



HAL
open science

Le blocage du récepteur cannabinoïde de type 1 : une nouvelle piste thérapeutique dans la maladie rénale chronique

Myriam Dao

► **To cite this version:**

Myriam Dao. Le blocage du récepteur cannabinoïde de type 1 : une nouvelle piste thérapeutique dans la maladie rénale chronique. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS389 . tel-04348086

HAL Id: tel-04348086

<https://theses.hal.science/tel-04348086v1>

Submitted on 16 Dec 2023

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.



THESE DE DOCTORAT SORBONNE UNIVERSITE
ED 394 – Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Discipline : Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Année universitaire 2020-2021

Le blocage du récepteur cannabinoïde de type 1 : une nouvelle piste thérapeutique dans la maladie rénale chronique

Présentée par Myriam Dao
Le 15 décembre 2021

Composition du jury :

Président du Jury	Frédéric Jaisser, DR, Sorbonne Université
Directrice de Thèse	Hélène François, PU-PH, Sorbonne Université
Rapporteur	Bertrand Knebelmann, PU-PH, Université de Paris
Rapporteur	Tony Jourdan, CR, Université de Bourgogne-Franche Comté
Examineur	Frank Bienaimé, MCU-PH, Université de Paris

REMERCIEMENTS

Cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans l'aide, le soutien et de la confiance de très nombreuses personnes. A vous tous qui m'avez accompagnée durant toutes ces années, je dédie ce manuscrit.

Merci au Professeur Hélène François d'avoir dirigé cette thèse. Merci de m'avoir fait découvrir la néphrologie puis de m'avoir accompagnée avec patience, gentillesse et bienveillance durant toute ma formation, depuis l'externat à la thèse, en passant par le M2 et l'internat !

Merci à Christos Chatziantoniou de m'avoir accueillie dans votre laboratoire. Merci d'avoir partagé vos précieux conseils scientifiques mais également pour les quizz, les gâteaux et votre grande culture grecque et générale !

Merci à Frédéric Jaisser d'avoir accepté le rôle de Président du Jury. Vos conseils et vos encouragements ont été précieux durant les comités de suivi de thèse. Je suis très heureuse de vous compter parmi les membres de ce Jury.

Merci au Professeur Bertrand Knebelmann d'être rapporteur de cette thèse. Découvrir jour après jour à tes côtés le vaste monde du syndrome néphrotique, des maladies rénales héréditaires et des lithiases héréditaires est un vrai plaisir.

Merci à Tony Jourdan d'être rapporteur de cette thèse. C'est un challenge et un grand honneur de réunir les deux spécialistes français de CB1R pour la soutenance de ma thèse. J'espère que tu ne regretteras pas le déplacement depuis Dijon !

Merci à Frank Bienaimé d'être observateur de cette thèse. J'ai découvert grâce à toi les courbes de Bland-Altman et le concept de l'anion non-réabsorbable. Autant de principes très intéressants bien qu'impossibles à caser en société ...

Merci à tous les membres de l'unité 1155 qui ont permis au projet cannabinoïde d'avancer et sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour. Merci aux poules pour leur accueil et leur investissement dans le projet. Merci à Sophie pour tes précieux conseils de culture cellulaire, et d'avoir baptisé les bébés poissons avec les noms des ligands cannabinoïdes endogènes ! Merci à Sandrine pour tous ces moments passés à l'animalerie. Merci de m'avoir appris les subtilités de l'ischémie reperfusion, de la néphrectomie et du DFG mesuré. Merci à Tiffany pour ton engagement dans le projet. De la microdissection aux Ki67 et aux TUNEL, les qPCR *Cnr1*, sans oublier les innombrables fois où tu m'as dépannée pour les digestions / génotypages / culture cellulaire ! Merci à Perrine pour ton enthousiasme à quantifier les rouges Sirius, les rouges lointains et tant d'autres couleurs ! Merci à Pierre Galichon pour le Perceval. Merci à Christos Junior de m'avoir prêté tes outils et (surtout) de m'avoir régulièrement approvisionnée en tablettes de chocolat. Merci à Juliette, à Souhila, à Mélanie, à Emmanuelle et à tous les autres membres de l'unité pour vos encouragements et votre soutien durant ces 3 années de thèse.

Rien n'aurait été possible sans la formidable équipe des animaliers et c'est sans doute à l'animalerie que j'ai passé le plus de temps pendant la thèse, avec un plaisir toujours renouvelé. Merci à Claude de ton humour et de ton aide pour les gavages le WE. Merci à Gaëtan et Jessy pour les points lignées, les excellents conseils, les gavages en semaine et le WE, les soins post-opératoires. Merci à Liliane de ton aide ultra efficace pour les chirurgies, pour toutes les techniques que tu m'as apprises et pour ta grande bienveillance.

Merci à tous les thésards et post-docs, Aïssata, Amélie, Elise, Ellie, Jérémy, Lilia, Morgane, pour votre aide, vos conseils et vos encouragements. Merci pour toutes les bonnes soirées passées et à venir, au Pinocchio ou Au fond du jardin ! Merci pour les incroyables fous rires !

Merci à tous les étudiants avec qui j'ai travaillé sur le projet et qui ont largement contribué aux résultats : Mélanie, Nesrine, Jade, Lucile, Hélène, Hassan et Lou-Hannah. Un grand merci à Marianne pour toutes les manips que tu as faites et pour ton enthousiasme !

De l'internat au clinicat, plusieurs équipes ont contribué à ma formation en néphrologie et ont fait grandir mon intérêt pour cette spécialité. Merci à Agathe et Valérie du CHSF d'avoir accompagné mes premiers pas d'interne en néphrologie. Un très grand merci à Mme Guettier, Sophie et à toute l'équipe médicale et technique du laboratoire d'ACP de Bicêtre de m'avoir accueilli comme interne puis comme assistante. Je garde de ces deux expériences dans le service un excellent souvenir ! Merci d'avoir éveillé mon goût pour la recherche clinique et translationnelle et de m'avoir donné envie de continuer dans cette voie. Merci beaucoup à Katia & Laurence de m'avoir apporté tant d'aide dans le projet de thèse !

Depuis quelques années, c'est à Necker que je poursuis ma formation clinique avec une passion qui reste intacte. Après un stage d'interne génial en Transplantation aux côtés de Lucile, Claire, Rebecca, Anne, Frank, Julien, Dany et Christophe, j'ai eu l'immense chance de m'installer au 3^{ème} étage. Merci infiniment à Christophe de m'avoir fait confiance et de m'avoir proposé le poste de CCA au 3^{ème}. Un très grand merci à Aurélie, Aude, Bertrand et Dominique pour votre accueil. Déjà 4 ans que je travaille avec vous : je suis encore toute étonnée d'avoir cette chance et c'est chaque jour un plaisir de venir à Necker. Merci également à Elsa, Idris, Hamza, Bruno et Malik de faire vivre le service au quotidien. Merci à Isabelle et Valérie de prendre aussi bien soin de moi ! Et merci à toutes les équipes paramédicales pour leur remarquable investissement dans la prise en charge des patients.

Merci à tous ceux dont l'amitié m'est précieuse et qui m'accompagnent jour après jour dans ma vie personnelle, et souvent aussi professionnelle. Merci à Charlotte pour ton indéfectible amitié, merci à Katia, Louise, Elodie et Aude ! J'espère pouvoir bientôt passer plus de temps avec vous.

Merci à toute ma famille, de la Bretagne au Burkina Faso. Merci à Noura, aux tontons Damien, Florent & Werner et à tous les cousins de part et d'autre de la Méditerranée ! Papa et Liliane, vous êtes partis trop tôt mais votre souvenir m'accompagne. Merci à Fabien pour tes magnifiques films qui me permettent de m'évader loin de la médecine.

Merci à Maman d'avoir soutenu et encouragé mes choix durant toutes ces années. Merci de m'avoir accompagnée dans les moments de doutes et d'incertitude, et d'avoir toujours cru que j'y arriverai. Merci d'avoir relu avec une grande attention ce manuscrit, pourtant bien éloigné de tes centres d'intérêt !

Table des matières

ABREVIATIONS	7
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES DE L'INTRODUCTION	9
INTRODUCTION ET REVUE DE LA LITTERATURE.....	10
1 – Contexte scientifique et positionnement du travail de thèse	10
2 – Le rôle du système endocannabinoïde en physiologie rénale	17
2.1 – Distribution du système endocannabinoïde dans le rein	17
2.1.1 – Expression rénale des récepteurs cannabinoïdes.....	17
2.1.2 – Les ligands endocannabinoïdes dans le rein	19
2.1.3 – Relations entre les récepteurs cannabinoïdes et leurs ligands.....	23
2.2 – Système endocannabinoïde et vascularisation rénale.....	26
2.3 – Système endocannabinoïde et cellules tubulaires rénales	29
2.3.1 – Hypothèse 1 : l'ECS favorise la natriurèse	30
2.3.2 – Hypothèse 2 : l'ECS favorise la rétention hydrosodée	31
2.3.3 – Synthèse sur la régulation de la natriurèse par l'ECS	33
2.4 – Rôle du système endocannabinoïde dans la régulation de la pression artérielle.....	35
2.4.1 – Régulation centrale de la pression artérielle par l'ECS.....	35
2.4.2 – Régulation périphérique de la tension artérielle par l'ECS	36
2.4.3 – Interactions entre le système rénine angiotensine et l'ECS	37
3 – Le rôle des récepteurs cannabinoïdes dans la maladie rénale chronique et la fibrose rénale	40
3.1 – Le récepteur cannabinoïde de type 1 est le principal acteur du système endocannabinoïde impliqué dans la fibrose rénale	40
3.2 – CB1R aggrave la fibrose rénale dans les maladies métaboliques	42
3.3 – L'activation de CB1R favorise la fibrose rénale dans les néphropathies non métaboliques.....	48
4 – Les antagonistes des inhibiteurs pharmacologiques du récepteur cannabinoïde de type 1	49
4.1 – Les antagonistes de CB1R de première génération : le rimonabant.....	49

4.2 – Les antagonistes de CB1R de deuxième génération : les antagonistes périphériques	50
4.3 – Les antagonistes de CB1R de troisième génération : les antagonistes périphériques hybrides de CB1R	52
4.4 – Les anticorps bloquants de CB1R	53
5 – Maladie rénale chronique et transition insuffisance rénale aiguë – maladie rénale chronique	54
5.1 – Les principaux acteurs de la fibrogenèse rénale.....	54
5.1.1 – Le myofibroblaste, cellule effectrice de la fibrogenèse rénale.....	54
5.1.2 – Le TGF- β , principal régulateur de la fibrogenèse rénale	55
5.2 – Mécanismes de la transition insuffisance rénale aiguë – maladie rénale chronique ...	58
5.3 – Modèles expérimentaux murins de maladie rénale chronique	61
OBJECTIFS	64
RESULTATS EXPERIMENTAUX	66
1 – Mise au point d’une technique morphométrique d’analyse d’image pour évaluer la fibrose rénale	66
1.1 - Introduction.....	66
1.2 – Article.....	67
1.3 – Discussion	77
2 – Le récepteur cannabinoïde de type 1 est impliqué dans la fibrose rénale au cours de la dysfonction chronique de l’allogreffe	80
2.1 – Introduction	80
2.2 – Article.....	81
2.3 – Discussion	92
3 – Le blocage du récepteur cannabinoïde de type 1 réduit la dysfonction rénale à la phase tardive de l’ischémie reperfusion	94
3.1 – Objectif.....	94
3.2 – Matériel et méthodes	95
3.2.1 – Animaux	95
3.2.2 – Traitements expérimentaux	95

3.2.3 – Modèles expérimentaux d’ischémie reperfusion.....	96
3.2.4 – Evaluation de la fonction rénale.....	96
3.2.5 – Histologie et immunohistochimie	97
3.4.6 – Extraction de l’ARN et RT-qPCR.....	98
3.4.7 – Lignées cellulaires.....	99
3.4.8 - Statistiques	100
3.3 – Résultats	101
3.3.1 – La délétion génétique globale de CB1R ne modifie pas la fonction rénale de base des souris.....	101
3.3.2 – CB1R ne joue pas de rôle dans l’insuffisance rénale aiguë à la phase aiguë de l’ischémie-reperfusion (I/R-AKI)	101
3.3.3 – L’inhibition génétique de CB1R prévient la fibrose rénale dans le modèle d’I/R-CKD	104
3.3.4 – L’inhibition pharmacologique de CB1 par le JD5037 préserve la fonction rénale dans le modèle d’I/R-CKD.....	108
3.3.5 – L’inhibition pharmacologique de CB1 par le composé X préserve la fonction rénale dans le modèle d’I/R-CKD.....	112
3.3.6 – Caractérisation de la lignée CNRO Pax8-LC1.cre : délétion tubulaire induction de <i>Cnr1</i>	115
3.3.7 – L’inhibition tubulaire de CB1R aggrave la fonction rénale dans le modèle d’I/R-CKD	116
3.3.8 – Le blocage pharmacologique de CB1R réduit la synthèse de collagène par les myofibroblastes <i>in vitro</i>	121
3.4 – Discussion	122
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	131
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	133
ANNEXE 1 - Dao M, François H. Cannabinoid Receptor 1 Inhibition in Chronic Kidney Disease: A New Therapeutic Toolbox. <i>Front Endocrinol (Lausanne)</i> . 2021;12:720734.....	165

ABBREVIATIONS

2-AG, 2-arachidonoylglycérol
 α -SMA, actine musculaire lisse alpha
 Δ 9-THC, Δ 9-tétrahydrocannabinol
ABHD, lipase α - β hydrolase
ACC, acétyl-CoA carboxylase
AEA, anandamide
AKI, *Acute Kidney Injury*
AMM, autorisation de mise sur le marché
AMPK, *AMP-activated kinase*
ARA2, antagonistes des récepteurs de l'angiotensine 2
Arg1, arginase de type 1
AT1R, récepteur de type 1 de l'angiotensine 2
CB1R, récepteur cannabinoïde de type 1
CB2R, récepteur cannabinoïde de type 2
ci, score semi-quantitatif de fibrose interstitielle selon le score de Banff
CKD, *chronic kidney disease*
COX1, cyclo-oxygénase de type 1
COX2, cyclo-oxygénase de type 2
DAGL, lipase *sn*-1-spécifique du diacylglycérol
DCA, dysfonction chronique de l'allogreffe
DDAC, Donneur Décédé après Arrêt Circulatoire
DFG, débit de filtration glomérulaire
DMSO, diméthylsulfoxyde
ECS, système endocannabinoïde
EdU, 5-éthynyl-2'-déoxyuridine
FAAH, hydrolase d'amide d'acide gras
FDA, *Food and Drug Administration*
FI, Fibrose interstitielle
FI/AT, Fibrose interstitielle/Atrophie tubulaire
FITC, isothiocyanate de fluorescéine
GLP-1R, agonistes du récepteur du glucagon-like peptide 1
GLUT2, transporteur de glucose 2
GPCR, récepteur couplé aux protéines G
GPR55, récepteur couplé aux protéines G 55 (*orphan G-protein coupled receptor 55*)
HK2, lignée de cellules tubulaires proximales humaines
HP, hémopressine
HTA, hypertension artérielle
I/R, ischémie reperfusion
IL23, interleukine 23
iNOS, NO synthase inducible
IEC, inhibiteur de l'enzyme de conversion
IHC, immunohistochimie
IRA, insuffisance rénale aiguë
IRT, insuffisance rénale terminale
K_i, constante d'inhibition
L-NAME, L-N^G-Nitroarginine méthyl ester
LAP, peptide de latence du TGF- β
LKB1, kinase tumor suppressor liver B1

LLC-PK1, cellules épithéliales tubulaires proximales de cochon
LTBP, *latent TGF- β binding protein*
MAGL, monoacylglycérol lipase
MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*
MEC, matrice extracellulaire
mIF, fibrose interstitielle morphométrique
miRNA, micro ARN
MMP, métalloprotéinase matricielle
MRC, maladie rénale chronique
NAPE, N-arachidonoyl phosphatidyl éthanolamine
NAPE-PLD, phospholipase D spécifique de la NAPE
NO, monoxyde d'azote
PAI-1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1
pCB1Rko, délétion podocytaire spécifique de CB1R
PDGFR- β , récepteur β du facteur de croissance plaquettaire (*platelet-derived growth factor receptor*)
PIP2, 2-arachidonoyl-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphonate
PKA, protéine kinase A
PKC, protéine kinase C
PTEC, cellules tubulaires rénales épithéliales proximales
RPTC-CB1R^{-/-}, délétion spécifique de CB1R dans les PTEC
RT-PCR, réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse
RTqPCR, RT-PCR quantitative
SEM, écart à la moyenne
SGLT2, cotransporteur sodium-glucose de type 2
Smad, *small mothers against decapentaplegic*
SHR, rats spontanément hypertendus
SRA, système rénine angiotensine
STZ, streptozotocine
TAL, branche ascendante fine de l'anse de Henlé
TGF- β , *transforming growth factor β*
TGFR1, récepteur de type 1 du TGF- β
TIMP, inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases matricielles
TRPV1, canal ionique à potentiel de récepteur transitoire vanilloïde de type 1
UUO, obstruction urétérale unilatérale
WB, western blot
WIN, WIN55,212-2
WT, *wild-type* = souris sauvages
ZDF, rats Zucker diabétiques et obèses
ZO-1, *zonula occludens 1*

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES DE L'INTRODUCTION

Tableaux :

Tableau 1 – Expression de CB1R dans le parenchyme rénal normal

Tableau 2 – Affinité des ligands pour les récepteurs cannabinoïdes de type 1 et 2

Tableau 3 – Données expérimentales sur la régulation de la balance sodée par le système endocannabinoïde rénal

Figures :

Figure 1 – Vue d'ensemble du système endocannabinoïde

Figure 2 – Distribution des récepteurs cannabinoïdes et des principaux ligands dans le parenchyme rénal normal

Figure 3 – Biosynthèse et dégradation des principaux endocannabinoïdes

Figure 4 – Le rôle physiologique du récepteur cannabinoïde de type 1 dans le rein

Figure 5 – CB1R active la voie de signalisation G α i-AMPC-PKA au cours de la néphropathie associée à l'obésité

Figure 6 - CB1R module l'expression de GLUT2 au cours de la néphropathie diabétique

Figure 7 – Le blocage de CB1R pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans la MRC, dans les néphropathies métaboliques et non métaboliques

Figure 8 – Voie de signalisation canonique du TGF- β

Figure 9 - Lésions tubulaires aiguës dans l'insuffisance rénale aiguë, transition insuffisance rénale aiguë – maladie rénale chronique et progression de la maladie rénale chronique

INTRODUCTION ET REVUE DE LA LITTÉRATURE

1 – Contexte scientifique et positionnement du travail de thèse

La maladie rénale chronique (MRC) est un enjeu mondial de santé publique. Elle affecte des millions d'individus dans le monde. Quelle qu'en soit sa cause (métabolique, immunologique, toxique ...), la MRC correspond au remplacement du tissu rénal fonctionnel par des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) qui altèrent de façon progressive et inéluctable le fonctionnement rénal (KDIGO, 2013). Ce processus est appelé la fibrogenèse rénale. Environ 1% des patients ayant une MRC atteignent le stade terminal de la MRC, appelé insuffisance rénale terminale (IRT). L'IRT réduit de façon significative la qualité de vie et l'espérance de vie des patients. La prise en charge de l'IRT constitue le premier poste de dépenses de santé des maladies chroniques. A ce jour, seul le blocage du système rénine angiotensine (SRA) permet de ralentir la progression de la MRC (Brenner et al., 2001; François et al., 2011; Lewis et al., 2001). Les classes thérapeutiques utilisées sont les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et les antagonistes du récepteur de l'angiotensine 2 (ARA2). La néphropathie diabétique reste à ce jour la principale cause de MRC et d'IRT dans le monde (Koye et al., 2017). De nouvelles classes thérapeutiques ont émergé récemment, permettant d'améliorer sa prise en charge. Il s'agit des inhibiteurs du cotransporteur sodium-glucose de type 2 (SGLT2) (Heerspink et al., 2018, 2020; Neal et al., 2017; Perkovic et al., 2019; Toyama et al., 2019) et des agonistes du récepteur du glucagon-like peptide 1 (GLP-1R) (Greco et al., 2019; Kristensen et al., 2019). Les inhibiteurs du SGLT2 ralentissent significativement la progression de la MRC vers l'IRT et réduisent la mortalité de cause rénale et cardiovasculaire. Leur utilisation chez les patients adultes diabétiques de type 2 est autorisée par la *Food and Drug Administration* (FDA) aux Etats-Unis depuis 2018. De façon tout à fait intéressante, les inhibiteurs du SGLT2 pourraient également ralentir la progression de la MRC au cours de néphropathies non

diabétiques (Heerspink et al., 2018, 2020; Neal et al., 2017; Perkovic et al., 2019; Toyama et al., 2019). Ils ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France en 2021 chez les patients diabétiques de type 2 ayant une néphropathie diabétique ou une maladie cardiovasculaire. Le 5 août 2021, l'AMM a été étendue à l'ensemble des patients ayant une maladie rénale chronique avec un débit de filtration glomérulaire (DFG) > 25 mL/min/1,73 m² et une protéinurie > 200 mg/g. L'arsenal thérapeutique permettant de ralentir la progression de la MRC reste donc malgré tout limité à ce jour, rendant plus que jamais nécessaire la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Un nombre croissant de travaux scientifiques suggèrent que la modulation du système endocannabinoïde (ECS) pourrait constituer une piste thérapeutique (Barutta et al., 2010; Francois & Lecru, 2018; Hinden et al., 2018; Jourdan et al., 2014, 2018; Lecru et al., 2015; Nam et al., 2012; Udi et al., 2017).

L'ECS est un système complexe de récepteurs, de ligands endogènes et exogènes et d'enzymes impliquées dans la biosynthèse et la dégradation des ligands (**Figure 1**). Ses deux récepteurs principaux sont le récepteur cannabinoïde de type 1 (CB1R) et le récepteur cannabinoïde de type 2 (CB2R). CB1R et CB2R sont tous les deux des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, respectivement codés par les gènes *CNR1* (6q14-15) et *CNR2* (1p36). Ils appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et présentent une interaction sélective pour Gi/o (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993). CB1R a été le premier récepteur endocannabinoïde découvert, initialement dans le cerveau (Matsuda et al., 1990). Ses rôles les mieux connus concernent la régulation des conduites addictives, des comportements émotionnels, de l'analgésie et de la mémoire (Howlett et al., 2010; Ledent et al., 1999). La distribution de CB1R est quasi-ubiquitaire dans les tissus périphériques (Francois & Lecru, 2018; O'Keefe et al., 2014). En plus de ses effets psychoactifs, CB1R est impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques, incluant l'appétit et le métabolisme (Francois & Lecru, 2018; O'Keefe et al., 2014). La découverte de CB2R est plus récente. CB2R

est principalement exprimé par les cellules du système immunitaire, notamment les macrophages et la rate, et participe à la régulation de ce système (Munro et al., 1993). Le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), principe actif du cannabis, est le plus célèbre des ligands exogènes de l'ECS. Plus de soixante ligands endogènes, appelés endocannabinoïdes, ont été identifiés. Les ligands endogènes les plus connus de l'ECS sont le N-arachidonylethanolamine (anandamide, AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG). La plupart des endocannabinoïdes sont des écosanoïdes. Ils sont synthétisés localement à la demande à partir des phospholipides membranaires comportant de l'acide arachidonique (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995) et situés au carrefour de plusieurs voies métaboliques. Les principales enzymes impliquées dans la biosynthèse et la dégradation de l'AEA sont la phospholipase D spécifique de la N-arachidonoyl phosphatidyl éthanolamine (NAPE-PLD) (Okamoto et al., 2004) et l'hydrolase d'amide d'acide gras (FAAH) (Cravatt et al., 1996; Giang & Cravatt, 1997). Les principales enzymes impliquées dans la biosynthèse et la dégradation du 2-AG sont la lipase *sn*-1-spécifique du diacylglycérol (DAGL) et la monoacylglycérol lipase (MAGL) (Tsuboi et al., 2011).

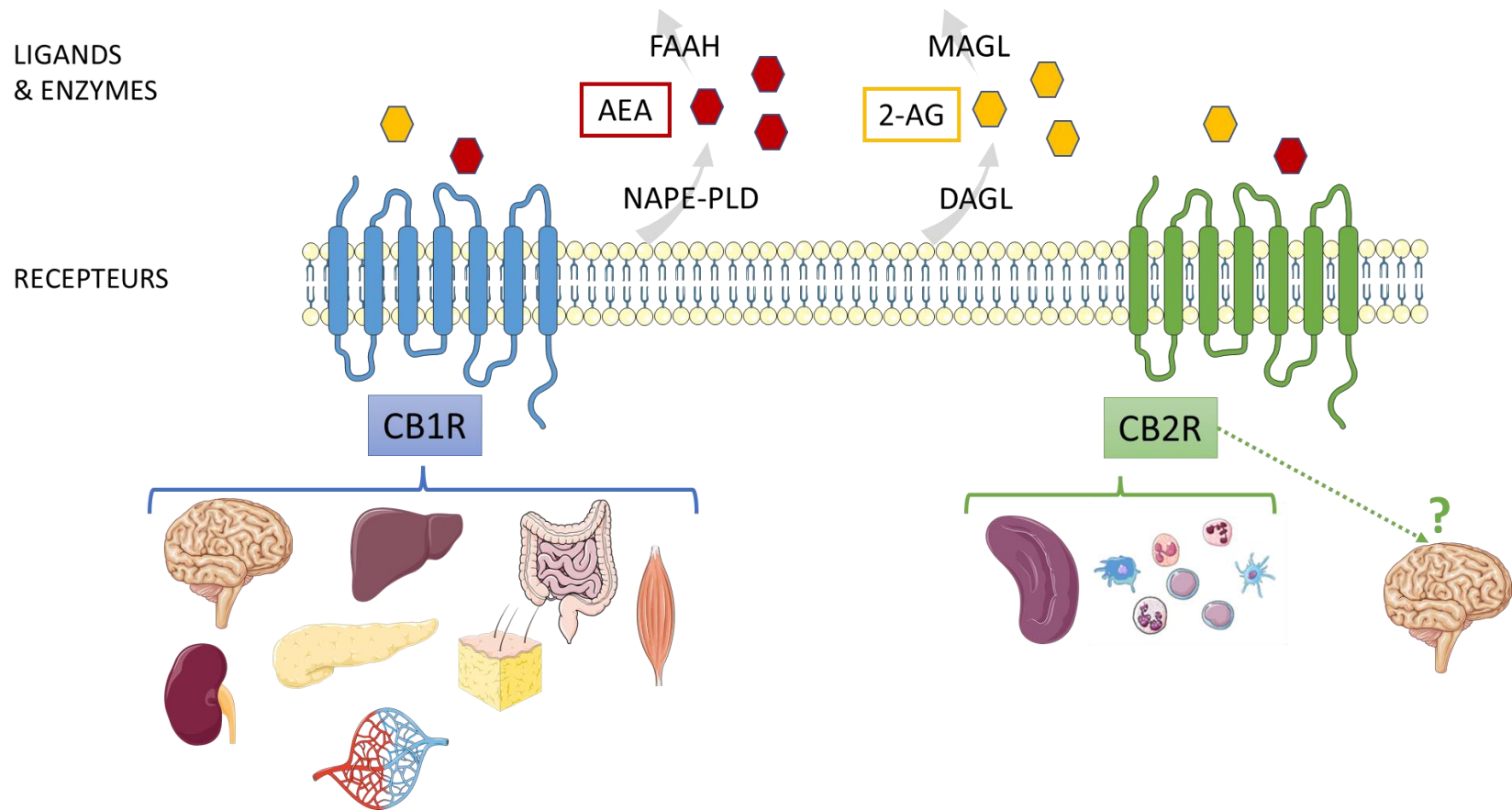


Figure 1 – Vue d’ensemble du système endocannabinoïde. Le système endocannabinoïde associe des récepteurs (CB1R et CB2R), des ligands endogènes (les 2 plus connus sont l’AEA et le 2-AG) et exogènes et des enzymes impliquées dans la biosynthèse et la dégradation des ligands (NAPE-PDL, FAAH, DAGL, MAGL). CB1R a été découvert initialement dans le cerveau. Sa distribution est quasi-ubiquitaire dans les tissus périphériques. CB2R est principalement exprimé par les cellules du système immunitaire, notamment les macrophages et la rate. Abréviations : 2-AG, 2-arachidonoylglycérol ; AEA, anandamide ; CB1R, récepteur cannabinoïde de type 1 ; CB2R, récepteur cannabinoïde de type 2 ; DAGL, lipase *sn*-1-spécifique du diacylglycérol ; FAAH, hydrolase d’amide d’acide gras ; MAGL, monoacylglycérol lipase ; NAPE-PDL, phospholipase D spécifique de la N-arachidonoyl phosphatidyl éthanolamine.

Alors que l'expression de CB1R est faible dans le parenchyme rénal normal (Koura et al., 2004; Larrinaga et al., 2010; Lecru et al., 2015), plusieurs travaux récents ont montré une augmentation de son expression lors de pathologies rénales. CB1R est fortement exprimé au cours de néphropathies d'origine métabolique mais également d'origine non métabolique telles que la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA ou la néphrite interstitielle aiguë (Lecru et al., 2015). CB1R est impliqué dans la MRC au cours du diabète et de l'obésité (Barutta et al., 2010; Hinden et al., 2018; Jourdan et al., 2014; Udi et al., 2017), à la fois par un rôle sur la régulation métabolique, mais également par une action directe sur les podocytes et les cellules tubulaires rénales. L'activation de CB1R augmente le stress oxydatif, l'inflammation et la fibrogenèse dans le parenchyme rénal. L'activation de CB2R exerce des effets opposés à celle de CB1R. Cependant, les agonistes de CB2R se sont révélés décevants, leur utilisation n'ayant pas d'effet additif avec celle des inhibiteurs de CB1R (Francois & Lecru, 2018; Lecru et al., 2015). Jusqu'à récemment, les agonistes pharmacologiques de CB2R manquaient aussi bien de spécificité que de sélectivité, ce qui a probablement freiné leur développement (Soethoudt et al., 2017). L'arrivée de nouveaux composés pourraient relancer dans les prochaines années l'intérêt pour CB2R (Sarott et al., 2020). Nous nous sommes focalisés dans le présent manuscrit sur le potentiel thérapeutique du blocage de CB1R dans la MRC. Des études cliniques ont déjà été conduites chez l'homme pour explorer les effets thérapeutiques du blocage de CB1R au cours de l'obésité et du syndrome métabolique. Le rimonabant, un agoniste inverse de CB1R appartenant à la première génération des antagonistes de CB1R, a brièvement été utilisé en pratique clinique (Després et al., 2005; Nissen et al., 2008; Pi-Sunyer et al., 2006; Rosenstock et al., 2008; Topol et al., 2010; Triay et al., 2012; Van Gaal et al., 2005). Il a été retiré du marché peu de temps après, en 2007, en raison d'effets secondaires neuro-psychiatriques graves, notamment des épisodes dépressifs caractérisés pouvant conduire au suicide. Depuis, des composés de deuxième génération traversant peu ou pas la barrière hémato-encéphalique ont

été développés (Le Foll et al., 2009). L'AM6545 et le JD5037 en sont les principaux exemples (Barutta et al., 2017, 2018; Cinar et al., 2020; Jourdan et al., 2013, 2014; Lecru et al., 2015; Tam et al., 2010, 2012; Udi et al., 2017). De plus en plus de composés sont en cours de développement avec pour double objectif non seulement de prévenir la traversée de la barrière hémato-encéphalique, mais également d'améliorer l'efficacité du blocage de CB1R. Les stratégies utilisées actuellement incluent le développement de « dual-target CB1R antagonists », bloquant CB1R et ciblant une seconde voie impliquée dans la progression de la pathologie visée (Cinar et al., 2020; Roger et al., 2020) ; le développement d'antagonistes périphériques de CB1R avec une activité biaisée vers la voie des β -arrestines 2 (Z. Liu et al., 2021) ; le développement d'anticorps bloquants anti-CB1R (études cliniques en cours : NCT03261739, NCT03900325).

L'objectif de ce travail est d'étudier le potentiel thérapeutique du blocage de CB1R dans la MRC. Lecru et al. (2015) ont déjà démontré que le blocage de CB1R, aussi bien génétique que pharmacologique par le rimonabant, réduit la fibrose rénale dans un modèle expérimental murin de néphropathie non métabolique. La preuve d'une amélioration de la fonction rénale reste cependant à apporter. De plus, les composés pharmacologiques de deuxième et de troisième génération n'ont encore jamais été évalués dans la MRC d'origine non métabolique. Au plan mécanistique, le rôle des myofibroblastes dans la fibrose rénale médiée par CB1R a déjà été documenté (Lecru et al., 2015) mais la contribution des cellules tubulaires reste à élucider.

