2006
196. Stokes MB, Valeri AM, Markowitz GS, D'Agati VD: Cellular focal segmental glomerulosclerosis: Clinical and pathologic features. *Kidney Int.* 70: 1783–1792, 2006
197. Barisoni L, Kriz W, Mundel P, D'Agati V: The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 10: 51–61, 1999
198. Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Sanden SK, Hussain S, Filipiak WE, Saunders TL, Dysko RC, Kohno K, Holzman LB, Wiggins RC: Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 16: 2941–2952, 2005

199. Matsusaka T, Sandgren E, Shintani A, Kon V, Pastan I, Fogo AB, Ichikawa I: Podocyte injury damages other podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 1275–1285, 2011
200. Papeta N, Zheng Z, Schon EA, Brosel S, Altintas MM, Nasr SH, Reiser J, D'Agati VD, Gharavi AG: Prkdc participates in mitochondrial genome maintenance and prevents Adriamycin-induced nephropathy in mice. *J. Clin. Invest.* 120: 4055–4064, 2010
201. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCreedy P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* 1: 575–582, 1998
202. Santín S, García-Maset R, Ruíz P, Giménez I, Zamora I, Peña A, Madrid A, Camacho JA, Fraga G, Sánchez-Moreno A, Cobo MA, Bernis C, Ortiz A, de Pablos AL, Pintos G, Justa ML, Hidalgo-Barquero E, Fernández-Llama P, Ballarín J, Ars E, Torra R, FSGS Spanish Study Group: Nephrin mutations cause childhood- and adult-onset focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 76: 1268–1276, 2009
203. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C: NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat. Genet.* 24: 349–354, 2000
204. Peti-Peterdi J, Sipos A: A high-powered view of the filtration barrier. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 21: 1835–1841, 2010
205. Friedrich C, Endlich N, Kriz W, Endlich K: Podocytes are sensitive to fluid shear stress in vitro. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291: F856–865, 2006
206. Wu J, Zheng C, Wang X, Yun S, Zhao Y, Liu L, Lu Y, Ye Y, Zhu X, Zhang C, Shi S, Liu Z: MicroRNA-30 family members regulate calcium/calcineurin signaling in podocytes. *J. Clin. Invest.* 125: 4091–4106, 2015
207. Olabisi OA, Zhang J-Y, VerPlank L, Zahler N, DiBartolo S, Heneghan JF, Schlöndorff JS, Suh JH, Yan P, Alper SL, Friedman DJ, Pollak MR: APOL1 kidney disease risk variants cause cytotoxicity by depleting cellular potassium and inducing stress-activated protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113: 830–837, 2016
208. McCarthy ET, Sharma M, Savin VJ: Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 5: 2115–2121, 2010
209. Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, Sageshima J, Maignel D, Karumanchi SA, Yap H-K, Saleem M, Zhang Q, Nikolic B, Chaudhuri A, Daftarian P, Salido E, Torres A, Salifu M, Sarwal MM, Schaefer F, Morath C, Schwenger V, Zeier M, Gupta V, Roth D, Rastaldi MP, Burke G, Ruiz P, Reiser J: Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Med.* 17: 952–960, 2011
210. Cathelin D, Placier S, Ploug M, Verpont M-C, Vandermeersch S, Luque Y, Hertig A, Rondeau E, Mesnard L: Administration of Recombinant Soluble Urokinase Receptor Per Se Is Not Sufficient to Induce Podocyte Alterations and Proteinuria in Mice. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 2014
211. Wada T, Nangaku M: A circulating permeability factor in focal segmental glomerulosclerosis: the hunt continues. *Clin. Kidney J.* 8: 708–715, 2015

212. Bruggeman LA, Ross MD, Tanji N, Cara A, Dikman S, Gordon RE, Burns GC, D'Agati VD, Winston JA, Klotman ME, Klotman PE: Renal epithelium is a previously unrecognized site of HIV-1 infection. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 11: 2079–2087, 2000
213. Wyatt CM, Morgello S, Katz-Malamed R, Wei C, Klotman ME, Klotman PE, D'Agati VD: The spectrum of kidney disease in patients with AIDS in the era of antiretroviral therapy. *Kidney Int.* 75: 428–434, 2009
214. Zuo Y, Matsusaka T, Zhong J, Ma J, Ma L, Hanna Z, Jolicoeur P, Fogo AB, Ichikawa I: HIV-1 genes vpr and nef synergistically damage podocytes, leading to glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 17: 2832–2843, 2006
215. Feng X, Lu T-C, Chuang PY, Fang W, Ratnam K, Xiong H, Ouyang X, Shen Y, Levy DE, Hyink D, Klotman M, D'Agati V, Iyengar R, Klotman PE, He JC: Reduction of Stat3 activity attenuates HIV-induced kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20: 2138–2146, 2009
216. Gu L, Dai Y, Xu J, Mallipattu S, Kaufman L, Klotman PE, He JC, Chuang PY: Deletion of podocyte STAT3 mitigates the entire spectrum of HIV-1-associated nephropathy. *AIDS Lond. Engl.* 27: 1091–1098, 2013
217. He JC, Husain M, Sunamoto M, D'Agati VD, Klotman ME, Iyengar R, Klotman PE: Nef stimulates proliferation of glomerular podocytes through activation of Src-dependent Stat3 and MAPK1,2 pathways. *J. Clin. Invest.* 114: 643–651, 2004
218. Snyder A, Alsauskas ZC, Leventhal JS, Rosenstiel PE, Gong P, Chan JJK, Barley K, He JC, Klotman ME, Ross MJ, Klotman PE: HIV-1 viral protein r induces ERK and caspase-8-dependent apoptosis in renal tubular epithelial cells. *AIDS Lond. Engl.* 24: 1107–1119, 2010
219. Moudgil A, Nast CC, Bagga A, Wei L, Nurmamet A, Cohen AH, Jordan SC, Toyoda M: Association of parvovirus B19 infection with idiopathic collapsing glomerulopathy. *Kidney Int.* 59: 2126–2133, 2001
220. Li R-M, Branton MH, Tanawattanacharoen S, Falk RA, Jennette JC, Kopp JB: Molecular identification of SV40 infection in human subjects and possible association with kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 13: 2320–2330, 2002
221. Tomlinson L, Boriskin Y, McPhee I, Holwill S, Rice P: Acute cytomegalovirus infection complicated by collapsing glomerulopathy. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 18: 187–189, 2003
222. Chandra P, Kopp JB: Viruses and collapsing glomerulopathy: a brief critical review. *Clin. Kidney J.* 6: 1–5, 2013
223. Friedman EA, Tao TK: Disappearance of uremia due to heroin-associated nephropathy. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 25: 689–693, 1995
224. Markowitz GS, Nasr SH, Stokes MB, D'Agati VD: Treatment with IFN- α , β , or γ is associated with collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 5: 607–615, 2010
225. Markowitz GS, Appel GB, Fine PL, Fenves AZ, Loon NR, Jagannath S, Kuhn JA, Dratch AD, D'Agati VD: Collapsing focal segmental glomerulosclerosis following treatment with high-dose pamidronate. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 12: 1164–1172, 2001

226. Vollenbröcker B, George B, Wolfgart M, Saleem MA, Pavenstädt H, Weide T: mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 296: F418-426, 2009
227. Stokes MB, Davis CL, Alpers CE: Collapsing glomerulopathy in renal allografts: a morphological pattern with diverse clinicopathologic associations. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 33: 658–666, 1999
228. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K: Nephron number in patients with primary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 348: 101–108, 2003
229. Kriz W, Lemley KV: A potential role for mechanical forces in the detachment of podocytes and the progression of CKD. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 26: 258–269, 2015
230. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM: Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am. J. Physiol.* 241: F85-93, 1981
231. Brenner BM, Lawler EV, Mackenzie HS: The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney Int.* 49: 1774–1777, 1996
232. Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH: Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N. Engl. J. Med.* 307: 652–659, 1982
233. Rennke HG, Klein PS: Pathogenesis and significance of nonprimary focal and segmental glomerulosclerosis. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 13: 443–456, 1989
234. Miller PL, Scholey JW, Rennke HG, Meyer TW: Glomerular hypertrophy aggravates epithelial cell injury in nephrotic rats. *J. Clin. Invest.* 85: 1119–1126, 1990
235. Doi T, Striker LJ, Gibson CC, Agodoa LY, Brinster RL, Striker GE: Glomerular lesions in mice transgenic for growth hormone and insulinlike growth factor-I. I. Relationship between increased glomerular size and mesangial sclerosis. *Am. J. Pathol.* 137: 541–552, 1990
236. Schwartz MM, Bidani AK: Role of glomerular epithelial cell injury in the pathogenesis of glomerular scarring in the rat remnant kidney model. *Am. J. Pathol.* 142: 209–219, 1993
237. Kriz W, Hähnel B, Hosser H, Rösener S, Waldherr R: Structural analysis of how podocytes detach from the glomerular basement membrane under hypertrophic stress. *Front. Endocrinol.* 5: 207, 2014
238. Nagata M, Kriz W: Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. *Kidney Int.* 42: 148–160, 1992
239. Xu J, Chen J, Dong Z, Meyuhas O, Chen J-K: Phosphorylation of ribosomal protein S6 mediates compensatory renal hypertrophy. *Kidney Int.* 87: 543–556, 2015
240. Huber TB, Benzing T: The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 14: 211–216, 2005

241. Huber TB, Schermer B, Benzing T: Podocin organizes ion channel-lipid supercomplexes: implications for mechanosensation at the slit diaphragm. *Nephron Exp. Nephrol.* 106: e27-31, 2007
242. Kurihara H, Anderson JM, Kerjaschki D, Farquhar MG: The altered glomerular filtration slits seen in puromycin aminonucleoside nephrosis and protamine sulfate-treated rats contain the tight junction protein ZO-1. *Am. J. Pathol.* 141: 805–816, 1992
243. Shono A, Tsukaguchi H, Yaoita E, Nameta M, Kurihara H, Qin X-S, Yamamoto T, Doi T: Podocin participates in the assembly of tight junctions between foot processes in nephrotic podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18: 2525–2533, 2007
244. Fries JW, Sandstrom DJ, Meyer TW, Rennke HG: Glomerular hypertrophy and epithelial cell injury modulate progressive glomerulosclerosis in the rat. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* 60: 205–218, 1989
245. Dubrulle MP, Terzi F, Gubler MC, Kleinknecht C, Schaefferbeke M: Changes in thickness and anionic sites of the glomerular basement membrane after subtotal nephrectomy in the rat. *Am. J. Pathol.* 141: 1481–1489, 1992
246. Terzi F, Henrion D, Colucci-Guyon E, Federici P, Babinet C, Levy BI, Briand P, Friedlander G: Reduction of renal mass is lethal in mice lacking vimentin. Role of endothelin-nitric oxide imbalance. *J. Clin. Invest.* 100: 1520–1528, 1997
247. Megyesi J, Price PM, Tamayo E, Safirstein RL: The lack of a functional p21(WAF1/CIP1) gene ameliorates progression to chronic renal failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 10830–10835, 1999
248. Abbate M, Zoja C, Morigi M, Rottoli D, Angioletti S, Tomasoni S, Zanchi C, Longaretti L, Donadelli R, Remuzzi G: Transforming growth factor-beta1 is up-regulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins: a central pathway in progressive glomerulosclerosis. *Am. J. Pathol.* 161: 2179–2193, 2002
249. Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, ten Dijke P, Mundel P, Böttinger EP: Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J. Clin. Invest.* 108: 807–816, 2001
250. Riser BL, Cortes P, Zhao X, Bernstein J, Dumler F, Narins RG: Intraglomerular pressure and mesangial stretching stimulate extracellular matrix formation in the rat. *J. Clin. Invest.* 90: 1932–1943, 1992
251. Shankland SJ: The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 69: 2131–2147, 2006
252. Nijenhuis T, Sloan AJ, Hoenderop JGJ, Flesche J, van Goor H, Kistler AD, Bakker M, Bindels RJM, de Boer RA, Möller CC, Hamming I, Navis G, Wetzels JFM, Berden JHM, Reiser J, Faul C, van der Vlag J: Angiotensin II contributes to podocyte injury by increasing TRPC6 expression via an NFAT-mediated positive feedback signaling pathway. *Am. J. Pathol.* 179: 1719–1732, 2011
253. Anderson S, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM: Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J. Clin. Invest.* 76: 612–619, 1985

254. Anderson S, Rennke HG, Brenner BM: Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *J. Clin. Invest.* 77: 1993–2000, 1986
255. Remuzzi A, Puntorieri S, Battaglia C, Bertani T, Remuzzi G: Angiotensin converting enzyme inhibition ameliorates glomerular filtration of macromolecules and water and lessens glomerular injury in the rat. *J. Clin. Invest.* 85: 541–549, 1990
256. Inagi R, Nangaku M, Onogi H, Ueyama H, Kitao Y, Nakazato K, Ogawa S, Kurokawa K, Couser WG, Miyata T: Involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in podocyte injury induced by excessive protein accumulation. *Kidney Int.* 68: 2639–2650, 2005
257. Striker GE: Modification of diet in renal disease. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 20: 673, 1992
258. Mittman N, Avram MM, Oo KK, Chattopadhyay J: Serum prealbumin predicts survival in hemodialysis and peritoneal dialysis: 10 years of prospective observation. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 38: 1358–1364, 2001
259. Freedman BI, Iskandar SS, Appel RG: The link between hypertension and nephrosclerosis. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 25: 207–221, 1995
260. Toto RB: Hypertensive nephrosclerosis in African Americans. *Kidney Int.* 64: 2331–2341, 2003
261. Marcantoni C, Ma L-J, Federspiel C, Fogo AB: Hypertensive nephrosclerosis in African Americans versus Caucasians. *Kidney Int.* 62: 172–180, 2002
262. Harvey JM, Howie AJ, Lee SJ, Newbold KM, Adu D, Michael J, Beevers DG: Renal biopsy findings in hypertensive patients with proteinuria. *Lancet Lond. Engl.* 340: 1435–1436, 1992
263. Ono H, Ono Y, Frohlich ED: L-arginine reverses severe nephrosclerosis in aged spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 17: 121–128, 1999
264. Lübbers DW, Baumgärtl H: Heterogeneities and profiles of oxygen pressure in brain and kidney as examples of the pO₂ distribution in the living tissue. *Kidney Int.* 51: 372–380, 1997
265. Fu Q, Colgan SP, Shelley CS: Hypoxia: The Force that Drives Chronic Kidney Disease. *Clin. Med. Res.* 14: 15–39, 2016
266. Fine LG, Orphanides C, Norman JT: Progressive renal disease: the chronic hypoxia hypothesis. *Kidney Int. Suppl.* 65: S74–78, 1998
267. Bohle A: Change of paradigms in nephrology--a view back and a look forward. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 13: 556–563, 1998
268. Mayer G: Capillary rarefaction, hypoxia, VEGF and angiogenesis in chronic renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 26: 1132–1137, 2011
269. Matsumoto M, Tanaka T, Yamamoto T, Noiri E, Miyata T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M: Hypoperfusion of peritubular capillaries induces chronic hypoxia before progression of tubulointerstitial injury in a progressive model of rat glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 15: 1574–1581, 2004

270. Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Miyata T, Inagi R, Kurokawa K, Fujita T, Nangaku M: Evidence of tubular hypoxia in the early phase in the remnant kidney model. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 15: 1277–1288, 2004
271. Friederich-Persson M, Thörn E, Hansell P, Nangaku M, Levin M, Palm F: Kidney hypoxia, attributable to increased oxygen consumption, induces nephropathy independently of hyperglycemia and oxidative stress. *Hypertension* 62: 914–919, 2013
272. Inoue T, Kozawa E, Okada H, Inukai K, Watanabe S, Kikuta T, Watanabe Y, Takenaka T, Katayama S, Tanaka J, Suzuki H: Noninvasive evaluation of kidney hypoxia and fibrosis using magnetic resonance imaging. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 1429–1434, 2011
273. Yin W-J, Liu F, Li X-M, Yang L, Zhao S, Huang Z-X, Huang Y-Q, Liu R-B: Noninvasive evaluation of renal oxygenation in diabetic nephropathy by BOLD-MRI. *Eur. J. Radiol.* 81: 1426–1431, 2012
274. Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Inagi R, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Ingelfinger JR, Nangaku M: Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia. *Kidney Int.* 65: 871–880, 2004
275. Kawakami T, Mimura I, Shoji K, Tanaka T, Nangaku M: Hypoxia and fibrosis in chronic kidney disease: crossing at pericytes. *Kidney Int. Suppl.* 4: 107–112, 2014
276. Nangaku M: Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 17: 17–25, 2006
277. Welch WJ, Baumgärtl H, Lübbers D, Wilcox CS: Nephron pO₂ and renal oxygen usage in the hypertensive rat kidney. *Kidney Int.* 59: 230–237, 2001
278. Welch WJ, Blau J, Xie H, Chabrashvili T, Wilcox CS: Angiotensin-induced defects in renal oxygenation: role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288: H22–28, 2005
279. Möglich A, Ayers RA, Moffat K: Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Struct. Lond. Engl.* 1993 17: 1282–1294, 2009
280. Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O: Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252: 954–958, 1991
281. Nambu JR, Lewis JO, Wharton KA, Crews ST: The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67: 1157–1167, 1991
282. Semenza GL, Wang GL: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 12: 5447–5454, 1992
283. Tanaka T: Expanding roles of the hypoxia-response network in chronic kidney disease. *Clin. Exp. Nephrol.* 2016
284. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ: The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399: 271–275, 1999

285. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG: HIF-1 α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292: 464–468, 2001
286. Schofield CJ, Ratcliffe PJ: Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 343–354, 2004
287. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ: Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468–472, 2001
288. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML: Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295: 858–861, 2002
289. Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, Ratcliffe PJ: Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J. Biol. Chem.* 284: 16767–16775, 2009
290. Bernhardt WM, Schmitt R, Rosenberger C, Munchenhagen PM, Gröne H-J, Frei U, Warnecke C, Bachmann S, Wiesener MS, Willam C, Eckardt K-U: Expression of hypoxia-inducible transcription factors in developing human and rat kidneys. *Kidney Int.* 69: 114–122, 2006
291. Rosenberger C, Heyman SN, Rosen S, Shina A, Goldfarb M, Griethe W, Frei U, Reinke P, Bachmann S, Eckardt K-U: Up-regulation of HIF in experimental acute renal failure: evidence for a protective transcriptional response to hypoxia. *Kidney Int.* 67: 531–542, 2005
292. Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG, Iredale JP, Pugh CW, Johnson MH, Ratcliffe PJ: Sites of erythropoietin production. *Kidney Int.* 51: 393–401, 1997
293. Yamazaki S, Souma T, Hirano I, Pan X, Minegishi N, Suzuki N, Yamamoto M: A mouse model of adult-onset anaemia due to erythropoietin deficiency. *Nat. Commun.* 4: 1950, 2013
294. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL: The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev.* 12: 3320–3324, 1998
295. Yu X, Fang Y, Ding X, Liu H, Zhu J, Zou J, Xu X, Zhong Y: Transient hypoxia-inducible factor activation in rat renal ablation and reduced fibrosis with L-mimosine. *Nephrol. Carlton Vic* 17: 58–67, 2012
296. Manotham K, Tanaka T, Ohse T, Kojima I, Miyata T, Inagi R, Tanaka H, Sassa R, Fujita T, Nangaku M: A biologic role of HIF-1 in the renal medulla. *Kidney Int.* 67: 1428–1439, 2005
297. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ: *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107: 43–54, 2001
298. Matsumoto M, Makino Y, Tanaka T, Tanaka H, Ishizaka N, Noiri E, Fujita T, Nangaku M: Induction of renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 14: 1825–1832, 2003

299. Hill P, Shukla D, Tran MGB, Aragonés J, Cook HT, Carmeliet P, Maxwell PH: Inhibition of hypoxia inducible factor hydroxylases protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 19: 39–46, 2008
300. Kojima I, Tanaka T, Inagi R, Kato H, Yamashita T, Sakiyama A, Ohneda O, Takeda N, Sata M, Miyata T, Fujita T, Nangaku M: Protective role of hypoxia-inducible factor-2alpha against ischemic damage and oxidative stress in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18: 1218–1226, 2007
301. Bernhardt WM, Câmpean V, Kany S, Jürgensen J-S, Weidemann A, Warnecke C, Arend M, Klaus S, Günzler V, Amann K, Willam C, Wiesener MS, Eckardt K-U: Preconditional activation of hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 17: 1970–1978, 2006
302. Wei Q, Liu Y, Liu P, Hao J, Liang M, Mi Q-S, Chen J-K, Dong Z: MicroRNA-489 Induction by Hypoxia-Inducible Factor-1 Protects against Ischemic Kidney Injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 2016
303. Schley G, Klanke B, Schödel J, Forstreuter F, Shukla D, Kurtz A, Amann K, Wiesener MS, Rosen S, Eckardt K-U, Maxwell PH, Willam C: Hypoxia-inducible transcription factors stabilization in the thick ascending limb protects against ischemic acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 2004–2015, 2011
304. Tanaka T, Kojima I, Ohse T, Inagi R, Miyata T, Ingelfinger JR, Fujita T, Nangaku M: Hypoxia-inducible factor modulates tubular cell survival in cisplatin nephrotoxicity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 289: F1123-1133, 2005
305. Weidemann A, Bernhardt WM, Klanke B, Daniel C, Buchholz B, Câmpean V, Amann K, Warnecke C, Wiesener MS, Eckardt K-U, Willam C: HIF activation protects from acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 19: 486–494, 2008
306. Kapitsinou PP, Sano H, Michael M, Kobayashi H, Davidoff O, Bian A, Yao B, Zhang M-Z, Harris RC, Duffy KJ, Erickson-Miller CL, Sutton TA, Haase VH: Endothelial HIF-2 mediates protection and recovery from ischemic kidney injury. *J. Clin. Invest.* 124: 2396–2409, 2014
307. Skuli N, Liu L, Runge A, Wang T, Yuan L, Patel S, Iruela-Arispe L, Simon MC, Keith B: Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood* 114: 469–477, 2009
308. Rudnicki M, Perco P, Enrich J, Eder S, Heining D, Bernthaler A, Wiesinger M, Sarközi R, Noppert S-J, Schramek H, Mayer B, Oberbauer R, Mayer G: Hypoxia response and VEGF-A expression in human proximal tubular epithelial cells in stable and progressive renal disease. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 89: 337–346, 2009
309. Tanaka T, Miyata T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M: Hypoxia in renal disease with proteinuria and/or glomerular hypertension. *Am. J. Pathol.* 165: 1979–1992, 2004
310. Rosenberger C, Khamaisi M, Abassi Z, Shilo V, Weksler-Zangen S, Goldfarb M, Shina A, Zibertrest F, Eckardt K-U, Rosen S, Heyman SN: Adaptation to hypoxia in the diabetic rat kidney. *Kidney Int.* 73: 34–42, 2008
311. Katavetin P, Miyata T, Inagi R, Tanaka T, Sassa R, Ingelfinger JR, Fujita T, Nangaku M: High glucose blunts vascular endothelial growth factor response to hypoxia via the oxidative stress-

- regulated hypoxia-inducible factor/hypoxia-responsible element pathway. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 17: 1405–1413, 2006
312. Chiang C-K, Tanaka T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M: Indoxyl sulfate, a representative uremic toxin, suppresses erythropoietin production in a HIF-dependent manner. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 91: 1564–1571, 2011
313. Tanaka T, Yamaguchi J, Higashijima Y, Nangaku M: Indoxyl sulfate signals for rapid mRNA stabilization of Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2 (CITED2) and suppresses the expression of hypoxia-inducible genes in experimental CKD and uremia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27: 4059–4075, 2013
314. Yamanaka S, Yokote S, Yamada A, Katsuoka Y, Izuhara L, Shimada Y, Omura N, Okano HJ, Ohki T, Yokoo T: Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in long-term dialysis patients display downregulation of PCAF expression and poor angiogenesis activation. *PLoS One* 9: e102311, 2014
315. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt K-U, Iwano M, Haase VH: Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 117: 3810–3820, 2007
316. Zhu Q, Wang Z, Xia M, Li P-L, Van Tassell BW, Abbate A, Dhaduk R, Li N: Silencing of hypoxia-inducible factor-1 α gene attenuated angiotensin II-induced renal injury in Sprague-Dawley rats. *Hypertension* 58: 657–664, 2011
317. Luo R, Zhang W, Zhao C, Zhang Y, Wu H, Jin J, Zhang W, Grenz A, Eltzschig HK, Tao L, Kellems RE, Xia Y: Elevated Endothelial Hypoxia-Inducible Factor-1 α Contributes to Glomerular Injury and Promotes Hypertensive Chronic Kidney Disease. *Hypertension* 66: 75–84, 2015
318. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M: NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature* 453: 807–811, 2008
319. Yamaguchi J, Tanaka T, Eto N, Nangaku M: Inflammation and hypoxia linked to renal injury by CCAAT/enhancer-binding protein δ . *Kidney Int.* 88: 262–275, 2015
320. Akhtar S, Hartmann P, Karshovska E, Rinderknecht F-A, Subramanian P, Gremse F, Grommes J, Jacobs M, Kiessling F, Weber C, Steffens S, Schober A: Endothelial Hypoxia-Inducible Factor-1 α Promotes Atherosclerosis and Monocyte Recruitment by Upregulating MicroRNA-19a. *Hypertension* 2015
321. Kolyada AY, Tighiouart H, Perianayagam MC, Liangos O, Madias NE, Jaber BL: A genetic variant of hypoxia-inducible factor-1 α is associated with adverse outcomes in acute kidney injury. *Kidney Int.* 75: 1322–1329, 2009
322. Maxwell PH, Eckardt K-U: HIF prolyl hydroxylase inhibitors for the treatment of renal anaemia and beyond. *Nat. Rev. Nephrol.* 12: 157–168, 2016
323. Safran M, Kim WY, O'Connell F, Flippin L, Günzler V, Horner JW, Depinho RA, Kaelin WG: Mouse model for noninvasive imaging of HIF prolyl hydroxylase activity: assessment of an oral agent that stimulates erythropoietin production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 105–110, 2006

324. Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P, Chou J, Schmieder RE, Günzler V, Eckardt K-U: Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 21: 2151–2156, 2010
325. Besarab A, Provenzano R, Hertel J, Zabaneh R, Klaus SJ, Lee T, Leong R, Hemmerich S, Yu K-HP, Neff TB: Randomized placebo-controlled dose-ranging and pharmacodynamics study of roxadustat (FG-4592) to treat anemia in nondialysis-dependent chronic kidney disease (NDD-CKD) patients. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 30: 1665–1673, 2015
326. Besarab A, Chernyavskaya E, Motylev I, Shutov E, Kumbar LM, Gurevich K, Chan DTM, Leong R, Poole L, Zhong M, Saikali KG, Franco M, Hemmerich S, Yu K-HP, Neff TB: Roxadustat (FG-4592): Correction of Anemia in Incident Dialysis Patients. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 27: 1225–1233, 2016
327. Bernhardt WM, Gottmann U, Doyon F, Buchholz B, Campean V, Schödel J, Reisenbuechler A, Klaus S, Arend M, Flippin L, Willam C, Wiesener MS, Yard B, Warnecke C, Eckardt K-U: Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogenic kidney transplant model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 21276–21281, 2009
328. Maranchie JK, Vasselli JR, Riss J, Bonifacino JS, Linehan WM, Klausner RD: The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 1: 247–255, 2002
329. Rankin EB, Fuh KC, Castellini L, Viswanathan K, Finger EC, Diep AN, LaGory EL, Kariolis MS, Chan A, Lindgren D, Axelson H, Miao YR, Krieg AJ, Giaccia AJ: Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 13373–13378, 2014
330. Troyanov S, Wall CA, Miller JA, Scholey JW, Cattran DC, Toronto Glomerulonephritis Registry Group: Focal and segmental glomerulosclerosis: definition and relevance of a partial remission. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 16: 1061–1068, 2005
331. Schönenberger E, Ehrich JH, Haller H, Schiffer M: The podocyte as a direct target of immunosuppressive agents. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 26: 18–24, 2011
332. Mallipattu SK, He JC: The podocyte as a direct target for treatment of glomerular disease? *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 311: F46-51, 2016
333. Xing C-Y, Saleem MA, Coward RJ, Ni L, Witherden IR, Mathieson PW: Direct effects of dexamethasone on human podocytes. *Kidney Int.* 70: 1038–1045, 2006
334. Guess A, Agrawal S, Wei C-C, Ransom RF, Benndorf R, Smoyer WE: Dose- and time-dependent glucocorticoid receptor signaling in podocytes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 299: F845-853, 2010
335. Yan K, Kudo A, Hirano H, Watanabe T, Tasaka T, Kataoka S, Nakajima N, Nishibori Y, Shibata T, Kohsaka T, Higashihara E, Tanaka H, Watanabe H, Nagasawa T, Awa S: Subcellular localization of glucocorticoid receptor protein in the human kidney glomerulus. *Kidney Int.* 56: 65–73, 1999
336. Ransom RF, Vega-Warner V, Smoyer WE, Klein J: Differential proteomic analysis of proteins induced by glucocorticoids in cultured murine podocytes. *Kidney Int.* 67: 1275–1285, 2005

337. Wada T, Pippin JW, Marshall CB, Griffin SV, Shankland SJ: Dexamethasone prevents podocyte apoptosis induced by puromycin aminonucleoside: role of p53 and Bcl-2-related family proteins. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 16: 2615–2625, 2005
338. Wada T, Pippin JW, Nangaku M, Shankland SJ: Dexamethasone's prosurvival benefits in podocytes require extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *Nephron Exp. Nephrol.* 109: e8-19, 2008
339. Fujii Y, Khoshnoodi J, Takenaka H, Hosoyamada M, Nakajo A, Bessho F, Kudo A, Takahashi S, Arimura Y, Yamada A, Nagasawa T, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Lee AS, Yan K: The effect of dexamethasone on defective nephrin transport caused by ER stress: a potential mechanism for the therapeutic action of glucocorticoids in the acquired glomerular diseases. *Kidney Int.* 69: 1350–1359, 2006
340. Zhang J, Pippin JW, Krofft RD, Naito S, Liu Z-H, Shankland SJ: Podocyte repopulation by renal progenitor cells following glucocorticoids treatment in experimental FSGS. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 304: F1375-1389, 2013
341. Wang Y, Jarad G, Tripathi P, Pan M, Cunningham J, Martin DR, Liapis H, Miner JH, Chen F: Activation of NFAT signaling in podocytes causes glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 21: 1657–1666, 2010
342. Schlöndorff J, Del Camino D, Carrasquillo R, Lacey V, Pollak MR: TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296: C558-569, 2009
343. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, Chang J-M, Choi HY, Campbell KN, Kim K, Reiser J, Mundel P: The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat. Med.* 14: 931–938, 2008
344. Fornoni A, Li H, Foschi A, Striker GE, Striker LJ: Hepatocyte growth factor, but not insulin-like growth factor I, protects podocytes against cyclosporin A-induced apoptosis. *Am. J. Pathol.* 158: 275–280, 2001
345. Murakami N, Riella LV, Funakoshi T: Risk of metabolic complications in kidney transplantation after conversion to mTOR inhibitor: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 14: 2317–2327, 2014
346. Letavernier E, Bruneval P, Mandet C, Duong Van Huyen J-P, Péraldi M-N, Helal I, Noël L-H, Legendre C: High sirolimus levels may induce focal segmental glomerulosclerosis de novo. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 2: 326–333, 2007
347. Müller-Krebs S, Weber L, Tsobaneli J, Kihm LP, Reiser J, Zeier M, Schwenger V: Cellular effects of everolimus and sirolimus on podocytes. *PLoS One* 8: e80340, 2013
348. Vogelbacher R, Wittmann S, Braun A, Daniel C, Hugo C: The mTOR inhibitor everolimus induces proteinuria and renal deterioration in the remnant kidney model in the rat. *Transplantation* 84: 1492–1499, 2007
349. Gödel M, Hartleben B, Herbach N, Liu S, Zschiedrich S, Lu S, Debreczeni-Mór A, Lindenmeyer MT, Rastaldi M-P, Hartleben G, Wiech T, Fornoni A, Nelson RG, Kretzler M, Wanke R, Pavenstädt H, Kerjaschki D, Cohen CD, Hall MN, Rüegg MA, Inoki K, Walz G, Huber TB: Role of mTOR in

- podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice. *J. Clin. Invest.* 121: 2197–2209, 2011
350. Tsagalis G, Psimenou E, Iliadis A, Nakopoulou L, Laggouranis A: Rapamycin for focal segmental glomerulosclerosis: a report of 3 cases. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 54: 340–344, 2009
351. Fornoni A, Sageshima J, Wei C, Merscher-Gomez S, Aguillon-Prada R, Jauregui AN, Li J, Mattiazzi A, Ciancio G, Chen L, Zilleruelo G, Abitbol C, Chandar J, Seeherunvong W, Ricordi C, Ikehata M, Rastaldi MP, Reiser J, Burke GW: Rituximab Targets Podocytes in Recurrent Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Sci. Transl. Med.* 3: 85ra46-85ra46, 2011
352. Fernandez-Fresnedo G, Segarra A, González E, Alexandru S, Delgado R, Ramos N, Egido J, Praga M, Trabajo de Enfermedades Glomerulares de la Sociedad Española de Nefrología (GLOSEN): Rituximab treatment of adult patients with steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 4: 1317–1323, 2009
353. Magnasco A, Ravani P, Edefonti A, Murer L, Ghio L, Belingheri M, Benetti E, Murtas C, Messina G, Massella L, Porcellini MG, Montagna M, Regazzi M, Scolari F, Ghiggeri GM: Rituximab in children with resistant idiopathic nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 23: 1117–1124, 2012
354. Iijima K, Sako M, Nozu K, Mori R, Tuchida N, Kamei K, Miura K, Aya K, Nakanishi K, Ohtomo Y, Takahashi S, Tanaka R, Kaito H, Nakamura H, Ishikura K, Ito S, Ohashi Y, Rituximab for Childhood-onset Refractory Nephrotic Syndrome (RCRNS) Study Group: Rituximab for childhood-onset, complicated, frequently relapsing nephrotic syndrome or steroid-dependent nephrotic syndrome: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 384: 1273–1281, 2014
355. Garrouste C, Canaud G, Büchler M, Rivalan J, Colosio C, Martinez F, Aniort J, Dudreuilh C, Pereira B, Caillard S, Philipponnet C, Anglicheau D, Heng AE: Rituximab for Recurrence of Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis After Kidney Transplantation: Clinical Outcomes. *Transplantation* 2016
356. Yu C-C, Fornoni A, Weins A, Hakrrouch S, Maiguel D, Sageshima J, Chen L, Ciancio G, Faridi MH, Behr D, Campbell KN, Chang J-M, Chen H-C, Oh J, Faul C, Arnaout MA, Fiorina P, Gupta V, Greka A, Burke GW, Mundel P: Abatacept in B7-1-positive proteinuric kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 369: 2416–2423, 2013
357. Fiorina P, Vergani A, Bassi R, Niewczas MA, Altintas MM, Pezzolesi MG, D’Addio F, Chin M, Tezza S, Ben Nasr M, Mattinzoli D, Ikehata M, Corradi D, Schumacher V, Buvall L, Yu C-C, Chang J-M, La Rosa S, Finzi G, Solini A, Vincenti F, Rastaldi MP, Reiser J, Krolewski AS, Mundel PH, Sayegh MH: Role of podocyte B7-1 in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 25: 1415–1429, 2014
358. Gagliardini E, Novelli R, Corna D, Zoja C, Ruggiero B, Benigni A, Remuzzi G: B7-1 Is Not Induced in Podocytes of Human and Experimental Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 27: 999–1005, 2016
359. Delville M, Baye E, Durrbach A, Audard V, Kofman T, Braun L, Olagne J, Nguyen C, Deschênes G, Moulin B, Delahousse M, Kesler-Roussey G, Beaudreuil S, Martinez F, Rabant M, Grimbert P, Gallazzini M, Terzi F, Legendre C, Canaud G: B7-1 Blockade Does Not Improve Post-Transplant Nephrotic Syndrome Caused by Recurrent FSGS. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 27: 2520–2527, 2016

360. He JC, Lu T-C, Fleet M, Sunamoto M, Husain M, Fang W, Neves S, Chen Y, Shankland S, Iyengar R, Klotman PE: Retinoic acid inhibits HIV-1-induced podocyte proliferation through the cAMP pathway. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18: 93–102, 2007
361. Lehrke I, Schaier M, Schade K, Morath C, Waldherr R, Ritz E, Wagner J: Retinoid receptor-specific agonists alleviate experimental glomerulonephritis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282: F741-751, 2002
362. Li X, Dai Y, Chuang PY, He JC: Induction of retinol dehydrogenase 9 expression in podocytes attenuates kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 25: 1933–1941, 2014
363. Moreno-Manzano V, Mampaso F, Sepúlveda-Muñoz JC, Alique M, Chen S, Ziyadeh FN, Iglesias-de la Cruz MC, Rodríguez J, Nieto E, Orellana JM, Reyes P, Arribas I, Xu Q, Kitamura M, Lucio Cazana FJ: Retinoids as a potential treatment for experimental puromycin-induced nephrosis. *Br. J. Pharmacol.* 139: 823–831, 2003
364. Orfanos CE, Ehlert R, Gollnick H: The retinoids. A review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 34: 459–503, 1987
365. Hoffmann S, Podlich D, Hähnel B, Kriz W, Gretz N: Angiotensin II type 1 receptor overexpression in podocytes induces glomerulosclerosis in transgenic rats. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 15: 1475–1487, 2004
366. Aldigier JC, Kanjanbuch T, Ma L-J, Brown NJ, Fogo AB: Regression of existing glomerulosclerosis by inhibition of aldosterone. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 16: 3306–3314, 2005
367. Whaley-Connell A, Nistala R, Habibi J, Hayden MR, Schneider RI, Johnson MS, Tilmon R, Rehmer N, Ferrario CM, Sowers JR: Comparative effect of direct renin inhibition and AT1R blockade on glomerular filtration barrier injury in the transgenic Ren2 rat. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 298: F655-661, 2010
368. Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Mundel P, Pichler R, Griffin S, Couser WG, Shankland SJ: Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int.* 65: 30–39, 2004
369. Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, Gutweiler A, Jellison J, Wiedmeyer CE, Ferrario CM, Sowers JR: Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates glomerular filtration barrier remodeling in the transgenic Ren2 rat. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 296: F1013-1022, 2009
370. Lee VWS, Harris DCH: Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol. Carlton Vic* 16: 30–38, 2011
371. Sternberg SS: Cross-striated fibrils and other ultrastructural alterations in glomeruli of rats with daunomycin nephrosis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 23: 39–51, 1970
372. Bucciarelli E, Binazzi R, Santori P, Vespasiani G: [Nephrotic syndrome in rats due to adriamycin chlorhydrate]. *Lav. Dell'Istituto Anat. E Istol. Patol. Univ. Degli Studi Perugia* 36: 53–69, 1976
373. Chen A, Sheu LF, Ho YS, Lin YF, Chou WY, Chou TC, Lee WH: Experimental focal segmental glomerulosclerosis in mice. *Nephron* 78: 440–452, 1998
374. Burke JF, Laucius JF, Brodovsky HS, Soriano RZ: Doxorubicin hydrochloride-associated renal failure. *Arch. Intern. Med.* 137: 385–388, 1977

375. Zheng Z, Schmidt-Ott KM, Chua S, Foster KA, Frankel RZ, Pavlidis P, Barasch J, D'Agati VD, Gharavi AG: A Mendelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 2502–2507, 2005
376. Jeansson M, Björck K, Tenstad O, Haraldsson B: Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20: 114–122, 2009
377. Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC: Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int.* 58: 1797–1804, 2000
378. Lee VWS, Wang Y, Qin X, Wang Y, Zheng G, Mahajan D, Coombes J, Rangan G, Alexander SI, Harris DCH: Adriamycin nephropathy in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 21: 3293–3298, 2006
379. Mahajan D, Wang Y, Qin X, Wang Y, Zheng G, Wang YM, Alexander SI, Harris DCH: CD4+CD25+ regulatory T cells protect against injury in an innate murine model of chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 17: 2731–2741, 2006
380. Casalena G, Krick S, Daehn I, Yu L, Ju W, Shi S, Tsai S, D'Agati V, Lindenmeyer M, Cohen CD, Schlondorff D, Bottinger EP: Mpv17 in mitochondria protects podocytes against mitochondrial dysfunction and apoptosis in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 306: F1372–1380, 2014
381. Wang Z, Bao H, Ge Y, Zhuang S, Peng A, Gong R: Pharmacological targeting of GSK3 β confers protection against podocytopathy and proteinuria by desensitizing mitochondrial permeability transition. *Br. J. Pharmacol.* 172: 895–909, 2015
382. Li C, Ge Y, Dworkin L, Peng A, Gong R: The β isoform of GSK3 mediates podocyte autonomous injury in proteinuric glomerulopathy. *J. Pathol.* 239: 23–35, 2016
383. Mallipattu SK, Horne SJ, D'Agati V, Narla G, Liu R, Frohman MA, Dickman K, Chen EY, Ma'ayan A, Bialkowska AB, Ghaleb AM, Nandan MO, Jain MK, Daehn I, Chuang PY, Yang VW, He JC: Krüppel-like factor 6 regulates mitochondrial function in the kidney. *J. Clin. Invest.* 125: 1347–1361, 2015
384. Finer G, Schnaper HW, Kanwar YS, Liang X, Lin HY, Hayashida T: Divergent roles of Smad3 and PI3-kinase in murine adriamycin nephropathy indicate distinct mechanisms of proteinuria and fibrogenesis. *Kidney Int.* 82: 525–536, 2012
385. Wakao H, Harada N, Kitamura T, Mui AL, Miyajima A: Interleukin 2 and erythropoietin activate STAT5/MGF via distinct pathways. *EMBO J.* 14: 2527–2535, 1995
386. Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN: Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93: 841–850, 1998
387. Kanai T, Seki S, Jenks JA, Kohli A, Kawli T, Martin DP, Snyder M, Bacchetta R, Nadeau KC: Identification of STAT5A and STAT5B target genes in human T cells. *PLoS One* 9: e86790, 2014
388. Hand TW, Cui W, Jung YW, Sefik E, Joshi NS, Chandele A, Liu Y, Kaech SM: Differential effects of STAT5 and PI3K/AKT signaling on effector and memory CD8 T-cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 16601–16606, 2010

389. Shinozaki M: IL-15, a survival factor for kidney epithelial cells, counteracts apoptosis and inflammation during nephritis. *J. Clin. Invest.* 109: 951–960, 2002
390. Papeta N, Zheng Z, Schon EA, Brosel S, Altintas MM, Nasr SH, Reiser J, D'Agati VD, Gharavi AG: Prkdc participates in mitochondrial genome maintenance and prevents Adriamycin-induced nephropathy in mice. *J. Clin. Invest.* 120: 4055–4064, 2010
391. Vielhauer V, Berning E, Eis V, Kretzler M, Segerer S, Strutz F, Horuk R, Gröne H-J, Schlöndorff D, Anders H-J: CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 66: 2264–2278, 2004
392. Kairaitis L, Wang Y, Zheng L, Tay Y-C, Wang Y, Harris DCH: Blockade of CD40-CD40 ligand protects against renal injury in chronic proteinuric renal disease. *Kidney Int.* 64: 1265–1272, 2003
393. Schönenberger E, Ehrich JH, Haller H, Schiffer M: The podocyte as a direct target of immunosuppressive agents. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 26: 18–24, 2011
394. Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, Vranic I, Su C, Rousell S, Niezychowski W, Study A3921063 Investigators: Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* 367: 616–624, 2012
395. Vincenti F, Tedesco Silva H, Busque S, O'Connell P, Friedewald J, Cibrik D, Budde K, Yoshida A, Cohnen S, Weimar W, Kim YS, Lawendy N, Lan S-P, Kudlacz E, Krishnaswami S, Chan G: Randomized phase 2b trial of tofacitinib (CP-690,550) in de novo kidney transplant patients: efficacy, renal function and safety at 1 year. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 12: 2446–2456, 2012
396. Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L: Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev.* 11: 179–186, 1997
397. Jeansson M, Björck K, Tenstad O, Haraldsson B: Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20: 114–122, 2009
398. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, Richardson C, Kopp JB, Kabir MG, Backx PH, Gerber H-P, Ferrara N, Barisoni L, Alpers CE, Quaggin SE: VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N. Engl. J. Med.* 358: 1129–1136, 2008
399. Fan Y, Wang L, Liu C, Zhu H, Zhou L, Wang Y, Wu X, Li Q: Local renin-angiotensin system regulates hypoxia-induced vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8: 2505–2514, 2015
400. Tipping PG, Kitching AR: Glomerulonephritis, Th1 and Th2: what's new? *Clin. Exp. Immunol.* 142: 207–215, 2005
401. Sato T, Kawachi H, Morioka T, Takashima N, Saeki T, Oite T, Sato NL, Takeuchi M, Shimizu F: Nephrotoxic serum nephritis in nude rats: the roles of host immune reactions in the accelerated type. *Clin. Exp. Immunol.* 91: 131–134, 1993
402. Zheng C-L, Ohki K, Hossain A, Kukita A, Satoh T, Kohashi O: Complete Freund's adjuvant promotes the increases of IFN-gamma and nitric oxide in suppressing chronic arthritis induced by pristane. *Inflammation* 27: 247–255, 2003

403. Bao L, Haas M, Pippin J, Wang Y, Miwa T, Chang A, Minto AW, Petkova M, Qiao G, Song W-C, Alpers CE, Zhang J, Shankland SJ, Quigg RJ: Focal and segmental glomerulosclerosis induced in mice lacking decay-accelerating factor in T cells. *J. Clin. Invest.* 119: 1264–1274, 2009
404. Heymann F, Meyer-Schwesinger C, Hamilton-Williams EE, Hammerich L, Panzer U, Kaden S, Quaggin SE, Floege J, Gröne H-J, Kurts C: Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. *J. Clin. Invest.* 119: 1286–1297, 2009
405. Tipping PG, Neale TJ, Holdsworth SR: T lymphocyte participation in antibody-induced experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 27: 530–537, 1985
406. Kitching AR, Turner AL, Wilson GRA, Semple T, Odobasic D, Timoshanko JR, O’Sullivan KM, Tipping PG, Takeda K, Akira S, Holdsworth SR: IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 16: 2023–2033, 2005
407. Lebleu VS, Sugimoto H, Miller CA, Gattone VH, Kalluri R: Lymphocytes are dispensable for glomerulonephritis but required for renal interstitial fibrosis in matrix defect-induced Alport renal disease. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 88: 284–292, 2008
408. Mohamadzadeh M, Ariizumi K, Sugamura K, Bergstresser PR, Takashima A: Expression of the common cytokine receptor gamma chain by murine dendritic cells including epidermal Langerhans cells. *Eur. J. Immunol.* 26: 156–160, 1996
409. Kurts C, Heymann F, Lukacs-Kornek V, Boor P, Floege J: Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology. *Semin. Immunopathol.* 29: 317–335, 2007
410. Yamaoka K, Min B, Zhou Y-J, Paul WE, O’Shea JJ: Jak3 negatively regulates dendritic-cell cytokine production and survival. *Blood* 106: 3227–3233, 2005
411. Di Santo JP, Kühn R, Müller W: Common cytokine receptor gamma chain (gamma c)-dependent cytokines: understanding in vivo functions by gene targeting. *Immunol. Rev.* 148: 19–34, 1995
412. Alves NL, Arosa FA, van Lier RAW: Common gamma chain cytokines: dissidence in the details. *Immunol. Lett.* 108: 113–120, 2007
413. Bulfone-Paus S, Ungureanu D, Pohl T, Lindner G, Paus R, Rückert R, Krause H, Kunzendorf U: Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nat. Med.* 3: 1124–1128, 1997
414. Fehniger TA, Caligiuri MA: Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97: 14–32, 2001
415. Ring AM, Lin J-X, Feng D, Mitra S, Rickert M, Bowman GR, Pande VS, Li P, Moraga I, Spolski R, Ozkan E, Leonard WJ, Garcia KC: Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15. *Nat. Immunol.* 13: 1187–1195, 2012
416. Giron-Michel J, Azzi S, Khawam K, Mortier E, Caignard A, Devocelle A, Ferrini S, Croce M, François H, Lecru L, Charpentier B, Chouaib S, Azzarone B, Eid P: Interleukin-15 Plays a Central Role in Human Kidney Physiology and Cancer through the γc Signaling Pathway. *PLoS ONE* 7: e31624, 2012

417. Tejman-Yarden N, Zlotnik M, Lewis E, Etzion O, Chaimovitz C, Douvdevani A: Renal cells express a functional interleukin-15 receptor. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20: 516–523, 2005
418. Zea AH, Stewart T, Ascani J, Tate DJ, Finkel-Jimenez B, Wilk A, Reiss K, Smoyer WE, Aviles DH: Activation of the IL-2 Receptor in Podocytes: A Potential Mechanism for Podocyte Injury in Idiopathic Nephrotic Syndrome? *PLoS One* 11: e0157907, 2016
419. Giron-Michel J, Azzi S, Ferrini S, Chouaib S, Camussi G, Eid P, Azzarone B: Interleukin-15 is a major regulator of the cell-microenvironment interactions in human renal homeostasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24: 13–22, 2013
420. Khawam K, Giron-Michel J, Gu Y, Perier A, Giuliani M, Caignard A, Devocelle A, Ferrini S, Fabbi M, Charpentier B, Ludwig A, Chouaib S, Azzarone B, Eid P: Human Renal Cancer Cells Express a Novel Membrane-Bound Interleukin-15 that Induces, in Response to the Soluble Interleukin-15 Receptor Chain, Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Res.* 69: 1561–1569, 2009
421. Reinecker HC, Podolsky DK: Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma c chain of the interleukin 2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 8353–8357, 1995
422. Schiwiek D, Endlich N, Holzman L, Holthöfer H, Kriz W, Endlich K: Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. *Kidney Int.* 66: 91–101, 2004
423. Budagian V, Bulanova E, Orinska Z, Ludwig A, Rose-John S, Saftig P, Borden EC, Bulfone-Paus S: Natural soluble interleukin-15 α is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE/ADAM17). *J. Biol. Chem.* 279: 40368–40375, 2004
424. Bulanova E, Budagian V, Pohl T, Krause H, Dürkop H, Paus R, Bulfone-Paus S: The IL-15R α chain signals through association with Syk in human B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167: 6292–6302, 2001
425. Minami Y, Nakagawa Y, Kawahara A, Miyazaki T, Sada K, Yamamura H, Taniguchi T: Protein tyrosine kinase Syk is associated with and activated by the IL-2 receptor: possible link with the c-myc induction pathway. *Immunity* 2: 89–100, 1995
426. Johnston JA, Bacon CM, Finbloom DS, Rees RC, Kaplan D, Shibuya K, Ortaldo JR, Gupta S, Chen YQ, Giri JD: Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 8705–8709, 1995
427. Kanai T, Seki S, Jenks JA, Kohli A, Kawli T, Martin DP, Snyder M, Bacchetta R, Nadeau KC: Identification of STAT5A and STAT5B target genes in human T cells. *PLoS One* 9: e86790, 2014
428. McAdoo SP, Bhangal G, Page T, Cook HT, Pusey CD, Tam FWK: Correlation of disease activity in proliferative glomerulonephritis with glomerular spleen tyrosine kinase expression. *Kidney Int.* 88: 52–60, 2015
429. Smith J, McDaid JP, Bhangal G, Chawanasantorapoj R, Masuda ES, Cook HT, Pusey CD, Tam FWK: A Spleen Tyrosine Kinase Inhibitor Reduces the Severity of Established Glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21: 231–236, 2009