Avant de présenter nos résultats expérimentaux, nous décrirons les connaissances actuelles sur le rôle des récepteurs cannabinoïdes, notamment CB1R, en physiologie et en pathologie rénale. Nous préciserons ensuite les caractéristiques des nouveaux inhibiteurs périphériques de CB1R en cours de développement. Enfin, nous documenterons les raisons pour lesquelles nous avons choisi le modèle expérimental murin de l'ischémie reperfusion avec néphrectomie controlatérale retardée.

Travailler sur la MRC nécessite l'utilisation d'outils robustes et reproductibles permettant de quantifier précisément la fibrose interstitielle. Dans la première partie des résultats expérimentaux, nous présenterons une solution d'analyse morphométrique d'image permettant de quantifier la fibrose interstitielle en lumière blanche après coloration par le rouge Sirius (Dao et al., 2020). Nous explorerons ensuite le rôle de CB1R dans la dysfonction chronique de l'allogreffe rénale, au moyen d'une double approche translationnelle et *in vitro* dans des cultures de cellules épithéliales tubulaires (Dao et al., 2019). Pour finir et afin de prouver le potentiel thérapeutique de l'inhibition de CB1R dans la MRC au moyen des inhibiteurs périphériques de deuxième et de troisième génération, nous étudieront l'efficacité de ces molécules à la phase tardive d'un modèle expérimental murin d'ischémie reperfusion. La mise au point d'une lignée murine génétiquement modifiée pour permettre une délétion tubulaire inductible de CB1R permettra également d'identifier les contributions des différents types cellulaires, notamment myofibroblastes et cellules tubulaires, dans la fibrogenèse médiée par CB1R.

2 – Le rôle du système endocannabinoïde en physiologie rénale

Le rôle exact de l'ECS en physiologie rénale reste à ce jour largement méconnu. Les données sont rares et parfois contradictoires (Francois & Lecru, 2018). Le rôle de CB1R en physiologie et en pathologie rénale a fait l'objet d'une revue invitée publiée récemment qui se trouve en Annexe 1 (Dao & François, 2021). Nous décrirons tout d'abord les composants rénaux de l'ECS. Nous détaillerons les sites d'expression des récepteurs endocannabinoïdes CB1R et CB2R, les voies métaboliques impliquées dans la biosynthèse et la dégradation des endocannabinoïdes, ainsi que les relations entre récepteurs cannabinoïdes et leurs ligands. Nous nous intéresserons ensuite plus précisément au rôle de l'ECS en physiologie rénale, en particulier aux aspects susceptibles de participer à la prise en charge thérapeutique de la MRC.

2.1 – Distribution du système endocannabinoïde dans le rein

2.1.1 – Expression rénale des récepteurs cannabinoïdes

La mise en évidence de composés protéiques repose souvent sur des techniques d'identification par immunohistochimie (IHC) ou western blot (WB). L'interprétation des résultats est cependant difficile dans le cas des GPCR, famille à laquelle appartiennent les récepteurs cannabinoïdes CB1R et CB2R. En effet, les différentes GPCR possèdent d'importantes homologies de séquence. Des contrôles positifs et négatifs robustes sont donc indispensables afin de s'assurer de la spécificité du marquage (Torlakovic et al., 2014, 2015). De ce fait, nous avons porté une attention toute particulière aux contrôles utilisés dans les différentes études citées (**Tableau 1**). Plusieurs équipes dont la nôtre ont couplé l'approche protéique à une approche transcriptionnelle par réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse (RT-PCR) de *CNR1* et *CNR2*. L'approche transcriptionnelle est particulièrement utile quand elle cible un type cellulaire en particulier.

CB1R est faiblement exprimé chez l'homme et chez les rongeurs dans le parenchyme rénal normal (Barutta et al., 2010; Deutsch et al., 1997; Janiak et al., 2007; Jenkin et al., 2010; Koura et al., 2004; Larrinaga et al., 2010; Lecru et al., 2015; Mukhopadhyay et al., 2010; Nam et al., 2012; Shire et al., 1995; Silva et al., 2013). A l'état basal, plusieurs types cellulaires peuvent exprimer CB1R (**Tableau 1**). Les cellules endothéliales sont le principal site d'expression de CB1R dans le rein (Deutsch et al., 1997; Koura et al., 2004; Lecru et al., 2015) (**Figure 2**).

Tableau 1 – Expression de CB1R dans le parenchyme rénal normal

Structure	Espèce	Approche technique
Rein total	Humain	RT-PCR, IHC, WB (Larrinaga et al., 2010; Shire et al., 1995; Tam, 2016)
	Rat	RT-PCR, WB (Jenkin et al., 2010; Shire et al., 1995)
	Souris	RT-PCR, WB (Barutta et al., 2010; Mukhopadhyay et al., 2010)
Endothélium	Humain	IHC* (Lecru et al., 2015)
	Rat	RT-PCR, IHC [#] (Deutsch et al., 1997; Janiak et al., 2007; Koura et al., 2004)
Glomérules	Rat	RT-PCR, IHC (cellules mésangiales) (Deutsch et al., 1997; Janiak et al., 2007)
	Souris	RT-PCR, IHC (Barutta et al., 2010; Nam et al., 2012) RT-PCR, IHC** / IF (podocytes) (Koura et al., 2004)
Tubules	Humain	IHC (tubule contourné proximal, tubule contourné distal, cellules intercalaires des canaux collecteurs) (Larrinaga et al., 2010) RT-PCR, WB (HK2) (Jenkin et al., 2010)
	Rat	WB (branche ascendante fine de l'anse de Henlé) (Silva et al., 2013)

*Du tissu rénal de souris *Cnr1*^{-/-} a été utilisé pour confirmer la spécificité du marquage en IHC

**Disparition du marquage après préincubation de l'anticorps avec un excès (X10) du peptide contrôle

[#]La microscopie biphotonique a montré un marquage plus intense de CB1R dans les artérioles afférentes par rapport aux artérioles efférentes.

Abréviations : CB1R, récepteur cannabinoïde de type 1 ; HK2, lignée de cellules tubulaires proximales humaines; IF, immunofluorescence ; IHC, immunohistochimie; RT-PCR, réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse ; WB, western blot.

L'expression de CB2R dans le rein normal est quant à elle controversée (Tam, 2016). Plusieurs groupes n'ont pas réussi à mettre en évidence CB2R dans le parenchyme rénal normal, tant par RT-PCR que par WB ou IHC (Larrinaga et al., 2010; Silva et al., 2013). Pour d'autres équipes au contraire, il existe une expression basale de CB2R dans le parenchyme rénal normal (Barutta

et al., 2011; Deutsch et al., 1997; Jenkin et al., 2010). Chez le rat, des transcrits de *Cnr2* ont été documentés dans des cellules mésangiales (Deutsch et al., 1997). Chez l'homme et chez la souris, Barutta et al. (2011) ont publié des immunofluorescences révélant une expression podocytaire de CB2R. *In vitro*, l'expression de CB2R a été mise en évidence par RT-PCR et WB dans une lignée de cellules tubulaires proximales humaines (HK2) (Barutta et al., 2011) (**Figure 1**). L'ensemble de ces résultats suggère que CB2R est très faiblement exprimé dans le parenchyme rénal normal. Il n'existe pas de données à ce jour sur un éventuel rôle de CB2R en physiologie rénale. Nous nous intéresserons donc uniquement au rôle physiologique de CB1R.

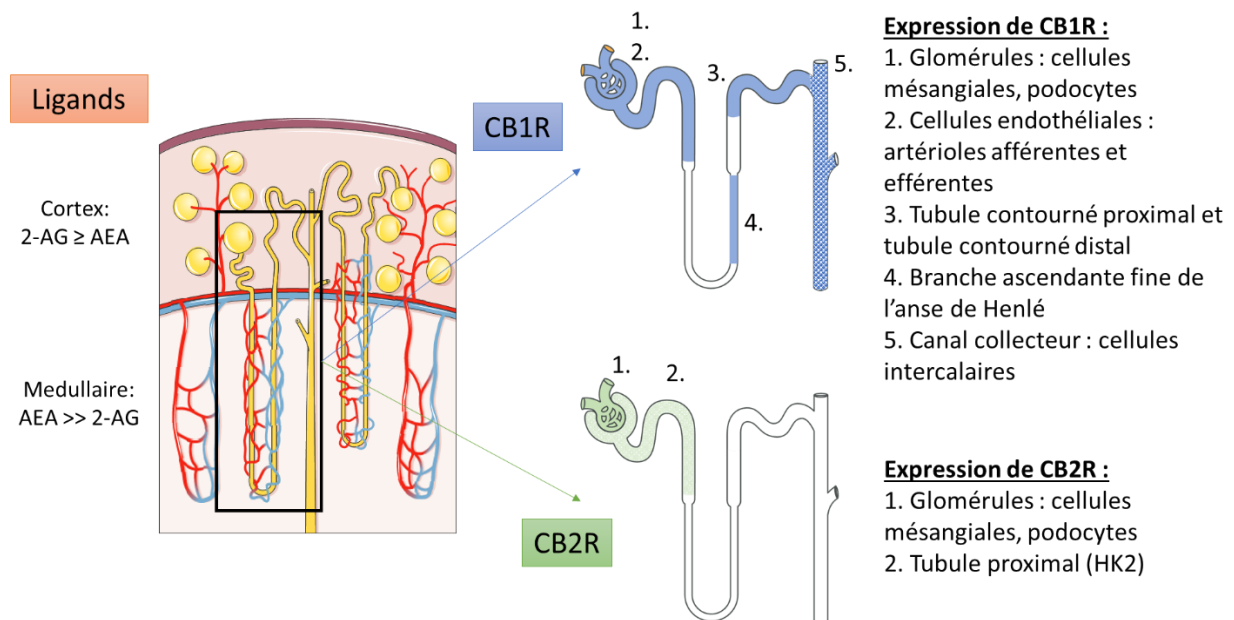


Figure 2 – Distribution des récepteurs cannabinoïdes et des principaux ligands dans le parenchyme rénal normal.

Abréviations : 2-AG, 2-arachidonoyl-glycérol ; AEA, anandamide ; CB1R, récepteur cannabinoïde de type 1 ; CB2R, récepteur cannabinoïde de type 2 ; HK2, lignée de cellules tubulaires proximales humaines.

2.1.2 – Les ligands endocannabinoïdes dans le rein

Les principaux ligands endocannabinoïdes, l'AEA et le 2-AG, sont des lipides à demi-vie courte. Ils sont situés au carrefour de différentes voies métaboliques ce qui rend leur caractérisation difficile. Ils ont été identifiés beaucoup plus récemment que les récepteurs cannabinoïdes (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Le 2-AG est

le ligand endogène naturel le plus abondant et le plus efficace des récepteurs cannabinoïdes dans la plupart des tissus (Sugiura et al., 2002). Dans le rein, les données concernant le ligand endogène principal des récepteurs cannabinoïdes sont rares. Des équipes, dont la nôtre, ont trouvé que le 2-AG était majoritaire dans le cortex rénal (Lecru et al., 2015; Mukhopadhyay et al., 2010). D'autres équipes ont mis en évidence une prédominance de l'AEA par rapport au 2-AG dans la médullaire rénale (Deutsch et al., 1997; Koura et al., 2004; Long et al., 2011; Ritter et al., 2016). L'AEA et le 2-AG sont des écosanoïdes. Ils sont synthétisés localement en fonction des besoins à partir des phospholipides membranaires comportant de l'acide arachidonique (Basith et al., 2018; Haspula & Clark, 2020; Pacher et al., 2006). Plusieurs voies de synthèse et de dégradation des endocannabinoïdes ont été décrites (**Figure 3**).

La principale source d'AEA est la N-arachidonoyl phosphatidyl éthanolamine (NAPE) (Cadas et al., 1996; Di Marzo et al., 1994; X.-H. Jin et al., 2007; Natarajan et al., 1983; Tsuboi et al., 2018). La NAPE est synthétisée depuis les phospholipides membranaires et secondairement converti en AEA. A ce jour, le mécanisme exact de la synthèse de la NAPE dans le rein reste inconnu (Ritter et al., 2016). Plusieurs voies de conversion de NAPE en AEA ont été décrites (Natarajan et al., 1983; Ritter et al., 2016; Sugiura et al., 1996, 2002) (**Figure 3A**). La voie de synthèse directe fait intervenir la NAPE-PLD (Okamoto et al., 2004). Des voies de synthèse indirectes ont également été identifiées. En effet, au moins 3 équipes différentes ont montré que les souris NAPE-PLD^{-/-} étaient capables de convertir la NAPE en AEA. Ces voies de synthèse indirectes impliquent la formation de composés intermédiaires qui sont secondairement métabolisés en AEA (Inoue et al., 2017; Leishman et al., 2016; Leung et al., 2006; J. Liu et al., 2006; G. M. Simon & Cravatt, 2006; Sun et al., 2004; Tsuboi et al., 2011) (**Figure 3A**). Dans le rein, la concentration rénale de NAPE est significativement plus élevée chez les souris NAPE-PLD^{-/-} que chez les souris sauvages suggérant une prépondérance de la voie de synthèse directe par la NAPE-PLD (Inoue et al., 2017).

L'expression rénale de NAPE-PLD a été confirmée par RT-PCR dans une lignée immortalisée de cellules épithéliales tubulaires proximales de cochon (LLC-PK1) (Sampaio et al., 2015). La demi-vie de l'AEA est courte. L'AEA est rapidement dégradé par la FAAH, une sérine hydrolase membranaire ubiquitaire qui hydrolyse plusieurs N-acyléthanolamines, avec une affinité préférentielle pour l'AEA (Cravatt et al., 1996; Giang & Cravatt, 1997; Wei et al., 2006). L'hydrolyse de l'AEA par la FAAH forme de l'acide arachidonique et de l'éthanolamine (Arreaza et al., 1997; Cravatt et al., 1996). L'activité enzymatique de la FAAH est plus importante dans le cortex rénal que dans la médullaire, ce qui pourrait expliquer la concentration plus importante d'AEA dans la médullaire rénale (Ritter et al., 2012). D'autres voies de dégradation de l'AEA ont été décrites, impliquant notamment la cyclo-oxygénase de type 2 (COX2), des lipoxigénases et des cytochromes P450. Toutes ces enzymes sont exprimées dans le rein (Breyer & Harris, 2001; Gohara et al., 2012; González-Núñez et al., 2005; Ritter et al., 2016; Snider et al., 2007; Sridar et al., 2011).

La biosynthèse du 2-AG implique également plusieurs voies métaboliques (Blankman & Cravatt, 2013; Sugiura et al., 2006; Tsuboi et al., 2018) (**Figure 3B**). Le principal précurseur du 2-AG est le 2-arachidonoyl-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphonate (PIP2). Le PIP2 est hydrolysé en 2-arachidonoyl diacylglycérol par la phospholipase C. Le 2-arachidonoyl diacylglycérol est ensuite dé-acylé par la DAGL et forme le 2-AG. La voie de dégradation du 2-AG implique son hydrolyse en acide arachidonique et glycérol (Tsuboi et al., 2018). Plusieurs enzymes peuvent catalyser cette réaction, dont la MAGL, la FAAH, la lipase α - β hydrolase (ABHD) 6 et l'ABHD12. Les contributions relatives de ces enzymes diffèrent selon les tissus et les types cellulaires. Les données concernant les voies de biosynthèse et de dégradation du 2-AG dans le rein sont particulièrement rares. A ce jour, seuls Sampaio et al. (2015) ont identifié par RT-PCR les transcrits de la DAGL et de la MAGL dans des cellules LLC-PK1 (**Figure 3B**).

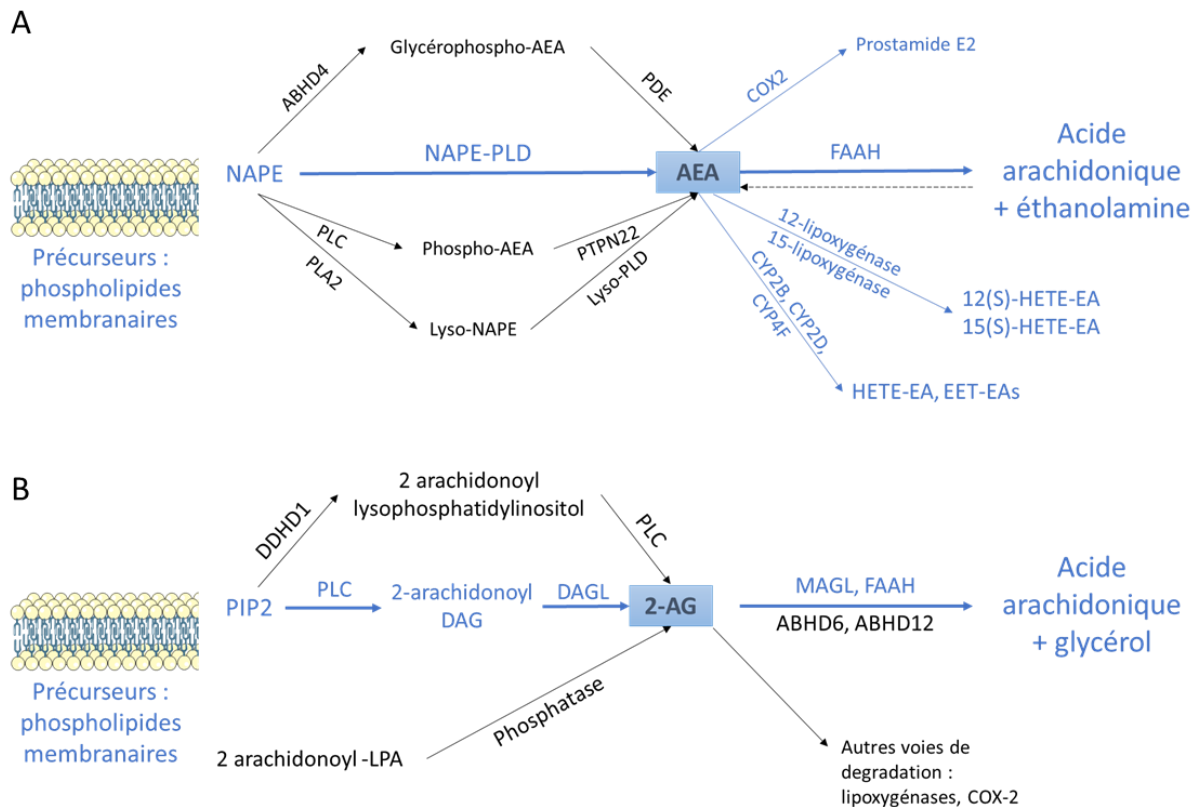


Figure 3 – Biosynthèse et dégradation des principaux endocannabinoïdes. (A) Biosynthèse et dégradation de l’anandamide. (B) Biosynthèse et dégradation du 2-arachidonoylglycérol. Les voies métaboliques et les enzymes qui ont été identifiées dans le rein sont en bleu. Les autres voies métaboliques et enzymes identifiées dans d’autres organes sont en noir. Abréviations : 2AG, 2-arachidonoyl-glycérol ; ABHD, lipase α - β hydrolase ; AEA, anandamide ; CB1R, récepteur cannabinoïde de type 1 ; CB2R, récepteur cannabinoïde de type 2 ; COX2, cyclooxygénase de type 2 ; CYP, cytochrome P450 ; DAG, diacylglycérol ; DAGL, lipase sn-1-spécifique du diacylglycérol ; DDHD1, phospholipase A1 de l’acide phosphatidique ; EA, éthanolamine ; EET, acide époxyeicosatriénoïque ; FAAH, hydrolase d’amide d’acide gras ; HETE, acide hydroxyeicosatétraoïque ; LPA, acide lysophosphatidique ; MAGL, monoacylglycérol lipase ; NAPE, N-arachidonoyl phosphatidyl éthanolamine ; PDE, phosphodiesterase ; PIP2, 2-arachidonoylphosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PLA2, phospholipase A2 ; PLC, phospholipase C ; PLD, phospholipase D.

Il existe de nombreux autres ligands lipidiques endogènes des récepteurs cannabinoïdes. Leur concentration rénale est néanmoins beaucoup plus faible. La N-acyl dopamine et le 2-arachidonoyl glyceryl éther par exemple ont une affinité élevée pour CB1R (Bisogno et al., 2000; Hanus et al., 2001). Des ligands peptidiques des récepteurs cannabinoïdes ont également été identifiés. L’hémopressine (HP), un peptide produit par le clivage de la chaîne α 1 de

l'hémoglobine, se comporte ainsi comme un agoniste inverse de CB1R (Gomes et al., 2009; Heimann et al., 2007).

2.1.3 – Relations entre les récepteurs cannabinoïdes et leurs ligands

L'AEA et le 2-AG lient à la fois CB1R et CB2R, avec une affinité plus importante pour CB1R que pour CB2R. La constante d'inhibition (K_i) de l'AEA est de 61 à 565 nM pour CB1R et de 279 à 1940 nM pour CB2R. Celle du 2-AG est de 58 à 472 nM pour CB1R et de 145 à 1400 nM pour CB2R (Deutsch et al., 1997; Howlett et al., 2002; Sugiura et al., 2002) (**Tableau 2**). Les ligands endocannabinoïdes interagissent également avec des récepteurs non cannabinoïdes, les plus étudiés étant le canal ionique à potentiel de récepteur transitoire vanilloïde de type 1 (TRPV1) (Berger et al., 2004; Chemin et al., 2001; De Petrocellis et al., 2001; Hansen et al., 2002; Hermann et al., 2003; Köfalvi et al., 2003; Pegorini et al., 2006; Zygmunt et al., 1999) et le récepteur couplé aux protéines G 55 (GPR55) (Henstridge, 2012; Jenkin et al., 2015; Ryberg et al., 2007). L'affinité de l'AEA pour TRPV1 est néanmoins 20 fois inférieure à son affinité pour CB1R (De Petrocellis et al., 2001; Hermann et al., 2003; Zygmunt et al., 1999). L'AEA peut également inhiber directement des canaux calciques de type T (Chemin et al., 2001). L'ECS est donc un système complexe dans lequel la plupart des ligands endogènes manquent de spécificité. La meilleure manière d'étudier son rôle précis en physiologie rénale reste débattue et plusieurs approches ont été proposées. Une première approche consiste à étudier les effets de l'administration rénale d'AEA. L'affinité de l'AEA pour CB1R est très supérieure à son affinité pour les autres récepteurs. Il semble de plus acquis que CB1R est le principal récepteur cannabinoïde exprimé dans le rein, que le rein est particulièrement riche en AEA et qu'il contient toutes les enzymes nécessaires à la biogénèse et à la dégradation de l'AEA. Cette approche ne permet cependant pas d'exclure formellement des effets non canoniques (i.e.

indépendants de CB1R) de l'AEA. Une autre limite de cette approche tient à la nature même des ligands endogènes qui sont synthétisés à la demande depuis les phospholipides membranaires contenant de l'acide arachidonique et dont la biosynthèse peut emprunter plusieurs voies métaboliques différentes.

Une seconde approche consiste à utiliser des ligands synthétiques, aussi bien des agonistes que des antagonistes, permettant de cibler plus directement CB1R. Les affinités de tous les ligands cités dans le manuscrit sont rapportées dans le **Tableau 2**. Le ligand pharmacologique le mieux caractérisé est le SR141716A (rimonabant), un agoniste inverse de CB1R appartenant à la famille des inhibiteurs de première génération, brièvement autorisé en pratique clinique (Després et al., 2005, 2009; Nissen et al., 2008; Pi-Sunyer et al., 2006; Rosenstock et al., 2008; Topol et al., 2010; Triay et al., 2012; Van Gaal et al., 2005). L'affinité du rimonabant pour CB1R est très supérieure à son affinité pour CB2R, respectivement 1,98 à 12,3 nM et 702 à 13 200 nM (Rinaldi-Carmona et al., 1994). Néanmoins, de façon similaire aux ligands endogènes, les ligands exogènes exercent des effets non-canoniques et interagissent avec des récepteurs non cannabinoïdes tels que TRPV1 (Pegorini et al., 2006). L'étude du rôle physiologique du système endocannabinoïde est donc difficile. Cibler directement les récepteurs cannabinoïdes reste à ce jour l'approche la plus pertinente pour explorer le potentiel thérapeutique de l'ECS.

Tableau 2 – Affinité des ligands pour les récepteurs cannabinoïdes de type 1 et 2

Ligands	Ki pour CB1R (nM)	Ki pour CB2R (nM)	Références
Ligands endogènes			
2-arachidonoylglycérol	58,3-472	145-1400	(Deutsch et al., 1997; Howlett et al., 2002; Sugiura et al., 2002)
Anandamide	61-543	279-1940	(Deutsch et al., 1997; Howlett et al., 2002; Sugiura et al., 2002)
Ligands exogènes			
MRI-1891 [§]	0,3 ± 0,17	613 ± 0,5	(Z. Liu et al., 2021)
MRI-1867 [#]	1,2-8,0	> 1000	(Cinar et al., 2016)
WIN55,212-2	1,89-123	0,28-16,2	(Pertwee et al., 2010; Showalter et al., 1996)
SR141716A (rimonabant)	1,98-12,3	702-13200	(Rinaldi-Carmona et al., 1994)
JD5037	2	> 1000	(Chorvat et al., 2012; Tam et al., 2012)
AM6545	3,3	624	(Cluny et al., 2010; Tam et al., 2010)
Δ9-Tétrahydrocannabinol	5,05-80,3	3,13-75,3	(Pertwee et al., 2010)
AM251	7,49	2290	(Gatley et al., 1996; Lan, Liu, et al., 1999)
(S)-SLV 319 (ibipinabant)	7,8	7,9	(Lange et al., 2004)
AM281	12	4200	(Lan, Gatley, et al., 1999)
(R)-Méthanandamide	17,9-28,3	815-868	(Abadji et al., 1994)
SR144528	400	0,6	(Rinaldi-Carmona et al., 1998)
AM1241	580	7	(Yao et al., 2006)
JWH-133	677	3,4	(Huffman et al., 1999)
AM630	5152	31,2	(Hosohata et al., 1997)

[§]Le MRI-1891 est un antagoniste biaisé de CB1R inhibant le recrutement de la β-arrestine-2

[#]Le MRI-1867 est un inhibiteur double de CB1R et de la NO synthase

Abréviations : CB1R, récepteur cannabinoïde de type 1; CB2R, récepteur cannabinoïde de type 2; Ki, constante d'inhibition ; NO, monoxyde d'azote

2.2 – Système endocannabinoïde et vascularisation rénale

L'expression de CB1R par les cellules endothéliales est bien documentée dans le rein normal (Deutsch et al., 1997; Koura et al., 2004; Lecru et al., 2015) (**Figure 2**). La perfusion de néphrons juxtaglomérulaires avec de l'AEA *ex vivo* chez le rat a permis d'étudier les effets de l'AEA sur les artérioles glomérulaires afférentes et efférentes et d'identifier une participation de CB1R à l'hémodynamique rénale (Deutsch et al., 1997; Koura et al., 2004). Dans l'étude de Deutsch et al. (1997), l'injection d'AEA (1 μ M) provoque une vasodilatation des artérioles glomérulaires afférentes et réduit la libération de norépinéphrine par le système nerveux de l'artère arquée. L'administration de SR141716A (1 μ M), un agoniste inverse de CB1R, bloque l'effet vasodilatateur de l'AEA (**Figure 4**). L'inhibition de la synthèse du monoxyde d'azote (NO) par administration de L-N^G-Nitroarginine méthyl ester (L-NAME, 0,1 mM) reproduit l'effet inhibiteur du SR141716A. En revanche, l'indométacine (10 μ M), qui inhibe COX1 et COX2, n'a pas d'effet sur la modulation du tonus vasculaire par l'AEA. Les auteurs concluent donc que l'administration intra-rénale d'AEA augmente la production locale de NO médiée par CB1R (Deutsch et al., 1997) (**Figure 4**). Plus récemment, Koura et al. (2004) ont étudié l'effet de différentes posologies d'AEA. La perfusion d'une dose élevée d'AEA (150 à 1500 pmol/kg) s'accompagne d'une vasodilatation des artérioles afférentes et efférentes, sans altération du DFG. En revanche, l'administration d'une dose plus faible d'AEA (15 pmol/kg) est responsable d'une vasodilatation prédominante des artérioles efférentes et, par suite, d'une réduction du DFG (Koura et al., 2004). Dans ce modèle, l'AM251 (1500 pmol/kg), un antagoniste sélectif de CB1R (**Tableau 2**), réduit la réponse des artérioles afférentes à l'AEA et inhibe complètement la réponse des artérioles efférentes à l'AEA. L'AM281 (1500 pmol/kg), un antagoniste non sélectif des récepteurs cannabinoïdes (**Tableau 2**) inhibe quant à lui tant la réponse des artérioles afférentes à l'AEA que celle des artérioles efférentes (Koura et al., 2004). Ces résultats suggèrent que les artérioles efférentes sont plus sensibles à l'AEA que les

artérioles afférentes. Ils illustrent également la difficulté d'étudier le rôle physiologique de l'ECS dans le rein au moyen de ligands endogènes. En raison du manque de spécificité des ligands endogènes et pharmacologiques de CB1R, il est tout à fait possible que la vasodilatation des artérioles afférentes médiée par de fortes concentrations d'AEA soit due à l'activation d'un récepteur non cannabinoïde. L'étude de l'hémodynamique rénale chez des rongeurs ayant une délétion génétique spécifique de CB1R dans leur vascularisation permettrait d'apporter des éléments de réponse. Aucune étude de ce type n'a encore été réalisée à ce jour.

Au cours de la MRC, l'augmentation de la pression capillaire participe à la réduction néphronique. L'efficacité des bloqueurs du SRA et des inhibiteurs de SGLT2, les deux lignes thérapeutiques qui ont fait la preuve de leur efficacité pour ralentir la progression de la MRC, est en grande partie médiée par des effets hémodynamiques et par la réduction de la pression capillaire (François et al., 2011; Toyama et al., 2019). De ce fait, diminuer la pression capillaire *via* l'activation de CB1R pourrait être bénéfique dans la MRC. Cependant, de façon similaire à ce qui peut être observé avec les bloqueurs du SRA, il n'est pas exclu qu'une baisse rapide de la pression capillaire médiée par CB1R soit délétère dans des reins normaux ou au cours de l'insuffisance rénale aiguë. Une meilleure compréhension des effets vasculaires rénaux de CB1R est donc absolument indispensable si le blocage de CB1R devient une cible thérapeutique dans la MRC.

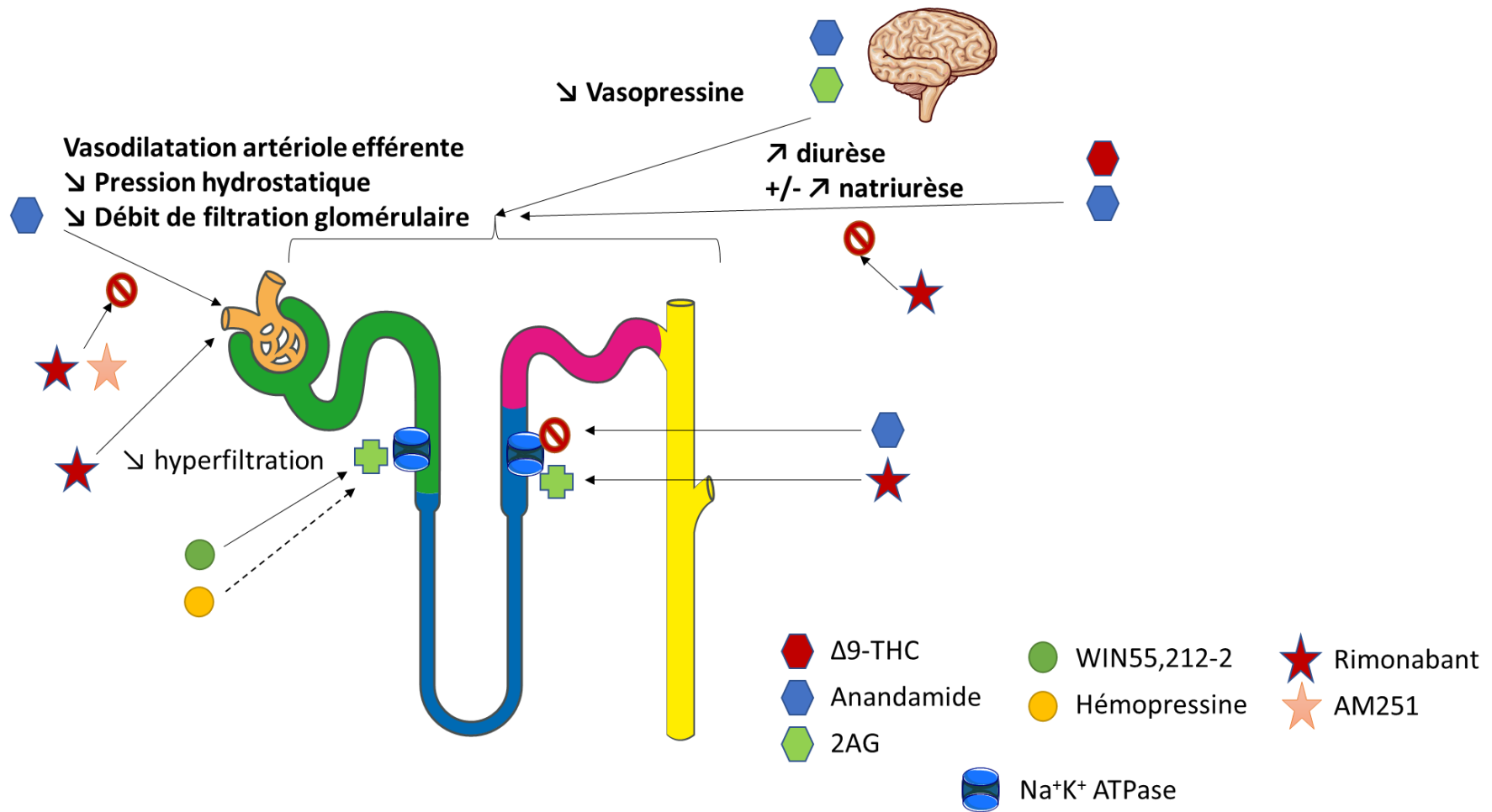


Figure 4 – Le rôle physiologique du récepteur cannabinoïde de type 1 dans le rein.