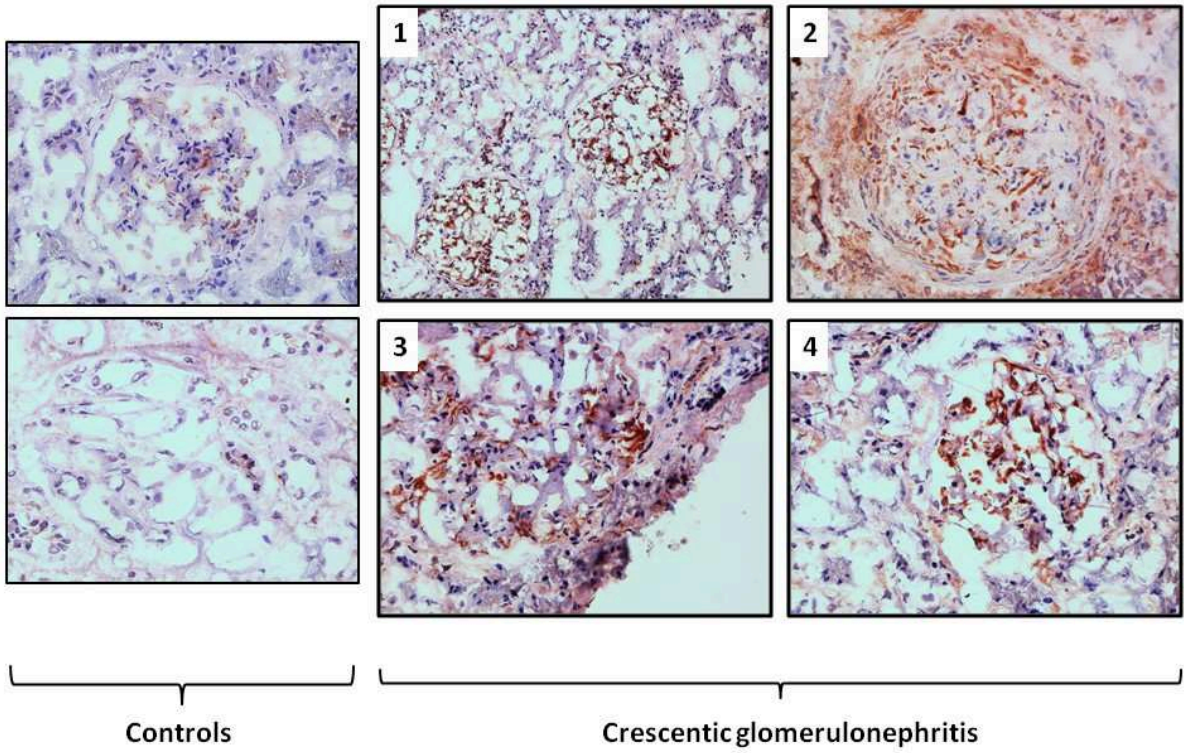
430. Huntington ND, Legrand N, Alves NL, Jaron B, Weijer K, Plet A, Corcuff E, Mortier E, Jacques Y, Spits H, Di Santo JP: IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 206: 25–34, 2009
431. Rose T, Moreau J-L, Eckenberg R, Thèze J: Structural analysis and modeling of a synthetic interleukin-2 mimetic and its interleukin-2Rbeta2 receptor. *J. Biol. Chem.* 278: 22868–22876, 2003
432. Changelian PS, Flanagan ME, Ball DJ, Kent CR, Magnuson KS, Martin WH, Rizzuti BJ, Sawyer PS, Perry BD, Brissette WH, McCurdy SP, Kudlacz EM, Conklyn MJ, Elliott EA, Koslov ER, Fisher MB, Strelevitz TJ, Yoon K, Whipple DA, Sun J, Munchhof MJ, Doty JL, Casavant JM, Blumenkopf TA, Hines M, Brown MF, Lillie BM, Subramanyam C, Shang-Poa C, Milici AJ, Beckius GE, Moyer JD, Su C, Woodworth TG, Gaweco AS, Beals CR, Littman BH, Fisher DA, Smith JF, Zagouras P, Magna HA, Saltarelli MJ, Johnson KS, Nelms LF, Des Etages SG, Hayes LS, Kawabata TT, Finco-Kent D, Baker DL, Larson M, Si M-S, Paniagua R, Higgins J, Holm B, Reitz B, Zhou Y-J, Morris RE, O’Shea JJ, Borie DC: Prevention of organ allograft rejection by a specific Janus kinase 3 inhibitor. *Science* 302: 875–878, 2003
433. Leonard WJ: Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int. J. Hematol.* 73: 271–277, 2001
434. Yoshimura A, Naka T, Kubo M: SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 454–465, 2007
435. Ortiz-Muñoz G, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Fernandez-Vizorra P, Mallavia B, Flores C, Sanz A, Blanco J, Mezzano S, Ortiz A, Egido J, Gomez-Guerrero C: Suppressors of cytokine signaling abrogate diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 21: 763–772, 2010
436. Berthier CC, Zhang H, Schin M, Henger A, Nelson RG, Yee B, Boucherot A, Neusser MA, Cohen CD, Carter-Su C, Argetsinger LS, Rastaldi MP, Brosius FC, Kretzler M: Enhanced expression of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway members in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 58: 469–477, 2009
437. Brosius FC, Tuttle KR, Kretzler M: JAK inhibition in the treatment of diabetic kidney disease. *Diabetologia* 59: 1624–1627, 2016
438. Martinez-Lostao L, Ordi-Ros J, Balada E, Segarra-Medrano A, Majó-Masferrer J, Labrador-Horrillo M, Vilardell-Tarrés M: Activation of the signal transducer and activator of transcription-1 in diffuse proliferative lupus nephritis. *Lupus* 16: 483–488, 2007
439. JAK3-STAT pathway blocking benefits in experimental lupus nephritis. - PubMed - NCBI [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/27278657> [cited 2016 Aug 21]
440. Takahashi T, Shirasawa T, Miyake K, Yahagi Y, Matsumura O, Abe A, Natori Y, Yamabe H, Utsunomiya Y, Maruyama N, Mitarai T, Sakai O: Jak3 expression in glomerular epithelia of IgA nephropathy (IgA-N) patients. *Clin. Exp. Immunol.* 104: 517–524, 1996
441. Hur J, O’Brien PD, Nair V, Hinder LM, McGregor BA, Jagadish HV, Kretzler M, Brosius FC, Feldman EL: Transcriptional networks of murine diabetic peripheral neuropathy and nephropathy: common and distinct gene expression patterns. *Diabetologia* 59: 1297–1306, 2016

442. Inhibition of Jak/STAT signaling ameliorates mice experimental nephrotic syndrome. - PubMed - NCBI [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/17823504> [cited 2016 Aug 21]
443. Liang Y, Jin Y, Li Y: Expression of JAKs/STATs pathway molecules in rat model of rapid focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 24: 1661–1671, 2009
444. Lo H-W, Hsu S-C, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wei Y, Bartholomeusz G, Shih J-Y, Hung M-C: Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 7: 575–589, 2005
445. Arany I, Megyesi JK, Nelkin BD, Safirstein RL: STAT3 attenuates EGFR-mediated ERK activation and cell survival during oxidant stress in mouse proximal tubular cells. *Kidney Int.* 70: 669–674, 2006
446. Lu T-C, Wang Z-H, Feng X, Chuang PY, Fang W, Shen Y, Levy DE, Xiong H, Chen N, He JC: Knockdown of Stat3 activity in vivo prevents diabetic glomerulopathy. *Kidney Int.* 76: 63–71, 2009
447. Matsui F, Rhee A, Hile KL, Zhang H, Meldrum KK: IL-18 induces profibrotic renal tubular cell injury via STAT3 activation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 305: F1014-1021, 2013
448. Tormo AJ, Letellier M-C, Sharma M, Elson G, Crabé S, Gauchat J-F: IL-6 activates STAT5 in T cells. *Cytokine* 60: 575–582, 2012
449. Wei L, Laurence A, O’Shea JJ: New insights into the roles of Stat5a/b and Stat3 in T cell development and differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19: 394–400, 2008
450. Cui Y, Hosui A, Sun R, Shen K, Gavrilova O, Chen W, Cam MC, Gao B, Robinson GW, Hennighausen L: Loss of signal transducer and activator of transcription 5 leads to hepatosteatosis and impaired liver regeneration. *Hepatology. Baltim. Md* 46: 504–513, 2007
451. Hosui A, Kimura A, Yamaji D, Zhu B, Na R, Hennighausen L: Loss of STAT5 causes liver fibrosis and cancer development through increased TGF- β and STAT3 activation. *J. Exp. Med.* 206: 819–831, 2009
452. Yu JH, Zhu B-M, Riedlinger G, Kang K, Hennighausen L: The liver-specific tumor suppressor STAT5 controls expression of the reactive oxygen species-generating enzyme NOX4 and the proapoptotic proteins PUMA and BIM in mice. *Hepatology. Baltim. Md* 56: 2375–2386, 2012
453. Brinkkoetter PT, Olivier P, Wu JS, Henderson S, Krofft RD, Pippin JW, Hockenbery D, Roberts JM, Shankland SJ: Cyclin I activates Cdk5 and regulates expression of Bcl-2 and Bcl-XL in postmitotic mouse cells. *J. Clin. Invest.* 119: 3089–3101, 2009
454. Wojciechowski D, Vincenti F: Tofacitinib in kidney transplantation. *Expert Opin. Investig. Drugs* 22: 1193–1199, 2013
455. Quaedackers ME, Mol W, Korevaar SS, van Gorp EAFJ, van Ijcken WFJ, Chan G, Weimar W, Baan CC: Monitoring of the immunomodulatory effect of CP-690,550 by analysis of the JAK/STAT pathway in kidney transplant patients. *Transplantation* 88: 1002–1009, 2009
456. Kremer JM, Cohen S, Wilkinson BE, Connell CA, French JL, Gomez-Reino J, Gruben D, Kanik KS, Krishnaswami S, Pascual-Ramos V, Wallenstein G, Zwillich SH: A phase IIb dose-ranging study of

- the oral JAK inhibitor tofacitinib (CP-690,550) versus placebo in combination with background methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate alone. *Arthritis Rheum.* 64: 970–981, 2012
457. Vincenti F, Silva HT, Busque S, O’Connell PJ, Russ G, Budde K, Yoshida A, Tortorici MA, Lamba M, Lawendy N, Wang W, Chan G: Evaluation of the effect of tofacitinib exposure on outcomes in kidney transplant patients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 15: 1644–1653, 2015
458. Kremer JM, Kivitz AJ, Simon-Campos JA, Nasonov EL, Tony H-P, Lee S-K, Vlahos B, Hammond C, Bukowski J, Li H, Schulman SL, Raber S, Zuckerman A, Isaacs JD: Evaluation of the effect of tofacitinib on measured glomerular filtration rate in patients with active rheumatoid arthritis: results from a randomised controlled trial. *Arthritis Res. Ther.* 17: 95, 2015
459. Boisset J-C, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, Galjart N, Dzierzak E, Robin C: In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* 464: 116–120, 2010
460. Taoudi S, Gonneau C, Moore K, Sheridan JM, Blackburn CC, Taylor E, Medvinsky A: Extensive hematopoietic stem cell generation in the AGM region via maturation of VE-cadherin+CD45+ pre-definitive HSCs. *Cell Stem Cell* 3: 99–108, 2008
461. Schley G, Scholz H, Kraus A, Hackenbeck T, Klanke B, Willam C, Wiesener MS, Heinze E, Burzlaff N, Eckardt K-U, Buchholz B: Hypoxia inhibits nephrogenesis through paracrine Vegfa despite the ability to enhance tubulogenesis. *Kidney Int.* 2015
462. Veron D, Aggarwal PK, Velazquez H, Kashgarian M, Moeckel G, Tufro A: Podocyte-specific VEGF-a gain of function induces nodular glomerulosclerosis in eNOS null mice. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 25: 1814–1824, 2014
463. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt K-U: Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17: 271–273, 2003
464. Branco-Price C, Zhang N, Schnelle M, Evans C, Katschinski DM, Liao D, Ellies L, Johnson RS: Endothelial Cell HIF-1 α and HIF-2 α Differentially Regulate Metastatic Success. *Cancer Cell* 21: 52–65, 2012
465. Thakor AS, Gambhir SS: Nanooncology: the future of cancer diagnosis and therapy. *CA. Cancer J. Clin.* 63: 395–418, 2013
466. Zuckerman JE, Davis ME: Targeting therapeutics to the glomerulus with nanoparticles. *Adv. Chronic Kidney Dis.* 20: 500–507, 2013

ANNEXE 1

IL2Ryc expression in podocytes and crescents during human glomerulonephritis



ANNEXE 2

Genetic Background Dependent Thrombotic Microangiopathy is Related to VEGFR2 Signaling During Anti-GBM Glomerulonephritis in Mice



CARDIOVASCULAR, PULMONARY, AND RENAL PATHOLOGY

Genetic Background—Dependent Thrombotic Microangiopathy Is Related to Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Signaling during Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis in Mice

Laurent Mesnard,^{*†‡} Dominique Cathelin,^{*†} Sophie Vandermeersch,^{*†} Cédric Rafat,^{*†} Yosu Luque,^{*†} Julie Sohier,^{*†} Dominique Nochy,^{§¶} Loïc Garçon,^{||} Patrice Callard,^{**} Chantal Jouanneau,^{*†} Marie-Christine Verpont,^{*†} Pierre-Louis Tharaux,^{¶††} Alexandre Hertig,^{*†‡} and Eric Rondeau^{*†‡}

From INSERM Unité UMR-S 1155,* Rare and Common Kidney Diseases, Matrix Remodeling and Tissue Repair, Hôpital Tenon, Paris; UMR-S 1155,† Rare and Common Kidney Diseases, Matrix Remodeling and Tissue Repair, the Sorbonne Universités, UPMC University Paris, Paris; Emergency Nephrological and Renal Transplantation,‡ the APHP, Hôpital Tenon, Paris; the Anatomy and Pathology Service,§ the APHP, Hôpital Européen Georges-Pompidou, and Université Paris V, Paris; Université Paris Descartes,¶ Sorbonne Paris Cité, Paris; the Biological Immunology and Hematology Service,|| the APHP, Hôpital Saint-Antoine, and Sorbonne Universités, UPMC University Paris, Paris; the Anatomic Pathology Service,** the APHP, Hôpital Tenon, and Sorbonne Universités, UPMC University Paris, Paris; and the Paris Cardiovascular Research Centre (PARCC),†† INSERM, Paris, France

Accepted for publication
May 27, 2014.

Address correspondence to
Laurent Mesnard, M.D., Ph.D.,
or Eric Rondeau, M.D., Ph.D.,
INSERM UMR 1155, Hôpital
Tenon, 4 rue de la Chine, 75020
Paris, France. E-mail: laurent.mesnard@tnn.aphp.fr or eric.rondeau@tnn.aphp.fr.

Because genetic background plays a pivotal role in humans and in various experimental models, we carefully monitored its impact on glomerular pathological characteristics during experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis (anti-GBM-GN), using two leading mouse strains, 129S2/SvPas (129Sv) and C57Bl/6J (B6J). These mice exhibited different severities of renal failure, hypertension, and glomerular lesions, according to their genetic background. In addition to the classic glomerular proliferative lesions, glomerular thrombotic microangiopathy (TMA) was found as a common genetic background—dependent histopathological hallmark of anti-GBM-GN, combined with hemolytic anemia and thrombocytopenia. Glomerular expression profiling, using microarrays and Western blot analysis in B6J TMA-resistant and 129Sv TMA-prone mice, demonstrated major differences in vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor (VEGFR) 2 pathways, despite similar Vegfa expression levels. Further analysis revealed a lower basal glomerular endothelial Vegfr2 expression level in 129Sv TMA-prone mice compared with B6J TMA-resistant mice. This difference was even more pronounced during anti-GBM-GN, explaining why an exogenous VEGFA supply failed to rescue any 129Sv TMA lesions. Conversely, the systemic blocking of Vegfr2 amplified TMA lesions only in B6J mice. Herein, we specified the role that genetic background plays in determining, in particular, the level of Vegfr2 expression. We also demonstrated that glomerular Vegfr2-dependent TMA lesions are an undervalued common hallmark of anti-GBM-GN in mice. (*Am J Pathol* 2014, 184: 2438–2449; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.05.020>)

Genetic background is of paramount importance to the response to injury in many experimental models, as in the progression of various forms of kidney disease.^{1–4} The molecular basis of these genetic differences, however, is poorly understood. The passive model of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis (anti-GBM-GN)—also known as nephrotoxic nephritis—is useful for analyzing the cellular and molecular mechanisms of the glomerular injury.^{5–7} Previous studies demonstrated the role of T and B cells in this

process, as well as various cytokines, such as tumor necrosis factor- α , IL-1, IL-12, and interferon- γ .^{8,9} In addition to these immune effectors, intrinsic glomerular cells seem to play an

Supported by INSERM, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, European Renal Association—European Dialysis and Transplant Association grant ERA-EDTA ALTF 74-2010 (D.C.) and Académie de Médecine grant (C.R.).

L.M. and D.C. contributed equally to this work.

Disclosures: DC101 antibody was provided by ImClone Systems (Eli Lilly and Company, New York, NY).

active role as well.¹⁰ Indeed, they modulate inflammatory and thrombotic pathways and contribute to the severity of glomerular lesions.^{10,11}

In the anti-GBM-GN, the genetic background of the mice has been shown to modulate the severity of the renal injuries.^{1,3} Indeed, among other strains, 129Sv mice were demonstrated to be more prone to severe glomerular disease than B6J mice.¹ In these studies, however, as often in animal experiments using different genetic backgrounds, the molecular mechanisms underlying such differences were not determined. This question is important because these differences may have human counterparts. Indeed, specific signaling pathways that may modulate the severity of human renal diseases may be strongly affected by the genetic background, given the large genomic diversity observed in the human population. This diversity has been circumvented in mice by both backcrossing and inbreeding strategies, leading to actual congenic strains.^{12,13} For historical reasons, single mutants have been made from embryonic stem cells coming from either 129Sv or, more recently, B6 strains.^{14,15} Despite some technological amelioration in the generation of mutant mice, a mixed genetic background still is frequently observed.^{12–15} This issue is exacerbated today with sophisticated multitargeted genetically engineered mice mutants (double or triple knockout, conditional, inducible, or not). These multiple-targeted mutant mice have been generated through diverse crossbreeding strategies made from diverse single mutants sometimes generated from diverse backgrounds, nurturing potentially underestimated genetic background-related experimental bias.

To better understand the glomerular lesion generation and their genetic background-related pathological features; we deliberately limit our study to the two aforementioned leading strains. As expected, we confirmed that the anti-GBM-GN was more severe in 129Sv than in B6J mice. We pointed out that the major genetic background-related pathological differences are mainly related to the severity of glomerular endothelial injury. Furthermore, the severity of tubular injuries or even the importance of the renal infiltration by immune effectors (T cells in particular) was actually not genetic background related as opposed to glomerular injuries. Finally, we demonstrated the existence of genetic background-related thrombotic microangiopathy (TMA) glomerular lesions. These lesions, as TMA systemic expressions (anemia and thrombocytopenia), have been underestimated during the passive anti-GBM-GN. Our results also indicate that this genetic background-dependent pathological feature of the anti-GBM-GN model could be related to a genetic background-dependent glomerular vascular endothelial growth factor receptor (Vegfr) 2 imbalance.

Materials and Methods

Animals and Induction of Experimental Passive Anti-GBM-GN

All mice (C57BL/6J and 129S2SvPAs) were provided by the Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Female

mice (aged 10 to 12 weeks) were used in all experiments, with 10 mice per group in each experiment. Passive experimental anti-GBM was induced, as previously described, using a decomplexed sheep anti-rat GBM serum prepared as described previously.^{16,17} The serum meets all criteria of anti-GBM-GN/nephrotoxic nephritis (eg, fixation along the glomerular structure), principally the GBM (Supplemental Figure S1). Similar glomerular lesions were obtained with purified IgG, previously described.¹⁸ The quantity of lipopolysaccharide found in our sera was <0.04 endotoxin units. Passive nonaccelerated anti-GBM-GN was induced by i.v. administration of a total of 1.5 mg total protein/g body weight over 3 consecutive days (days 0, 1, and 2). This protocol was popularized by Salant and Cybulsky,⁶ according to the seminal work done by Morley and Wheeler¹⁹ in mice. Renal injuries were evaluated on day 4 or 10 as needed. Control mice were injected with phosphate-buffered saline (PBS) or sheep pre-immune sera.

Measurement of Systolic Arterial Pressure

Systolic arterial pressure (measured in mmHg) was measured with a tail-cuff sphygmomanometer adapted for the mouse using an automated system (MC 4000 BP analysis system; Hatteras Instruments, Inc., Cary, NC). To avoid variation in blood pressure due to day cycle, all measurements were performed between 9 and 11 AM. Animals were accustomed to the system for several days before measurements were taken. Ten measurements from each mouse were taken at 2-minute intervals and then a mean value was determined.

Measurement of Hemoglobin Count and Platelet Count

Analyses were conducted from 20- μ L blood samples with dedicated EDTA tubes (Melet Schloesing Laboratories, Osny, France). Calibrated veterinary automated equipment (MS9 blood counting equipment; Melet Schloesing Laboratories) was used for all measurements.

Measurement of Urinary Protein Excretion

All mice were acclimated to metabolic cages with free access to food and water for 8-hour urine collection. Urinary protein concentration was normalized to urinary creatinine concentration, and values were expressed as g/mmol creatinuria. Plasma samples were taken at the moment of sacrifice, and creatinemia or blood urea nitrogen (BUN) was determined by a KONELAB automater (Thermo Scientific, Waltham, MA).

Transmission Electron Microscopy

Animals were perfused with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol/L sodium phosphate buffer at pH 7.4. Kidneys were removed, cut into small pieces, and immersed in 2.5% glutaraldehyde containing 1% tannic acid in 0.1 mol/L PBS

for 2 hours at 4°C. Samples were post-fixed with 1% OsO₄, dehydrated, and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and then examined under a Philips CM10 electron microscope (Philips Innovation Services, Eindhoven, the Netherlands).

Scanning Electron Microscopy Analysis

Mice were perfused by 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol/L sodium phosphate buffer at pH 7.4. Kidney slices were then fixed with glutaraldehyde and cut with a razor blade. The specimens were washed in phosphate buffer and then treated with 1.0% OsO₄ for 2 hours. After being washed again in phosphate buffer, the specimens were dehydrated in a graded series of ethanol and submitted to standard scanning electron microscopy protocols. The specimens were then examined in a scanning electron microscope (model JSM-6301F; JEOL, Tokyo, Japan) at 15 keV.

Immunofluorescence Analysis of Fibrin Deposits and Immunohistological Staining of Vegfr2

Fibrin deposition was first detected on Masson's trichrome and, therefore, confirmed by immunofluorescence on 6- μ m cryosections. Slides were incubated for 1 hour with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse fibrin, diluted 1:50 (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, the Netherlands). Glomerular fibrin deposition was assessed using a semiquantitative protocol, as previously described.²⁰ Vegfr2 was revealed using a two-layer technique on cryosections with a primary rabbit anti-mouse Vegfr2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany).

Isolation of Glomeruli

Decapsulated glomeruli were isolated as previously described.^{21,22} Briefly, freshly isolated renal cortex was mixed and digested by 2 mg/mL collagenase I (Gibco; Life Technologies, Saint-Aubin, France) in RPMI 1640 medium (Life Technologies) for 2 minutes at 37°C, and then collagenase I was inactivated with RPMI 1640 medium plus 10% fetal calf serum. Tissues were then passed through a 100- μ m cell strainer and a 40- μ m cell strainer (BD Falcon, Le Pont-de-Claix, France) in PBS (Euromedex, Souffelweyersheim, France) plus 0.5% bovine serum albumin (Euromedex). Glomeruli, adherent to the 40- μ m cell strainer, were removed from the cell strainer with PBS plus 5% bovine serum albumin injected under pressure, and then washed twice in PBS. Isolated glomeruli were then picked up in radioimmunoprecipitation assay buffer (Santa Cruz) supplemented with orthovanadate (Santa Cruz), phenylmethylsulfonyl fluoride (Santa Cruz), protease inhibitor cocktail (Calbiochem, Merck Chimie SAS, Fontenay sous Bois, France), and NaF. They were then frozen at -80°C for protein extraction or picked up in RNeasy Lysis Buffer (Qiagen) and frozen at -80°C for total RNA extraction.

Western Blot Analysis from *ex Vivo* Glomerular Extracts

Glomerular lysates (10 μ g; radioimmunoprecipitation assay buffer and kinase inhibitor cocktail) were fractionated by SDS-PAGE NuPAGE 4/12% gels (Invitrogen, Life Technologies) under reducing conditions and blotted with rabbit anti-Vegfa antibody (Lab Vision/NeoMarkers, Fremont, CA), Vegfr2 and Vegfr2 Y1175 (Cell Signaling Technology Europe, B.V. Leiden, the Netherlands), or VEGFR1 (Santa Cruz). This process was followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Amersham, Arlington Heights, IL) for 2 hours at room temperature in 5% PBS-Tween buffers. The membrane was stripped and reprobed with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse β -actin or hsc70 (Hspa8) to control protein loading, and antibodies were detected by enhanced chemiluminescence-plus on autoradiography films (Fuji Film, Asnières, France). Relative quantification was made using ImageJ software version 1.46r (NIH, Bethesda, MD).

Gene Expression Profiling in Isolated Glomeruli

Anti-GBM-GN disease was induced in disease-sensitive strains (129Sv) and resistant strain (B6). Glomerular RNA were next profiled using microarrays (Affymetrix GeneChip MOE 430 2.0; Affymetrix, Santa Clara, CA) on day 4 of the glomerulonephritis with standard Affymetrix protocol. RNA quality check, cDNA synthesis, labeling, and microarray analysis were performed by the Affymetrix Resource Facility core of PartnerChip (Genopole, Evry, France). The quality of total RNA was monitored by Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) following the manufacturer's instructions. Generation of double-stranded cDNA, preparation and labeling of cDNA, hybridization to 430 2.0 Mouse Genome Arrays, washing, and scanning were performed according to the standard Affymetrix protocol.

All comparisons of mRNA expression levels between groups were performed using unpaired *t*-tests with the Genespring GX software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). To correct for multiple testing, a false-discovery rate of 5% was applied. Genes were identified as differentially expressed if they showed a fold change of at least 1.5 with *P* < 0.05. The data discussed in this publication have been deposited in the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; accession number GSE56236).

Pathway Analysis

The Genomatix Pathways System-GePS Software (Genomatix Software GmbH, Munich, Germany) was applied to elucidate putative pathways associated with the gene expression changes in glomeruli of disease-prone mice (129S2/SvPas) versus disease-resistant mice (C57BL/6J), each time compared with their own respective non-disease control

mice. Genomatix GePS uses information extracted from public and proprietary databases to display canonical pathways or to generate and extend networks on the basis of literature data. Pathway data were collected from the Pathway interaction database. This includes several pathways imported from BioCarta (http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta_Pathways). These data and their generation are described in detail by Schaefer et al.²³

qPCR on Glomerular mRNA

To validate the expression differences observed using microarrays, we quantified glomerular mRNA expression of Vegfr2, Vegfr1, neuropilin 1 (Nrp1), and Vegfa at day 4 using quantitative PCR (qPCR). Podocin from the entire renal cortex was analyzed on day 10. Glomeruli were extracted using different sieving procedures, as previously described.^{20,22} Contamination with tubular fragments was <10%, as assessed by phase-contrast microscopy. RNA was extracted from the glomerular extract using a Qiagen micro kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France). Reverse transcription with Superscript II (Gibco) was used to convert RNA into cDNA, which was then amplified by PCR with a LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France); SYBR Green (Fast Start DNA Master SYBR Green I; Roche Diagnostics), and specific primers for target mRNA designed by Roche (Universal Probe Library). Results are expressed as $2^{-\Delta\text{Ct}}$.

Injection of VEGFA (VEGFA165) Recombinant Protein

Human VEGFA 165-sf9 (1 μg ; Biovendor, Brno, Czech Republic) was s.c. injected (half-life of 6.2 hours, as previously described²⁴) four times on days 0, 1, 2, and 3 after nephrotoxic sera injection. Mice were sacrificed on day 4.

Mouse Vegfr2 Blocking and Injection of the Rat Anti-Mouse Vegfr2 Antibody

We used an antibody made in rat supplied by ImClone Systems (a wholly owned subsidiary of Eli Lilly and Company, New York, NY).^{25,26} This antibody is specific of mouse Vegfr2, without cross-reactivity, and was injected i.p. (500 μg every 48 hours) during 9 days in total. Proteinuria and histological parameters were all evaluated at days 4 and 9, respectively.

Statistical Analysis

Quantitative analyses of histological features were performed using blinded coded slides. A total of 10 mice per experiment were analyzed in two or three separate experiments, and the results are expressed as means \pm SEMs. Differences were compared using an unpaired *t*-test with Welch correction. When variance differed significantly, a Mann-Whitney test was performed. All statistical analyses were performed using

GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Fibrin score deposition was compared using a two-sided Fisher's exact test. Differences were considered to be significant when $P < 0.05$.

Results

The Severity of Anti-GBM-GN Is Dependent on Genetic Background

We challenged 129Sv mice using a deplete complemented nephrotoxic serum from the same batch. After anti-GBM serum injection, we were able to demonstrate the characteristic deposits of anti-GBM sheep antibody along the GBM membrane in particular. Similarly, mice developed anti-sheep IgG, colocalized to GBM membrane (Supplemental Figure S1). Mortality at day 20 was 100% in 129Sv compared with 40% in B6J mice ($P < 0.005$) (Figure 1A), showing that genetic background is an important factor in anti-GBM-GN. Similarly, proteinuria and acute renal failure at day 10 were more pronounced in 129Sv than in B6J mice (Figure 1, B and C). Renal inflammatory cell infiltration, a common hallmark of anti-GBM-GN severity, was quantified at a similar time point (day 10). Concerning the renal recruitment of macrophages (Figure 1F) and T cells (Figure 1, G and H), we failed to find any significant difference in cellular infiltration between strains; only the recruitment of polymorphonuclear cells (Figure 1I) appeared different, specifically elevated, in the more resistant B6J strain.