Synthèse des connaissances actuelles sur le rôle du récepteur cannabinoïde de type 1 dans la vascularisation rénale, les cellules tubulaires et la régulation de la pression artérielle. La figure prend en compte à la fois les données expérimentales *in vitro* et *in vivo*.
 Abréviations : 2-AG, 2-arachidonoylglycérol ; THC, tétrahydrocannabinol.

2.3 – Système endocannabinoïde et cellules tubulaires rénales

Des données expérimentales suggèrent que l'ECS pourrait moduler le fonctionnement des cellules épithéliales tubulaires rénales, en particulier par le biais d'une régulation de la balance hydrosodée (**Figure 4**). Il est connu de longue date que le $\Delta 9$ -THC, principe actif du cannabis (**Tableau 2**), augmente la diurèse (Ames, 1958; Sofia et al., 1977). Aucune étude ne s'est cependant intéressée à ce jour aux conséquences du $\Delta 9$ -THC sur la natriurèse. Les premiers mécanismes identifiés mettent en lumière un effet diurétique médié par le système nerveux central (Di et al., 2005; Kapusta & Obih, 1993, 1995; Soya et al., 2005). La modulation des voies glutaminergiques et GABAergiques hypothalamo-hypophysaires par l'AEA et le 2-AG inhibe la libération de vasopressine (Di et al., 2005; Soya et al., 2005). Plus récemment, une participation de l'ECS périphérique dans la régulation de la diurèse a également été identifiée (Chopda et al., 2013; Li & Wang, 2006; Paronis et al., 2013; Ritter et al., 2012; Silva et al., 2013). L'expression de CB1R a été documentée dans les cellules du tubule contourné proximal, du tubule contourné distal, de la branche ascendante fine de l'anse de Henlé (TAL) et dans les cellules intercalaires des canaux collecteurs (Jenkin et al., 2010; Larrinaga et al., 2010; Silva et al., 2013) (**Tableau 1**) (**Figure 2**). Il semble également acquis que les cellules tubulaires rénales expriment les enzymes nécessaires à la biosynthèse et à la dégradation des ligands endocannabinoïdes (Ritter et al., 2021; Sampaio et al., 2015). Cependant, les conséquences de l'activation ou de l'inhibition de CB1R sur la natriurèse restent débattues et le rôle physiologique exact de CB1R dans les cellules tubulaires rénales demeure largement méconnu. Les études présentées dans les paragraphes suivants sont résumées dans le **Tableau 3**.

2.3.1 – Hypothèse 1 : l'ECS favorise la natriurèse

Des données expérimentales suggèrent que l'activation de l'ECS favorise la natriurèse. Chez le rat, l'administration orale de Δ^9 -THC reproduit les effets aquarétiques et natriurétiques de l'hydrochlorothiazide, un diurétique thiazidique (Sofia et al., 1977). Ritter et al. (2012, 2021) ont étudié les conséquences de la modulation de l'ECS périphérique sur la natriurèse. La perfusion intramédullaire rénale d'AEA chez la souris (15 à 60 nmol/kg/min pendant 30 minutes) augmente la diurèse, la natriurèse et la kaliurèse de façon dose-dépendante, sans modification de la tension artérielle (Ritter et al., 2012, 2021). Dans leur premier travail, les auteurs ont identifié un mécanisme d'action de l'AEA indépendant de CB1R (Ritter et al., 2012). En effet, la perfusion intraveineuse concomitante de celecoxib (0,1 μ g/kg/min), un inhibiteur de COX2, bloque les effets de l'AEA. Au contraire, la perfusion intraveineuse de prostamide E2 (30 à 120 nmol/kg/min), un des métabolites issus de la dégradation de l'AEA par COX2, reproduit les effets de l'AEA. La prostamide E2 augmente également le débit sanguin rénal. De plus, la perfusion intraveineuse simultanée de prostamide E2 (30 à 120 nmol/kg/min) et d'angiotensine 2 (120 nmol/kg/min) inhibe les effets de l'angiotensine 2 sur la pression artérielle et le débit sanguin rénal. Ces résultats montrent que la production d'AEA dans la médullaire rénale a un effet diurétique et natriurétique médié au moins en partie par la dégradation de l'AEA par COX2 (Ritter et al., 2012). Plus récemment, Ritter et al. (2021) ont administré du rimonabant aux souris (3 mg/kg) par injection intrapéritonéale 30 minutes avant le début de la perfusion intramédullaire d'AEA. Dans ce modèle expérimental, le rimonabant diminue de façon prolongée la pression artérielle et bloque les effets diurétiques et natriurétiques de l'AEA (Ritter et al., 2021). L'effet de l'AEA est donc vraisemblablement également médié par la voie canonique CB1R.

In vitro, l'effet de l'AEA sur des cellules de la TAL a été documenté chez le rat par mesure de la consommation d'oxygène dans des suspensions de cellules (Silva et al., 2013). L'AEA réduit

la consommation d'oxygène de façon concentration-dépendante. Dans ce modèle, WIN55,212-2 (WIN), un agoniste cannabinoïde lipidique non sélectif liant CB1R et CB2R avec une affinité supérieure pour CB2R (**Tableau 2**) reproduit les effets de l'AEA alors que le rimonabant les bloque. Ces travaux suggèrent donc que la réduction de la consommation d'oxygène est médiée par l'activation de CB1R. Au contraire, aussi bien le JHW-133, un agoniste sélectif de CB2R (**Tableau 2**) que l'AM630, un antagoniste de CB2R, sont sans effet sur la réduction de la consommation d'oxygène par l'AEA. Ainsi, l'activation de CB1R par l'AEA dans la TAL inhiberait le transport de sodium en bloquant ses transporteurs apicaux ce qui s'associerait, par suite, à une augmentation de la natriurèse (**Figure 4**). Tout récemment, Ritter et al. (2021) ont renforcé cette hypothèse en montrant *ex vivo*, sur des cellules murines de la TAL, que l'AEA exerce un effet inhibiteur direct sur l'activité Na^+/K^+ -ATPase et favorise ainsi l'excrétion sodée.

2.3.2 – Hypothèse 2 : l'ECS favorise la rétention hydrosodée

D'autres études au contraire suggèrent que la stimulation de l'ECS n'a pas d'effet sur la natriurèse, voire favorise la rétention sodée (Koura et al., 2004; Li & Wang, 2006; Sampaio et al., 2015, 2018). *In vivo* chez le rat, la perfusion intramédullaire rénale de méthanandamide, un analogue stable de l'AEA, accroît la diurèse sans affecter la natriurèse (Li & Wang, 2006). Toujours chez le rat, l'administration par voie artérielle centrale de 3 bolus d'AEA à 40 minutes d'intervalle (15 à 1500 pmol/kg) ne modifie pas la natriurèse (Koura et al., 2004). Enfin, à la phase aiguë d'une I/R chez des rats Wistar, l'activité de l'ECS et de la pompe Na^+/K^+ -ATPase diminue significativement 24 heures après l'I/R (Sampaio et al., 2018).

In vitro, Sampaio et al. (2015, 2018) ont étudié les conséquences de la modulation de l'ECS sur l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase dans des cellules LLC-PK1. Leurs résultats sont en faveur d'une augmentation de la réabsorption rénale de sodium par l'ECS. Lorsque les cellules sont traitées par WIN, l'activité Na^+/K^+ -ATPase augmente de façon précoce (en moins d'une

minute) et soutenue (plus de 30 minutes). Après l'administration d'HP, un agoniste inverse de CB1R, dans le milieu de culture, une augmentation rapide et précoce de l'activité Na^+/K^+ -ATPase est également observée mais elle est suivie d'une décroissance de l'activité Na^+/K^+ -ATPase après 15 minutes. L'effet précoce induit par WIN et HP n'est pas modifié par l'AM251, un antagoniste de CB1R (**Tableau 2**). Il est en revanche atténué par l'ajout d'un inhibiteur de TRPV1 dans le milieu de culture. Au contraire, après 30 minutes de traitement, l'AM251 abolit complètement les effets de WIN et de l'HP. Ces résultats sont en faveur d'un effet précoce indépendant de CB1R médié par TRPV1 et d'un effet tardif dépendant de CB1R. Les voies de signalisation activées par WIN et HP sont différentes, respectivement la voie de la protéine kinase C (PKC) et celle de la protéine kinase A (PKA), d'où les effets différents sur la pompe Na^+/K^+ -ATPase (Sampaio et al., 2015). Plus récemment et pour documenter leur étude à la phase aiguë de l'I/R chez les rats, Sampaio et al. (2018) ont traité des cellules LLC-PK1 par antimycine A. L'antimycine A est un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale (Berden & Slater, 1972). Son ajout dans le milieu de culture induit une déplétion en ATP et reproduit *in vitro* le modèle d'I/R. L'administration de WIN restaure l'activité Na^+/K^+ -ATPase après 30 minutes de traitement. Cet effet est aboli en cas de prétraitement par l'AM251 et est donc médié par CB1R. Des résultats similaires ont été obtenus après traitement par WIN et/ou AM251 d'homogénats de cortex rénal de rats 24 heures après l'I/R (Sampaio et al., 2018). Il faut souligner cependant que les résultats suggérant que l'ECS favorise la rétention sodée ont été obtenus *in vitro* ou à la phase aiguë de l'I/R.

2.3.3 – Synthèse sur la régulation de la natriurèse par l'ECS

Au final, l'effet sur la natriurèse de l'ECS demeure largement débattu. Des travaux expérimentaux *in vivo* montrent que l'activation de CB1R augmente la natriurèse. L'inhibition thérapeutique de CB1R aggraverait donc l'hypertension artérielle (HTA) et la rétention sodée, comme les antagonistes de l'endothéline-1. D'autres travaux au contraire, dans la très grande majorité des cas obtenus *in vitro*, montrent que l'inhibition de CB1R favorise la natriurèse et serait donc bénéfique dans le traitement de l'HTA. Les effets de l'AEA observés dans les études dépendent largement de la dose utilisée, de la voie d'administration et du type cellulaire étudié (TAL ou cellules tubulaires rénales épithéliales proximales, PTEC). Différentes voies de signalisation et différents canaux sodiques sont impliqués dans la réabsorption sodée selon les segments tubulaires du néphron. De plus, la modulation de la réabsorption sodée dans un segment tubulaire a des conséquences sur la réabsorption sodée dans les segments d'aval. Les rats traités au long cours avec du furosémide par exemple, un diurétique de l'anse, développent en effet une hypertrophie compensatrice du tubule distal, du canal collecteur et des cellules intercalaires (Kaissling et al., 1985; Kaissling & Stanton, 1988; J. Kim et al., 1992). Leur réabsorption du sodium au niveau du tubule distal est trois fois supérieure à celle des rats qui ne reçoivent pas de furosémide (Ellison et al., 1989).

Il est donc tout à fait possible que l'AEA exerce plusieurs modes d'action dépendant du stimulus et de la cellule cible. Là encore, l'étude précise du rôle physiologique de CB1R dans les cellules tubulaires rénales est gênée par le manque de spécificité des ligands endogènes ou pharmacologique de l'ECS. L'utilisation de rongeurs avec une délétion tubulaire spécifique de CB1R permettrait d'apporter des éléments de réponse. De même qu'une meilleure compréhension des effets vasculaires rénaux de CB1R est nécessaire, une meilleure compréhension du rôle de CB1R dans la régulation de la balance hydrosodée est indispensable pour envisager la modulation thérapeutique de CB1R dans la MRC.

Tableau 3 – Données expérimentales sur la régulation de la balance sodée par le système endocannabinoïde rénal

Modèle expérimental	Espèce, Lignée	Effet observé
Données expérimentales <i>in vivo</i> ou <i>ex vivo</i>		
Administration orale de Δ^9 -THC (1,25 à 20 mg/kg) (Sofia et al., 1977)	Rat	↗ natriurèse
Administration par voie artérielle centrale de 3 bolus d'AEA à 40 minutes d'intervalle (15 à 1500 pmol/kg) (Koura et al., 2004)	Rat	Pas d'effet sur la natriurèse
Perfusion intramédullaire rénale de méthanandamide (300 nmol/kg/min) (Li & Wang, 2006)	Rat	Pas d'effet sur la natriurèse
Perfusion intramédullaire rénale d'AEA (15 à 60 nmol/kg/min, 30 minutes) (Ritter et al., 2012)	Souris	↗ natriurèse dose dépendante + celecoxib ¹ (voie IV, 0,1 µg/kg/min) : inhibe l'effet de l'AEA
Modèle aigu d'ischémie reperfusion rénale (Sampaio et al., 2018)	Rat	↘ activité Na ⁺ /K ⁺ -ATPase Homogénats de cortex rénal : - WIN ² : restaure l'activité Na ⁺ /K ⁺ -ATPase ; - WIN + AM251 ³ : aboli l'effet
Perfusion intramédullaire rénale d'AEA (15 à 60 nmol/kg/min, 30 minutes) (Ritter et al., 2021)	Souris	↗ natriurèse dose dépendante + rimonabant ⁴ (3 mg/kg, voie IP) : inhibe l'effet de l'AEA
Données expérimentales <i>in vitro</i>		
Mesure de la consommation d'oxygène (Silva et al., 2013)	Rat, TAL	AEA : ↘ Q _{O2} + rimonabant : inhibe l'effet de AEA + JHW-133 ⁵ , + AM630 ⁶ : pas d'effet AEA : ↘ Q _{O2}
Activité Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (Sampaio et al., 2015)	LLC-PK1	Effet précoce (< 1 minute) : WIN, HP ⁴ : ↗ activité Na ⁺ /K ⁺ -ATPase + AM251 : pas d'effet + antagoniste TRPV1 : inhibe l'effet Effet tardif (> 30 minutes) : WIN : ↗ activité Na ⁺ /K ⁺ -ATPase + AM251 : inhibe l'effet HP : ↘ activité Na ⁺ /K ⁺ -ATPase + AM251 : inhibe l'effet
Activité Na ⁺ /K ⁺ -ATPase après déplétion en ATP par l'antimycine A (Sampaio et al., 2018)	LLC-PK1	Antimycine A : ↘ activité Na ⁺ /K ⁺ -ATPase + WIN : restaure l'activité Na ⁺ /K ⁺ -ATPase ; + WIN + AM251 : aboli l'effet de WIN
Activité Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (Ritter et al., 2021)	Souris, TAL	AEA : ↘ activité Na ⁺ /K ⁺ -ATPase

¹antagoniste des cyclooxygénases 1 et 2 ; ²agoniste non sélectif de CB1R et CB2R ; ³antagoniste de CB1R ; ⁴agoniste inverse de CB1R ; ⁵agoniste de CB2R ; ⁶antagoniste de CB2R
Abréviations : AEA, anandamide ; CB1R, récepteur cannabinoïde de type 1 ; CB2R, récepteur cannabinoïde de type 2 ; ECS, système endocannabinoïde ; HP, hémopressine ; IP, intrapéritonéale ; IV, intraveineuse ; LLC-PK1, cellules épithéliales tubulaires proximales de cochon ; THC, tétrahydrocannabinol ; Q_{O2}, consommation d'oxygène ; TAL, TAL, branche ascendante fine de l'anse de Henlé ; TRPV1, canal ionique à potentiel de récepteur transitoire vanilloïde de type 1 ; WIN, WIN55,212-2.

2.4 – Rôle du système endocannabinoïde dans la régulation de la pression artérielle

2.4.1 – Régulation centrale de la pression artérielle par l'ECS

Bien que les mécanismes mis en œuvre restent imparfaitement compris, les données expérimentales présentées dans les paragraphes précédents suggèrent que l'ECS joue un rôle dans la vascularisation rénale et dans la régulation de la balance hydrosodée. Il est donc hautement probable que l'ECS participe également à la régulation de la pression artérielle, qui est un élément essentiel de la prise en charge de la MRC (KDIGO, 2013) (**Figure 4**).

La consommation chronique de $\Delta 9$ -THC augmente la diurèse. Son effet sur la natriurèse reste débattu. Elle réduit également la fréquence cardiaque et la pression artérielle, aussi bien chez l'homme que chez l'animal (Benowitz & Jones, 1975; Caverro et al., 1973; Lake, Compton, et al., 1997; Varga et al., 1995; Vollmer et al., 1974). Chez le rat, les mêmes effets sont observés après perfusion intraveineuse de $\Delta 9$ -THC (Lake, Compton, et al., 1997; Varga et al., 1995). Une réponse triphasique a été décrite avec une chute de la pression artérielle à médiation vagale (phase I), suivie d'un bref effet vasopresseur (phase II) et finalement d'une hypotension prolongée (Malinowska et al., 2012; Siqueira et al., 1979; Varga et al., 1995). De nombreux mécanismes sont impliqués, à la fois centraux et périphériques (Haspula & Clark, 2020).

Les mécanismes centraux ont été identifiés en premier. Ils impliquent les centres de régulation cardiovasculaires du système nerveux central et l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'activation de CB1R réduit l'activité sympathique (Lake, Compton, et al., 1997; Varga et al., 1995; Vidrio et al., 1996; Vollmer et al., 1974). L'AEA agit sur le baroréflexe en activant CB1R dans le noyau du tractus solitaire, possiblement via la modulation de la neurotransmission du GABA et/ou du glutamate (Seagard et al., 2004). CB1R participe également à l'effet vasopresseur cérébral de l'angiotensine 2 (Gyombolai et al., 2012; Haspula & Clark, 2020).

2.4.2 – Régulation périphérique de la tension artérielle par l'ECS

Les mécanismes périphériques de la régulation de la pression artérielle par l'ECS ont été identifiés secondairement. L'activation cardiaque de CB1R a des effets chronotropes et inotropes négatifs indépendants du système nerveux central, favorisant ainsi la baisse de la pression artérielle (Bonz et al., 2003; Haspula & Clark, 2020). En plus d'un effet cardiopresseur direct, les ligands de l'ECS vasodilètent l'aorte et les artères coronaires, ce qui participe également à la réduction de la pression artérielle (Dannert et al., 2007; O'Sullivan et al., 2005a, 2005b; Szekeres et al., 2018; Wagner et al., 2005; White et al., 2001). Les ligands agissent via plusieurs voies de signalisation, dépendantes et indépendantes de CB1R.

De façon intéressante, les souris *Cnr1*^{-/-} ont la même pression artérielle de base que les souris sauvages issues de la même portée (Járai et al., 2000; Ledent et al., 1999). L'administration de SR121716A à des rongeurs normotendus n'a que peu d'impact sur la pression artérielle (Lake, Compton, et al., 1997; Varga et al., 1995), de même que l'inhibition du transport de l'AEA (Calignano et al., 1997). En condition basale et lorsque la pression artérielle est normale, CB1R n'est donc pas toniquement actif dans les vaisseaux et ne participe pas à la régulation de la pression artérielle (Ritter et al., 2016). En revanche, CB1R est impliqué dans la régulation de la pression artérielle dans 4 modèles expérimentaux d'HTA : chez les rats spontanément hypertendus (SHR), dans le modèle des rats Dahl sensibles/résistants au sel, chez les rats Sprague Dawley après induction d'HTA par perfusion chronique d'angiotensine 2 (Bátkai et al., 2004; Kosersky, 1978; Lake, Martin, et al., 1997) et chez les rats transgéniques (mRen2)27, un modèle monogénique d'HTA dépendante de l'angiotensine 2 (Schaich et al., 2014). Dans ces 4 modèles, la pression artérielle des rats contrôles n'est modifiée ni par les agonistes (Δ^9 -THC, AEA) ni par les antagonistes ou agonistes inverses (SR141716A, AM251) de CB1R (Bátkai et al., 2004; Kosersky, 1978; Lake, Martin, et al., 1997; Schaich et al., 2014). Chez les rats SHR, le SR141716A et l'AM251 aggravent l'HTA (Bátkai et al., 2004).

Inversement, l'URB597, un inhibiteur de FAAH, réduit la pression artérielle des rats SHR et des rats hypertendus après perfusion d'angiotensine 2. Le SR144528, un antagoniste de CB2R (**Table 2**) et la capsazépine, un antagoniste de TRPV1, ne modifient pas l'HTA des rats SHR (Bátkai et al., 2004). L'amélioration du contrôle tensionnel dans ces modèles est attribuée à un effet des endocannabinoïdes sur la contractilité myocardique et sur les résistances vasculaires médié par l'activation de CB1R par l'AEA (Bátkai et al., 2004).

2.4.3 – Interactions entre le système rénine angiotensine et l'ECS

Un autre mécanisme de régulation proposé repose sur une interaction entre le SRA et l'ECS (Sainz-Cort & Heeroma, 2020). Cette interaction a été identifiée dans des artéριοles périphériques de rongeurs. Alors que l'angiotensine 2 stimule la formation vasculaire des endocannabinoïdes, ceux produits localement au niveau de la paroi vasculaire pourraient réduire les effets vasoconstricteurs et hypertenseurs de l'angiotensine 2 (Szekeres et al., 2012, 2015). A l'inverse, chez les rats transgéniques (mRen2)²⁷, l'inhibition chronique de CB1R par le rimonabant (10 mg/kg/jour pendant 28 jours) améliore significativement le contrôle tensionnel. Des effets métaboliques systémiques sont cependant probablement en partie responsables de l'effet observé dans ce modèle car les rats (mRen2)²⁷ ont une masse grasse plus importante, une insulino-résistance et un niveau de leptine plus élevé que les rats contrôles (Schaich et al., 2014).

Une interaction entre l'ECS et le SRA a également été documentée au niveau surrénalien (Ziegler et al., 2010). CB1R est exprimé dans le cortex surrénalien chez l'homme et par la lignée cellulaire corticosurrénale NCI-H295R. *In vitro*, l'AEA inhibe la libération d'aldostérone et les effets de l'AEA sont bloqués par le rimonabant (Ziegler et al., 2010).

Au niveau rénal, CB1R pourrait moduler les conséquences hypertensives de l'angiotensine 2 par une action sur la balance hydrosodée (Chopda et al., 2013; Crowley et al., 2005; Crowley

& Coffman, 2008; Li & Wang, 2006; Paronis et al., 2013; Ritter et al., 2012, 2021; Silva et al., 2013; Sofia et al., 1977). En effet, le récepteur de type 1 de l'angiotensine 2 (AT1R) est largement exprimé dans le rein. Les régions juxtaglomérulaires et tubulo-interstitielles rénales sont des sites d'expression très conservés d'AT1R chez l'homme et chez les rongeurs (Schrankl et al., 2021). Utilisant un modèle expérimental murin de transplantation croisée de cœurs et de reins de souris *AT1R*^{-/-} et de souris sauvages, Crowley et al. (2005) ont identifié différents mécanismes d'action de l'AT1R dans le rein et dans les tissus extra-rénaux. Dans le rein, l'AT1R favorise la réponse vasopressive à l'angiotensine 2 et la rétention sodée (Crowley & Coffman, 2008).

Plusieurs études ont documenté des interactions directes entre AT1R et l'ECS dans différents organes (Gyombolai et al., 2012; Haspula & Clark, 2020; Rozenfeld et al., 2011; Szekeres et al., 2012, 2015; Tiyerili et al., 2010). Comme CB1R, AT1R est une GPCR. Il peut prendre différentes conformations et activer par la suite des voies de signalisation différentes. AT1R peut également se dimériser, s'oligomériser et même s'hétéromériser avec d'autres récepteurs (Tóth et al., 2018). Plusieurs hétérodimères GPCR-AT1R ont ainsi été décrits, incluant par exemple le récepteur à l'adiponectine (Zha et al., 2017), le récepteur α 2C-adrénergique (Bellot et al., 2015), le récepteur β 2-adrénergique (Barki-Harrington et al., 2003), le récepteur de la bradykinine B2 (Ayoub et al., 2015), le récepteur de la prostaglandine F2 α (Goupil et al., 2015) ou le récepteur purinergique P2Y6 (Nishimura et al., 2016). Ces hétérodimères activent des voies de signalisation différentes.

Des hétéromères AT1R-CB1R ont été décrits par Rozenfeld et al. (2011) dans plusieurs types cellulaires incluant des cellules Neuro2A, une lignée cellulaire de neuroblastome qui exprime CB1R, et des cellules hépatiques stellaires. Chez le rat, l'administration d'éthanol augmente l'expression de CB1R dans les cellules stellaires hépatiques, les hétéromères AT1R-CB1R dans ces cellules et renforce les voies de signalisation médiées par l'angiotensine 2. Dans ce modèle,

l'inhibition de CB1R par le rimonabant réduit l'expression des gènes mitogènes et profibrotiques induite par l'angiotensine 2 dans le foie (Rozenfeld et al., 2011). Dans le rein, Jourdan et *al.* (2014) ont montré que le losartan, un antagoniste d'AT1R, diminue non seulement les lésions rénales de néphropathie diabétique chez le rat, mais également l'expression podocytaire de CB1R, renforçant l'hypothèse d'une coopération entre AT1R et CB1R et d'un renforcement des actions de l'angiotensine 2 par CB1R. Récemment, Barutta et al. (2018) ont étudié l'impact du double blocage de CB1R et du SRA par l'AM6545 et le périndopril dans un modèle expérimental murin de diabète induit par la streptozotocine (STZ). Tant l'AM6545 que le périndopril, administrés en monothérapie, réduisaient significativement l'expression d'AT1R dans ce modèle. De façon intéressante, l'administration simultanée des deux traitements était plus efficace que l'AM6545 ou le périndopril en monothérapie pour réduire l'albuminurie, prévenir la perte d'expression des protéines du diaphragme de fente, réduire l'infiltration monocytaire et prévenir la surexpression des marqueurs de fibrose (Barutta et al., 2018).

Il est donc tout à fait possible que le système endocannabinoïde dans le rein participe à la physiopathologie de l'HTA, en particulier *via* CB1R. Une telle hypothèse mérite d'être étudiée en détail, et ce d'autant qu'une large proportion des patients suivis pour une MRC, qui pourraient être amenés à recevoir un traitement bloqueur de CB1R, ont également une HTA.

3 – Le rôle des récepteurs cannabinoïdes dans la maladie rénale chronique et la fibrose rénale

3.1 – Le récepteur cannabinoïde de type 1 est le principal acteur du système endocannabinoïde impliqué dans la fibrose rénale

La fibrogenèse est un processus multifactoriel qui aboutit au dépôt excessif de composants de la matrice extracellulaire. Tous les organes peuvent être concernés et les causes de la fibrogenèse sont multiples. De plus en plus de travaux montrent que l'ECS participe à la fibrogenèse. Des effets opposés de CB1R et de CB2R ont été mis en évidence dans plusieurs organes avec un rôle pro-fibrosant de CB1R et un rôle anti-fibrosant de CB2R. L'activation de CB1R favorise la fibrogenèse et son blocage la réduit dans le foie (Dai et al., 2014; Patsenker et al., 2011; Teixeira-Clerc et al., 2006), le cœur (Slavic et al., 2013), les poumons (Bronova et al., 2015; Cinar et al., 2017) et la peau (Lazzerini et al., 2012). Au contraire, l'activation de CB2R réduit les lésions fibreuses et son blocage les aggrave dans le foie (Julien et al., 2005), le cœur (Defer et al., 2009) et la peau (Servettaz et al., 2010).

Le rôle le mieux documenté de l'ECS dans la fibrogenèse rénale est celui de CB1R. Dans le modèle expérimental murin d'obstruction urétérale unilatérale (UUO), un modèle rapide et reproductible de fibrose rénale, Lecru et al. (2015) ont comparé par *microarray* les gènes exprimés dans les reins obstrués fibreux par rapport aux reins contrôles contralatéraux. Les gènes du *transforming growth factor* β (TGF- β) et des métalloprotéinases matricielles (MMPs) étaient, comme attendu, surexprimés dans les reins fibreux. De façon beaucoup plus surprenante, *cnr1* était parmi les 10 gènes les plus surexprimés dans les reins fibreux. De nombreuses données expérimentales suggèrent que CB1R pourrait être une nouvelle cible thérapeutique pour prévenir la fibrose rénale, indépendamment de la cause de la MRC (Barutta et al., 2010; Francois & Lecru, 2018; Hinden et al., 2018; Jourdan et al., 2014, 2018; Lecru et al., 2015; Nam et al., 2012; Udi et al., 2017).

Contrairement à CB1R et à l'inverse de ce qui est observé dans d'autres organes, le rôle de CB2R dans la fibrose rénale demeure largement inconnu. Les données sont peu nombreuses et contradictoires. Dans l'UUO notamment, Lecru et al. (2015) ont montré que le SR144528, un antagoniste de CB2R, majore les lésions de fibrose rénale alors que le JWH 133, un agoniste de CB2R, les réduit. Le rôle de CB1R dans ce modèle est cependant prépondérant car en cas de traitement concomitant par le rimonabant, un agoniste inverse de CB1R, ni le SR144528 ni le JWH 133 n'ont d'effet sur la modulation de la fibrose rénale (Lecru et al., 2015). Etonnamment, dans les travaux publiés par Zhou et al. (2018), la stimulation de CB2R favorisait la fibrose rénale et son blocage la prévenait, à la fois dans un modèle d'UUO et dans un modèle d'I/R. Dans cette étude et dans leur suivante, les auteurs n'ont cependant pas documenté une éventuelle modulation de CB1R en réponse à la modulation de CB2R (L. Zhou et al., 2018; S. Zhou et al., 2021). Les travaux de Barutta et al. (2011, 2014) sur le rôle de CB2R dans la néphropathie diabétique sont, à l'instar de ceux de Lecru et al. (2015) dans l'UUO, en faveur d'un rôle protecteur de CB2R. Une diminution de l'expression podocytaire de CB2R a été mise en évidence sur des lames de biopsies humaines de néphropathie diabétique ainsi que chez la souris. Dans le modèle expérimental murin de diabète induit par la STZ, l'AM1241, un agoniste de CB2R (**Tableau 2**), diminue l'albuminurie, améliore la régulation des protéines podocytaires et réduit l'infiltration monocytaire au cours de la néphropathie diabétique (Barutta et al., 2011). L'inactivation génétique de CB2R a les effets inverses : elle aggrave la perte d'expression de la néphrine et de la podocine, l'expansion mésangiale et augmente les marqueurs de fibrose rénale que sont la fibronectine, la chaîne $\alpha 4$ du collagène IV, le collagène I, les transcrits du TGF β 1 et du *connective tissue growth factor* (CTGF) (Barutta et al., 2014). *In vitro* dans des podocytes en culture, l'AM1241 diminue l'expression du récepteur aux chémokines CC de type 2, suggérant que l'activation de CB2R interfère avec les effets délétères de la chimiokine MCP1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) (Barutta et al., 2011).

Ainsi le rôle exact de CB2R dans la fibrose rénale reste-t-il à documenter plus précisément. Il n'y a pas d'étude clinique en cours chez l'homme portant sur la modulation de CB2R. Nous nous intéresserons donc dans la suite du manuscrit exclusivement au potentiel thérapeutique offert par le blocage de CB1R.

3.2 – CB1R aggrave la fibrose rénale dans les maladies métaboliques

Le blocage de CB1R, qu'il soit génétique ou pharmacologique, améliore de nombreux paramètres du syndrome métabolique dont le diamètre abdominal, l'équilibre glycémique et l'hémoglobine glyquée, l'insulinorésistance, le LDL et le HDL cholestérol, les triglycérides, la stéatose hépatique (Barutta et al., 2010; Després et al., 2005; Janiak et al., 2007; Van Gaal et al., 2005). Le rôle de CB1R a été documenté initialement dans la fibrose rénale compliquant le diabète et le syndrome métabolique (Barutta et al., 2010; Hinden et al., 2018; Janiak et al., 2007; Jourdan et al., 2014; Udi et al., 2017). L'expression rénale de CB1R augmente au cours de la néphropathie diabétique, aussi bien chez l'homme (Janiak et al., 2007; Lecru et al., 2015), que chez les rongeurs (Hinden et al., 2018; Jourdan et al., 2014, 2018; Nam et al., 2012). Dans des modèles expérimentaux animaux de diabète, le blocage de CB1R réduit l'albuminurie, la MRC, la fibrose rénale et l'inflammation (Barutta et al., 2010; Jourdan et al., 2014; Nam et al., 2012). Cette amélioration est médiée non seulement par la correction des facteurs métaboliques, incluant les paramètres glycémiques et lipidiques, mais également par un effet direct du blocage rénal de CB1R. Récemment, Udi et al. (2017) ont démontré que CB1R joue un rôle direct dans les cellules épithéliales tubulaires proximales (PTEC) au cours de la MRC associée à l'obésité chez la souris. La délétion tubulaire spécifique de CB1R dans les cellules épithéliales tubulaires proximales (souris RPTC-CB1R^{-/-}) ne réduit pas le poids des souris. En revanche, les souris RPTC-CB1R^{-/-} ont significativement moins d'accumulation rénale de lipides, d'insuffisance rénale, d'albuminurie, d'inflammation et de fibrose rénale. Les voies de signalisation activées

par CB1R durant l'obésité ont été étudiées *in vitro* dans des HK2 en cultures. Le JD5037, un antagoniste périphérique de CB1R, bloque l'activation de la protéine $G\alpha_{i/0}$ et, au terme d'une cascade de phosphorylations, augmente la β -oxydation des acides gras dans les PTEC (**Figure 5**).

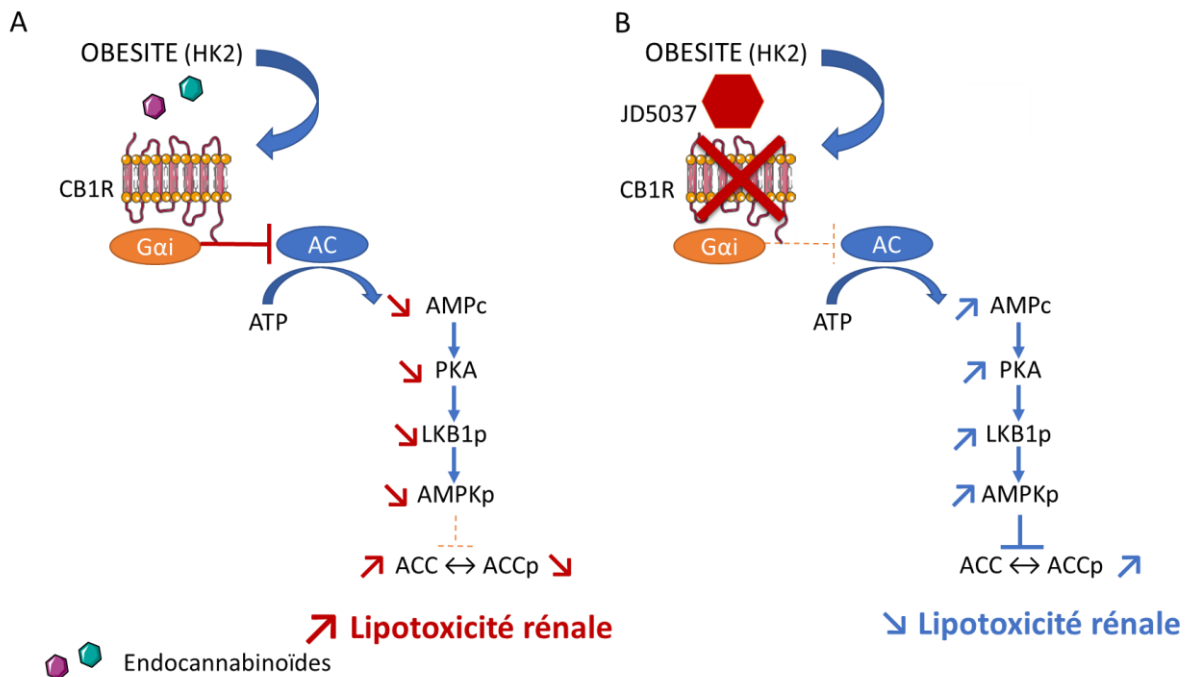


Figure 5 – CB1R active la voie de signalisation $G\alpha_i$ -AMPc-PKA au cours de la néphropathie associée à l'obésité. Adapté de Udi et al. (2017). (A) Cascade de phosphorylations médiée par l'activation de CB1R. (B) Conséquences de l'inhibition de CB1R par le JD5037.

Abréviations : AC, adénylate cyclase ; ACC, acétyl-CoA carboxylase ; ACCp, ACC phosphorylée ; AMPc, AMP cyclique ; AMPKp, AMP-activated kinase phosphorylée ; CB1R, récepteur cannabinoïde de type 1 ; HK2, lignée de cellules tubulaires proximales humaines ; LKB1p, tumor suppressor liver kinase B1 phosphorylée ; PKA, protéine kinase A.

Un rôle périphérique direct de CB1R a également été démontré au cours de la néphropathie diabétique. Les premières données ont été obtenues par Janiak et al. (2007) avec le rimonabant. Le rimonabant réduit significativement le poids corporel, la glycémie et améliore le profil lipidique des rongeurs (Janiak et al., 2007; Nam et al., 2012). Le rimonabant réduit également la prise alimentaire. Des rats obèses Zucker traités par du rimonabant pendant 12 mois ont été comparés avec des rats recevant exactement les mêmes apports caloriques, pour s'affranchir d'une amélioration médiée par la réduction de la prise alimentaire. Indépendamment de la

réduction des apports caloriques, et donc de l'amélioration métabolique, le rimonabant réduit significativement la protéinurie, l'insuffisance rénale, la fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire (Janiak et al., 2007). *In vitro* dans des podocytes en culture, la stimulation par de fortes doses de glucose augmente l'expression de CB1R. L'ajout de rimonabant dans le milieu de culture empêche la surexpression des gènes du collagène et réduit la synthèse de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1). Les lésions histologiques des modèles expérimentaux murins de diabète sont très souvent minimales, rendant difficile l'étude des conséquences du blocage de CB1R sur la fibrose rénale. Si le blocage génétique et les inhibiteurs de première génération de CB1R, dont le rimonabant, améliorent drastiquement l'hyperglycémie et l'insulinorésistance, l'efficacité des inhibiteurs périphériques de CB1R reste à démontrer. Le JD5037 et l'AM6545, des antagonistes périphériques de CB1R qui ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique, ont été évalués dans plusieurs modèles expérimentaux de diabète chez les rongeurs : les rats Zucker diabétiques et obèses (ZDF) (Jourdan et al., 2014), les souris ayant un diabète induit par la STZ (Barutta et al., 2017, 2018; Hinden et al., 2018; Jourdan et al., 2014) et les souris diabétiques Akita (Hinden et al., 2018). Lorsque le diabète est déjà installé, le JD5037 et l'AM6545 n'ont pas ou peu d'effet sur l'hyperglycémie et l'hémoglobine glyquée (Barutta et al., 2017, 2018; Hinden et al., 2018; Jourdan et al., 2014). En revanche, ils présentent un bénéfice néphrologique net en terme d'amélioration de la fonction rénale, de réduction de l'albuminurie et de réduction de l'inflammation interstitielle (Barutta et al., 2017, 2018; Hinden et al., 2018; Jourdan et al., 2014). Plusieurs mécanismes d'action ont été documentés. Chez les rats ZDF, le JD5037 améliore la filtration glomérulaire et réduit l'albuminurie, l'activation du SRA, le stress oxydatif et la perte des podocytes (Jourdan et al., 2014). L'absence de lésions histologiques significatives au moment du sacrifice (90 jours de traitement) ne permet pas de conclure sur une éventuelle réduction de la fibrose rénale. L'amélioration observée est donc possiblement en rapport avec un effet du blocage de CB1R sur l'hémodynamique rénale. Alors

que l'activation de CB1R dans les podocytes augmente l'activité du SRA, le blocage de CB1R la réduit. Jourdan et al. (2014) ont également mis en évidence un lien direct entre l'activation de l'AT1R et l'expression de CB1R. *In vitro* dans des podocytes en culture, il existe des relations étroites entre les espèces réactives de l'oxygène, l'angiotensine 2 et l'expression de protéines du diaphragme de fente comme la néphrine. La prolongation du délai avant le sacrifice permet d'observer des lésions histologiques au cours du diabète induit par la STZ (Barutta et al., 2017, 2018; Jourdan et al., 2018). Après 14 semaines de traitement, l'AM6545 diminue l'expansion mésangiale, la surexpression de fibronectine dans les glomérules et les dépôts de collagène mésangiaux et interstitiels (Barutta et al., 2017). L'AM6535 empêche également la perte d'expression de la néphrine, de la podocine (Barutta et al., 2018) et des marqueurs anti-inflammatoires des macrophages de type M2 (Barutta et al., 2017, 2018).

Le rôle précis de CB1R dans le podocyte au cours de la néphropathie diabétique a été étudié dans un modèle de diabète induit par la STZ chez des souris ayant une délétion génétique podocytaire spécifique de CB1R (pCB1Rko) (Jourdan et al., 2018). Le profil glycémique des souris n'est pas affecté par la délétion podocytaire de CB1R. En revanche, les souris pCB1Rko ont significativement moins d'albuminurie, de perte podocytaire, de dysfonction tubulaire et de fibrose interstitielle que les souris sauvages de la même portée. Cette amélioration est médiée pour partie par une collaboration entre les endocannabinoïdes podocytaires et CB1R dans les PTEC (Jourdan et al., 2018). La délétion génétique de CB1R dans les PTEC chez la souris protège également contre le développement d'une néphropathie diabétique induite par la STZ. Les souris RPTC-CB1R^{-/-} ont moins d'insuffisance rénale, d'albuminurie, d'inflammation interstitielle et de fibrose interstitielle que les souris sauvages de la même portée (Hinden et al., 2018). Ces effets sont en rapport avec une diminution de l'expression du transporteur de glucose 2 (GLUT2) dans les PTEC. GLUT2 module l'efflux de glucose depuis les cellules tubulaires vers la circulation sanguine (Chin et al., 1993; Thorens, 1996). Son expression augmente au

cours du diabète chez l'homme et chez l'animal (Chichger et al., 2016; Chin et al., 1997; Marks et al., 2003; Rahmoune et al., 2005). L'hyperglycémie favorise la translocation de GLUT2 depuis la membrane basolatérale vers le pôle apical de la cellule et la bordure en brosse, majorant de ce fait la réabsorption de glucose (Cohen et al., 2014; Marks et al., 2003). Le blocage de CB1R inhibe l'activation de la PKC β 1-dépendante du calcium ce qui réduit l'expression et la translocation de GLUT2 dans les PTEC. *In vitro*, la stimulation de CB1R médiée par le glucose dans des PTEC active la PKC β 1-dépendante du calcium alors que le blocage de CB1R par le JD5037 l'inhibe (Hinden et al., 2018) (**Figure 6**).

Au final, toutes ces études démontrent que l'effet bénéfique du blocage de CB1R n'est pas seulement médié par l'amélioration des paramètres métaboliques mais qu'il s'exerce également par une action directe sur les cellules rénales (podocytes et PTEC), indépendamment du métabolisme. Ces études démontrent également que l'effet de CB1R est médié par plusieurs voies de signalisation. Les résultats expérimentaux du blocage de CB1R dans les néphropathies métaboliques sont synthétisés dans la **Figure 7**.

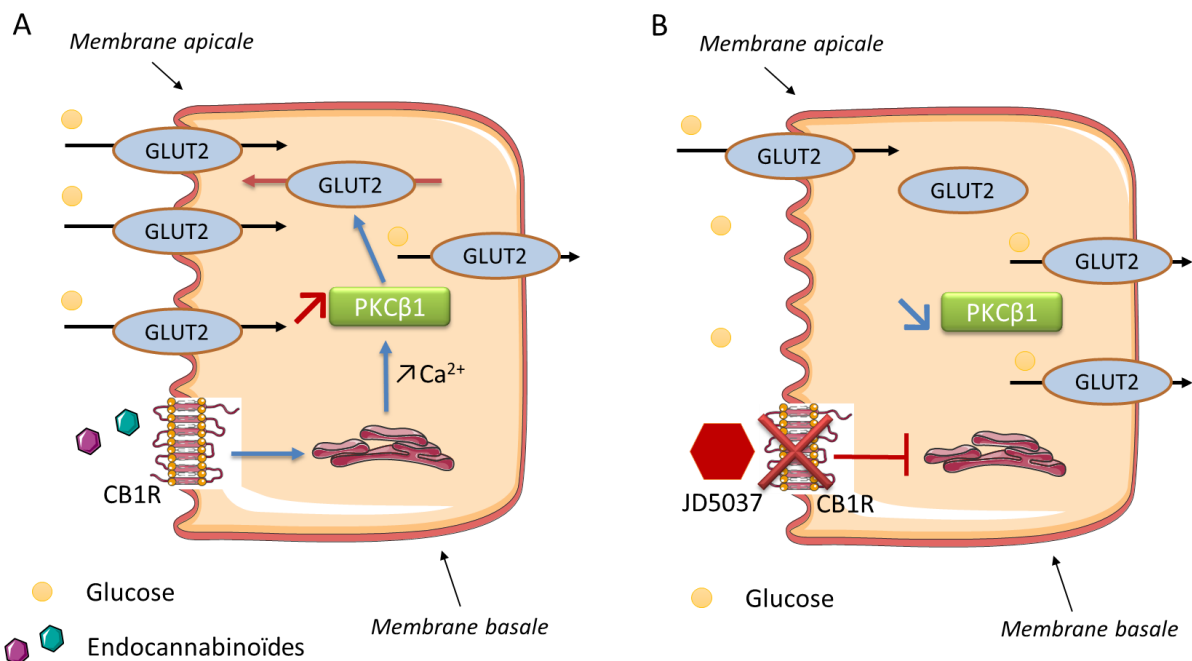


Figure 6 - CB1R module l'expression de GLUT2 au cours de la néphropathie diabétique. Adapté de Hinden et al. (2018) (A) CB1R favorise la translocation de GLUT2 au pôle apical via l'activation de la PKC β 1. (B) L'inhibition de CB1R par le JD5037 prévient la translocation de GLUT2 au pôle apical.

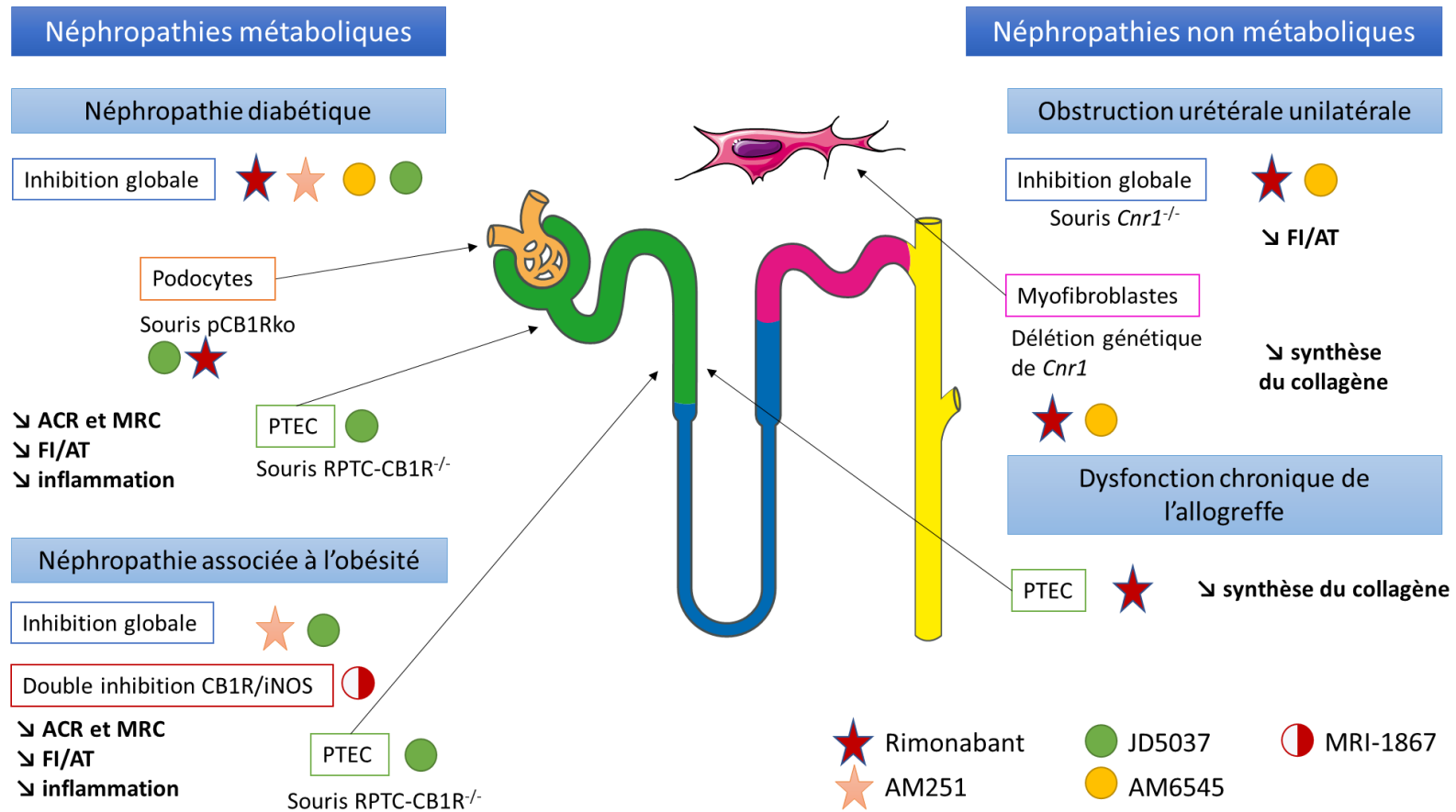


Figure 7 – Le blocage de CB1R pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans la MRC, dans les néphropathies métaboliques et non métaboliques. La figure reprend les résultats des études *in vivo* et *in vitro*.

Abréviations : ACR, ratio albuminurie sur créatininurie ; CB1R, récepteur cannabinoïde de type 1 ; FI/AT, fibrose interstitielle et atrophie tubulaire ; iNOS, synthase inductible du monoxyde d'azote ; MRC, maladie rénale chronique ; pCB1Rko, délétion podocytaire spécifique de CB1R ; RPTC, cellules proximales tubulaires rénales.

3.3 – L'activation de CB1R favorise la fibrose rénale dans les néphropathies non métaboliques

A ce jour, seuls Lecru et al. (2015) ont étudié le rôle pro-fibrosant de CB1R dans un modèle expérimental murin de fibrose rénale non métabolique, l'UUO (**Figure 7**). Alors que CB1R est faiblement exprimé dans les reins normaux, son expression augmente notablement dans les néphropathies métaboliques (diabète) mais également dans les néphropathies non métaboliques (néphrite interstitielle aiguë, néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA). De plus, une corrélation négative a été mise en évidence entre l'expression de CB1R et la fonction rénale dans ces néphropathies (Lecru et al., 2015). Chez la souris, dans l'UUO, tant le blocage pharmacologique de CB1R par le rimonabant et l'AM6545, que son inhibition génétique réduisent la fibrose rénale. Cet effet est dû principalement à un effet direct paracrine/autocrine sur les myofibroblastes rénaux, la cellule effectrice finale de la fibrogenèse. *In vitro*, la stimulation de myofibroblastes rénaux par le TGF β augmente l'expression de CB1R et la sécrétion des ligands endocannabinoïdes. Au contraire, l'administration concomitante de rimonabant dans le milieu de culture bloque la synthèse de collagène (Lecru et al., 2015). Dans les cellules tubulaires, CB1R ne joue pas de rôle majeur *in vitro* ni *in vivo* dans ce modèle.

Alors que le blocage génétique de CB1R n'a pas d'effet sur l'infiltrat macrophagique dans ce modèle, le rimonabant réduit significativement les marqueurs macrophagiques de type M1 (iNOS, MCP-1 et IL-23). Les auteurs proposent un effet non canonique du rimonabant, d'autant plus qu'il n'a pas été identifié d'expression de CB1R dans les macrophages rénaux (Lecru et al., 2015). A l'inverse, des données obtenues au cours de modèles expérimentaux de néphropathies diabétiques suggèrent un rôle direct de CB1R dans l'orientation du phénotype macrophagique, l'activation de CB1R favorisant la polarisation vers le type M1 et son inhibition vers le type M2 (Jourdan et al., 2013, 2018). Le rôle de CB1R dans l'orientation du phénotype macrophagique au cours de néphropathies non diabétiques reste donc à préciser.

Tous ces résultats suggèrent que CB1R pourrait être une cible thérapeutique pour prévenir la progression de la MRC, quelle qu'en soit la cause. L'un des objectifs de ce travail de thèse est donc de documenter les effets du blocage pharmacologique de CB1R lors de néphropathies non métaboliques avec des molécules dont l'administration pourra être envisagée chez l'homme.

4 – Les antagonistes des inhibiteurs pharmacologiques du récepteur cannabinoïde de type 1

Des données expérimentales de plus en plus nombreuses mettent en lumière le potentiel thérapeutique du blocage de CB1R dans la fibrose rénale et la MRC, qu'elle soit de cause métabolique ou non (Barutta et al., 2010; Hinden et al., 2018; Jourdan et al., 2014, 2018; Lecru et al., 2015; Udi et al., 2017). Après les désillusions liées à l'abandon du rimonabant en raison de ses effets secondaires neuro-psychiatriques sévères, l'industrie a bien noté les perspectives offertes par le blocage de CB1R et de nombreuses molécules ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique sont actuellement en développement (Hirsch & Tam, 2019).

4.1 – Les antagonistes de CB1R de première génération : le rimonabant

Le rimonabant est le seul antagoniste de CB1R qui a été utilisé en pratique clinique. L'AMM avait été obtenue dans l'indication de la prise en charge de l'obésité. Malheureusement, les études cliniques conduites chez l'homme avec le rimonabant se sont focalisées sur le syndrome métabolique et l'insuffisance rénale chronique était un critère d'exclusion (Després et al., 2005, 2009; Nissen et al., 2008; Pi-Sunyer et al., 2006; Rosenstock et al., 2008; Topol et al., 2010; Triay et al., 2012; Van Gaal et al., 2005). L'objectif principal de l'étude RIALTO (NCT00458081) était d'évaluer l'effet du rimonabant sur la microalbuminurie des patients ayant un syndrome métabolique. L'objectif secondaire de l'étude portait sur l'évolution du DFG. En raison de ses effets indésirables, notamment du risque d'épisode dépressif caractérisé

sévère, le rimonabant a été retiré du marché en 2008, avant la fin de l'étude RIALTO. Celle-ci s'est donc terminée prématurément avant que des résultats ne soient communiqués. Plusieurs études cliniques de phases 2 et 3 évaluant d'autres antagonistes de première génération de CB1R étaient en cours lorsque le rimonabant a été retiré du marché. Parmi les molécules étudiées, les principales étaient l'ibipinabant, le taranabant, l'otanabant et le surinabant. Ces études incluaient des patients ayant une obésité et/ou un syndrome métabolique. Elles ont été arrêtées prématurément et seuls quelques résultats partiels sont publiés (Addy et al., 2008; Aronne et al., 2011). A ce jour, aucune étude clinique n'a évalué l'impact néphrologique du blocage de CB1R sur l'évolution de la fonction rénale au cours du diabète et de l'obésité.

4.2 – Les antagonistes de CB1R de deuxième génération : les antagonistes périphériques

De nombreux antagonistes périphériques de CB1R, sans effets indésirables sur le système nerveux central, ont été développés ces 10 dernières années (Cinar et al., 2020). Des données expérimentales montrent que le blocage périphérique de CB1R est un bon candidat pour intégrer l'arsenal thérapeutique de la prise en charge de la MRC (Barutta et al., 2017; Cinar et al., 2020; Jourdan et al., 2018; Lecru et al., 2015; Tam et al., 2010; Udi et al., 2017). Les principales molécules étudiées sont l'AM6545 et le JD5037 (**Tableau 2**). L'AM6545 est un antagoniste neutre de CB1R ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique. La structure de l'AM6545 reprend celle du rimonabant mais avec un alkynyl sur la chaîne du groupe 4-aryl. La sélectivité et l'affinité de l'AM6545 pour CB1R sont similaires à celles du rimonabant, avec un K_i à 3,3 nM (Tam et al., 2010). La pénétration cérébrale de l'AM6545 est réduite (Cluny et al., 2010; Tam et al., 2010). L'AM6545 réduit de façon significative l'albuminurie (Barutta et al., 2017, 2018) ainsi que les dépôts de collagène dans le mésangium et l'interstitium (Barutta et

al., 2017) des souris diabétiques. Dans l'UUO, l'AM6545 réduit de 25 à 60% la fibrose rénale par rapport au placebo (Lecru et al., 2015).

La plupart des antagonistes périphériques de CB1R sont développés à partir de la structure chimique du rimonabant. Le JD5037 a quant à lui été développé par le groupe Jenrin à partir de la structure de l'ibipinabant, qui traverse moins la barrière hémato-encéphalique que le rimonabant (Chorvat, 2013; Chorvat et al., 2012). Les modifications du groupe N-méthyl central de l'ibipinabant permettent de réduire le passage de la barrière hémato-encéphalique. Le JD5037 a été conçu avec un substitut N-vanilamide. Son affinité pour CB1R est 15 fois supérieure à celle de l'ibipinabant (IC₅₀ 1,5 nM) (Chorvat et al., 2012). Par rapport à l'AM6545 et à la plupart des composés basés sur la structure du rimonabant, le JD5037 présente l'avantage d'une plus grande biodisponibilité par voie orale (Cinar et al., 2020). Il n'a pas été mis en évidence d'effets indésirables du JD5037 dans des études précliniques de toxicité chez le rat et les chiens, avec des posologies allant respectivement jusqu'à 150 et 75 mg/kg/j (Kale et al., 2019). Chez le rongeur, le JD5037 réduit efficacement les lésions de néphropathies diabétiques par un effet direct sur le podocyte (Jourdan et al., 2014) et sur les PTEC (Hinden et al., 2018). Le JD5037 régule notamment la translocation de GLUT2 à la membrane apicale. Le JD5037 est également efficace dans la néphropathie associée à l'obésité en augmentant la β -oxydation des acides gras dans les PTEC (Udi et al., 2017).

Il n'y a pas encore de données publiées sur l'effet du JD5037 dans la fibrose rénale compliquant la MRC non métabolique. Documenter l'effet du JD5037 dans cette indication fait partie des objectifs de ce travail de thèse. Les résultats expérimentaux disponibles, en particulier au cours de la néphropathie diabétique, sont néanmoins très encourageants. Le JD5037 est actuellement développé par Corbus Pharma, sous le nom de CRB-4001. Une étude de phase II est en cours dans la stéatohépatite non alcoolique.

Tout récemment, Liu et al. (2021) ont décrit les propriétés du MRI-1891, un antagoniste biaisé de CB1R inhibant le recrutement de la β -arrestine-2. Il s'agit du premier antagoniste de CB1R qui signale préférentiellement *via* une β -arrestine par rapport aux protéines G. Les β -arrestines, en particulier la β -arrestine 2, sont impliquées dans le maintien de l'intégrité du diaphragme de fente (Quack et al., 2006). La néphropathie diabétique s'accompagne d'une dérégulation de la voie des β -arrestines 2 (J. Liu et al., 2016; Quack et al., 2011). Chez la souris obèse, le MRI-1891 réduit la prise alimentaire, la prise de poids et l'insulinorésistance (Z. Liu et al., 2021).

4.3 – Les antagonistes de CB1R de troisième génération : les antagonistes périphériques hybrides de CB1R

Les dernières avancées pharmacologiques ont porté sur le développement d'antagonistes hybrides de CB1R. Les molécules sont modifiées de telle sorte qu'elles permettent d'inhiber deux voies de signalisation. Cette approche augmente l'efficacité thérapeutique et a été proposée dans la prise en charge de la fibrose hépatique (Cinar et al., 2016; Iyer et al., 2017) et de la fibrose pulmonaire (Cinar et al., 2017, 2021). L'inhibition périphérique de CB1R couplée à l'inhibition de la synthèse du NO inductible (iNOS) a été proposée dans le syndrome métabolique (Roger et al., 2020) et dans la MRC (Cinar et al., 2020). En effet, tant CB1R que iNOS sont augmentés au cours de la MRC (Udi et al., 2020). L'hyperactivité de iNOS contribue à la dysfonction tubulaire dans la MRC associée à l'obésité chez la souris (Udi et al., 2020) et à la fibrose rénale dans l'UUO (Ozbek et al., 2009). Dans la néphropathie associée à l'obésité chez la souris, le MRI-1867, un antagoniste hybride de CB1R et iNOS, est plus efficace pour prévenir la fibrose rénale, l'inflammation et l'insuffisance rénale que l'inhibition isolée de CB1R par le JD5037 ou l'inhibition isolée de iNOS par le 1400W (Udi et al., 2020). Là encore, les effets du MRI-1867 sur la MRC d'origine non métabolique ne sont pas connus.

Une autre piste de molécule hybride repose sur une inhibition périphérique de CB1R couplée à une activation de l'AMP-activated kinase (AMPK) (Cinar et al., 2020). Des travaux expérimentaux sont néanmoins indispensables avant d'envisager une administration thérapeutique chez l'homme. La société Inversago Pharma a conduit une première étude clinique de phase 1 avec un composé de troisième génération (INV101, NCT04531150) et a annoncé le 7 septembre 2021 le démarrage d'une seconde étude clinique de phase 1 testant un autre composé de nouvelle génération (INV202). Evaluer la sécurité et la tolérance de ces molécules, notamment neuro-psychiatriques, est un prérequis indispensable avant de proposer leur utilisation chez les patients.

4.4 – Les anticorps bloquants de CB1R

Une autre approche thérapeutique actuelle est celle des anticorps bloquants. L'encombrement stérique de telles molécules prévient en effet le risque de passage de la barrière hémato-encéphalique. Le groupe Bird Roc Bio, Inc group, a conçu le RYI-018 (nimacimab), un anticorps bloquant de CB1R. Les phases précoces du développement clinique sont en cours avec notamment des études cliniques de phase 1 (NCT03261739) et 2a (NCT03900325) visant à confirmer la sécurité, la tolérance et les propriétés pharmacocinétiques du RYI-018 respectivement dans la stéatohépatite non alcoolique et la gastroparésie diabétique. Le groupe Goldinch Bio, Inc group, a quant à lui conçu le GFB-024, un anticorps monoclonal qui se comporte comme un agoniste inverse de CB1R. La population cible de la molécule est celle des patients insulino-résistants à haut risque de MRC. Une étude de phase 1 chez des volontaires sains est en cours. A ce jour, il n'y a aucune donnée expérimentale chez l'animal publiée avec le RYI-018 et le GFB-024.

5 – Maladie rénale chronique et transition insuffisance rénale aiguë – maladie rénale chronique

Quelle qu'en soit sa cause (métabolique, immunologique, toxique ...) et indépendamment de la néphropathie initiale (glomérulaire, tubulo-interstitielle, vasculaire), la MRC correspond au remplacement du tissu rénal fonctionnel par des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) qui altèrent de façon progressive et inéluctable le fonctionnement rénal (KDIGO, 2013). Les principales caractéristiques de la MRC sont une réduction néphronique, une altération des capacités de régénération rénale, des lésions de la micro-vascularisation, des modifications métaboliques, du stress oxydatif et de l'inflammation (Bábíčková et al., 2017; Hodgkins & Schnaper, 2012; Humphreys, 2018; Ruiz-Ortega et al., 2020; N. Simon & Hertig, 2015). La fibrogenèse rénale résulte de l'ensemble de ces phénomènes. Les mécanismes effecteurs terminaux de la MRC sont communs à l'ensemble des néphropathies, qu'elles intéressent les reins natifs ou les reins greffés. La MRC favorise la survenue d'épisodes d'insuffisance rénale aiguë (IRA) qui accélèrent la progression de la MRC, définissant la transition IRA-MRC. De façon similaire, l'IRA est un facteur de risque de MRC (Chawla et al., 2014). La transition IRA-MRC est donc un phénomène particulièrement fréquent en pratique clinique, d'où un intérêt de la recherche de plus en plus marqué (Ruiz-Ortega et al., 2020). Ses mécanismes physiopathologiques ont été précisés ces dernières années.