Crescentic and Endothelial Lesions, But Not Tubular Injuries, Are GB Dependent

Histological lesions, in particular crescentic lesions (Supplemental Figure S2, A–C), were quantified at day 10 of the disease (Figure 1, D–F). B6J mice developed fewer glomerular lesions than 129Sv mice (Figure 1D). Podocytic necrosis or ballooning, with or without cystic lesions (Supplemental Figure S2H), were frequently observed and occasionally led to the disruption of the glomerular architecture, forming pseudocrescents or crescents, a classic feature of this model (Supplemental Figure S2, A and B). Tubular lesions were obviously not different between strains. The pseudocrescentic lesions were also assessed by electron microscopy, and the down-regulation of podocyte mRNA markers was also quantified (Supplemental Figure S2, E–G). At an early time point of the glomerulonephritis (day 4), all podocyte mRNA markers (podocin, nephrin, and Wt1), measured from *ex vivo* isolated glomeruli, were found more elevated in B6J mice than in 129Sv mice. Podocin mRNA level was also different at the basal stage, lower in 129Sv mice than B6J mice. Genetic background-dependent podocytic lesions were visible by scanning electron microscopy (Supplemental Figure S2, H–M). We discovered that dedifferentiation of podocytes occurred earlier in 129Sv compared with B6J mice

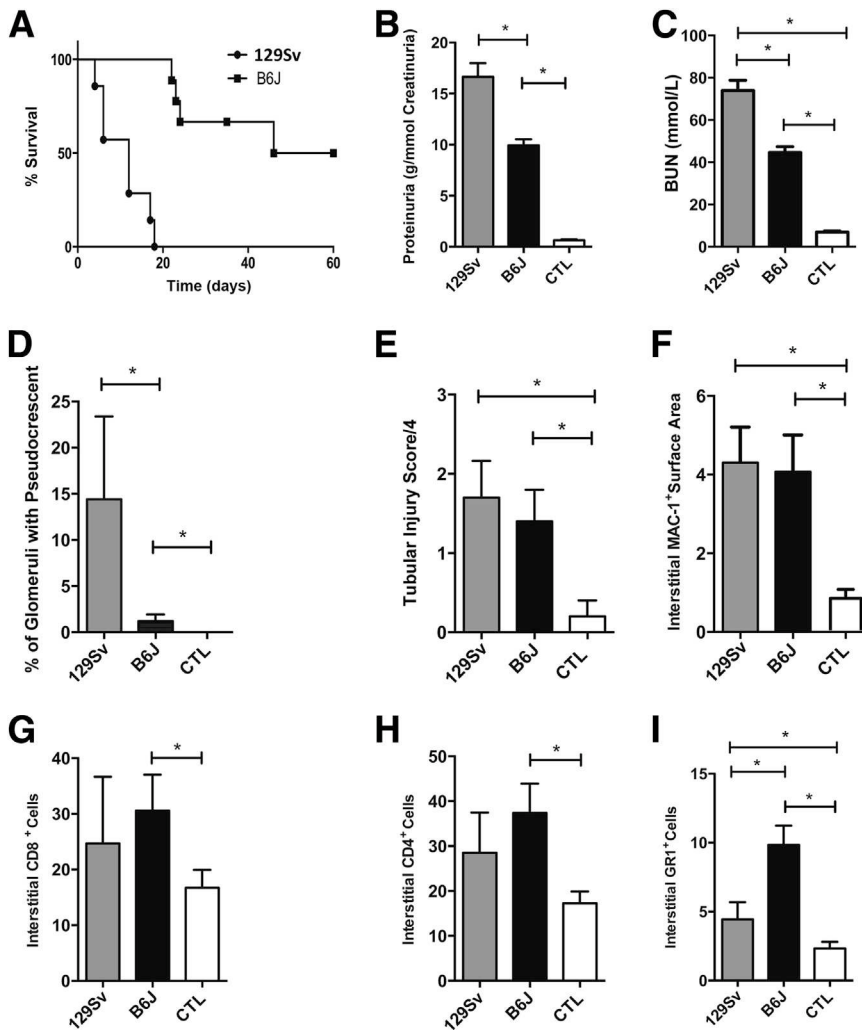


Figure 1 Genetic background and glomerular lesions are associated with anti-GBM-GN severity. **A:** After anti-GBM serum injection, mortality is largely dependent on mouse strain ($P < 0.005$, Kaplan-Meier for B6J versus 129Sv); B6J mice were largely protected. On day 10 of the experimental model, proteinuria (**B**) and BUN (**C**) were lower in B6J mice and maximal in 129Sv mice. **D:** Glomerular lesions, represented herein by the percentage of glomeruli with crescents or pseudocrescents at day 10, were higher in 129Sv mice than in B6J mice. **E:** Tubulo-interstitial lesions were not different between strains. Renal inflammatory cell infiltration, a hallmark of the anti-GBM-GN model, was also quantified by detection of Mac-1, reflecting macrophages (**F**), CD8⁺ and CD4⁺ reflecting T cells (**G** and **H**, respectively), and Gr1⁺-highlighting polymorphonuclear cells (**I**). **I:** Despite an important infiltration of these cells into the kidney, no differences could be related to the genetic background of the mice, except for Gr1⁺ staining, which was inversely correlated to disease severity. Results are expressed as means \pm SEM ($n = 10$). Data are representative of four isolated experiments, each with 5 to 10 animals per group. * $P < 0.05$ (Student's *t*-test with Welch correction or Mann-Whitney test). CTL, control.

(Supplemental Figure S2L compared with Supplemental Figure S2D); we noted the regression of major foot processes. Podocytes appeared vacuolated, with evident cytoplasmic protrusions (blebs) explaining some aforementioned pathological aspects at a later time point. For B6J mice, glomerular lesions at day 4 were limited by light microscopy (Supplemental Figure 2C). At day 10, lesions were scarce and consisted of double contours visible at high magnification, and by electron microscopy, an effacement of the foot processes, which appeared flattened (Supplemental Figure S2, D, I, and J).

TMA Lesions Are Associated with Classic Hematological Features of Human TMA

The glomerular endothelium is also a potential target of injury in the anti-GBM-GN model, and local activation of the coagulation system is common.²⁷ Thus, endothelial lesions were assessed and quantified by light and electronic microscopy. Fibrin deposits were numerous in 129Sv mice (Figure 2C) and visible by transmission electron

microscopy (Figure 2N). In B6J mice, tiny dots of fibrin deposits were visible, but glomerular thrombosis was virtually never seen (Figure 2B). In contrast, 129Sv mice often had massive coagulation of the glomerular capillary (Figure 2A). In both strains, but especially in 129Sv mice, we observed endothelial lesions that were highly reminiscent of TMA, such as double contours, subendothelial spaces, and fibrin deposits, but to a different extent according to their genetic background. Double contours were mainly observed in B6J mice, and fibrin deposits were mostly seen in 129Sv mice (Figure 2, D and E). TMA was further confirmed by transmission electron microscopy analysis. Similar to TMA lesions described in humans, we found large loss of endothelium (Figure 2M), platelet accumulation, and existence of subendothelial spaces (Figure 2, N and O, respectively).

As in human, we looked for systemic evidence of TMA. At day 10, profound anemia was observed, along with reticulocytosis (Figure 2, H and I), scarce circulating helmet cells (schistocytes) (Figure 2J), and thrombocytopenia (Figure 2G). Here again, anemia and thrombocytopenia

were more severe in 129Sv mice than in B6J mice (Figure 2, F and G). Finally, blood pressure also increased, and hypertension was more pronounced as the renal disease became more severe (ie, in 129Sv mice) (Figure 2K). All

these parameters have been used to characterize human TMA.

VEGF/VEGFR2 and Hypoxia Pathways Are the Main Pathways Involved in Genetic Background—TMA Severity

To further understand the mechanism of the GB-dependent TMA, we performed microarray expression profiling of mRNA isolated from glomeruli in disease-prone mice (129Sv) and disease-resistant mice (B6J) at an early time point (day 4) ($n = 3$ per group, 12 mice in total). Interestingly, the VEGFR and hypoxia-inducible pathways were implicated in TMA-prone mice (Figure 3A and Table 1). Kdr (Vegfr2) appears as one of the most differentially expressed genes between non-nephritic B6J and 129Sv mice (basal level). Top differentially expressed genes involved in both the hypoxia and VEGFR pathways are depicted in the heatmap (Figure 3B). A common pathway (shared by both B6J and 129Sv mice) showed that differentially expressed genes were enriched in the NF- κ B and matrix metalloprotease pathways (Figure 3B and Table 1). Furthermore, cell cycle pathways seemed more specifically involved in B6J-resistant mice (Table 1).

Endothelial Glomerular VEGFR2 Expression Is Lower in TMA-129Sv—Prone Mice in Comparison to B6-TMA—Resistant Mice

To confirm these differences and to determine whether an insufficient signaling of the VEGFR1/2 pathways caused the severity of the glomerular TMA, levels of Vegfr2 and Vegfr1 and one of their coreceptor Nrp1 were also determined from *ex vivo*—isolated glomeruli. We found similar expression of Nrp1 and Vegfr1 in both strains at the basal

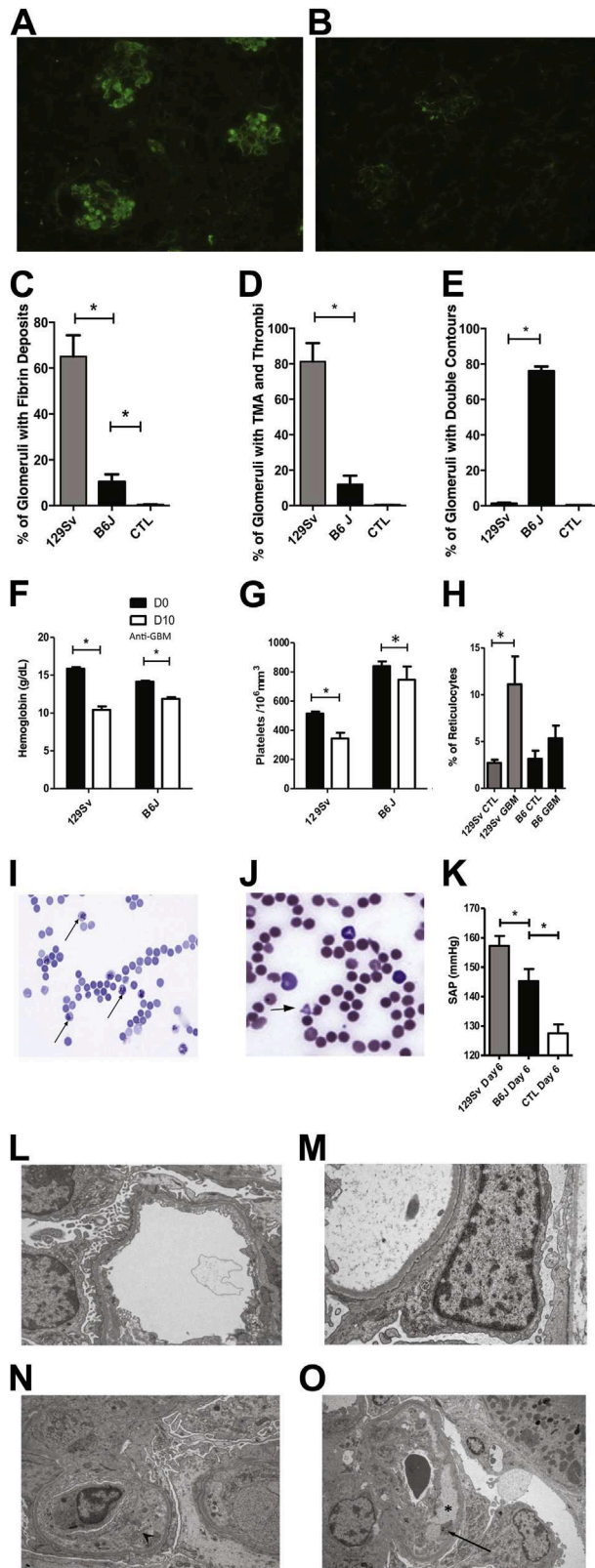


Figure 2 TMA is a yet unrecognized hallmark of anti-GBM-GN, which is maximal in 129Sv mice and less severe in B6J mice. The most striking difference between strains was glomerular fibrin deposits (129Sv mice in **A** and B6J mice in **B**). **C**: We quantified fibrin deposits at day 10 of anti-GBM-GN. Fibrin deposits with double contour were maximal in 129Sv mice (**D**), and the percentage of double contour pattern alone was maximal in B6J mice (**E**). Quantification of hemoglobin showing anemia (**F**); platelet count showing thrombocytopenia (**G**). **H** and **I**: The intensity of associated reticulocytosis (indicated by **arrows** in **I**) was also analyzed in the two strains (blood stained with brilliant cresyl blue). **J**: Scarce schistocytosis was also observed (**arrows**). Note the virtual absence of thrombocytes on May-Grünwald-Giemsa staining, confirming thrombocytopenia. **K**: Anti-GBM-GN also induces hypertension in both strains measured at day 6, again maximal in the 129Sv strain. Early TEM examination of the glomerular endothelium at day 4 (representative normal aspect in **L**) shows its virtual absence in 129Sv mice (**M**), and the existence in 129Sv of subendothelial space (**arrowhead** in **N**) with deposited platelets in **O** (**arrow** indicates platelets and an **asterisk** marks the existence of a subendothelial space). The same type of lesion is also visible to a lesser degree in B6J mice. All results are expressed as means \pm SEMs ($n = 10$). Data are representative of three isolated experiments, each with 5 to 10 animals per group. $*P < 0.05$ (Mann-Whitney test). Original magnification, $\times 10,000$. CTL, control.

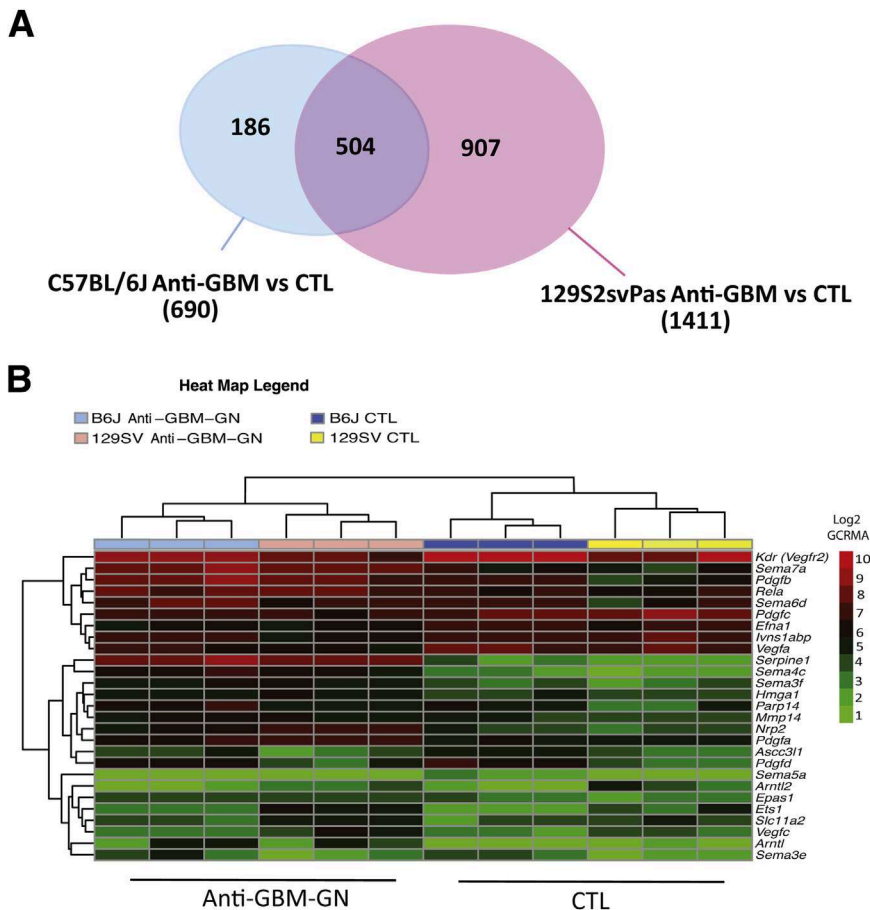


Figure 3 Venn diagram and representation of glomerular DNA microarray showing the importance of VEGFR pathway during anti-GBM-GN, according to mice genetic backgrounds. Anti-GBM-GN was induced in disease-sensitive (129Sv) and resistant (B6J) strains, then glomerular RNA was analyzed using DNA microarrays on day 4 of the glomerulonephritis. A total of 690 transcripts (186 + 504) were modulated in B6J strain compared with its own control (CTL; $n = 3$); conversely, 1411 transcripts (504 + 907) were modulated in 129Sv compared again with its own control ($n = 3$). **A:** Venn diagram representing the repartition of transcripts. **B:** Heatmap representations focusing on VEGFR and hypoxia-related genes; major differences are found according to the genetic background, either at the basal level or after glomerulonephritis. Note the striking difference between Kdr (Vegfr2) expressions at the basal level. Three biological replicates were included for each strain. Gene chip robust multi-array averaging (GCRMA) intensity values have been plotted and clustered in the heatmap.

level either at the mRNA (Figure 4, A and B) or protein (Figure 4, C–E) level. At day 4, the level of Vegfr1 was slightly decreased in B6J mice, but finally not found to differ between strains. Contrary to Vegfr1 and confirming our microarray data, Vegfr2 (Kdr) was significantly lower in 129Sv mice at the basal level compared with B6J mice, suggesting that a genetic background–determined process may especially tune vegfr2 level. Similarly, following the course of the nephritis, both Vegfr2 mRNA and total Vegfr2 protein were found to be lower in TMA-prone mice either at day 4 (Figure 4, F–I and K) or even at day 10 by immunohistochemistry (Figure 4, G and H).

For technical reasons, we failed to evaluate vegfr1 phosphorylation, but were able to quantify the glomerular Vegfr2-Y1175 phosphorylation, reflecting Vegfr2 functionality. Consistently, the level of Vegfr2-Y1175 appeared higher in B6J mice compared with 129Sv mice (Figure 4, J and K). In addition, using confocal microscopy, we pointed out that glomerular VEGFR-2 expression was mainly limited to glomerular endothelial cells (Supplemental Figure S3). Again, its expression appeared higher in B6J than in 129Sv strain, at day 4 of the anti-GBM-GN (Supplemental Figure S3, C versus D). Taken together, these data suggest that the Vegfr2 expression and its Y1175 phosphorylation by glomerular endothelial cells may be on a genetic background dependency.

Systemic VEGFA Supply Fails to Rescue Genetic Background–TMA Lesions and, Conversely, Specific Vegfr2 Blocking Aggravates B6 Mice Only

By using *ex vivo*–isolated glomeruli, we failed to find any defect in glomerular levels of VegfA by Western blot analysis, despite a difference in its associated mRNA (Figure 5, A and B). *In vivo*, early VEGFA supplementation in nephritic animals (every day for 4 days in total, beginning day 0) exerted no benefit regarding BUN level (Figure 5D) in any strain. We even found an increase in proteinuria in the VEGFA B6–treated mice (Figure 5C). Conversely, to confirm the genetic background–Vegfr2 dependency during anti-GBM-GN, we specifically blocked Vegfr2 using a rat anti-mouse Vegfr2 antibody (DC101). In such conditions, after the Vegfr2-blocking antibody injection, B6J mice were strikingly aggravated, contrary to 129Sv mice (Figure 5, E–H). Glomerular fibrin deposits and glomerular thrombosis were higher, especially in B6J mice (Figure 5H). The surrogate systemic TMA parameters (anemia and thrombocytopenia) were found to be especially aggravated in B6J anti-vegfr2-treated mice versus B6J non-treated mice (Figure 4, I and J). Thus, the systemic Vegfr2 blocking aggravated the TMA-resistant B6J mice but failed to aggravate significantly the 129Sv TMA-prone mice.

Table 1 Strain-Dependent Gene Expression Pathways during Anti-GBM-GN

Variable	Canonical pathway	Pathway ID	P value
186 Transcripts found only in C57BL/6J	Polo-like kinase 1	PW_PLKI1_MUS_MUSCULUS	1.18×10^{-4}
	Polo-like kinase 3	PW_PLKI3_MUS_MUSCULUS	1.39×10^{-4}
	Aurora kinase	PW-AURORA_MUS_MUSCULUS	1.56×10^{-4}
	Cell division cycle 2	PW-CDC2_MUS_MUSCULUS	1.71×10^{-4}
	Signal transducer and activator of transcription	PW-STAT_MUS_MUSCULUS	3.84×10^{-3}
	Granzyme B	PW-GZMB_MUS_MUSCULUS	9.75×10^{-3}
504 Transcripts found in both strains	Matrix metalloproteinase	PW_MMP_MUS_MUSCULUS	7.56×10^{-13}
	VEGFR	PW_VEGF_MUS_MUSCULUS	9.05×10^{-11}
	NF- κ B	PW_NFKB_MUS_MUSCULUS	5.21×10^{-9}
	Mitogen-activated protein kinase	PW_MAPK_MUS_MUSCULUS	2.12×10^{-8}
	Focal adhesion kinase	PW_FAK_MUS_MUSCULUS	3.71×10^{-8}
	Tissue inhibitor of metalloproteinase	PW_TIMP_MUS_MUSCULUS	4.75×10^{-8}
	Rho Ras homologue	PW_RHOA_MUS_MUSCULUS	9.37×10^{-8}
	Caveolin 1	PW_CAVEOLIN_MUS_MUSCULUS	5.64×10^{-7}
	Small GTP-binding protein Rac	PW_RAC_MUS_MUSCULUS	5.92×10^{-7}
	IL-1	PW_IL1_MUS_MUSCULUS	8.19×10^{-7}
907 Transcripts found only in 129S2SvPas	VEGFR	PW_VEGF_MUS_MUSCULUS	5.77×10^{-7}
	Hypoxia-inducible factor, α subunit (basic helix loop helix transcription factor)	PW_HIF1A_MUS_MUSCULUS	2.74×10^{-6}
	Integrin	PW_INTEGRIN_MUS_MUSCULUS	2.75×10^{-5}
	Matrix metalloproteinase	PW_MMP_MUS_MUSCULUS	3.02×10^{-5}
	Peroxisome proliferator-activated receptor γ	PW_PPARG_MUS_MUSCULUS	8.73×10^{-4}
	Integrin-linked kinase	PW_ILK_MUS_MUSCULUS	1.25×10^{-4}
	Nitric oxide synthase	PW_NOS_MUS_MUSCULUS	1.26×10^{-4}
	Cyclin D1	PW_CCND1_MUS_MUSCULUS	1.62×10^{-4}
	Protein kinase C	PW_PKC_MUS_MUSCULUS	1.84×10^{-4}
	FK506 binding protein 12 and rapamycin-associated protein, mTor	PW_MTOR_MUS_MUSCULUS	2.96×10^{-4}

Major strain-dependent gene expression pathway differences in isolated glomeruli at day 4 of the anti-GBM-GN (more than twofold up or down, $P < 0.05$), corresponding to Venn diagram in Figure 3. Analysis of the common gene set represented in Figure 3 (504 transcripts) found VEGFR and matrix metalloproteinase pathways as top-ranking pathways involved in the pathogenesis of glomerular injury. Analysis of transcripts implicated only in 129Sv found VEGFR and hypoxia-inducible factor pathways strikingly modulated. Angiogenesis pathways seem largely implicated in 129Sv mice compared with B6J mice. Conversely, in this last strain, cell cycle pathways represented by polo-like kinase/aurora kinase are largely implicated. Pathways were built using GePS software (<http://www.genomatix.de>).

Discussion

Our study shows that, in the anti-GBM-GN model, TMA lesions are associated with classical glomerular epithelial proliferative lesions. Endothelial lesions explain fibrin deposition and microthrombosis. These features are largely genetic background related, mimicking human TMA lesions. Anti-GBM-GN-associated TMA lesions have been largely underrecognized in previous studies. In addition, we demonstrated that the glomerular VEGFR2 pathway activation is genetically determined. Given the current pathophysiological features of TMA, genetic background-related VEGFR2 peculiarities may explain the difference observed in disease severity between the two strains of mice.

The anti-GBM-GN model is a widely used experimental model mainly adapted to decipher crescentic glomerulonephritis (CG) and its associated pathophysiological characteristics.^{6,9,28} Using different strains, Xie et al^{1,3} were able to demonstrate the large genetic background dependency of the anti-GBM-GN model. The scarcity of the lesions in B6J

mice could explain why TMA lesions were, until now, poorly described. The severity of TMA lesions could be even more unpredictable in ultramixed genetic backgrounds, a situation inherent to modern multitargeted mouse models, in which 129Sv embryonic stem cells are widely used.^{12,13,29,30} Our observation may also explain the large phenotypic variations related to VEGFR2 pathways, in particular in the developmental study.^{18,29,31-33} In addition, we assigned anti-GBM-GN as a potential, yet poorly recognized, experimental renal TMA model, especially in 129Sv-prone mice strains. Indeed, we demonstrate the presence of hemolytic anemia featured by red blood cell abnormalities, thrombocytopenia, and acute renal failure with nephrotic range proteinuria and hypertension. All these abnormalities have been found in humans with hemolytic uremic syndrome.³⁴ Finally, the major molecular pathways involved in glomeruli during anti-GBM-GN were related to VEGFR pathways.

Our Vegfr2-blocking strategy confirmed not only the dependency of the anti-GBM-GN model to this receptor, but also pointed out its association with genetic background.

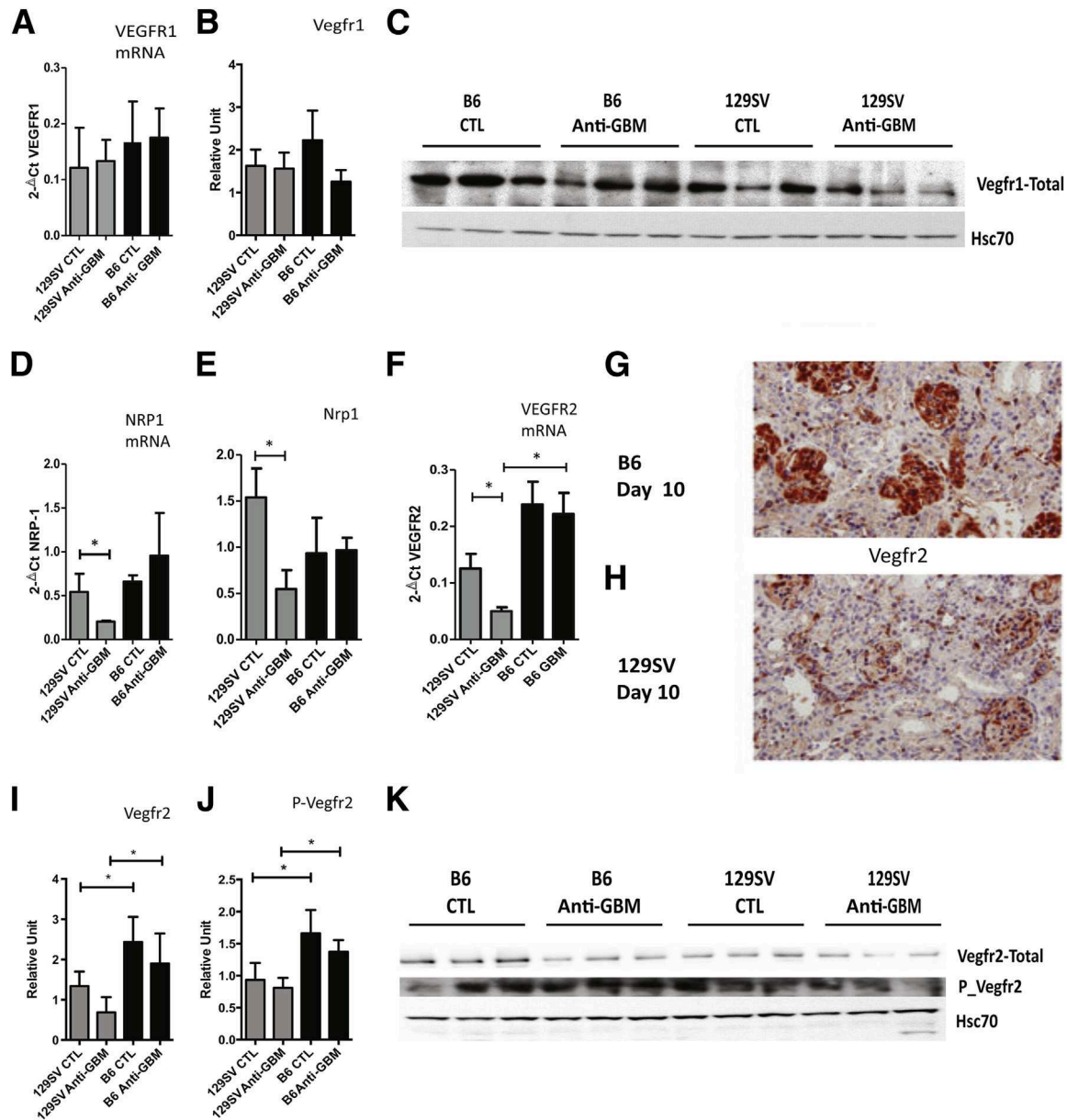


Figure 4 Podocytic fate and glomerular VEGF pathway analyses during early stages of anti-GBM-GN. Vegfr1 or Nrp1 expression were found to be similar in glomerular extracts, as quantified by qPCR (A and D, respectively) and Western blot analysis (B and E, respectively); a representative Vegfr1 Western blot analysis (C). F–K: Only the glomerular Vegfr2 level and its associated phosphorylation is different during the early phase of anti-GBM-GN. Intense staining is found at day 10 in B6J mice (G) compared with 129Sv mice (H). K: Western blot analysis of the representative Vegfr2 and its phosphorylated form. All results are expressed as means ± SEMs (n = 8). Data are representative of four pooled isolated experiments, each time with at least three to five animals per group (n = 9 to 12 per group). *P < 0.05 (Mann-Whitney test). Original magnification, ×400. CTL, control.

The involvement of Vegfr2 was also largely suggested by the adverse effects of drugs associated with anti-VEGF therapies in humans.^{35–37} Masuda et al³⁸ were able to demonstrate that a VEGFA supply may limit crescentic lesions during rat anti-GBM-GN model at a later time point (in the Wistar Kyoto rat strain, which is extremely sensitive to the anti-GBM-GN model). Hohenstein et al³⁹ recently described the glomerular expression of VEGFR2 during human CG. In this work, TMA lesions were not analyzed and VEGFR2 expression was not quantified in a pure TMA context as a positive control.³⁹ However, one study at least

was able to pinpoint the existence of TMA lesions during anti-GBM-GN in 6 of 12 patients. The authors state that histological evidence of TMA may be seen in 75% of patients with anti-GBM-GN. More recently, a report discussed the relationship between TMA lesions and CG. In these two studies, TMA lesions are well described, but no pathophysiological mechanism was suggested.⁴⁰ In addition, the importance of genetic background in the genesis of these lesions is not discussed.⁴¹

Interestingly, published studies have shown that murine podocytes are one of the key elements of crescentic lesion

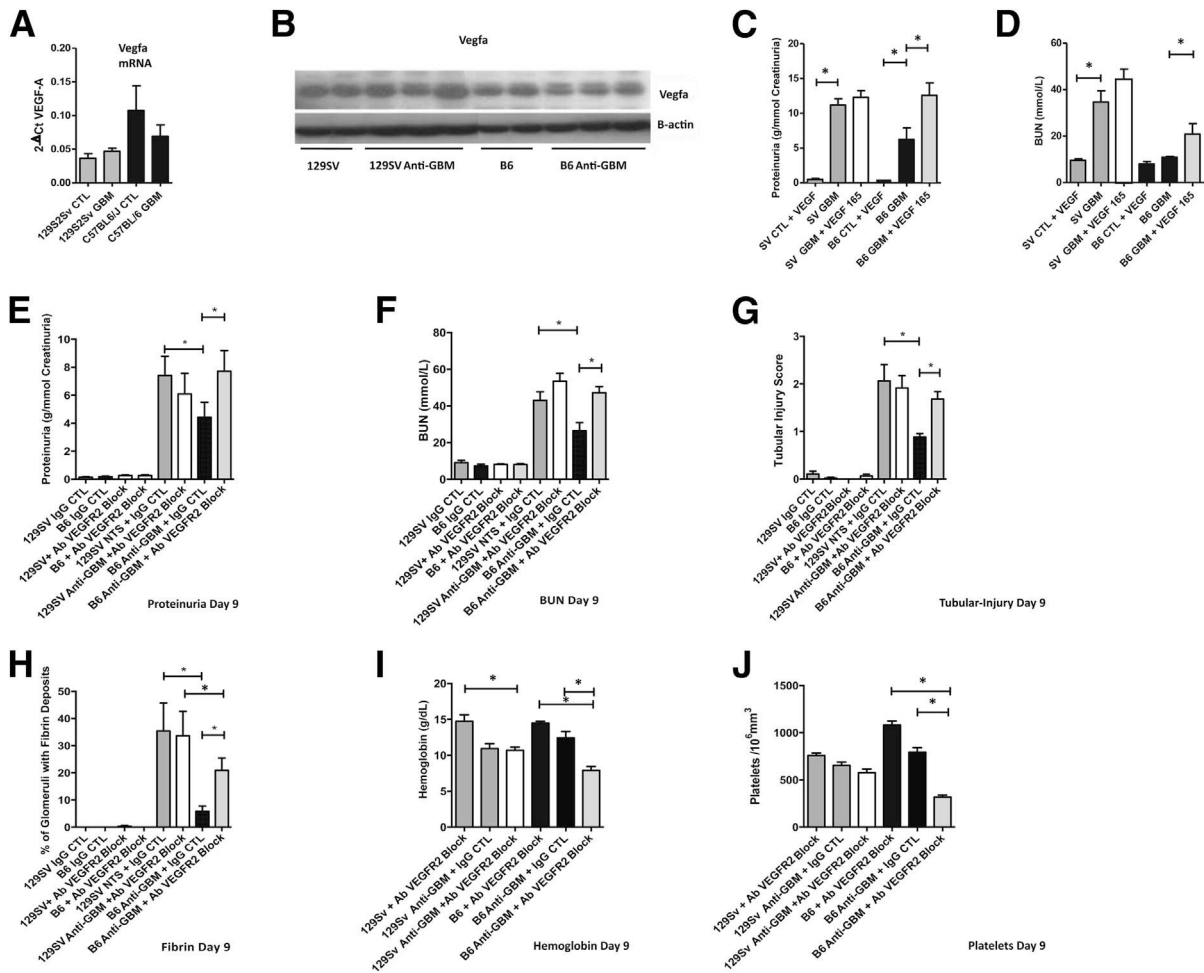


Figure 5 Systemic VEGF165A administration failed to prevent TMA lesions, but specific VEGFR2 inhibition aggravated B6J mice only. Analysis of Vegfa mRNA (**B**) and its associated protein (**A**) from glomerular lysates from both strains (B6J and 129Sv). No difference is observed in the Vegfa level between strains. **C**: Slight aggravation of proteinuria in B6-VEGFA—treated mice is observed. **D**: Conversely, the daily injection of recombinant human VEGF165A has no benefit regarding BUN level in any strain. Systemic Vegfr2 (Kdr) blocking using a rat anti-mouse Vegfr2 antibody leads to the aggravation of the anti-GBM-GN, especially proteinuria and BUN at day 9 (**E** and **F**, respectively). **G**: Tubulo-interstitial lesions and score are especially aggravated after VEGFR2 blocking only in B6 mice. **H**: Glomerular fibrin deposits are more numerous after vegfr2 blocking in the B6J strain. At day 10 of the anti-GBM-GN, systemic TMA parameters (anemia in **I** and thrombocytopenia in **J**) are clearly seen in the B6J strain after anti-vegfr2 injection. There was no glomerular toxicity in control (CTL) mice. All results are expressed as means \pm SEMs ($n = 8$). Data are representative of four isolated experiments, each time with at least five animals per group. * $P < 0.05$ (Mann-Whitney test).

ignition, particularly in the anti-GBM-GN model.^{22,42–44} Herein, we demonstrated and confirmed the existence of podocytic lesions in both strains. In particular, pseudocrescent formation was evident in 129Sv. At first, we expected a lower VEGFA output from diseased podocytes, leading to glomerular endothelial dysfunction and, thus, TMA lesions. Our data cannot support this hypothesis, given that glomerular Vegfa production was finally not altered and a VEGFA supply could not reverse the disease, as previously shown in other studies.^{45,46} Even more, our data suggest that an exogenous supply of VEGFA could be harmful in the B6J strain, as measured by the proteinuria. This observation reinforces the fact that Vegfa responses are largely dependent on the genetic background. Furthermore, specific lesions of podocytes facilitated by inducible disruption of podocin did not lead to glomerular endothelium

dysregulation or TMA in different genetic backgrounds.^{47,48} Thus, TMA lesions observed in the anti-GBM-GN model did not seem to be related to the Vegfa supply from podocytes, but rather to Vegfr2 signaling in endothelial cells. This hypothesis is largely sustained by our data and the findings reported in inducible *Kdr/Vegfr2* knockout mice by Sison et al.⁴⁹ The authors observed that the specific inducible *Vegfr2* deletion in endothelial cells led to glomerular TMA.