5.1 – Les principaux acteurs de la fibrogenèse rénale

5.1.1 – Le myofibroblaste, cellule effectrice de la fibrogenèse rénale

Les cellules effectrices de la fibrogenèse rénale sont les myofibroblastes (Leaf & Duffield, 2017; Ruiz-Ortega et al., 2020; Zeisberg et al., 2008). Ils partagent des propriétés des fibroblastes et des cellules musculaires lisses. Les marqueurs myofibroblastiques, qui ne sont

néanmoins pas spécifiques des myofibroblastes, sont l'actine muscle lisse alpha (α -SMA), la fibronectine, la vimentine, le collagène 1 α 1 et le récepteur β du facteur de croissance plaquettaire (PDGFR- β) (Humphreys, 2018; Lin et al., 2008). S'il est largement admis que les myofibroblastes sont les principales cellules productrices des composants de la MEC dans la fibrose rénale, l'origine des myofibroblastes rénaux reste débattue (Ruiz-Ortega et al., 2020). Les cellules résidentes du stroma rénal, constituées des péricytes rénaux, des fibroblastes périvasculaires et des cellules souches mésenchymateuses, sont la source majoritaire des myofibroblastes rénaux (Kramann et al., 2015). Il a également été montré que des cellules issues de la moelle osseuse (macrophages et fibrocytes) peuvent se différencier en myofibroblastes (Lin et al., 2008; Niedermeier et al., 2009; Reich et al., 2013; Reilkoff et al., 2011). La contribution des processus de transition épithélio-mésenchymateuse et endothélio-mésenchymateuse à la genèse des myofibroblastes a fait l'objet d'une abondante littérature mais reste débattue (Asada et al., 2011; De Palma et al., 2003, 2005; Deng et al., 2016; Humphreys, 2018; Humphreys et al., 2010; Koesters et al., 2010; Phua et al., 2013; Zeisberg et al., 2008).

5.1.2 – Le TGF- β , principal régulateur de la fibrogenèse rénale

Le TGF- β est la principale cytokine impliquée dans la prolifération, la migration et l'activation des myofibroblastes au cours de la fibrose rénale. Il favorise la transcription de molécules profibrosantes incluant les collagènes, la fibronectine et PAI-1 (Border, Okuda, Languino, & Ruoslahti, 1990; Haberstroh et al., 1993; Wilson et al., 1993). Le blocage du TGF- β 1 dans des modèles expérimentaux chez l'animal réduit l'activation des fibroblastes et les dépôts de collagène (Border, Okuda, Languino, Sporn, et al., 1990; Gruden et al., 2005; Isaka et al., 1993; López-Hernández & López-Novoa, 2012; Moon et al., 2006; Russo et al., 2007). Le TGF- β participe à de nombreuses autres réponses biologiques incluant la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation, l'autophagie et la réponse immunitaire (Meng et al., 2016).

La superfamille du TGF- β compte une soixantaine de composés parmi lesquels les trois isoformes TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3. La surexpression hépatique de la forme active du TGF- β 1 chez des souris transgéniques est suffisante pour induire la fibrogenèse dans de multiples organes, dont les reins (Sanderson et al., 1995). La voie de signalisation canonique du TGF- β implique la phosphorylation et l'activation de *small mothers against decapentaplegic* (Smad) 2 et Smad3 via son récepteur de type 1 (TGFR1). Des voies de signalisation non canoniques indépendantes de Smad ont également été décrites. Les 3 isoformes du TGF- β sont sécrétées sous la forme d'un précurseur inactif. Le clivage de ce précurseur dans sa région N-terminale libère le peptide de latence (LAP, *latency associated peptide*) qui s'associe au TGF- β mature et à la *latent TGF- β binding protein* (LTBP) (Robertson et al., 2015). Le complexe TGF- β /LAP/LTBP est un important réservoir de TGF- β . Il est fréquemment ancré dans la MEC et empêche le TGF- β d'interagir avec ses récepteurs cibles. Plusieurs enzymes peuvent cliver ce complexe et libérer la forme active du TGF- β , dont la MMP2, la MMP9 et la thrombospondine (Annes et al., 2003). Le TGF- β actif permet l'assemblage des homodimères inactifs TGFR2 et TGFR1, deux récepteurs membranaires à activité sérine/théronine kinase (**Figure 8**). Le TGFR2 active le TGFR1 par phosphorylation. Le TGFR1 activé phosphoryle Smad2 et Smad3, permettant le recrutement de Smad4, la formation du complexe Smad2/3/4 et sa translocation nucléaire. Le composé Smad3 du complexe Smad2/3/4 active les myofibroblastes et promeut la fibrogenèse par plusieurs mécanismes. Smad3 est un facteur de transcription de molécules pro-fibrosantes, dont α -SMA, le collagène I et les inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMP), impliquées dans l'activation des myofibroblastes et la synthèse de la MEC (Meng et al., 2016). Smad3 favorise également la transcription de microARN (miRNA) pro-fibrosants, le mieux documenté étant miR-21, et inhibe la transcription de miRNA anti-fibrosants (Chau et al., 2012; Chung & Lan, 2015; McClelland et al., 2015; Rudnicki et al., 2015; Zarjou et al., 2011; Zhong et al., 2011, 2013). Enfin, des modifications épigénétiques de l'ADN et des histones induites

par Smad3 modulent la transcription des gènes impliqués dans la fibrogenèse (Bian et al., 2014; Pan et al., 2013; Tampe et al., 2014; Xiao et al., 2015). Les composés Smad2 et Smad4 ne possèdent pas de site de liaison à l'ADN et mais régulent l'activité de Smad3 (Chen et al., 1999; Dennler et al., 1998; Piek et al., 2001; Yuan & Varga, 2001).

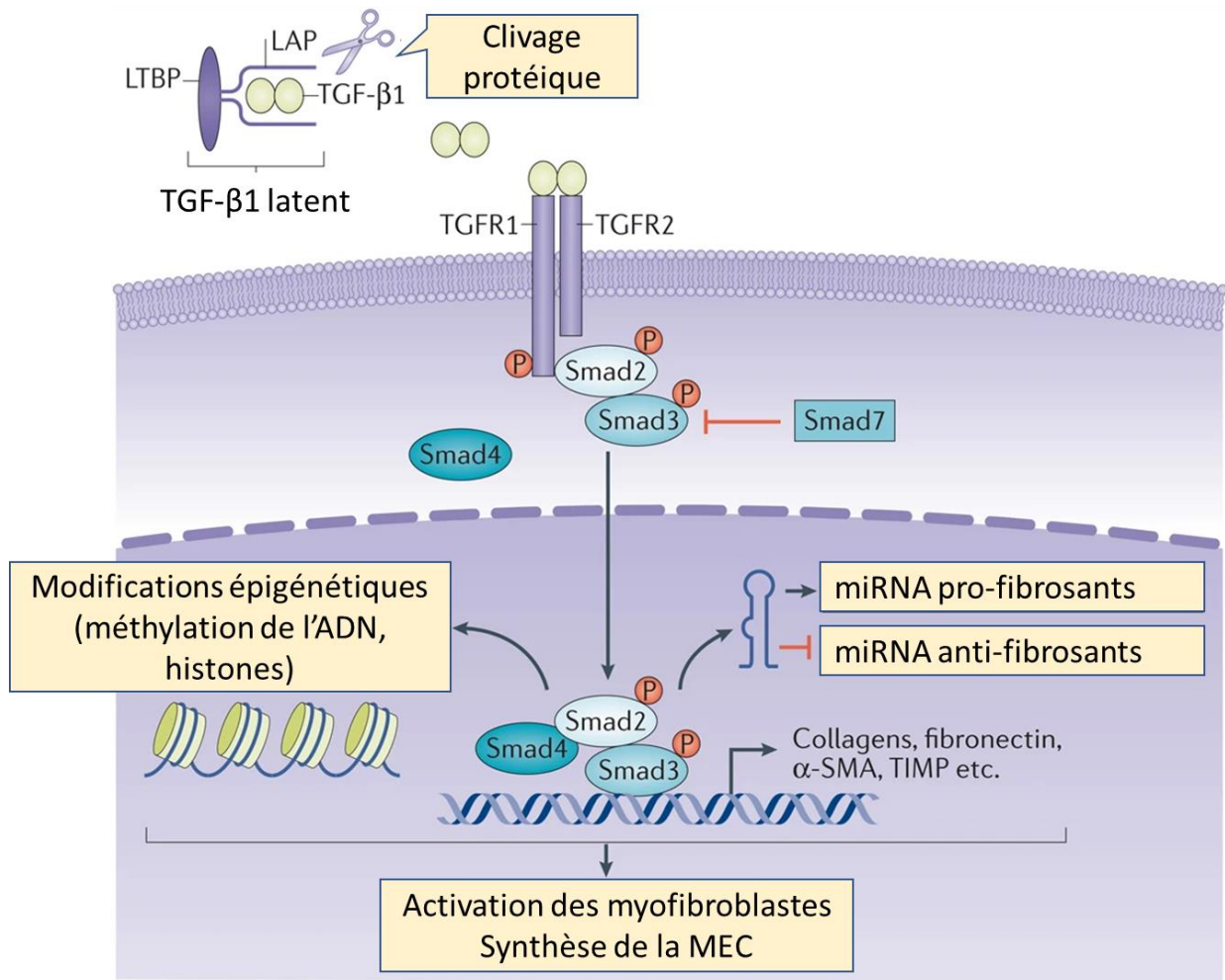


Figure 8 - Voie de signalisation canonique du TGF-β – Adapté de Meng et al. (2016).

Abréviations : α-SMA, actine musculée lisse alpha ; LAP, peptide de latence du TGF-β ; LTBP, *latent TGF-β binding protein* ; MEC, matrice extracellulaire ; miRNA, micro-ARN ; Smad, *small mothers against decapentaplegic* ; TGF, *transforming growth factor* ; TGFR1, récepteur de type 1 du TGF-β ; TGFR2, récepteur de type 2 du TGF-β ; TIMP, inhibiteur des métalloprotéinases matricielles

5.2 – Mécanismes de la transition insuffisance rénale aiguë – maladie rénale chronique

La recherche s'est largement intéressée aux mécanismes de la transition IRA-MRC ces dernières années. L'épithélium tubulaire rénal est constitué de cellules épithéliales polarisées disposées sur une membrane basale et soutenues par un tissu interstitiel. Les cellules adjacentes interagissent via des jonctions adhérentes, des desmosomes et des jonctions serrées. Elles créent ainsi un tapis continu de cellules qui facilite les transports de solutés. Lors d'une agression aiguë, les cellules tubulaires subissent différentes formes de mort cellulaire, de l'apoptose à la nécrose (Baisantry et al., 2019; Canaud et al., 2019; Ding et al., 2014; Djudjaj et al., 2017; Lenoir et al., 2016; Ortiz et al., 1997; Sancho-Martínez et al., 2015; Sanz et al., 2008; B. Yang et al., 2018; L. Yang et al., 2010). La mort cellulaire est caractérisée par la perte de la bordure en brosse, de la polarisation cellulaire et des interactions intercellulaires. Les cellules tubulaires lésées sécrètent des médiateurs de l'inflammation, qui contribuent à la majoration des lésions. Des mécanismes directs et indirects, via le recrutement de macrophages, ont été identifiés (**Figure 9**). Après la phase aiguë, les cellules tubulaires restantes participent à la régénération de l'épithélium tubulaire. Les mécanismes de réparation sont multiples, de l'autophagie à la réactivation de voies de signalisation impliquées dans le développement embryonnaire (dont Notch, Wnt/ β -caténine, Hedgehog et SOX9) qui régulent la différenciation cellulaire et la migration. Les changements phénotypiques des cellules tubulaires incluent la transition épithélio-mésenchymateuse partielle et l'induction de la sénescence (H. Jin et al., 2019; Ruiz-Ortega et al., 2020; Valentijn et al., 2018). Le dialogue entre les cellules tubulaires lésées et le compartiment interstitiel est l'un des acteurs majeurs de la progression de la fibrose rénale. En effet, les ligands de Wnt/ β -caténine et de Hedgehog libérés par les cellules tubulaires jouent un rôle paracrine direct dans la différenciation des cellules résidentes stromales en myofibroblastes activés. Il est également possible que les ruptures de la membrane basale tubulaire favorisent

l'activation des MMPs, indispensables au clivage du complexe inactif TGF- β /LAP/LTBP, et la migration interstitielle des myofibroblastes (Boutet et al., 2006; LeBleu et al., 2013). Ce dernier point est néanmoins très débattu actuellement. Tous ces remaniements contribuent à la différenciation et à l'activation des myofibroblastes, à la sécrétion des protéines de la MEC et, par suite, à la progression de la fibrose interstitielle.

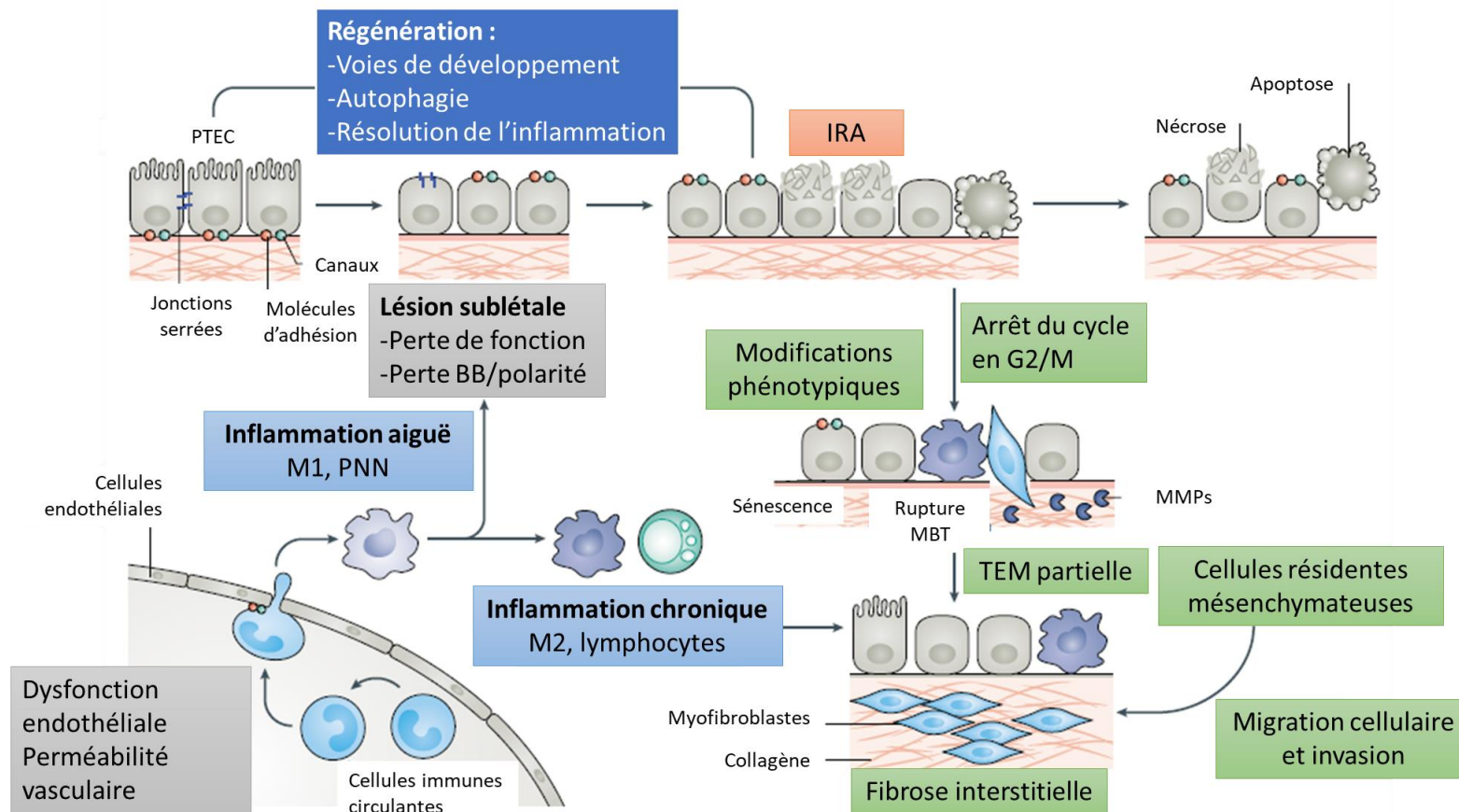


Figure 9 - Lésions tubulaires aiguës dans l'insuffisance rénale aiguë, transition insuffisance rénale aiguë – maladie rénale chronique et progression de la maladie rénale chronique. D'après Ruiz-Ortega et al. (2020).

Abréviations : BB, bordure en brosse ; M1, macrophages de type M1 ; M2, macrophages de type M2 ; MBT, membrane basale tubulaire ; MMPs, métalloprotéinases ; PNN, polynucléaires neutrophiles ; PTEC, cellule épithéliale tubulaire proximale ; TEM, transition épithélio-mésenchymateuse.

5.3 – Modèles expérimentaux murins de maladie rénale chronique

Peu de modèles expérimentaux murins de MRC permettent d'étudier concomitamment l'évolution de la fonction rénale et le développement d'une fibrose interstitielle significative. Les modèles expérimentaux de néphropathie diabétique et de néphropathie glomérulaire (Alport, IgA, lupus, anticorps anti-membranes basales glomérulaires) se caractérisent essentiellement par une albuminurie marquée sans lésion significative de fibrose interstitielle (Barutta et al., 2010; Betz & Conway, 2014; Graham & Schuurman, 2015; Kitada et al., 2016; Østergaard et al., 2017). Les lésions de fibrose interstitielle manquent également dans les modèles de néphropathie hypertensive (Bao et al., 2018; Guo et al., 2015).

Des modèles de transition IRA-MRC faisant suite à l'administration de toxiques comme le cisplatine, l'acide folique, l'acide aristolochique, la warfarine, le glycérol ou la gentamicine ont également été proposés. Le cisplatine (Ko et al., 2014; Morsy & Heeba, 2016; Xu et al., 2015), l'acide aristolochique (Matsui et al., 2011; Wu et al., 2014), la warfarine (Brodsky, 2014; Brodsky et al., 2011; Ozcan et al., 2012; Ware et al., 2011) et la gentamicine (Borouhaki et al., 2014; He et al., 2015; Heidarian et al., 2017) sont également néphrotoxiques chez l'homme. Les modèles expérimentaux utilisant ces molécules permettent ainsi de mieux comprendre leurs modes d'action et d'adapter la prise en charge des patients. L'acide folique est responsable d'une néphropathie cristalline chez le rongeur (Kumar et al., 2015; Soofi et al., 2013; Szczypka et al., 2005; Wen et al., 2012). Le glycérol quant à lui est un modèle expérimental de rhabdomyolyse (Geng et al., 2014; J. H. Kim et al., 2014). Ainsi, les spécificités propres à chacune de ces molécules rendent difficile la généralisation des conclusions à l'ensemble des causes de transition IRA-MRC.

Lorsqu'un délai suffisant est observé après l'obstruction, l'UUO permet d'observer les lésions histologiques de la MRC à savoir des lésions d'atrophie tubulaire, de fibrose interstitielle et d'inflammation interstitielle (Chevalier et al., 2009; Lecru et al., 2015; Misseri et al., 2004). La

présence du rein adelphe dans ce modèle ne permet cependant pas d'étudier l'impact d'éventuelles modulations thérapeutiques sur la fonction rénale.

Deux modèles expérimentaux permettent d'évaluer concomitamment la dysfonction rénale et les lésions histologiques de fibrose interstitielle : la néphrectomie des 5/6^{ème} et l'ischémie reperfusion avec sacrifice retardé. La néphrectomie des 5/6^{ème} s'accompagne initialement d'une néphropathie hypertensive avec hyperfiltration (Ergür et al., 2015; Tapia et al., 2012), et secondairement de lésions de glomérulosclérose, d'atrophie tubulaire et de fibrose interstitielle (Gong et al., 2016; D. H. Kim et al., 2009). Les principales limites de ce modèle sont une mortalité péri-opératoire élevée, la faible masse de tissu rénal lésé analysable et la résistance des souris C57BL/6 aux lésions tubulo-interstitielles dans ce contexte (Bao et al., 2018). Ces limites nous ont conduits à préférer le modèle d'ischémie reperfusion unilatérale avec néphrectomie controlatérale retardée (I/R-CKD)(Scarfe et al., 2019). Ce modèle reproduit en effet la transition IRA-MRC, situation fréquente en pratique clinique (Bao et al., 2018; Fu et al., 2018; Ruiz-Ortega et al., 2020; Scarfe et al., 2019). L'ischémie rénale unilatérale induite par le clampage du pédicule vasculaire s'accompagne de lésions tubulaires aiguës, d'une inflammation interstitielle et d'une dysfonction vasculaire (Agarwal et al., 2016; Bonventre & Yang, 2011; Linkermann et al., 2014; Sharfuddin & Molitoris, 2011). La néphrectomie controlatérale révèle le niveau d'insuffisance rénale. Retarder la néphrectomie permet non seulement de s'affranchir de la mortalité précoce liée à l'IRA, mais également d'aggraver les lésions chroniques. En effet, après l'I/R, le flux rénal sanguin est dirigé de façon préférentielle vers le rein sain controlatéral, prolongeant de ce fait l'hypoxie médullaire du rein qui a subi l'intervention (Fu et al., 2018; Gao et al., 2013; Scarfe et al., 2019). L'I/R-CKD constitue donc un modèle expérimental de transition IRA-MRC permettant d'évaluer la fonction rénale ainsi que les lésions histologiques de fibrose interstitielle. Les paramètres opératoires (température corporelle, durée de l'ischémie, délai entre l'I/R et la néphrectomie) modulent la sévérité du

modèle et doivent être précisément contrôlés (Bonventre & Yang, 2011; Fu et al., 2018; Le Clef et al., 2016; Scarfe et al., 2019).

OBJECTIFS

Notre hypothèse principale, que nous étayerons par une approche translationnelle, expérimentale chez l'animal et *in vitro* avec des cultures cellulaires, est que CB1R favorise la fibrogenèse rénale, indépendamment de sa cause, aussi bien sur les reins natifs que sur les greffons rénaux. Son inhibition (génétique ou pharmacologique), pourrait protéger le rein contre la progression des maladies rénales, faisant du blocage de CB1R une voie thérapeutique prometteuse dans le traitement de la fibrose rénale, de la MRC et de la dysfonction chronique de l'allogreffe (DCA).

Afin de démontrer cette hypothèse, les objectifs sont :

- 1) Démontrer que l'activation de CB1R est impliquée dans la fibrose rénale survenant au cours de la DCA :
 - a. Mise au point d'une technique morphométrique d'analyse d'image d'évaluation de la fibrose rénale ;
 - b. Approche translationnelle chez l'homme : quantification de l'expression de CB1R par immunohistochimie (IHC), recherche d'une corrélation entre l'expression de CB1R et la fibrose rénale, le score de Banff et les données cliniques ;
 - c. *In vitro* : étude de l'expression de CB1R dans un modèle de lésions tubulaires médiées par le tacrolimus et évaluation de l'effet du rimonabant, un agoniste inverse de CB1R, dans ce modèle.
- 2) Démontrer que l'inhibition de CB1R préserve la fonction rénale à la phase tardive d'un modèle expérimental murin d'ischémie-reperfusion (I/R-CKD) :
 - a. Démontrer que l'inhibition de CB1R, qu'elle soit génétique ou pharmacologique préserve la fonction rénale et réduit la fibrose rénale dans l'I/R-CKD ;

- b. Evaluer l'efficacité et la tolérance d'inhibiteurs pharmacologiques périphériques de CB1R de seconde génération (JD5037) et de troisième génération (composé X – agrément de confidentialité en cours) ;
 - c. Identifier la contribution des différents types cellulaires rénaux impliqués dans la fibrogénèse médiée par CB1R en utilisant un système cre-lox : inhibition génétique tubulaire de CB1R et inhibition génétique myofibroblastique de CB1R.
- 3) Caractériser *in vitro* l'effet de l'inhibition génétique et pharmacologique de CB1R sur les différents types de cellules possiblement impliquées dans la fibrogenèse que sont les cellules épithéliales tubulaires et les myofibroblastes :
- a. Développement de lignées de cellules primaires murines myofibroblastiques et tubulaires *Cnr1^{-/-}* et *Cnr1^{+/+}*
 - b. Préciser les conséquences du blocage de CB1R sur le phénotype, la sécrétion de collagène, la prolifération et la migration des cellules ainsi obtenues.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1 – Mise au point d’une technique morphométrique d’analyse d’image pour évaluer la fibrose rénale

1.1 - Introduction

La MRC est définie par un DFG < 60 mL/min/1,73 m² pendant plus de 3 mois ou par des anomalies fonctionnelles et/ou structurelles rénales (KDIGO, 2013). Le risque évolutif de la MRC est la progression vers l’IRT. De nombreuses études ont montré que la fibrose interstitielle (FI) rénale est corrélée à la fonction rénale (Farris et al., 2011; Schainuck et al., 1970). La FI est également prédictive du devenir rénal, qu’elle intéresse les reins natifs (Risdon et al., 1968; Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society et al., 2009) ou les greffons rénaux (Choi et al., 2005; Cosio et al., 2005; Grimm et al., 1999). Contrôler la progression de la FI voire la réduire sont donc des objectifs thérapeutiques majeurs dans la prise en charge de la MRC. Cela nécessite une quantification précise de la FI, non seulement chez l’homme pour préciser le pronostic de la MRC et guider les stratégies thérapeutiques, mais également dans les modèles expérimentaux chez l’animal pour évaluer de façon précise les pistes thérapeutiques anti-fibrosantes. L’évaluation de la FI en microscopie optique conventionnelle, notamment aux stades précoces, est particulièrement difficile et soumise à d’importantes variabilités intra- et inter-observateurs (Furness et al., 2001; Marcussen et al., 1995; Rowshani et al., 2006; Serón et al., 2002). Afin de s’affranchir de cette problématique, plusieurs équipes, dont la nôtre, ont proposé l’utilisation de techniques informatisées morphométriques d’analyse d’image (Diaz Encarnacion et al., 2004; Farris et al., 2011; Grimm et al., 2003; Pape et al., 2003; Servais et al., 2007, 2011; Street et al., 2014; Sund et al., 2004).

L'objectif de ce travail est donc de développer une nouvelle technique de quantification de la FI qui soit simple à mettre en œuvre et reproductible. Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité, la robustesse et la reproductibilité de notre solution informatique d'analyse d'image après coloration par le rouge Sirius, sans polarisation. Dans un second temps, nous avons appliqué cette technique à une cohorte de patients transplantés rénaux ayant reçu un greffon de Donneur Décédé après Arrêt Circulatoire (DDAC Maastricht II) et l'avons utilisée pour décrire l'évolution de la fibrose du greffon rénal au cours de la première année après la greffe.

1.2 – Article

Dao, M., Pouliquen, C., Duquesne, A., Posseme, K., Mussini, C., Durrbach, A., Guettier, C., François, H., & Ferlicot, S. (2020). Usefulness of morphometric image analysis with Sirius Red to assess interstitial fibrosis after renal transplantation from uncontrolled circulatory death donors. *Scientific Reports*, 10(1), 6894. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63749-3>



OPEN

Usefulness of morphometric image analysis with Sirius Red to assess interstitial fibrosis after renal transplantation from uncontrolled circulatory death donors


Myriam Dao^{1,2,8}, Christelle Pouliquen^{3,8}, Alyette Duquesne⁴, Katia Posseme⁵, Charlotte Mussini⁵, Antoine Durrbach⁶, Catherine Guettier⁵, Hélène Fran cois^{2,7,8}  & Sophie Ferlicot^{5,8}

Early interstitial fibrosis (IF) correlates with long-term renal graft dysfunction, highlighting the need for accurate quantification of IF. However, the currently used Banff classification exhibits some limitations. The aim of our study was to precisely describe the progression of IF after renal transplantation using a new morphometric image analysis method relying on Sirius Red staining. The morphometric analysis we developed showed high inter-observer and intra-observer reproducibility, with ICC [95% IC] of respectively 0.75 [0.67–0.81] ($n = 151$) and 0.88 [0.72–0.95] ($n = 21$). We used this method to assess IF (mIF) during the first year after the kidney transplantation from 66 uncontrolled donors after circulatory death (uDCD). Both mIF and interstitial fibrosis (ci) according to the Banff classification significantly increased the first three months after transplantation. From M3 to M12, mIF significantly increased whereas Banff classification failed to highlight increase of ci. Moreover, mIF at M12 ($p = 0.005$) correlated with mean time to graft function recovery and was significantly associated with increase of creatinemia at M12 and at last follow-up. To conclude, the new morphometric image analysis method we developed, using a routine and cheap staining, may provide valuable tool to assess IF and thus to evaluate new sources of grafts.

Chronic kidney disease (CKD) is a burden for Public Health and concerns millions of individuals worldwide. Kidney transplantation remains the optimal treatment for CKD, offering a better survival than dialysis and being cost-effectiveness^{1–3}.

In order to increase the pool of available donors in a setting of organ shortage, grafts from uncontrolled donors after circulatory death (uDCD) have been used in France since 2006. Several studies have shown that kidneys from DCD provide almost an equal function as kidneys from donation after brain death (DBD)^{4–13}. Moreover, as DBD kidney transplantation, DCD kidney transplantation is associated with increased survival of patients who have end-stage renal disease (ESRD) and are on the transplant waiting list¹⁴. Whereas early reports of uDCD showed good renal outcome and no increase in IF/TA compared to extended criteria DBD, other reported a very early and more severe development of IF/TA¹⁵ than in DBD.

Whatever the donor's status, chronic allograft dysfunction (CAD), which is the final result of different etiological and pathogenetic conditions, remains the first cause of graft loss^{16–20}. CAD corresponds to the irreversible

¹AP-HP, Service de Néphrologie adulte, Hôpital Necker, 75015, Paris, France. ²Inserm UMR_S 1155, Hôpital Tenon, 75020, Paris, France. ³Service d'Anatomie pathologique, Hôpital Foch, 92150, Suresnes, France. ⁴Service de Néphrologie, CHI André Grégoire, 93100, Montreuil, France. ⁵AP-HP, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital de Bicêtre, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France, Hôpitaux Universitaires Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁶AP-HP, Service de Néphrologie, Hôpital de Bicêtre, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France, Hôpitaux Universitaires Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁷AP-HP, Unité de Néphrologie et de Transplantation rénale, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, Sorbonne Université, Paris, France. ⁸These authors contributed equally: Myriam Dao, Christelle Pouliquen, Hélène François and Sophie Ferlicot.  e-mail: helene.francois@aphp.fr

replacement of functional renal tissue by extracellular matrix (ECM) proteins, leading to the progressive impairment of renal graft function. Among the pathological lesions observed during CAD, one of the most prominent is interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA). Other histological damages include glomerulosclerosis, splitting of glomerular capillary basement membranes and vascular intimal hyperplasia²¹. Many mechanisms which are of immunological origins or not, are involved in this multifactorial and complex process^{22–26}. The current concept states that many processes leading to graft fibrosis, i.e. IF/TA, occur early after the transplantation, especially within the first few months²⁷. IF/TA involves about 40% of kidney grafts at 3–6 months and up to 50% at 1 year, while renal function remains stable^{28,29}, which suggests that renal function is a suboptimal and late marker of kidney graft dysfunction. Up to now, the only reliable method to assess IF/TA is the histological evaluation of a graft biopsy^{30,31} which also allows to determine specific lesions and pathogenic processes affecting the graft^{22,23}. It is also well-known that early IF correlates with long-term graft dysfunction^{32–34}, highlighting the need for accurate quantification of IF to better identify patients requiring specific therapeutic interventions and to determine the efficacy of such interventions. IF in kidney graft is usually graded using the Banff classification³⁵. However, the Banff classification exhibits some limitations. The semi-quantitative evaluation in only 4 grades (0 to 3) prevents the precise evaluation of IF evolution and may be not sensitive enough in the early stages. Furthermore, studies have shown a wide interobserver variation in the assessment of renal graft biopsies using the Banff classification^{28,36–38}.

The aim of the study was to assess the initial progression of interstitial fibrosis and tubular atrophy in kidney grafts from uDCD formerly classified as “Maastricht II” non heart beating donors, using a new image analysis method based on Sirius Red staining.

In the first part of our work, we will evaluate the accuracy, the robustness and reproducibility of our computerized analysis method (mIF) to assess IF. In the second part, mIF will be applied to assess IF during the first year after kidney transplantation from uDCD and mIF score will be correlated with clinico-biological data.

Results

Validation and reliability tests of the image analysis method for the quantification of interstitial fibrosis (mIF). Among the 166 graft biopsies, 15 were rejected for image analysis because specimen adequacy was unsatisfactory (<7 glomeruli and/or no artery on the sample) according to the Banff criteria³⁹ or because the paraffin block was worn out. Measurement of interstitial fibrosis by image analysis (mIF) was performed on the 151 biopsies independently by two pathologists (CP and SF) (Fig. 1A). The value of inter-operator intraclass correlation coefficient (ICC) was 0.75 with its 95% confidence interval (95% CI) equal to [0.67–0.81] ($p = 8.4 \cdot 10^{-29}$) (Fig. 1B). To assess the intra-observer reproducibility, 21 consecutive graft biopsies were analyzed again by one of the pathologists (CP) 6 months later. The value of ICC was 0.88 with 95% CI of [0.72–0.95] ($p = 5.5 \cdot 10^{-8}$) (Fig. 1C). Analysis of interstitial fibrosis (ci) according to the Banff criteria (using Masson’s trichrome staining) exhibited inter-operator ICC of 0.78 with 95% CI of [0.70–0.84] ($p = 5.6 \cdot 10^{-25}$) (Fig. 1D). Then, we compared morphometric quantification of interstitial fibrosis and semi-quantitative analysis performed by an expert pathologist (SF) according to Banff criteria (Fig. 1E). The mIF score significantly increased ($p < 0.05$) between the four groups defined by the Banff classification. Mean mIF (%) was respectively 8.3 ± 2.4 (ranges: 4.3–15.8) in the ci0 group ($n = 40$), 10.7 ± 3.6 (ranges: 4.0–25.2) in the ci1 group ($n = 82$), 17.1 ± 6.4 (ranges: 9.8–36.6) in the ci2 group ($n = 18$) and 20.1 ± 8.0 (ranges: 5.7–32.7) in the ci3 group ($n = 11$). The correlation between mIF and Banff ci was 0.62 with 95% CI of [0.51–0.71] ($p < 0.001$). Discrepancies between ci and mIF were observed in only 2 cases. These cases were carefully reanalyzed: interstitial edema and inflammation were the main drawback to accurately quantify ci in Masson’s trichrome staining (Supplemental Fig. 1).

Clinical characteristics of the patients. The 66 patients who received kidney graft from uDCD included 14 females and 52 males. Mean age at the time of kidney transplantation was 44.7 ± 9.8 years old (median: 46; range: 20–59). Indications for kidney transplantation were hypertensive nephroangiosclerosis ($n = 16$), IgA nephropathy ($n = 7$), autosomal dominant polycystic kidney disease ($n = 6$), Alport syndrome ($n = 4$), diabetic nephropathy ($n = 3$), other glomerulopathies ($n = 5$), tubulo-interstitial nephritis ($n = 3$) and uropathy ($n = 4$). Nephropathy remained undetermined in 18 patients. All patients received induction therapy with anti-lymphocyte serum. They also received mycophenolate mofetil, corticosteroids and tacrolimus per local practice. Characteristics of the recipient patients are summarized in Table 1.

Uncontrolled DCD: Baseline characteristics, transplantation and clinical outcome. The 66 patients received kidney graft from 48 uDCD (Table 1). Donors included 9 females and 39 males and were 39.7 ± 8.5 years old (median: 40.5; range: 19–53). None of them had history of arterial hypertension or diabetes mellitus. Mean total warm ischemic time (tWIT) from cardiac arrest to *in situ* preservation was 145.9 ± 15.2 minutes (median: 148.5; ranges: 115–188). Mean cold ischemia was 16.2 ± 3.7 hours (median: 17.0, ranges: 10–23.8). Delayed graft function occurred in 54/66 patients (82%). Mean time between transplantation and renal graft recovery was 22.6 ± 9.8 days (median: 20, ranges: 1–58). Non-primary graft function occurred in 2 patients. Biopsy-proven acute rejection occurred in eight patients (12%). Mean LDH level reached a pic at Day 3 post transplantation (2539 ± 1089 IU/L) which was significantly associated with time to graft recovery (time to recovery according to LDH at D3: $y = 15.2 + 0.0025x$, $p = 0.016$, $R^2 = 0.1028$).

Histological features. Among the 48 uDCD, 43 underwent kidney biopsies (so called D0) before organ donation. Thereafter, 20 patients underwent kidney graft biopsy between 15 and 30 days (D15–30) post-transplantation for delayed graft function, 28 at 3 months (M3) and at 12 months (M12) for routine evaluation. Socio-demographic and clinical data were not significantly different between the patients who underwent biopsies at D15–30, M3 and M12. Histological features of biopsies are summarized in Table 2. Acute tubular

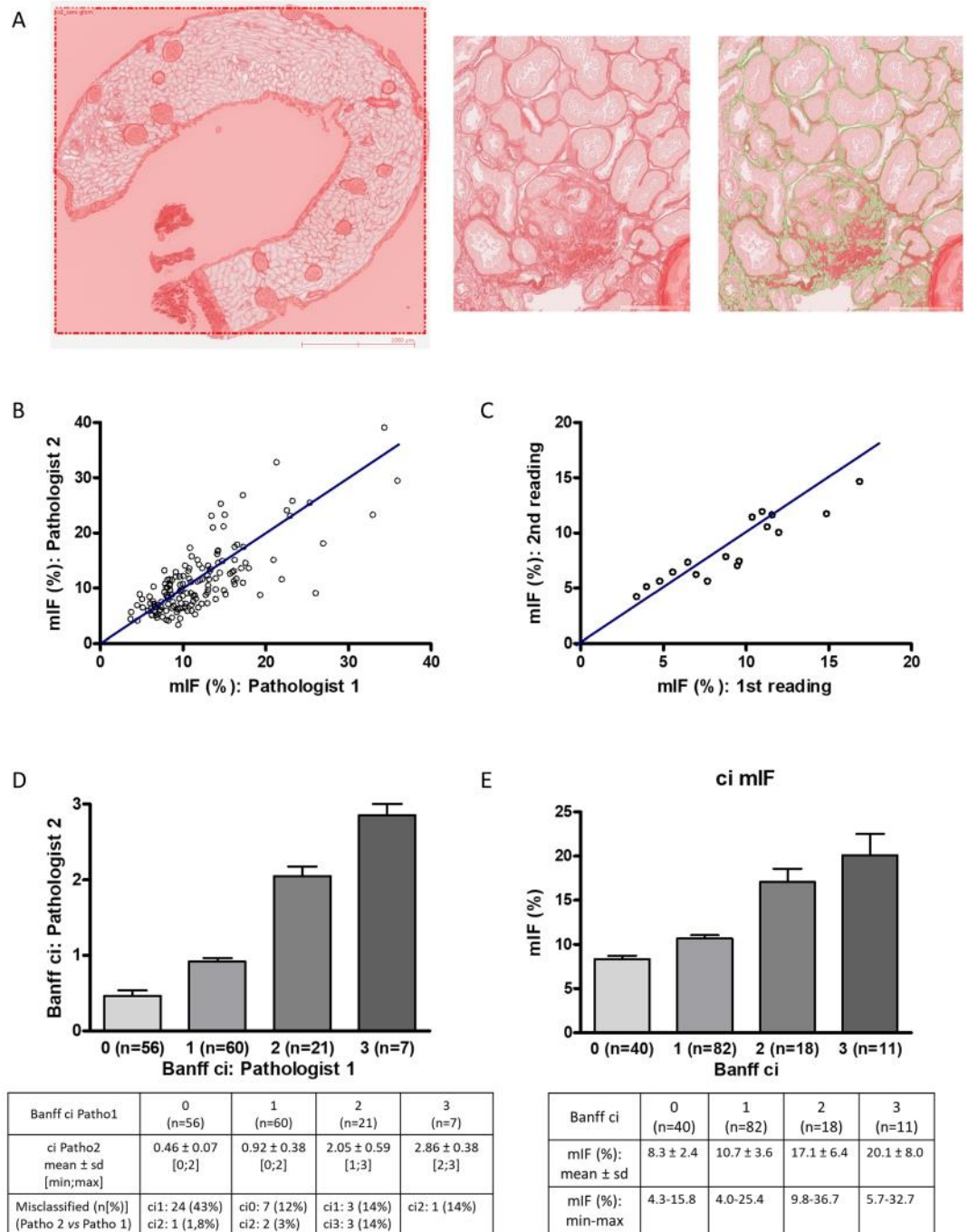


Figure 1. Quantification of interstitial fibrosis by image analysis: validation and reliability tests of the morphometric quantification of IF (mIF). **(A)** Morphometric analysis. Renal biopsy sections stained with Sirius red were captured by a ScanScope Aperio scanner (CS), using 20X objective. For each biopsy, the cortical section was manually selected. Glomeruli and medium-sized arteries were deleted by the operator. The red positive area was expressed as a percentage of the entire cortical kidney section using a computer-based morphometric analysis software (Calopix, Tribvn, Montrouge, France). **(B)** The value of inter-operator intraclass correlation coefficient (ICC) using mIF was 0.75 with its 95% confidence interval (95% CI) equal to [0.67–0.81] ($p < 10^{-3}$) ($n = 151$). **(C)** The value of intra-observer ICC of mIF was 0.88 with 95% CI of [0.72–0.95] ($p < 10^{-3}$) (21 consecutive graft biopsies were analyzed again 6 months later). **(D)** The value of inter-operator ICC using Banff criteria was 0.78 with 95% CI of [0.70–0.84] ($p < 10^{-3}$) ($n = 151$). **(E)** mIF according to Banff ci. Pearson correlation between mIF and Banff ci was 0.62 with 95% CI of [0.51–0.71] ($p < 10^{-3}$). Abbreviations: ci = interstitial cortical fibrosis; mIF, morphometric interstitial fibrosis; sd, standard deviation.

Donors characteristics (n = 48)		
Age (years)*		39.7 ± 8.5
Sex: male [n(%)]/female [n(%)]		39(81%)/9(19%)
BMI (kg/m ²)*		26.0 ± 4.5
Smoke history [n(%)]		28(58%)
Diabete mellitus [n(%)]		0(0%)
High blood pressure [n(%)]		0(0%)
Dyslipidemia [n(%)]		3(6%)
Ischemic times	No flow time (min)*	6.9 ± 8.0
	Low flow time (min)*	138.7 ± 14.4
	Total warm ischemic time (min)*	145.9 ± 15.2
	<i>In situ</i> cold perfusion time (min)*	148.7 ± 54.1
Recipients characteristics (n = 66)		
Age (years)*		44.7 ± 9.8
Sex: male [n(%)]/female [n(%)]		52(79%) / 14(21%)
ESRD cause	Nephroangiosclerosis [n(%)]	16(24%)
	Diabetes mellitus [n(%)]	3(5%)
	Glomerulopathies [n(%)]	16(24%)
	Tubulo-interstitial nephritis [n(%)]	4(6%)
	Polycystic kidney disease [n(%)]	6(9%)
	Malformative uropathies [n(%)]	4(6%)
	Unknown [n(%)]	17(26%)
Dialysis duration (months)* ^a		32.2 ± 28.8
PRA < 10% [n(%)]		66(100%)
Graft characteristics (n = 66)		
HLA mismatches (A + B + DR)*		4.5 ± 1.4
Machine perfusion [n(%)]		66(100%)
Rc lifeport at 30 min		0.21 ± 0.07
Cold ischemic time (hours)*		16.2 ± 3.7
Clinical outcome (n = 66)		
Delayed graft function [n(%)]		54(82%)
Time before graft recovery (days)* ^b		22.6 ± 9.8
Biopsy-proven acute rejection [n(%)]		8(12%)

Table 1. Characteristics of donors, recipients and grafts. Abbreviations: ESRD, End-stage renal disease; HLA, Human Leukocytes Antibodies; PRA, panel reactive antibodies. *Numeric data are expressed by mean ± standard deviation. ^aPreemptive transplantation: n = 3. ^bNon-primary graft function: n = 2.

injury significantly decreased from D0 to D15–D30 ($63\% \pm 28\%$ versus $47\% \pm 22\%$, $p = 0.036$), then to M3 ($9\% \pm 11\%$, $p < 10^{-3}$) and M12 ($4\% \pm 6\%$, $p = 0.016$). Conversely, chronic lesions, especially interstitial fibrosis and tubular atrophy, significantly increased over time. According to the Banff staging system, interstitial fibrosis remained unchanged from D0 to D15/30 (0.6 ± 0.5 at D0, 0.7 ± 0.6 at D15/30), increased from D0 to M3 (0.6 ± 0.5 versus 1.5 ± 0.8 , $p < 10^{-3}$) and remained stable between M3 and M12 (1.7 ± 0.9 versus 1.5 ± 0.8 , $p = 0.37$) (Fig. 2A).

mIF significantly increased after the transplantation and correlated with clinical outcome.

Image analysis IF was $8.4\% \pm 3.8\%$ at D0, $10.0\% \pm 3.9\%$ at D15–D30, $13.6\% \pm 6.7\%$ at M3 and $15.9\% \pm 5.2\%$ at M12 (Fig. 2B). Increase was significant from D0 to M3 ($p < 10^{-3}$). Conversely to ci according to the Banff scoring system, increase of mIF remained significant from M3 to M12 ($p = 0.021$). Fibrosis tended to increase as early as the first month after renal transplant ($p = 0.056$). Most of the patients underwent more than one kidney biopsy. Among them, seven patients underwent early kidney graft biopsy between D7 and D30 and protocol biopsies at M3 and at M12 (Supplemental Fig. 2). In these paired cases, mIF significantly increased from first month to M3 (respectively $7.8\% \pm 1.8\%$ and $11.4\% \pm 2.7\%$, $p < 0.01$) then from M3 to M12 (respectively $11.4\% \pm 2.7\%$ and $17.7 \pm 4.8\%$, $p = 0.02$). In these cases, Banff classification failed to demonstrate early increase of ci from first month to M3 (respectively 0.88 ± 0.35 and 1.3 ± 0.46 , $p = 0.08$).

Baseline characteristics of uDCD (sex, age), tWIT and cold ischemia were not associated with mIF at any time. mIF at M12 ($R^2 = 0.29$, $p = 0.005$) but not at D0, D15–30 and M3 correlated with mean time to renal graft function recovery. In addition, mIF at M12 correlated with increase of creatininemia at M12 ($R^2 = 0.32$, $p = 0.013$) and at last follow-up ($R^2 = 0.29$, $p = 0.005$). We found the same correlation using the Banff scoring system, however, whereas there was no correlation between ci according to the Banff scoring system at M3 and creatininemia at M12 ($R^2 = 0.15$, $p = 0.18$), mIF at M3 tended to be associated with increase of creatininemia at M12 ($R^2 = 0.31$, $p = 0.057$).

	D0 (n = 43)	D15-D30 (n = 20)	M3 (n = 28)	M12 (n = 28)	p value
Acute lesions:					
Glomerulitis « g »	0 ± 0	0.2 ± 0.4	0.08 ± 0.3	0.07 ± 0.3	0.12
Peritubular capillaritis « ptc »	0 ± 0	0.1 ± 0.3	0.08 ± 0.3	0.04 ± 0.2	0.41
Interstitial inflammation « i »	0 ± 0	0.2 ± 0.7	0.3 ± 0.5	0.07 ± 0.3	0.01
Total inflammation « ti »	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.7	0.6 ± 0.8	0.8 ± 0.8	<0.001
Tubulitis « t »	0 ± 0	0.2 ± 0.7	0.2 ± 0.4	0.1 ± 0.4	0.03
Intimal arteritis « v »	0 ± 0	0 ± 0	0.04 ± 0.2	0.04 ± 0.2	0.54
Acute tubular injury (%)	63 ± 28	47 ± 22	9 ± 11	4 ± 6	<0.05
Chronic lesions:					
Sclerotic glomeruli	3.5 ± 5.1	2.0 ± 3.5	4.4 ± 6.7	9.0 ± 14.0	0.11
Allograft glomerulopathy « cg »	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.04 ± 0.2	0.37
Mesangial matrix increase « mm »	0 ± 0	0 ± 0	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.5	0.01
Interstitial fibrosis « ci »	0.6 ± 0.5	0.7 ± 0.6	1.5 ± 0.8	1.7 ± 0.9	<0.001
Tubular atrophy « ct »	0.2 ± 0.5	0.4 ± 0.5	1.2 ± 0.8	1.5 ± 0.9	<0.001
Vascular fibrous intimal thickening « cv »	0.3 ± 0.5	0.8 ± 0.9	1.0 ± 1.1	0.7 ± 0.9	<0.01
Arteriolar hyaline thickening « ah »	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.6	0.4 ± 0.6	0.49
C4d (immunofluorescence):					
Negative (0 or minimal 1)	37/37(100%) ^a	15/17(88%) ^b	24/25(96%) ^b	25/26(96%) ^c	0.22
Positive (focal 2 or diffuse 3)	0/37(0%) ^a	2/17(12%) ^b	1/25(4%) ^b	1/26(4%) ^c	0.22
Rejection:					
Antibody-mediated rejection (n)	NA	2 ^d	1 ^e	1 ^e	
Borderline rejection (n)	NA	0	4	3	
T-cell-mediated rejection (n)	NA	1 ^f	0	1 ^g	
Other lesions:					

Table 2. Histological features of renal biopsies at D0, D15-D30, M3 and M12. Digital data are means ± standard deviation. ^aNA = 6. ^bNA = 3. ^cNA = 2. ^dAntibody-mediated rejection included: 1 acute antibody-mediated rejection, and 1 “suspicious” for acute antibody-mediated rejection. ^eacute antibody-mediated rejection. ^fgrade Ib. ^gchronic T-cell mediated rejection.

Discussion

The aim of this study was to precisely describe the evolution of IF after renal transplantation with uDCD, using a new computerized image analysis method. Indeed, IF is one of the most prominent pathological lesions of CAD and correlated with renal graft prognosis^{32–34} but the currently used Banff classification is a semi-quantitative system which prevents precise description of IF evolution and may not be sensitive enough in early stages. Slight but significant increase of IF on renal graft may be missed. Grimm *et al.* demonstrated that a precise quantification of IF by computerized image analysis provides a better surrogate marker for time to graft failure than any combination of chronic lesion scoring using the Banff schema³⁴. Moreover, some studies also exhibited a wide inter-observer variation in the IF assessment according to the Banff classification^{36,37}. The morphometric analysis we developed exhibited high inter-observer and intra-observer reproducibility, with ICC [95% IC] of respectively 0.79 [0.74–0.83] and 0.88 [0.72–0.95]. A variety of techniques have been used to measure renal fibrosis, each with its own advantages and disadvantages. We decided to assess IF with unpolarized Sirius red staining, firstly because Sirius red staining is commonly used in pathological laboratories since the 1980s⁴⁰, especially to assess liver fibrosis^{41–45}, secondly because to its high specificity for collagen fibers and its previously demonstrated superiority compared to polarized Sirius Red and trichrome staining^{46–49}. Indeed, IF is typically considered to be an excess accumulation of fibrillary collagen. Types I and III collagen represent almost all collagens synthesized by fibroblasts and often predominate in fibrotic scars. Sirius red dye molecules intercalate into the tertiary groove in the structure of types I and III collagen and are strongly birefringent when observed under polarized light. Polarized Sirius Red analysis exhibited good results in IF assessment^{34,49,50} but it requires individual fields to be photographed in polarized light and analyzed or cost-expensive whole slide scanners capable of polarized light. Similarly, trichrome staining, that is commonly used to the visual assessment of collagen content in the interstitium, has also been used to quantify IF by image analysis, with good results^{51,52}. However, studies demonstrated that unpolarized Sirius Red had not only the best correlation with estimated glomerular filtration rate (GFR)^{47,48} compared to polarized Sirius Red and trichrome staining, but also significant correlation with the decrease of GFR³³.

In our uDCD cohort, both mIF and ci according to the Banff classification significantly increased the first three months after renal transplantation. From M3 to M12, mIF significantly increased whereas Banff classification failed to highlight increase of ci. Then, mIF may be more accurate than semiquantitative Banff evaluation to identify the effects of antifibrotic therapeutic interventions. Morphometric IF tended to increase in the first month after renal transplantation but without reaching significance, due to the limited size of sample, graft biopsies being not systematically performed during the first month. However, this early and sensitive quantification of IF may be a very valuable surrogate marker to study therapeutic intervention aiming the early development of IF in kidney transplantation. Moreover, whereas increase of creatinemia at M12 was not associated with ci

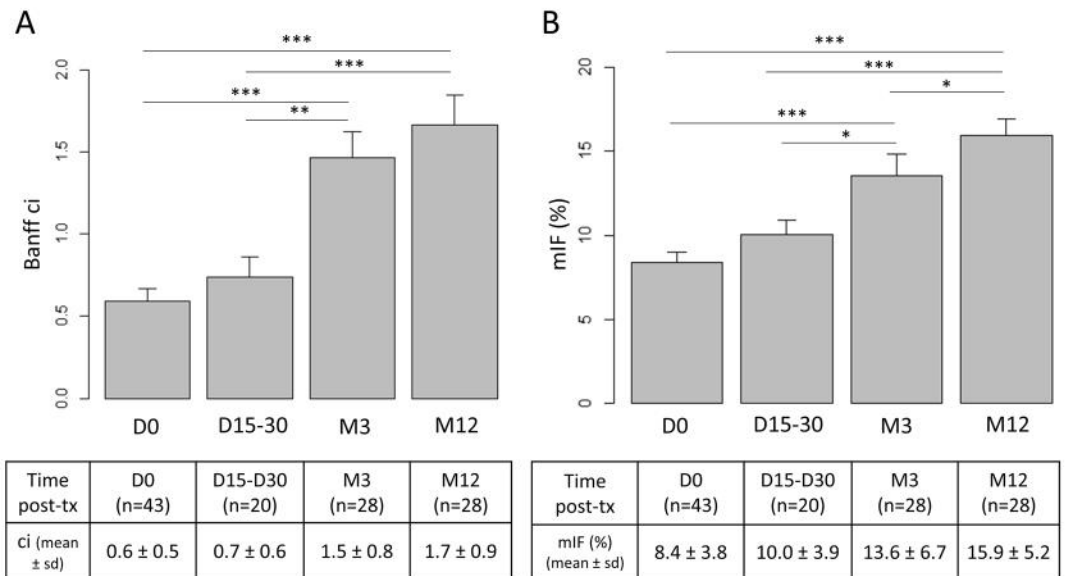


Figure 2. Interstitial fibrosis (IF) significantly increased after renal graft transplantation. **(A)** According to the Banff criteria, ci remained unchanged from D0 to D15/30, increased from D0 to M3 ($p < 10^{-3}$) and remained stable between M3 and M12 ($p = 0.37$). **(B)** Using morphometry analysis, mIF tended to increase as early as the first month after renal transplant ($p = 0.056$), increase was significant from D0 to M3 ($p < 10^{-3}$) and remained significant from M3 to M12 ($p = 0.021$). Abbreviations: ci = interstitial cortical fibrosis; mIF, morphometric interstitial fibrosis; sd, standard deviation; tx, renal transplantation; * $p < 0.05$; *** $p < 10^{-3}$. Figure was performed using R software⁵⁸.

according to the Banff scoring system at M3, it tended to be associated with mIF at M3, suggesting usefulness of a more sensitive quantification analysis.

In our study, mIF at M12 was significantly associated with increase of creatinemia at M12 and at last follow-up, which confirms the need for a precise assessment of IF.

IF, which corresponds to the replacement of renal functional tissue by ECM, is not only a major concern after kidney transplantation, but also during CKD in native kidneys. Indeed, renal fibrosis still represents the final target to treat CKD⁵³. Surprisingly, few studies have focused on morphometric quantification of IF on native kidneys^{54,55}. Hunter *et al.*⁵⁴ demonstrated that high collagen matrix index and fibrillary collagen index, both assessed by quantitative morphometry after Sirius Red staining, predicted relapse and progression to ESRD during lupus nephritis. Similarly, Gibyeli Genek *et al.*⁵⁵ performed a quantitative evaluation of IF with Sirius Red in IgA nephritis and highlighted that such evaluation might serve as an effective novel method to determine the prognosis in IgA nephritis.

To conclude, the new morphometric image analysis method we developed, using a routine and cheap staining, may provide valuable tool to assess IF during chronic allograft dysfunction and thus to evaluate new sources of grafts. The use of this method to describe CKD on native kidney should also be evaluated.

Methods

Patients. After institutional review board, we retrospectively included all the 66 patients who received a kidney graft from uDCD between 2007 and 2012 in Bicêtre hospital. Kidney donation followed the 2008 Declaration of Istanbul principles and the French Agence Nationale de la Biomédecine regulation. Research was approved by the committee of the Centre de Ressources Biologiques (CRB, Paris Sud University). Informed written consent was given by all the patients for the scientific use of the graft biopsies in the CRB, Paris Sud University. All procedures and the use of tissues were performed in accordance with the Declaration of Helsinki principles. Clinical reports and biological data were collected from the associated clinical database.

Histological review of kidney graft biopsies. A total of 166 kidney graft biopsies was performed in the 66 patients. The biopsies were processed for routine light microscopy, as we previously described⁵⁶. Biopsy samples were fixed in formalin, acetic acid and alcohol (AFA), paraffin-embedded and sliced 2.5 μm thick. Slides were stained with HES (hematoxylin, eosin and saffron), Masson's trichrome (3 sections), periodic acid Schiff, Jones methenamine silver and Sirius red. Third Masson's trichrome and Sirius red staining were consecutive. Kidney graft biopsies were reviewed independently by 2 pathologists (CP and SF) for histological features according to Banff recommendations³⁵ in a blind manner from clinical data. Immunostaining for C4d was performed using a rabbit monoclonal A24-T anti-human C4d antibody (DB Biotech, Kosice, Slovak Republic; dilution 1/100) and a Leica BOND-MAX™ autostainer (Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK). Epitope retrieval was achieved using the ready-to-use Bond Epitope Retrieval Solution 1 (Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK) after 30 min heating.

Quantification of interstitial fibrosis by image analysis. Renal biopsy sections sliced 2.5 µm sliced and stained with Sirius red were digitalized by a ScanScope Aperio scanner (CS), using 20X objective. For each biopsy, the cortical section, defined as the part inside the renal capsule and outside the medulla, was manually selected on digital slides. Glomeruli and medium-sized arteries were deleted by the operator.

Renal-cortex fibrosis was quantified using a computer-based morphometric analysis software (Calopix, Tribvn Healthcare, Châtillon France) as previously published^{56,57}. Briefly, the operator manually selects internal Sirius Red negative areas and positive areas and next runs the software that show the final selection of the Red area. The internal negative control step allows the comparison of slides that are sequentially stained in various batches of Sirius Red since staining usually may vary. Finally, the result was expressed as a percentage of the red positive area on the total cortical surface. Morphometric analyses were performed twice for each biopsy in an independent manner by two pathologists (CP and SF) who had no knowledge of the clinical data.

Statistical analyzes. Descriptive statistical methods (means, medians, standard deviations and ranges) were used to assess the distributions of variables. Wilcoxon rank sum and *t* tests for continuous variables, Fisher's exact and chi-squared tests for categorical variables were performed. The intraclass correlation coefficient (ICC) with its 95% CI was used to study the reproducibility of morphometric IF (mIF) measures. Correlations between quantitative variables were assessed with Pearson product-moment correlation coefficient. For all analyses, a *p* value <0.05 was regarded as significant. Analyses were performed using R software (version 3.2.0)^{58,59}, InStat 3 software (GraphPad Software, San Diego, CA) and Prism 4 (GraphPad Software).

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 17 October 2019; Accepted: 19 March 2020;

Published online: 23 April 2020

References

1. Wolfe, R. A. *et al.* Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1725–1730 (1999).
2. Savoye, E., Tamarelle, D., Chalem, Y., Rebibou, J.-M. & Tuppin, P. Survival benefits of kidney transplantation with expanded criteria deceased donors in patients aged 60 years and over. *Transplantation* **84**, 1618–1624 (2007).
3. Bayat, S., Kessler, M., Briançon, S. & Frimat, L. Survival of transplanted and dialysed patients in a French region with focus on outcomes in the elderly. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25**, 292–300 (2010).
4. Wijnen, R. M. *et al.* Outcome of transplantation of non-heart-beating donor kidneys. *Lancet* **345**, 1067–1070 (1995).
5. Cho, Y. W., Terasaki, P. I., Cecka, J. M. & Gjertson, D. W. Transplantation of kidneys from donors whose hearts have stopped beating. *N. Engl. J. Med.* **338**, 221–225 (1998).
6. Weber, M., Dindo, D., Demartines, N., Ambühl, P. M. & Clavien, P.-A. Kidney transplantation from donors without a heartbeat. *N. Engl. J. Med.* **347**, 248–255 (2002).
7. Brook, N. R., Waller, J. R. & Nicholson, M. L. Nonheart-beating kidney donation: current practice and future developments. *Kidney Int.* **63**, 1516–1529 (2003).
8. Koffman, G. & Gambaro, G. Renal transplantation from non-heart-beating donors: a review of the European experience. *J. Nephrol.* **16**, 334–341 (2003).
9. Arias-Diaz, J., Alvarez, J., del Barrio, M. R. & Balibrea, J. L. Non-heart-beating donation: current state of the art. *Transplant. Proc.* **36**, 1891–1893 (2004).
10. Alonso, A. *et al.* Renal transplantation from non-heart-beating donors: a single-center 10-year experience. *Transplant. Proc.* **37**, 3658–3660 (2005).
11. Gagandeep, S. *et al.* Expanding the donor kidney pool: utility of renal allografts procured in a setting of uncontrolled cardiac death. *Am. J. Transplant.* **6**, 1682–1688 (2006).
12. Kokkinos, C. *et al.* Outcome of kidney transplantation from nonheart-beating versus heart-beating cadaveric donors. *Transplantation* **83**, 1193–1199 (2007).
13. Sánchez-Fructuoso, A. I. *et al.* Victims of cardiac arrest occurring outside the hospital: a source of transplantable kidneys. *Ann. Intern. Med.* **145**, 157–164 (2006).
14. Snoeijis, M. G. *et al.* Kidneys from donors after cardiac death provide survival benefit. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1015–1021 (2010).
15. Viglietti, D. *et al.* Kidney allograft fibrosis after transplantation from uncontrolled circulatory death donors. *Transplantation* **99**, 409–415 (2015).
16. Lamb, K. E., Lodhi, S. & Meier-Kriesche, H.-U. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am. J. Transplant.* **11**, 450–462 (2011).
17. Haas, M. Chronic allograft nephropathy or interstitial fibrosis and tubular atrophy: what is in a name? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **23**, 245–250 (2014).
18. Cosio, F. G., El Ters, M., Cornell, L. D., Schinstock, C. A. & Stegall, M. D. Changing Kidney Allograft Histology Early Posttransplant: Prognostic Implications of 1-Year Protocol Biopsies. *Am. J. Transplant.* **16**, 194–203 (2016).
19. Hart, A. *et al.* OPTN/SRTR 2015 Annual Data Report: Kidney. *Am. J. Transplant.* **17**(Suppl 1), 21–116 (2017).
20. Stegall, M. D., Cornell, L. D., Park, W. D., Smith, B. H. & Cosio, F. G. Renal Allograft Histology at 10 Years After Transplantation in the Tacrolimus Era: Evidence of Pervasive Chronic Injury. *Am. J. Transplant.* <https://doi.org/10.1111/ajt.14431> (2017).
21. Solez, K. *et al.* Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am. J. Transplant* **7**, 518–526 (2007).
22. Racusen, L. C. & Regele, H. The pathology of chronic allograft dysfunction. *Kidney Int. Suppl.* S27–32, <https://doi.org/10.1038/kj.2010.419> (2010).
23. Pascual, J., Pérez-Sáez, M. J., Mir, M. & Crespo, M. Chronic renal allograft injury: early detection, accurate diagnosis and management. *Transplant. Rev.* **26**, 280–290 (2012).
24. Sellarés, J. *et al.* Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am. J. Transplant.* **12**, 388–399 (2012).
25. Heemann, U. & Lutz, J. Pathophysiology and treatment options of chronic renal allograft damage. *Nephrol. Dial. Transplant.* **28**, 2438–2446 (2013).