The systemic blocking of Vegfr2 in both strains of mice confirmed not only the genetic background–Vegfr2 dependency of the model, but also explains why VEGFA supply was not able to rescue 129Sv mice in particular. Indeed, the defect was more on the receptor than the ligand. Remarkably, comparing glomerular Vegfr2 expression, we observed an imbalance of this receptor at the basal state,

with lower expression in 129Sv mice and higher expression in B6J mice. A higher Vegfr2 level could confer a survival effect on B6J glomerular endothelial expression or even a proliferation advantage and repairs. How to explain genetic background—Vegfr2 differential expression remains unknown at present, and further studies are needed to answer this question. Whether a similar genetic background role is involved in human glomerulonephritis is likely and will need large genetic screening with modern genomic tools to be analyzed.

In conclusion, our work refined the role played by the genetic background during the anti-GBM-GN model and demonstrated that the genetic background determined, in particular, the level of glomerular Vegfr2 expression. The blocking of Vegfr2 worsens the disease severity and TMA lesions in anti-GBM-GN-prone, but not in anti-GBM-GN-resistant, mice. We also demonstrated that glomerular Vegfr2-dependent TMA lesions are an undervalued severity hallmark of anti-GBM-GN.

Acknowledgments

We thank Chantal Millot, Carole Martori, Corinne Da Rold, and Ismaël Drouet de la Thibauderie (Service des Explorations Fonctionnelles Rénales, Hôpital Tenon, Pr Baud) for their technical assistance; Caroline Martin and Claude Kitou for providing animal housing; Isabel le Disquet [Institut de biologie intégrative (IFR-BI - IFR 83, Paris, France)] for help with scanning electron microscopy analysis; and Fanny Menard for hematological analysis. ImClone Systems (a wholly owned subsidiary of Eli Lilly and Company, NYC) provided the DC101 antibody.

Supplemental Data

Supplemental material for this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.05.020>.

References

1. Xie C, Sharma R, Wang H, Zhou XJ, Mohan C: Strain distribution pattern of susceptibility to immune-mediated nephritis. *J Immunol* 2004, 172:5047–5055
2. Xie C, Qin X, Jonnalala G, Gong Y, Yan M, Zong P, Zhou XJ, Mohan C: Enhanced susceptibility to immune nephritis in DBA/1 mice is contingent upon IL-1 expression. *Clin Immunol* 2007, 124:49–56
3. Xie C, Rahman ZS, Xie S, Zhu J, Du Y, Qin X, Zhou H, Zhou XJ, Mohan C: Strain distribution pattern of immune nephritis: a follow-up study. *Int Immunol* 2008, 20:719–728
4. Montagutelli X: Effect of the genetic background on the phenotype of mouse mutations. *J Am Soc Nephrol* 2000, 11(Suppl 16):S101–S105
5. Masugi M: Über die spezifischen zytotoxischen Veränderungen der Niere und der Leber durch das spezifische Antiserum (Nephrotoxin and Hepatotoxin): Zugleich ein Beitrag zur Pathogenese der Glomerulonephritis. (Specific cytotoxic alterations of kidney and liver induced by specific anti-serum (nephrotoxin and hepatotoxin): a report about the pathogenesis of glomerulonephritis.) *German. Jap Path Soc* 1932, 21:329–341

6. Salant DJ, Cybulsky AV: Experimental glomerulonephritis. *Methods Enzymol* 1988, 162:421–461
7. El Nahas AM: Masugi nephritis: a model for all seasons. Edited by Gretz N. *Experimental and Genetic Rat Models of Chronic Renal Failure*. Basel, Karger, 1993, pp 49–67
8. Tipping PG, Holdsworth SR: Cytokines in glomerulonephritis. *Semin Nephrol* 2007, 27:275–285
9. Tipping PG, Holdsworth SR: T cells in crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006, 17:1253–1263
10. Timoshanko JR, Tipping PG: Resident kidney cells and their involvement in glomerulonephritis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005, 4:353–362
11. Tipping PG, Timoshanko J: Contributions of intrinsic renal cells to crescentic glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol* 2005, 101:e173–e178
12. Linder CC: Genetic variables that influence phenotype. *ILAR J* 2006, 47:132–140
13. Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE, Sharp JJ: Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet* 1997, 16:19–27
14. Taft RA, Davisson M, Wiles MV: Know thy mouse. *Trends Genet* 2006, 22:649–653
15. Linder CC: The influence of genetic background on spontaneous and genetically engineered mouse models of complex diseases. *Lab Anim (NY)* 2001, 30:34–39
16. Mesnard L, Keller AC, Michel ML, Vandermeersch S, Rafat C, Letavernier E, Tillet Y, Rondeau E, Leite-de-Moraes MC: Invariant natural killer T cells and TGF-beta attenuate anti-GBM glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2009, 20:1282–1292
17. Hertig A, Berrou J, Allory Y, Breton L, Commo F, Costa De Beauregard MA, Carmeliet P, Rondeau E: Type 1 plasminogen activator inhibitor deficiency aggravates the course of experimental glomerulonephritis through overactivation of transforming growth factor beta. *FASEB J* 2003, 17:1904–1906
18. Zhu WH, Iurlaro M, MacIntyre A, Fogel E, Nicosia RF: The mouse aorta model: influence of genetic background and aging on bFGF- and VEGF-induced angiogenic sprouting. *Angiogenesis* 2003, 6:193–199
19. Morley AR, Wheeler J: Cell proliferation within Bowman's capsule in mice. *J Pathol* 1985, 145:315–327
20. Mesnard L, Rafat C, Vandermeersch S, Hertig A, Cathelin D, Xu-Dubois YC, Jouanneau C, Keller AC, Ribeil JA, Leite-de-Moraes MC, Rondeau E: Vitronectin dictates intraglomerular fibrinolysis in immune-mediated glomerulonephritis. *FASEB J* 2011, 25:3543–3553
21. Schiwiek D, Endlich N, Holzman L, Holthöfer H, Kriz W, Endlich K: Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. *Kidney Int* 2004, 66:91–101
22. Bollee G, Flamant M, Schordan S, Fligny C, Rumpel E, Milon M, Schordan E, Sabaa N, Vandermeersch S, Galaup A, Rodenas A, Casal I, Sunnarborg SW, Salant DJ, Kopp JB, Threadgill DW, Quaggin SE, Dussaule JC, Germain S, Mesnard L, Endlich K, Boucheix C, Belenfant X, Callard P, Endlich N, Tharaux PL: Epidermal growth factor receptor promotes glomerular injury and renal failure in rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Nat Med* 2011, 17:1521
23. Schaefer CF, Anthony K, Krupa S, Buchoff J, Day M, Hannay T, Buetow KH: PID: the Pathway Interaction Database. *Nucleic Acids Res* 2009, 37:D674–D679
24. Rennel ES, Hamdollah-Zadeh MA, Wheatley ER, Magnussen A, Schuler Y, Kelly SP, Finucane C, Ellison D, Cebe-Suarez S, Ballmer-Hofer K, Mather S, Stewart L, Bates DO, Harper SJ: Recombinant human VEGF165b protein is an effective anti-cancer agent in mice. *Eur J Cancer* 2008, 44:1883–1894
25. Ran S, Huang X, Downes A, Thorpe PE: Evaluation of novel anti-mouse VEGFR2 antibodies as potential antiangiogenic or vascular targeting agents for tumor therapy. *Neoplasia* 2003, 5:297–307
26. Yuen D, Pytowski B, Chen L: Combined blockade of VEGFR-2 and VEGFR-3 inhibits inflammatory lymphangiogenesis in early and middle stages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011, 52:2593–2597

27. Hertig A, Rondeau E: Role of the coagulation/fibrinolysis system in fibrin-associated glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 2004, 15: 844–853
28. Couser WG: Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 2012, 23:381–399
29. Ward NL, Moore E, Noon K, Spassil N, Keenan E, Ivanco TL, LaManna JC: Cerebral angiogenic factors, angiogenesis, and physiological response to chronic hypoxia differ among four commonly used mouse strains. *J Appl Physiol* 2007, 102:1927–1935
30. Downing GJ, Battey JF Jr: Technical assessment of the first 20 years of research using mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2004, 22: 1168–1180
31. Rogers MS, Rohan RM, Birsner AE, D'Amato RJ: Genetic loci that control vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *FASEB J* 2003, 17:2112–2114
32. Marques SM, Campos PP, Castro PR, Cardoso CC, Ferreira MA, Andrade SP: Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvasc Res* 2011, 82:246–252
33. Chan CK, Pham LN, Chinn C, Spee C, Ryan SJ, Akhurst RJ, Hinton DR: Mouse strain-dependent heterogeneity of resting limbal vasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, 45:441–447
34. Laszik ZG, Silva FG: Hemolytic uremic syndrome, thrombotic thrombocytopenic purpura, and other thrombotic microangiopathies. Edited by Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG. *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. ed 6. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp 676–684
35. Bollee G, Patey N, Cazajous G, Robert C, Goujon JM, Fakhouri F, Bruneval P, Noel LH, Knebelmann B: Thrombotic microangiopathy secondary to VEGF pathway inhibition by sunitinib. *Nephrol Dial Transplant* 2009, 24:682–685
36. Nochy D, Lefaucheur C, Hill G: VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* 2008, 359:206; author reply -7
37. Frangie C, Lefaucheur C, Medioni J, Jacquot C, Hill GS, Nochy D: Renal thrombotic microangiopathy caused by anti-VEGF-antibody treatment for metastatic renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol* 2007, 8: 177–178
38. Masuda Y, Shimizu A, Mori T, Ishiwata T, Kitamura H, Ohashi R, Ishizaki M, Asano G, Sugisaki Y, Yamanaka N: Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2001, 159:599–608
39. Hohenstein B, Colin M, Foellmer C, Amann KU, Brekken RA, Daniel C, Hugo CP: Autocrine VEGF-VEGF-R loop on podocytes during glomerulonephritis in humans. *Nephrol Dial Transplant* 2010, 25:3170–3180
40. Stave GM, Croker BP: Thrombotic microangiopathy in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Arch Pathol Lab Med* 1984, 108:747–751
41. Bazari H, Guimaraes AR, Kushner YB: Case records of the Massachusetts General Hospital: case 20-2012: a 77-year-old man with leg edema, hematuria, and acute renal failure. *N Engl J Med* 2012, 366: 2503–2515
42. Bariety J, Mandet C, Hill GS, Bruneval P: Parietal podocytes in normal human glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 2006, 17:2770–2780
43. Thorner PS, Ho M, Eremina V, Sado Y, Quaggin S: Podocytes contribute to the formation of glomerular crescents. *J Am Soc Nephrol* 2008, 19:495–502
44. Moeller MJ, Soofi A, Hartmann I, Le Hir M, Wiggins R, Kriz W, Holzman LB: Podocytes populate cellular crescents in a murine model of inflammatory glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2004, 15:61–67
45. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, Richardson C, Kopp JB, Kabir MG, Backx PH, Gerber HP, Ferrara N, Barisoni L, Alpers CE, Quaggin SE: VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* 2008, 358:1129–1136
46. Eremina V, Baelde HJ, Quaggin SE: Role of the VEGF—a signaling pathway in the glomerulus: evidence for crosstalk between components of the glomerular filtration barrier. *Nephron Physiol* 2007, 106: p32–p37
47. Ratelade J, Lavin TA, Muda AO, Morisset L, Mollet G, Boyer O, Chen DS, Henger A, Kretzler M, Hubner N, Thery C, Gubler MC, Montague X, Antignac C, Esquivel EL: Maternal environment interacts with modifier genes to influence progression of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2008, 19:1491–1499
48. Mollet G, Ratelade J, Boyer O, Muda AO, Morisset L, Lavin TA, Kitzis D, Dallman MJ, Bugeon L, Hubner N, Gubler MC, Antignac C, Esquivel EL: Podocin inactivation in mature kidneys causes focal segmental glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2009, 20:2181–2189
49. Sison K, Eremina V, Baelde H, Min W, Hirashima M, Fantus IG, Quaggin SE: Glomerular structure and function require paracrine, not autocrine, VEGF-VEGFR-2 signaling. *J Am Soc Nephrol* 2010, 21: 1691–1701

Résumé: Rôle de l'épithélium et de l'endothélium rénal au cours des glomérulopathies expérimentales

Les maladies glomérulaires sont une des principales causes d'insuffisance rénale terminale de nos jours et constituent un problème de santé publique. Le concept classique dans les glomérulopathies accorde à l'agression systémique immune, toxique ou hypertensive le rôle principal dans la formation des lésions glomérulaires. L'hypothèse développée dans ce manuscrit est que épithélium et endothélium, deux composants principaux du parenchyme rénal sont des acteurs majeurs dans la formation des lésions glomérulaires. Trois modèles expérimentaux de glomérulopathie (inflammatoire, toxique et hypertensive) chez la souris nous ont permis d'étudier une voie de signalisation épithéliale γ C/JAK/STAT classiquement décrite dans les cellules immunitaires et le système de réponse à l'hypoxie endothéliale afin d'étayer cette hypothèse. Après avoir discuté le rôle principal classiquement attribué aux lymphocytes T dans le modèle anti-membrane basale glomérulaire, un modèle animal de glomérulonéphrite inflammatoire, nous avons démontré le rôle protecteur de la chaîne γ commune (γ C) glomérulaire et de sa protéine d'aval STAT5 dans le podocyte au cours du modèle anti-MBG et de la néphropathie à l'adriamycine. Enfin, nous avons étudié le rôle protecteur de EPAS1 (HIF-2 α), une sous-unité régulatrice du complexe HIF, dans l'endothélium au cours des lésions glomérulaires hypertensives. Au total, ce travail met en évidence le rôle majeur de l'épithélium et l'endothélium rénal, étroitement liés, dans la formation des lésions glomérulaires. Le parenchyme rénal représente un acteur à part entière dans la physiopathologie de ces lésions comme le montrent les travaux sur les systèmes γ C/STAT5 et HIF.

Abstract: Role of renal epithelium and endothelium in experimental glomerular diseases

Glomerular diseases are a leading cause of kidney failure and represent a public health problem. Classically, systemic effectors such as the immune system, drug toxicity or hypertension are thought to be the main drivers of glomerular diseases. The hypothesis developed in this manuscript is that epithelium and endothelium, the two main components of the renal parenchyma, are major players in the formation of glomerular lesions. Three experimental models of glomerular disease (inflammatory, toxic and hypertensive) in mice allowed us to study epithelial γ C / JAK / STAT signaling classically described in immune cells and the endothelial hypoxia inducible system in order to support this hypothesis. After discussing the main role traditionally assigned to T cells in the anti- glomerular basement membrane model, an animal model of inflammatory glomerulonephritis, we demonstrated the protective role of the glomerular interleukin common γ chain (γ C) receptor and its dependent podocyte-specific STAT5 during the anti-GBM model and adriamycin nephropathy. We then showed the protective role of endothelial EPAS1 (HIF-2 α), a regulatory subunit of HIF complex in focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) induced by angiotensin II. In total, this work highlights the important role of the closely linked renal epithelium and endothelium in the formation of glomerular lesions using three experimental models of glomerular diseases. The renal parenchyma is a full player in the pathophysiology of these lesions as shown by the works studying γ C / JAK / STAT and HIF systems.