26. Maluf, D. G. *et al.* Evaluation of molecular profiles in calcineurin inhibitor toxicity post-kidney transplant: input to chronic allograft dysfunction. *Am. J. Transplant.* **14**, 1152–1163 (2014).
27. Torres, I. B., Moreso, F., Sarró, E., Meseguer, A. & Serón, D. The Interplay between inflammation and fibrosis in kidney transplantation. *BioMed Res. Int.* **2014**, 750602 (2014).
28. Serón, D. *et al.* Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies. *Kidney Int.* **61**, 727–733 (2002).
29. Melk, A., Schmidt, B. M. W., Vongwiwatana, A., Rayner, D. C. & Halloran, P. F. Increased expression of senescence-associated cell cycle inhibitor p16INK4a in deteriorating renal transplants and diseased native kidney. *Am. J. Transplant.* **5**, 1375–1382 (2005).
30. Serón, D. *et al.* Protocol renal allograft biopsies and the design of clinical trials aimed to prevent or treat chronic allograft nephropathy. *Transplantation* **69**, 1849–1855 (2000).
31. Yilmaz, S. *et al.* Protocol core needle biopsy and histologic Chronic Allograft Damage Index (CADI) as surrogate end point for long-term graft survival in multicenter studies. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 773–779 (2003).
32. Serón, D. *et al.* Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int.* **51**, 310–316 (1997).
33. Pape, L. *et al.* Computer-assisted quantification of fibrosis in chronic allograft nephropathy by picosirius red-staining: a new tool for predicting long-term graft function. *Transplantation* **76**, 955–958 (2003).
34. Grimm, P. C. *et al.* Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1662–1668 (2003).
35. Roufosse, C. *et al.* A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation*, <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002366> (2018).
36. Marcussen, N., Olsen, T. S., Benediktsson, H., Racusen, L. & Solez, K. Reproducibility of the Banff classification of renal allograft pathology. Inter- and intraobserver variation. *Transplantation* **60**, 1083–1089 (1995).
37. Furness, P. N. & Taub, N. & Convergence of European Renal Transplant Pathology Assessment Procedures (CERTPAP) Project. International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: report of the CERTPAP Project. *Kidney Int.* **60**, 1998–2012 (2001).
38. Furness, P. N. *et al.* International variation in histologic grading is large, and persistent feedback does not improve reproducibility. *Am. J. Surg. Pathol.* **27**, 805–810 (2003).
39. Solez, K. *et al.* Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am. J. Transplant.* **8**, 753–760 (2008).
40. Junqueira, L. C., Bignolas, G. & Brentani, R. R. Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* **11**, 447–455 (1979).
41. López-De León, A. & Rojkind, M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J. Histochem. Cytochem.* **33**, 737–743 (1985).
42. Moragas, A. *et al.* Cirrhotic changes in livers from children undergoing transplantation. Image analysis. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **14**, 359–366 (1992).
43. Manabe, N. *et al.* Interferon-alpha 2b therapy reduces liver fibrosis in chronic non-A, non-B hepatitis: a quantitative histological evaluation. *Hepatology* **18**, 1344–1349 (1993).
44. Calvaruso, V. *et al.* Computer-assisted image analysis of liver collagen: relationship to Ishak scoring and hepatic venous pressure gradient. *Hepatology* **49**, 1236–1244 (2009).
45. Huang, Y. *et al.* Image analysis of liver collagen using sirius red is more accurate and correlates better with serum fibrosis markers than trichrome. *Liver Int.* **33**, 1249–1256 (2013).
46. De Heer, E. *et al.* Morphometry of interstitial fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **15**(Suppl 6), 72–73 (2000).
47. Diaz Encarnacion, M. M. *et al.* Correlation of quantitative digital image analysis with the glomerular filtration rate in chronic allograft nephropathy. *Am. J. Transplant.* **4**, 248–256 (2004).
48. Farris, A. B. *et al.* Morphometric and visual evaluation of fibrosis in renal biopsies. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 176–186 (2011).
49. Street, J. M. *et al.* Automated quantification of renal fibrosis with Sirius Red and polarization contrast microscopy. *Physiol. Rep.* **2**, (2014).
50. Sund, S., Grimm, P., Reisaeter, A. V. & Hovig, T. Computerized image analysis vs semiquantitative scoring in evaluation of kidney allograft fibrosis and prognosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 2838–2845 (2004).
51. Servais, A. *et al.* Quantification of interstitial fibrosis by image analysis on routine renal biopsy in patients receiving cyclosporine. *Transplantation* **84**, 1595–1601 (2007).
52. Servais, A. *et al.* Interstitial fibrosis evolution on early sequential screening renal allograft biopsies using quantitative image analysis. *Am. J. Transplant.* **11**, 1456–1463 (2011).
53. François, H. & Chatziantoniou, C. Renal fibrosis: Recent translational aspects. *Matrix Biol. J.*, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.013> (2017).
54. Hunter, M. G., Hurwitz, S., Bellamy, C. O. C. & Duffield, J. S. Quantitative morphometry of lupus nephritis: the significance of collagen, tubular space, and inflammatory infiltrate. *Kidney Int.* **67**, 94–102 (2005).
55. Gibyeli Genek, D. *et al.* Quantitative evaluation of interstitial fibrosis with Sirius Red in IgA nephritis. *Ren. Fail.* **36**, 73–77 (2014).
56. Dao, M. *et al.* The cannabinoid receptor 1 is involved in renal fibrosis during chronic allograft dysfunction: Proof of concept. *J. Cell. Mol. Med.* <https://doi.org/10.1111/jcmm.14570> (2019).
57. Lecru, L. *et al.* Cannabinoid receptor 1 is a major mediator of renal fibrosis. *Kidney Int.* **88**, 72–84 (2015).
58. R Core Team. R. A Language and Environment for Statistical Computing. (R Foundation for Statistical Computing, 2017).
59. Gamer, M., Lemon, J. & Singh, I.F.P. Various Coefficients of Interrater Reliability and Agreement. (R package version 0.84.1, 2019).

Author contributions

M.D.⁺: conception of the work, data collection, data analysis and interpretation, drafting the article; C.P.⁺: conception of the work, data collection, data analysis and interpretation, critical revision of the article; A.D.: conception of the work, data collection, data analysis and interpretation, critical revision of the article; K.P.: data collection; C.M.: data analysis and interpretation, critical revision of the article; A.D.: revision of the article and Head of the Division of the Bicetre nephrology and transplantation department from which the patients were recruited; C.G.: conception of the work, critical revision of the article; H.F.[§]: conception of the work, data collection, data analysis and interpretation, drafting the article; S.F.[§]: conception of the work, data collection, data analysis and interpretation, drafting the article. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63749-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to H.F.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

1.3 – Discussion

La fonction rénale et la progression de la MRC sont étroitement corrélées à l'importance de la FI (Choi et al., 2005; Cosio et al., 2005; Farris et al., 2011; Grimm et al., 1999; Risdon et al., 1968; Schainuck et al., 1970; Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society et al., 2009). La quantification précise de la FI est donc indispensable pour préciser le pronostic de la MRC, guider la thérapeutique et évaluer l'impact des thérapeutiques proposées. La lecture conventionnelle en microscopie optique manque de reproductibilité (Furness et al., 2001; Marcussen et al., 1995; Rowshani et al., 2006; Serón et al., 2002), en particulier aux stades précoces de la FI. Nous avons développé une nouvelle technique morphométrique d'analyse informatisée de la fibrose rénale (mIF) après coloration par le rouge Sirius. Nous avons mis en évidence une grande reproductibilité de cette technique avec des index de corrélation intra-classe intra-observateur et inter-observateur respectivement à 0,88 [0,72-0,95] et 0,79 [0,74-0,83].

Le rouge Sirius est une coloration simple utilisée en pratique quotidienne sur lames de tissu fixé déparaffiné dans les laboratoires d'anatomie pathologique (Junqueira et al., 1979), notamment pour évaluer la fibrose hépatique (Calvaruso et al., 2009; Huang et al., 2013; López-De León & Rojkind, 1985; Manabe et al., 1993; Moragas et al., 1992). En effet, les molécules du colorant s'intercalent dans la structure tertiaire des fibres de collagène I et III, composants majoritaires de la MEC et par suite de la FI. Elles sont fortement biréfringentes en lumière polarisée. Bien qu'utile pour quantifier la FI, l'analyse informatique de lames polarisées reste néanmoins un processus contraignant, coûteux et chronophage (Grimm et al., 2003; Street et al., 2014; Sund et al., 2004). En l'absence de scanners de lames polarisées faciles d'accès et disponibles, elle suppose la photographie de champs individuels contigus. Plus récemment, des études ont démontré que le rouge Sirius non polarisé présente non seulement la meilleure corrélation avec le DFG estimé par rapport au rouge Sirius polarisé et à la coloration trichrome (Diaz

Encarnacion et al., 2004; Farris et al., 2011), mais également une corrélation significative avec la diminution du DFG (Pape et al., 2003).

Nous avons appliqué notre technique morphométrique d'analyse informatisée de la fibrose rénale après coloration par le rouge Sirius, sans polarisation, à une cohorte de patients ayant reçu un greffon rénal DDAC Maastricht II. La pratique de biopsies systématiques de dépistages après la greffe dans notre centre permettait en effet une évaluation longitudinale du développement de la FI. L'évaluation conventionnelle de la FI en transplantation rénale repose sur l'index semi-quantitatif ci du score de Banff : ci0, FI intéressant moins de 5% du cortex rénal ; ci1, FI intéressant 6 à 25% du cortex rénal (FI légère) ; ci2, FI intéressant 26 à 50% du cortex rénal (FI modérée) et ci3, FI intéressant plus de 50% du cortex rénal (FI sévère) (Roufosse et al., 2018).

Dans notre cohorte de patients DDAC Maastricht II, tant la mIF que le ci augmentaient significativement au cours des trois premiers mois suivant la greffe : le ci augmentait de $0,6 \pm 0,5$ à $1,5 \pm 0,8$ ($p < 10^{-3}$) et la mIF de $8,4\% \pm 3,8\%$ à $13,6\% \pm 6,7\%$ ($p < 10^{-3}$). De M3 à M12, la mIF était plus sensible que le ci : elle augmentait significativement de $13,6\% \pm 6,7\%$ à $15,9\% \pm 5,2\%$ ($p=0,02$), ce qui n'était pas le cas du ci ($1,5 \pm 0,8$ à M3 *versus* $1,7 \pm 0,9$ à M12, $p=0,37$). La mIF est donc plus sensible que le score semi-quantitatif de Banff pour évaluer la progression précoce de la fibrose rénale et l'impact d'interventions thérapeutiques. De plus, nous avons observé une tendance à l'augmentation de la mIF dès le premier mois post-greffe ($10\% \pm 3,9\%$ à J15-J30 *versus* $8,4\% \pm 3,8\%$ à J0, $p=0,056$). L'effectif était probablement insuffisant ($n=20$) pour atteindre un seuil significatif. De façon intéressante, la mIF était également corrélée au devenir clinique des patients. En effet, la mIF à M12 était significativement associée à l'augmentation de la créatininémie à M12 ($R^2 = 0.32$, $p = 0.013$) et au dernier suivi ($R^2 = 0.29$, $p = 0.005$).

La méthode informatique d'analyse d'image après coloration par le rouge Sirius sans polarisation que nous avons développée est donc tout à la fois suffisamment robuste et sensible pour mettre en évidence des augmentations précoces de la FI, mais également relativement simple à mettre en œuvre au plan technique. Cette même technique a été utilisée dans un modèle expérimental murin d'UUO par Lecru et al. (2015). Nous l'avons également utilisée dans le travail suivant où nous cherchons à corrélérer l'expression rénale de CB1R et la FI chez l'homme.

2 – Le récepteur cannabinoïde de type 1 est impliqué dans la fibrose rénale au cours de la dysfonction chronique de l'allogreffe

2.1 – Introduction

La transplantation rénale est la thérapeutique de choix de l'IRT, aussi bien en termes de survie et de qualité de vie qu'en terme de coût. Elle est cependant associée de façon inéluctable à une perte progressive de la fonction du greffon rénal, appelée dysfonction chronique de l'allogreffe (DCA) (Haas, 2014). La DCA reste la première cause de perte du greffon à l'heure actuelle (Cosio et al., 2016; Haas, 2014; Hart et al., 2017; Lamb et al., 2011; Stegall et al., 2017). Indépendamment de sa cause, qui peut être d'origine immunologique ou non, la DCA correspond au remodelage progressif du tissu rénal fonctionnel qui est remplacé par des protéines de la MEC, principalement du collagène (Heemann & Lutz, 2013; Maluf et al., 2014; Pascual et al., 2012; Racusen & Regele, 2010; Venner et al., 2016). Les principales lésions anatomopathologiques observées au cours de la DCA sont des lésions de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire (FI/AT). S'y associent des lésions de glomérulosclérose et d'hyperplasie vasculaire intinale. Le tissu rénal non fonctionnel aboutit à la perte de fonction du greffon rénal (Roufosse et al., 2018). La FI/AT s'installe précocement, dès les premiers mois suivant la greffe. L'objectif du travail présenté ci-après est de déterminer dans quelle mesure CB1R est impliqué dans la progression de la fibrose rénale au cours de la DCA. Dans la première partie du travail, nous avons quantifié l'expression de CB1R par IHC avec le logiciel d'analyse d'image mis au point précédemment (Dao et al., 2020). Nous avons corrélé l'expression de CB1R avec la mIF, le score de Banff et les données cliniques. Dans la seconde partie du travail, nous avons développé un modèle *in vitro* de fibrogenèse induite par le tacrolimus dans des cellules tubulaires proximales humaines et murines. Ce modèle nous a permis d'évaluer l'effet du rimonabant sur la synthèse de collagène.

2.2 – Article

Dao, M., Lecru, L., Vandermeersch, S., Ferreira, M., Ferlicot, S., Posseme, K., Dürrbach, A., Hermeziu, B., Mussini, C., Chatziantoniou, C., & François, H. (2019). The cannabinoid receptor 1 is involved in renal fibrosis during chronic allograft dysfunction : Proof of concept. *Journal of Cellular and Molecular Medicine. J Cell Mol Med.* 2019 Nov;23(11):7279-7288. Epub 2019 Aug 30. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14570>

ORIGINAL ARTICLE

The cannabinoid receptor 1 is involved in renal fibrosis during chronic allograft dysfunction: Proof of concept

Myriam Dao^{1,2}  | Lola Lecru³ | Sophie Vandermeersch¹ | Mélanie Ferreira¹ | Sophie Ferlicot⁴ | Katia Posseme⁴ | Antoine Dürrbach⁵ | Bogdan Hermeziu⁶ | Charlotte Mussini⁴ | Christos Chatziantoniou¹ | Hélène François^{1,7}

¹Inserm UMR_S 1155, Hôpital Tenon, Paris, France

²APHP, Service de Néphrologie Adulte, Hôpital Necker, Paris, France

³Galapagos SASU, Romainville, France

⁴AP-HP, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital Bicêtre, Université Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France

⁵AP-HP, Service de Néphrologie, Hôpital Bicêtre, Université Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France

⁶AP-HP, Service d'Hépatologie Pédiatrique, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France

⁷AP-HP, Unité de Néphrologie et de Transplantation rénale, Hôpital Tenon, Sorbonne Université, Paris, France

Correspondence

Hélène François, Service d'Urgence Néphrologique et de Transplantation Rénale, INSERM UMR_S1155, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France.
Email: helene.francois@aphp.fr

Abstract

Chronic allograft dysfunction (CAD), defined as the replacement of functional renal tissue by extracellular matrix proteins, remains the first cause of graft loss. The aim of our study was to explore the potential role of the cannabinoid receptor 1 (CB1) during CAD. We retrospectively quantified CB1 expression and correlated it with renal fibrosis in 26 kidney-transplanted patients who underwent serial routine kidney biopsies. Whereas CB1 expression was low in normal kidney grafts, it was highly expressed during CAD, especially in tubular cells. CB1 expression significantly increased early on after transplantation, from day 0 (D0) to month 3 post-transplant (M3) ($22.5\% \pm 15.4\%$ vs $33.4\% \pm 13.8\%$, $P < .01$), and it remained stable thereafter. CB1 expression correlated with renal fibrosis at M3 ($P = .04$). In an in vitro model of tacrolimus-mediated fibrogenesis by tubular cells, we found that tacrolimus treatment significantly induced mRNA and protein expression of CB1 concomitantly to *col3a1* and *col4a3* up regulation. Administration of rimonabant, a CB1 antagonist, blunted collagen synthesis by tubular cells ($P < .05$). Overall, our study strongly suggests an involvement of the cannabinoid system in the progression of fibrosis during CAD and indicates the therapeutic potential of CB1 antagonists in this pathology.

KEYWORDS

cannabinoid receptor 1, chronic allograft dysfunction, renal fibrosis, renal transplantation

1 | INTRODUCTION

The progressive and inevitable impairment of renal graft function, called chronic allograft dysfunction (CAD), remains the first cause of graft loss.¹ CAD corresponds to the replacement of functional renal tissue by extracellular matrix (ECM) proteins, mainly collagens, leading to both interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA). Other histological damages include glomerulosclerosis, splitting of glomerular capillary basement membranes and vascular intimal hyperplasia.²

Because this process is multifactorial and complex, there is still to date no efficient treatment of CAD.³⁻⁷ CAD is a multifactorial process in which a lot of immunological and non-immunological causes are involved,³⁻⁷ related to donor,^{8,9} recipient, organ conservation and transfer,¹⁰ surgery, rejection, recurrence of primary renal diseases... Antibody-mediated rejection has recently emerged as one of the major cause of CAD.^{7,11,12} Calcineurin inhibitor (CNI) nephrotoxicity has been considered for a long time as the most prominent cause of renal allograft failure, but its role may have been overstated.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2019 The Authors. Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

However, CNI toxicity is well demonstrated in other organ recipients and in native kidneys.¹³⁻¹⁶ In the specific case of renal transplantation, CNI nephrotoxicity can produce renal fibrosis but progression to graft failure from CNI nephrotoxicity alone is uncommon.^{7,11} However, renal fibrogenesis leading to IF/TA during CAD resembles what is seen during chronic kidney disease (CKD) in native kidneys. Therefore, a better understanding of renal fibrogenesis during CAD is an essential therapeutic approach.¹⁷

We and others have recently showed the potential role of the endocannabinoid system, and especially of the cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1, CB2) in renal metabolic and non-metabolic disease.¹⁸⁻²⁴ CB1 is best known to be involved in the regulation of behaviour in the central nervous system and in metabolic pathways in peripheral tissues²⁵⁻²⁷ whereas CB2 is mainly expressed in the immune system.²⁸ Whereas expression of CB1 is low in normal kidneys,^{18,29,30} we previously found that its expression is increased in IgA nephropathy, acute interstitial nephritis and diabetic nephropathy.¹⁸ Experimental studies in animals showed that in injured kidneys, CB1 is expressed in various structures in glomeruli,^{18-21,31} especially in podocytes and mesangial cells, in the tubules,^{18,32} in the interstitium¹⁸ and in vessels.¹⁸ Recent studies found that CB1 is involved in the development of renal disease during diabetes and/or obesity,^{19,21-24} both by its role on metabolism and through a direct action in podocytes and tubules. Our group previously demonstrated for the first time an anti-fibrotic role of CB1 blockade in non-metabolic experimental renal fibrosis in mice in the unilateral ureteral obstruction (UO) model.¹⁸ In this model, both the pharmacological blockade and the genetic disruption of CB1 profoundly reduced the development of renal fibrosis. This effect was mainly due to a direct paracrine/autocrine role of CB1 in myofibroblasts, which are the final effector cells in renal fibrogenesis. We found that upon TGF β stimulation, renal myofibroblasts expressed CB1 and secreted endocannabinoid ligands, whereas CB1 blockade reduced collagen synthesis. These results suggest that the CB1 pathway may be a major target against the development of renal fibrosis in various types of renal injury.³³

The aim of the present study was to examine whether the activation of the CB1 receptor is involved in the progression of renal fibrosis during CAD. In the first part of our work, we quantified CB1 expression by immunohistochemistry (IHC) and a morphometry software, and we correlated it with renal fibrosis, Banff scoring and clinical data. In the second part, we studied the *in vitro* expression of CB1 after tubular injury induced by tacrolimus and the effects of rimonabant, a CB1 antagonist, in tacrolimus-induced fibrogenesis, which we used as an *in vitro* model of CAD.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients and kidney graft biopsies

We retrospectively included all kidney-transplanted patients in Bicêtre hospital who received a kidney graft in 2012 and 2013 and who underwent a routine kidney graft biopsy at day 0 (D0), month 3 (M3) and month 12 (M12). Kidney donation followed the 2008

Declaration of Istanbul principles and the French Agence Nationale de la Biomedecine regulation. Informed written consent was given by the patients for the use of part of the biopsy for scientific purposes. All procedures and the use of tissues were performed in accordance with the Declaration of Helsinki principles. We reviewed clinical reports from the 26 patients. Biological tests were performed on blood samples harvested concurrently with the kidney allograft biopsy. Kidney graft biopsies were processed for routine light microscopy. Biopsy samples were fixed in formalin, acetic acid and alcohol (FAA) and sliced 3 μ m thick. The slides were stained with Masson's trichrome, haematoxylin, eosin and saffron (HES), periodic acid Schiff and Jones methenamine silver stains. Biopsies were reviewed for histological features according to 2018 Banff recommendations.² Semi-quantitative scoring for acute and chronic lesions (glomerulitis, peritubular capillaritis, interstitial inflammation, total inflammation, tubulitis, intimal arteritis, allograft glomerulopathy, mesangial matrix increase, interstitial fibrosis, tubular atrophy, vascular fibrous intimal thickening and arteriolar hyaline thickening) and C4d immunostaining provided the morphologic basis for main diagnosis classification: normal biopsy or nonspecific changes (after exclusion of any diagnosis from the Banff Diagnostic Categories), antibody-mediated changes, suspicious (borderline) for acute T cell-mediated rejection, T cell-mediated rejection, IF/TA, other changes not considered to be caused by acute or chronic rejection (such as BK-virus nephropathy, CNI toxicity, acute tubular injury, recurrent disease, *de novo* glomerulopathy other than transplant glomerulopathy...)²

2.2 | Histopathological analysis of renal fibrosis

Interstitial fibrosis (ci) and tubular atrophy (ct) were separately assessed using the Banff classification: respectively ci0 = interstitial fibrosis in up to 5% of cortical area; ci1 = interstitial fibrosis in 6 to 25% of cortical area (mild interstitial fibrosis); ci2 = interstitial fibrosis in 26 to 50% of cortical area (moderate interstitial fibrosis); ci3 = interstitial fibrosis >50% of cortical area (severe interstitial fibrosis) and ct0 = no tubular atrophy; ct1 = tubular atrophy in up to 25% of the area of cortical tubules; ct2 = tubular atrophy involving 26 to 50% of the area of cortical tubules; ct3 = tubular atrophy in >50% of the area of cortical tubules. Taking together, ci and ct allowed to semi-quantitatively grade IF/TA according to Banff classification: grade I, mild (ci1 or ct1); grade II, moderate (ci2 or ct2); and grade III, severe (ci3 or ct3).² To improve accuracy of interstitial fibrosis evaluation, renal biopsy sections (3 μ m) were stained with Sirius red. Sirius red specifically stains collagen fibres. Renal cortex fibrosis was quantified using a computer-based morphogenic analysis software (Calopix, Tribvn, Montrouge, France). The red positive area was expressed as a percentage of the entire cortical kidney section.

2.3 | Cannabinoid receptor 1 immunohistochemical staining

Cannabinoid receptor 1 immunohistochemical staining was performed using rabbit polyclonal anti-CB1 antibody (Abcam; dilution

1/100). Epitope retrieval was achieved using heat-mediated retrieval method in citrate buffer (10 mmol/L Sodium Citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0). Endogenous peroxidase activity was blocked by 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 10 minutes. Primary CB1 antibody was incubated for 2h at room temperature. Horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody was applied for 1h at room temperature. Staining was revealed by applying a 3'-diaminobenzidine (DAB) kit (DakoCytomation). Appropriate positive and negative controls were run concurrently. Morphometric analyses and quantification were quantified using computer-based morphogenic analysis software (Calopix, Tribvn.). The brown positive area was expressed as a percentage of the entire cortical kidney section.

2.4 | Cell cultures and treatments

Human proximal tubule epithelial cells (HK-2) from American Type Culture Collection (ATCC) were cultured in Quantum 286 (Medium for epithelial cells, PAA, France) supplemented with 1% (v/v) penicillin/streptomycin, at 37°C in 95% air–5% CO₂. The cells were sub-cultured at 80% confluence using 0.05% trypsin with 0.02% EDTA. Cells were used between passages 15 to 17. Murine proximal tubular epithelial cells (mPTEC) were isolated and cultured from C57/BL6 mice, as previously described.³⁴ Cells were used between passages 5 to 9.

Tacrolimus was preserved as a stock solution (PROGRAF 5 mg/mL, Astellas). Working solution was prepared by extemporaneous mixture of stock solution in 100% ethanol. Rimonabant (Sanofi-Aventis R&D) was preserved as a stock solution (10 mmol/L). Working solution was prepared by extemporaneous mixture of stock solution in DMSO.

2.5 | Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

RNA was extracted from cells cultures using EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-preps Super Kit (Bio Basic Inc) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was measured by NanoDrop1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). cDNA was synthesized using Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific), and PCR was performed using SYBR green and specific primers (Table 1) on a Light Cycler 480 (Roche). Expression levels were normalized to the house-keeping gene GAPDH using Lightcycler advanced relative quantification programme (Roche).

2.6 | Western blotting

Cells were lysed in PhosphoP38 buffer containing protease inhibitors (Roche, Mannheim, Germany) and quantified by Bradford's method. Proteins were separated in a 7% SDS-PAGE gel and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane. Immunoblotting was performed using a rabbit anti CB1 (Abcam) diluted 1:800 or a rabbit beta-actin diluted 1:5000 for loading control. The membranes were then probed with a HRP-conjugated secondary antibody diluted 1:5,000 (Amersham), and the bands were detected by enhanced

TABLE 1 Primers (Eurogentec) used for RT-qPCR

mRNA	Strand	Sequence
cnr1	Sense	5'-GGGCAAATTTCCTTGAGCA-3'
	Antisense	5'-GGCTCAACGTGACTGAGAAA-3'
col3a1	Sense	5'-TCCCCTGGAAATCTGTGAATC-3'
	Antisense	5'-TGAGTCGAATTGGGGAGAAT-3'
col4a3	Sense	5'-CACGGGTTCCAAAGGTGTA-3'
	Antisense	5'-AGTCCGTAAGGCCCGGTAT-3'
gapdh	Sense	5'-AGCTTGTCATCAACGGGAAG-3'
	Antisense	5'-TTTGATGTTAGTGGGGTCTCG-3'

chemiluminescence using ECL Plus (Amersham). A PXi (Syngen) imaging system was used to reveal bands, and densitometric analysis was used for quantification. Membranes were then incubated with anti-rabbit antibody conjugated to HRP (Millipore), and proteins were visualized by the addition of chemiluminescent HRP substrate (Immobilon Western, Millipore).

2.7 | Sirius red collagen assay

Total collagen content in the culture cell supernatant was quantified using the Sirius red collagen detection kit (Chondrex) according to the manufacturer's instructions. Each supernatant was diluted in 1:2.5 in 0.05 mol/L. Optical density was read at 530 nm against the reagent blank using a spectrophotometer (Xenius, SAFAS, Monaco).

2.8 | Statistical analyses

Descriptive statistical methods (means, medians, standard deviations and ranges) were used to assess the distributions of variables. Associations between categorical variables were assessed with Fisher's exact test (2 groups) or chi-square test (3 groups). Associations between quantitative variables were assessed with Mann-Whitney test (2 groups) or Kruskal-Wallis test (3 groups). Correlations between quantitative variables were assessed with Pearson product-moment correlation coefficient. For all analyses, a *P* value <.05 was regarded as significant. Analyses were performed using the R software (version 3.2.0) and GraphPad 5.0.³⁵

3 | RESULTS

3.1 | Patients

We selected patients transplanted in Bicêtre hospital between 2012 and 2013 who underwent a routine kidney biopsy at D0, M3 and M12. We included 26 patients in our study. The patients included 11 females and 15 males. The mean age at the time of kidney transplantation was 54 ± 13 years. The indications for kidney transplantation were hypertensive nephrosclerosis and/or diabetic nephropathy (n = 8), other glomerulopathies (n = 4), tubulointerstitial nephritis (n = 3), uropathy (n = 3) and autosomal

TABLE 2 Histological features of renal biopsies at D0, M3 and M12

	D0 (n = 26)	M3 (n = 26)	M12 (n = 26)	P
Specimen adequacy according to the Banff recommendations				
Adequate samples (n)	19	15	9	.019
Limit samples (n)	6	7	11	.28
Inadequate samples (n)	1	4	6	.13
Acute lesions				
Glomerulitis «g»	NA	0.31 ± 0.55	0 ± 0	<.01
Peritubular capillaritis «ptc»	NA	0.15 ± 0.37	0.083 ± 0.41	.23
Interstitial inflammation «i»	NA	0.042 ± 0.20	0.087 ± 0.29	.55
Total inflammation «ti»	NA	0.38 ± 0.74	0.5 ± 0.72	.41
Tubulitis «t»	NA	0.08 ± 0.28	0.4 ± 0.71	.059
Intimal arteritis «v»	NA	0 ± 0	0 ± 0	NA
Acute tubular necrosis	85% (n = 22)	19% (n = 5)	19% (n = 5)	<.01
Chronic lesions				
Sclerotic glomeruli	10.3% ± 11.3%	9.1% ± 11.6%	13.9% ± 13.7%	.42
Allograft glomerulopathy «cg»	0 ± 0	0.08 ± 0.28	0.042 ± 0.20	.15
Mesangial matrix increase «mm»	0.12 ± 0.59	0.42 ± 0.86	0.42 ± 0.88	.077
Interstitial fibrosis «ci»	0.64 ± 0.7	1.08 ± 0.93	1.33 ± 0.96	.040
Tubular atrophy «ct»	0.4 ± 0.71	0.81 ± 0.75	1.13 ± 0.95	.083
Vascular fibrous intimal thickening «cv»	0.92 ± 0.89	0.76 ± 0.78	1.32 ± 0.99	.62
Arteriolar hyaline thickening «ah»	0.56 ± 0.92	0.69 ± 0.84	0.8 ± 0.91	.33
C4d (immunofluorescence)				
Negative (0 or minimal 1)	NA	88% (22/25)	92% (22/24)	1
Positive (focal 2 or diffuse 3)	NA	12% (3/25)	8% (2/24)	1
Rejection				
Antibody-mediated rejection	NA	12% (n = 3) ^a	0	.24
Borderline rejection	NA	8% (n = 2)	23% (n = 6)	.13
T cell-mediated rejection	NA	0	0	NA
Other pathologies	0	2 ^b	8 ^c	

Note: Digital data are means ± standard deviation.

^aAntibody-mediated rejection included 1 acute antibody-mediated rejection, 1 chronic active antibody-mediated rejection and 1 'suspicious' for acute antibody-mediated rejection.

^bOther pathologies were 1 diabetic glomerulonephritis and 1 recurrence of focal segmental glomerulosclerosis.

^cOther pathologies were 1 diabetic glomerulonephritis, 2 BK-polyomavirus-associated nephropathy, 1 de novo membranous glomerulonephritis, 2 focal segmental glomerulosclerosis (including 1 recurrence of original disease), 1 acute bacterial pyelonephritis and 1 thrombotic micro-angiopathy.

dominant polycystic kidney disease (n = 2). Nephropathy remained undetermined in 3 patients. Patients received induction therapy with anti-lymphocyte serum or basiliximab. They also received mycophenolate mofetil, corticosteroids and tacrolimus per local practice (mean through tacrolimus level at M3: 9.0 ± 3.9 ng/mL and at M12: 7.8 ± 4.4 ng/mL). Four patients received belatacept in place of calcineurin inhibitors. All patients received a kidney graft from a deceased donor. Among the donors, 22 were brain-dead donors (8 standard donors [SD] and 14 extended criteria donors [ECD]) and 4 were cardiac-dead donors (CDD) deceased after unforeseeable irreversible circulatory arrest (Maastricht 2). Donor age, history of diabetes or active smoking, use of catecholamines and serum creatinine were similar among the different groups of donors. As expected, vascular causes of deaths and prevalence of

high blood pressure were more frequent in brain-dead donors (respectively, SD 75%, ECD 71% vs CDD 0%, *P* = .02 and SD 63%, ECD 86% vs CDD 0%, *P* < .01).

3.2 | Histological features of renal biopsies at D0, M3 and M12 and renal graft function

Histological features of the 78 renal biopsies, reviewed according to the 2018 Banff recommendations, are summarized in Table 2. They were similar by donor type (Table S1). In preimplantation biopsies, IF/TA was absent or mild in 24/26 samples (92%), respectively 10/26 (38%), and 14/26 (54%) biopsies. Preimplantation biopsies also exhibited mild to moderate lesions of arteriosclerosis (cv1 or cv2, 62%) and acute tubular necrosis (85%). The most relevant findings were a

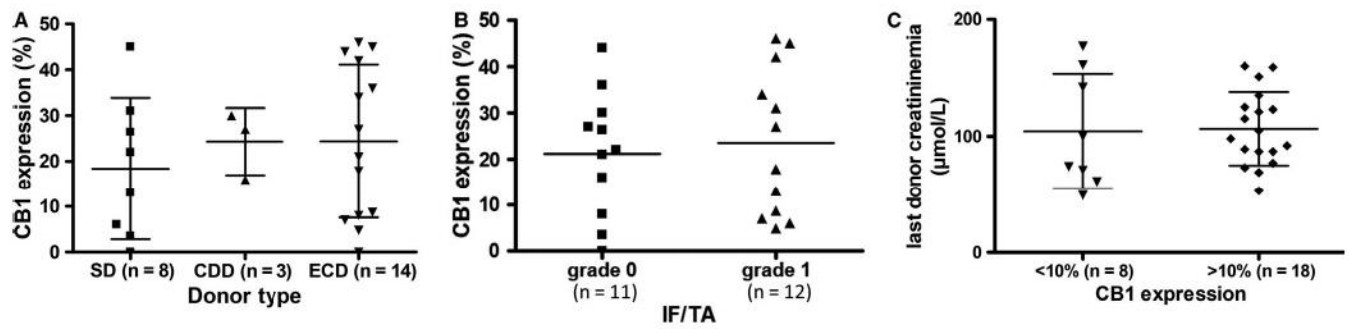


FIGURE 1 Cannabinoid receptor 1 expression on preimplantation biopsies was not associated with donor characteristics. A, CB1 expression was similar by donor type. B, CB1 expression was not associated by IF/TA on preimplantation biopsies. C, Donor creatininemia at time of organ removal was not associated with CB1 expression. Abbreviations: CDD, cardiac death donor; ECD, extended criteria donor; IF/TA, interstitial fibrosis and tubular atrophy; SD, standard donor

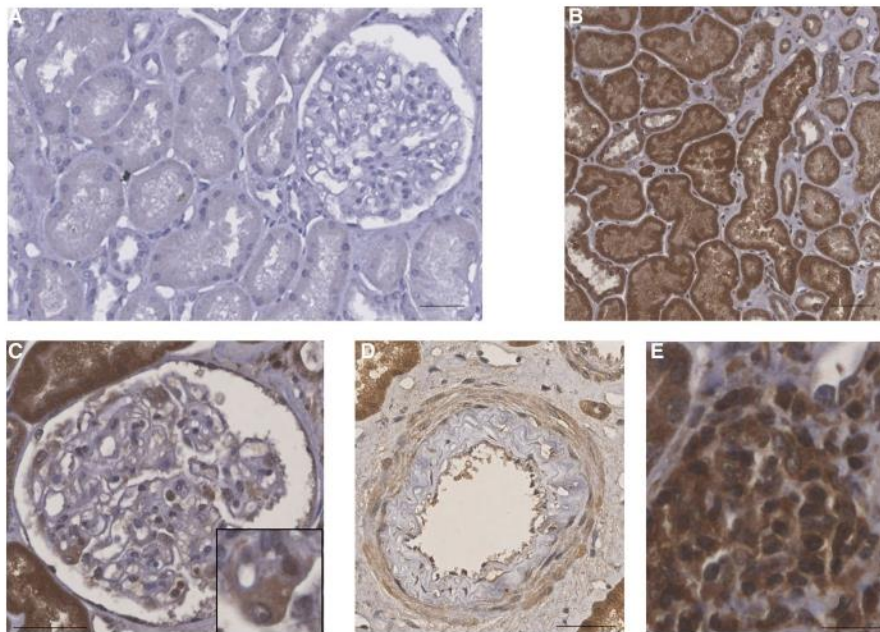


FIGURE 2 Cannabinoid receptor 1 expression in 3 mo biopsies of renal grafts developing CAD revealed by peroxidase immunohistochemistry. A, Absence of CAD: CB1 was not expressed. The biopsy was performed in a 66-y-old man who received a kidney graft from extended criteria donor. Early allograft history was unremarkable. M3 graft biopsy exhibited a normal graft according to the Banff classification, without lesions nor IF/TA. M3 creatininemia was 128 µmol/L and immunosuppressive regimen included prednisone, mycophenolate mofetil and tacrolimus (T0 4.5 ng/mL). B, CB1 expression in tubular epithelial cells. C, CB1 glomerular expression is mainly found in the podocyte (in the inset). D, CB1 expression in medium-sized arteries: endothelial cells, smooth muscle cells of media and to a lesser extent intimal cells express CB1. E, CB1 expression in the interstitial inflammatory infiltrate. Bar scales = 50 µm. Abbreviations: CAD, chronic allograft dysfunction; IF/TA, interstitial fibrosis and tubular atrophy

significant decrease of acute tubular necrosis (ATN) over time (85% at D0 vs 19% at M3 and M12, $P < .01$) and a significant increase of renal graft fibrosis (0.6 ± 0.7 at D0 vs 1.1 ± 0.9 at M3 and 1.3 ± 1.0 at M12, $P = .04$). At M3, mean creatininemia was 143 ± 59 µmol/L (median: 121 µmol/L, ranges: 69-289 µmol/L) and mean estimated glomerular filtration rate (eGFR) was 47 ± 19 mL/min/1.73 m² by CKD-EPI. At M12, mean creatininemia slightly increased at 160 ± 75 µmol/L (median: 127 µmol/L, ranges: 69-389 µmol/L) and mean GFR slightly decreased at 41 ± 19 mL/min/1.73 m² ($P = .5$). Taken together, both the significant increase in IF/TA and the decline in eGFR established that CAD was developed in these patients.

3.3 | Cannabinoid receptor 1 expression in kidney transplants during chronic allograft dysfunction

We found that $23\% \pm 15\%$ of cortical area was positive for CB1 staining at D0 in preimplantation biopsies. CB1 expression at D0 was similar by donor type and by IF/TA grade. It was not associated with donor last creatininemia (Figure 1). At M3 and M12, whereas CB1 expression was low in normal graft, it was induced in many cell types during CAD (Figure 2) such as proximal and distal tubular epithelial cells, medium-sized arteries and arterioles vascular smooth muscle cells, interstitial inflammatory infiltrate and glomeruli, mainly

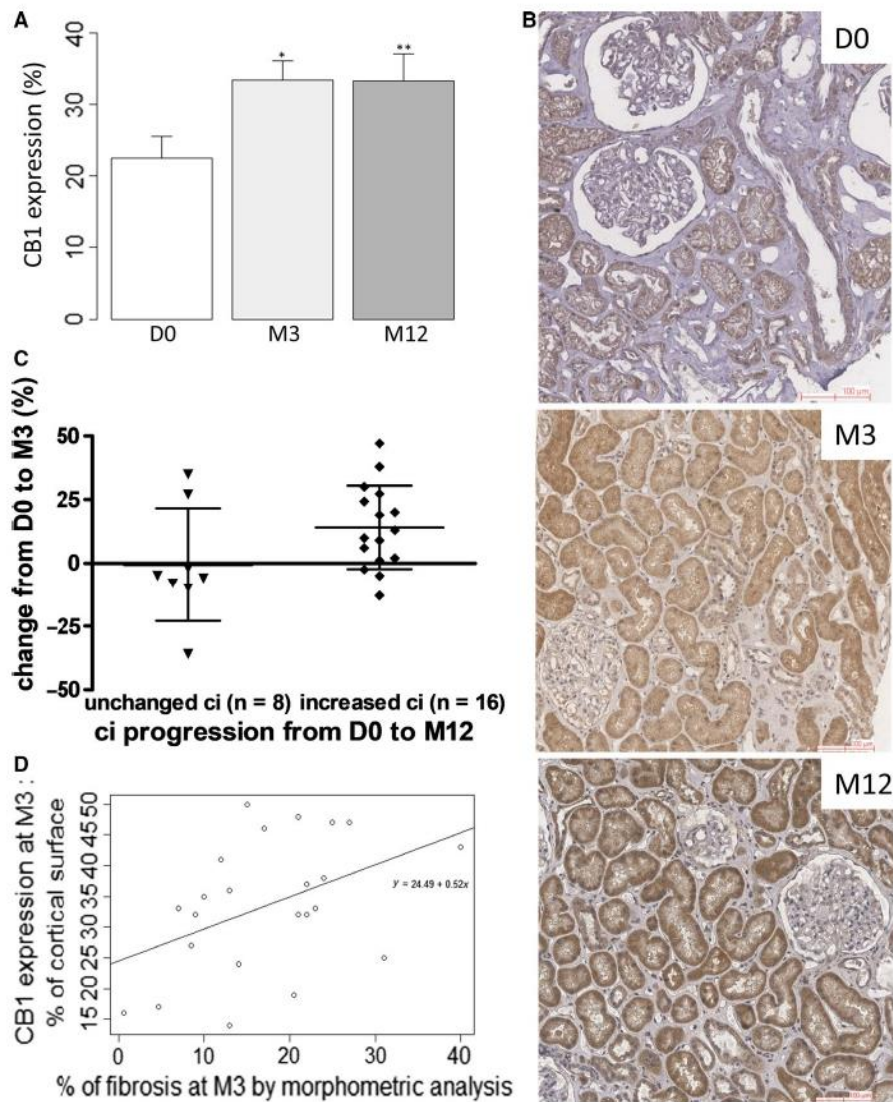


FIGURE 3 Cannabinoid receptor 1 expression is induced during CAD and correlates with renal fibrosis. A, Quantification of CB1 expression by a morphometry software (Calopix, Tribvn). * $P < .05$ and ** $P < .05$ compared to D0. Means \pm standard deviation. B, Illustrative case of CB1 expression at D0, M3 and M12 revealed by peroxidase immunohistochemistry. The biopsies were performed in a 68-y-old woman who received a kidney graft from an extended criteria donor. Preimplantation biopsy was normal according to Banff classification, with IF/TA grade 0. Creatininemia at organ removal was 89 $\mu\text{mol/L}$. From M3, graft biopsies exhibited IF/TA grade 1 according to the Banff classification, without other changes. At M3 and M12, creatininemia were, respectively, at 155 $\mu\text{mol/L}$ and 122 $\mu\text{mol/L}$. Her immunosuppressive regimen included prednisone, mycophenolate mofetil and tacrolimus (T0 3.2 ng/mL at M3 and 4.3 ng/mL at M12). Quantification of CB1 expression by a morphometry software was 21% at D0, 48% at M3 and 57% at M12. C, Patients with unchanged ci from D0 to M12 tended to have less CB1 progression evaluated by a morphometry software (Calopix, Tribvn) (-0.62 ± 7.8 vs $14.1 \pm 4.1\%$, $P = .08$). D, Correlation between CB1 expression and renal fibrosis assessed by morphometry software (Calopix, Tribvn) at M3 ($n = 26$, NA = 3, Pearson correlation test, $P = .04$, $R = .44$). Abbreviations: CAD, chronic allograft dysfunction; D0, day 0; IF/TA, interstitial fibrosis and tubular atrophy; M3, month 3; M12, month 12

podocytes. Specifically, CB1 expression significantly increased from D0 to M3 (23% \pm 15% of stained cortical area vs 33% \pm 14%, $P = .01$) and then it remained increased up to M12 (33% \pm 19% of stained cortical area) (Figure 3A and 3). Patients with stable interstitial fibrosis from D0 to M12 tended to have lower CB1 progression ($n = 8$, CB1 expression $-0.62 \pm 7.8\%$) than patients in whom interstitial fibrosis increased ($n = 16$, $14.1 \pm 4.1\%$, $P = .08$) (Figure 3C). We also found a positive correlation between CB1 expression and renal fibrosis at M3 ($P = .04$, $R = .44$) but not at M12 (Figure 3D). This result

may be due to a lack of power (only 35% biopsies were adequate according to Banff classification at M12). However, we did not find a significant correlation between CB1 expression and eGFR.

3.4 | Cannabinoid receptor 1 expression in the tacrolimus-induced model of tubule injury in vitro

We next studied the role of CNI in CB1 expression using HK-2 as a model of CAD. We hypothesized that tubular stress induced by

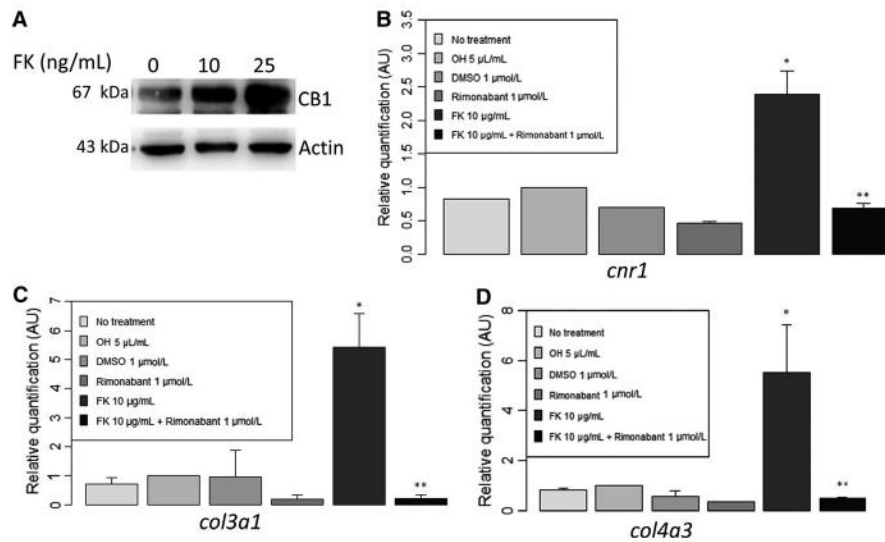


FIGURE 4 In vitro model of tacrolimus-mediated fibrogenesis: tacrolimus increased CB1 expression, *cnr1* (encoding for CB1) expression as well as *col3a1* (encoding for Collagen 3) and *col4a3* (encoding for Collagen 4). *Cnr1*, *col3a1* and *col4a3* expression were significantly blunted by rimobant, a CB1 antagonist. A, Tacrolimus significantly increased CB1 expression (Western blot, $n = 4$, 3.5 ± 3.4 vs 1.0 ± 0 , relative quantification after normalization, $P = .03$) in human proximal tubule epithelial cells (HK2) after 48 h of daily treatment with tacrolimus (FK) (10 ng/mL and 25 ng/mL). B, Expression of *cnr1* mRNA evaluated by RT-qPCR after 24 h of treatment ($n = 4$ for each group). * $P < .05$ vs ethanol 5 μ L/mL. ** $P < 0.05$ vs FK 10 μ g/mL. C, Expression of *col3a1* mRNA evaluated by RT-qPCR after 24 h of treatment ($n = 4$ for each group). * $P < 0.05$ vs ethanol 5 μ L/mL. ** $P < .05$ vs FK 10 μ g/mL. D, Expression of *col4a3* mRNA evaluated by RT-qPCR after 24 h of treatment ($n = 4$ for each group). * $P < .05$ vs ethanol 5 μ L/mL. ** $P < .05$ vs FK 10 μ g/mL

CNI would increase CB1 expression. Protein expression was evaluated by Western blot analysis. Tacrolimus significantly increased CB1 expression ($n = 4$, 3.5 ± 3.4 vs 1.0 ± 0 , relative quantification after normalization, $P = .03$) (Figure 4). This result was confirmed by RT-qPCR analysis on mPTEC. We found a significant increase in *cnr1* (encoding for CB1) expression after 24 hours of treatment with tacrolimus ($n = 4$, 2.4 ± 0.7 vs 1.0 ± 0 , relative quantification after normalization, $P = .02$).

3.5 | Cannabinoid receptor 1 blockade decreased expression of mesenchymal markers on mPTEC in the tacrolimus-induced model of renal injury

In addition, tacrolimus administration on epithelial tubular cells increased not only CB1 expression but also *col3a1* (encoding for collagen III) and *col4a3* (encoding for collagen IV) (Figure 4) and total collagen in cell supernatants (Figure S1). Addition of rimobant, a CB1 inverse agonist, strongly blunted *col3a1* and *col4a3* expressions (Figure 4) and decreased total collagen in cell supernatants (Figure S1).

4 | DISCUSSION

The general objective of our research is to find new pathways in the development of renal interstitial fibrosis which is a key feature of CAD. In the present study, we establish for the first time an interaction between abnormal CB1 expression and progression of renal fibrosis, leading to CAD. We and others have previously published

that CB1 is a major mediator in both metabolic renal disease²²⁻²⁴ and non-metabolic renal fibrosis,¹⁸ but its expression was never assessed in renal grafts. In our work, we found that $23\% \pm 15\%$ of cortical area was positive for CB1 staining at D0 in preimplantation biopsies whereas IF/TA was absent or mild in most of preimplantation biopsies. Out of the 26 graft D0 biopsies, 10/26 (38%) showed no IF/TA and 14/26 (54%) mild IF/TA according to the Banff classification. In our previous study,¹⁸ we found a low level of CB1 expression ($6.5\% \pm 4.8\%$, $n = 5$) in normal kidneys, which is lower than the D0 biopsies (ie $23\% \pm 15\%$). However, the preimplantation biopsies of our series do not correspond to the 'normal' category of our previous paper since they were performed at the end of the cold preservation period just before graft transplantation and as expected revealed significant ATN, which is the consequence of ischaemia (22/26, 85% revealed ATN). Indeed, previous studies described the metabolic consequences of ischaemia: compromised mitochondrial ATP production and activation of anaerobic glycolysis leading to ATN.³⁶⁻³⁹ Therefore, the high level of D0 CB1 expression that we observed is not associated with concurrent IF/TA but is a consequence of cold ischaemia-induced ATN. In addition, recent studies demonstrated that renal hypoxia-induced ATN promotes tubulointerstitial fibrosis.⁴⁰⁻⁴² Hence, our hypothesis is that CB1 expression at D0 is predictive for the development of kidney graft fibrosis as a consequence of ischaemia-induced ATN and that early CB1 expression could be used as a biomarker.

We next studied CB1 expression at M3 and M12. CB1 expression was low in normal kidney grafts, similar to CB1 expression in normal native kidneys. Interestingly, we found that CB1 was induced in many different cell types during CAD: tubular epithelial

cells, medium-sized arteries (endothelial cells, smooth muscle cells of media), interstitial inflammatory infiltrate and glomeruli (mainly in podocytes). During CAD, CB1 expression significantly increased early on after transplantation, from D0 to M3 and it remained stable and high (around 30% of the total cortical area of the kidney graft) thereafter. This high expression corresponds to a plateau of CB1 expression which is reached at M3. It is noteworthy that in CAD, CB1 expression was higher (33% from M3) than in native nephropathies (18%)¹⁸ and found mostly in tubules. We also found a parallel increase of IF/TA from D0 to M3, in accordance with the literature regarding the development of IF/TA assessed by routine kidney biopsies.⁴³ We found that not only CB1 and IF/TA increased from D0 to M3 in kidney grafts but also that there was a significant positive correlation between CB1 expression and renal fibrosis at M3 ($P = .04$). Moreover, individual CB1 expression trajectories from D0 to M3 then M12 allowed to distinguish groups of patients: patients with stable interstitial fibrosis from D0 to M12 tended to have lower CB1 progression ($n = 8$, CB1 expression $-0.62\% \pm 7.8\%$) than patients in whom interstitial fibrosis increased ($n = 16$, $14.1\% \pm 4.1\%$, $P = .08$). Therefore, CB1 could be a key player in the early steps of the development of IF/TA in kidney grafts or at least be a marker of renal fibrosis. Conversely to what we found in a small cohort of patients with various nephropathies in native kidneys,¹⁸ we could not establish that CB1 expression correlated with kidney graft function. This difference can be due to the slow decline of kidney graft function in our CAD cohort as well as the short-term follow-up. However, the development of IF/TA usually precedes kidney graft dysfunction. As previous studies demonstrated that early interstitial fibrosis was associated with chronic allograft dysfunction and kidney graft outcome,^{7,44-46} early increased CB1 expression may be an early event before the development of IF/TA in kidney grafts. Such correlation between renal CB1 expression and renal fibrosis was never described in kidney grafts. We also suggested that CB1 is expressed by initially injured cells and by cells involved in synthesizing extracellular matrix proteins similarly to what is seen with the expression of DDR1, another important pathway in renal fibrosis.⁴⁷ The high tubular expression of CB1 that we observed during CAD, using the exact same primary antibody and protocol that was previously used in the other types of CKD,¹⁸ enhances this hypothesis and strongly suggests a key role of CB1 in tubules in the IF/TA process.

To support this hypothesis, we tested whether CB1 expressed in tubules plays a causative role in the progression of fibrosis in an in vitro model mimicking CAD. Indeed, CAD is a multifactorial process in which a lot of immunological and non-immunological causes are involved, including CNI toxicity. Since, it is impossible to completely reproduce the entire CAD process in vitro, we chose a simple model of epithelial-to-mesenchymal (EMT) transition in vitro. We therefore studied the effect of CNI on epithelial tubular cells because direct toxic effects of calcineurin inhibition on tubular function have been already well documented.⁴⁸ Direct effects of CNI tubular toxicity include upregulation of TGF β expression by tubular epithelial cells.⁴⁹⁻⁵² We developed a model of tacrolimus-induced tubular injury and collagen synthesis in vitro which reproduces the first steps of CAD. We

found increased expression of *cnr1*, *col3a1* and *col4a3* after treatment of mPETC by tacrolimus. Therefore, CB1 could be involved in the first steps of the development of CAD, possibly due to tacrolimus-induced tubular epithelial injury. Interestingly, expression of *col3a1* and *col4a3* was significantly blunted by rimonabant, a CB1 antagonist ($P < .05$). Our results are in accordance with the recent literature where the specific deletion of CB1 in proximal tubules not only decreased renal fibrosis, injury and inflammation, but also preserved renal function in obesity-induced nephropathy in mice.²²

To conclude, our study strongly suggests an involvement of CB1 activation during CAD and paves the way to the development of CB1 inhibitors in CAD. However, the impact of cannabinoid system modulation on the evolution of chronic allograft dysfunction, as well as the cellular and molecular pathways involved, remains to be clarified.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MD: conception of the work, data collection, data analysis and interpretation, drafting the article; LL: conception of the work, data collection, critical revision of the article; SV: data collection, data analysis and interpretation; MF: data collection, data analysis and interpretation; SF: data analysis and interpretation; KP: data collection; AD: revision of the article and Head of the Division of the Bicetre nephrology and transplantation department from which the patients were recruited; BH: data collection; CM: data collection; CC: conception of the work, critical revision of the article; HF: conception of the work, data collection, data analysis and interpretation, drafting the article. All authors reviewed the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

'The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.'

ORCID

Myriam Dao  <https://orcid.org/0000-0001-5505-1364>

REFERENCES

1. Haas M. Chronic allograft nephropathy or interstitial fibrosis and tubular atrophy: what is in a name? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014;23:245-250.
2. Roufousse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, et al. A 2018 Reference guide to the banff classification of renal allograft pathology. *Transplantation*. 2018;102(11):1795-1814.
3. Racusen LC, Regele H. The pathology of chronic allograft dysfunction. *Kidney Int*. 2010;78:S27-S32.
4. Pascual J, Pérez-Sáez MJ, Mir M, Crespo M. Chronic renal allograft injury: early detection, accurate diagnosis and management. *Transplant Rev*. 2012;26:280-290.

5. Heemann U, Lutz J. Pathophysiology and treatment options of chronic renal allograft damage. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28:2438-2446.
6. Maluf DG, Dumur CI, Suh JL, et al. Evaluation of molecular profiles in calcineurin inhibitor toxicity post-kidney transplant: input to chronic allograft dysfunction. *Am J Transplant*. 2014;14:1152-1163.
7. Venner JM, Famulski KS, Reeve J, Chang J, Halloran PF. Relationships among injury, fibrosis, and time in human kidney transplants. *JCI Insight*. 2016;1:e85323.
8. Merion RM, Ashby VB, Wolfe RA, et al. Deceased-donor characteristics and the survival benefit of kidney transplantation. *JAMA*. 2005;294:2726-2733.
9. Aubert O, Kamar N, Vernerey D, et al. Long term outcomes of transplantation using kidneys from expanded criteria donors: prospective, population based cohort study. *BMJ*. 2015;351:h3557.
10. Wong G, Teixeira-Pinto A, Chapman JR, et al. the impact of total ischemic time, donor age and the pathway of donor death on graft outcomes after deceased donor kidney transplantation. *Transplantation*. 2017;101:1152-1158.
11. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant*. 2009;9:527-535.
12. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant*. 2012;12:388-399.
13. Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perloth M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med*. 1984;311:699-705.
14. Palestine AG, Austin HA, Balow JE, et al. Renal histopathologic alterations in patients treated with cyclosporine for uveitis. *N Engl J Med*. 1986;314:1293-1298.
15. Greenberg A, Egel JW, Thompson ME, et al. Early and late forms of cyclosporine nephrotoxicity: studies in cardiac transplant recipients. *Am J Kidney Dis*. 1987;9:12-22.
16. Ojo AO, Held PJ, Port FK, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med*. 2003;349:931-940.
17. François H, Chatziantoniou C. Renal fibrosis: recent translational aspects. *Matrix Biol J*. 2018;68-69:318-332.
18. Lecru L, Desterke C, Grassin-Delyle S, et al. Cannabinoid receptor 1 is a major mediator of renal fibrosis. *Kidney Int*. 2015;88:72-84.
19. Barutta F, Corbelli A, Mastrocola R, et al. Cannabinoid receptor 1 blockade ameliorates albuminuria in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2010;59:1046-1054.
20. Nam DH, Lee MH, Kim JE, et al. Blockade of cannabinoid receptor 1 improves insulin resistance, lipid metabolism, and diabetic nephropathy in db/db mice. *Endocrinology*. 2012;153:1387-1396.
21. Jourdan T, Szanda G, Rosenberg AZ, et al. Overactive cannabinoid 1 receptor in podocytes drives type 2 diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111:E5420-E5428.
22. Udi S, Hinden L, Earley B, et al. Proximal tubular cannabinoid-1 receptor regulates obesity-induced CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28:3518-3532.
23. Hinden L, Udi S, Drori A, et al. Modulation of renal GLUT2 by the cannabinoid-1 receptor: implications for the treatment of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29:434-448.
24. Jourdan T, Park JK, Varga ZV, et al. Cannabinoid-1 receptor deletion in podocytes mitigates both glomerular and tubular dysfunction in a mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetes Obes. Metab*. 2018;20:698-708.
25. Ledent C, Valverde O, Cossu G, et al. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*. 1999;283:401-404.
26. Howlett AC, Blume LC, Dalton GD. CB1 cannabinoid receptors and their associated proteins. *Curr Med Chem*. 2010;17:1382.
27. O'Keefe L, Simcocks AC, Hryciw DH, Mathai ML, McAinch AJ. The cannabinoid receptor 1 and its role in influencing peripheral metabolism. *Diabetes Obes Metab*. 2014;16:294-304.
28. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365:61-65.
29. Koura Y, Ichihara A, Tada Y, et al. Anandamide decreases glomerular filtration rate through predominant vasodilation of efferent arterioles in rat kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:1488-1494.
30. Larrinaga G, Varona A, Pérez I, et al. Expression of cannabinoid receptors in human kidney. *Histol Histopathol*. 2010;25:1133-1138.
31. Lim JC, Lim SK, Park MJ, Kim GY, Han HJ, Park SH. Cannabinoid receptor 1 mediates high glucose-induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress in primary cultured rat mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301:F179-F188.
32. Jenkin KA, McAinch AJ, Zhang Y, Kelly DJ, Hryciw DH. Elevated cannabinoid receptor 1 and G protein-coupled receptor 55 expression in proximal tubule cells and whole kidney exposed to diabetic conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015;42:256-262.
33. Francois H, Lecru L. The role of cannabinoid receptors in renal diseases. *Curr Med Chem*. 2018;25:793-801.
34. Legouis D, Bataille A, Hertig A, et al. Ex vivo analysis of renal proximal tubular cells. *BMC Cell Biol*. 2015;16:12.
35. R Core Team. *A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014.
36. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;281:F887-F899.
37. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:2199-2210.
38. Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J Invest Med*. 2004;52:299-309.
39. Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287:F181-187.
40. Tanaka S, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;307:F1187-F1195.
41. Hirakawa Y, Tanaka T, Nangaku M. Renal Hypoxia in CKD; pathophysiology and detecting methods. *Front Physiol*. 2017;8:99.
42. Liu M, Ning X, Li R, et al. Signalling pathways involved in hypoxia-induced renal fibrosis. *J Cell Mol Med*. 2017;21:1248-1259.
43. Serón D, Moreso F, Fulladosa X, Hueso M, Carrera M, Grinyó JM. Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies. *Kidney Int*. 2002;61:727-733.
44. Serón D, Moreso F, Bover J, et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int*. 1997;51:310-316.
45. Pape L, Henne T, Offner G, et al. Computer-assisted quantification of fibrosis in chronic allograft nephropathy by picosirius red-staining: a new tool for predicting long-term graft function. *Transplantation*. 2003;76:955-958.
46. Grimm PC, Nickerson P, Gough J, et al. Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:1662-1668.
47. Kavvadas P, Dussaule J-C, Chatziantoniou C. Searching novel diagnostic markers and targets for therapy of CKD. *Kidney Int Suppl*. 2014;4:53-57.
48. Naesens M, Kuypers D, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:481-508.
49. Wolf G, Killen PD, Neilson EG. Cyclosporin A stimulates transcription and procollagen secretion in tubulointerstitial fibroblasts and proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol*. 1990;1:918-922.
50. Vieira JM, Noronha IL, Malheiros DM, Burdmann EA. Cyclosporine-induced interstitial fibrosis and arteriolar TGF-beta expression with preserved renal blood flow. *Transplantation*. 1999;68:1746-1753.
51. Khanna A, Plummer M, Bromberek C, Bresnahan B, Hariharan S. Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int*. 2002;62:2257-2263.

52. Roos-van Groningen MC, Scholten EM, Lelieveld PM, et al. Molecular comparison of calcineurin inhibitor-induced fibrogenic responses in protocol renal transplant biopsies. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:881-888.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Dao M, Lecru L, Vandermeersch S, et al. The cannabinoid receptor 1 is involved in renal fibrosis during chronic allograft dysfunction: Proof of concept. *J Cell Mol Med*. 2019;00:1-10. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14570>

2.3 – Discussion

Nous avons montré dans le travail ci-dessus que les cellules tubulaires expriment fortement CB1R durant la DCA. L'expression de CB1R augmente significativement au cours des trois premiers mois après la transplantation rénale, et reste stable par la suite. Dans leur travail, Lecru et al. (2015) ont également rapporté une expression tubulaire marquée de CB1R au cours de la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA, de la néphrite interstitielle aiguë et de la néphropathie diabétique. L'expression rénale de CB1R dans les reins normaux a été documentée par Lecru et al. (2015) et évaluée à $6,5\% \pm 4,8\%$. L'expression rénale de CB1R sur les biopsies préimplantatoires dans notre travail sur la DCA est beaucoup plus importante ($23\% \pm 15\%$) alors que nous avons utilisé le même anticorps, le même protocole expérimental et la même quantification morphométrique que ceux utilisés par Lecru et al. (2015). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de CB1R sur les biopsies préimplantatoires résulte des lésions de nécrose tubulaire aiguë dues à l'ischémie froide. CB1R pourrait donc être un marqueur prédictif du développement de la fibrose interstitielle et de la DCA.

Trois mois après la transplantation, il existe une corrélation positive entre l'expression de CB1R et la fibrose interstitielle. De plus, les patients dont la fibrose rénale ne progresse pas durant la première année après la greffe tendent à avoir une moindre majoration de l'expression de CB1R. Il est donc tout à fait possible que CB1R joue un rôle direct dans les stades précoces de la DCA. Nous avons documenté une expression de CB1R dans toutes les structures rénales (glomérules, tubules, cellules endothéliales et infiltrat inflammatoire interstitiel) au cours de la DCA. Les cellules tubulaires sont néanmoins le principal site d'expression de CB1R dans cette pathologie. Afin de préciser le rôle de CB1R au cours de la DCA, nous avons utilisé un modèle de fibrogenèse médiée par les anticalcineurines. Nous avons choisi le tacrolimus, qui est la molécule la plus utilisée actuellement. *In vitro*, nous avons traité des cellules tubulaires

proximales humaines et murines avec du tacrolimus. CB1R augmente significativement après l'administration de tacrolimus, tant au niveau transcriptionnel que protéique. Concomitamment à l'augmentation de CB1R, nous avons mis en évidence une augmentation de la synthèse de collagène, inhibée par l'ajout de rimonabant.

Ces résultats ainsi que ceux de Lecru et al. (2015) soulignent le rôle profibrosant de CB1R dans des néphropathies indépendantes du métabolisme. Les contributions respectives de la modulation myofibroblastique et de la modulation tubulaire de CB1R restent cependant à préciser. En effet, au cours de l'UUO, l'expression de CB1R augmente significativement dans les cellules tubulaires, les myofibroblastes interstitiels et les glomérules. Le blocage de CB1R dans ce modèle réduit la fibrose interstitielle via un rôle direct paracrine/autocrine sur les myofibroblastes, sans nette participation des cellules tubulaires. Au cours de la DCA au contraire, l'expression majoritaire de CB1R est tubulaire et le blocage de CB1R réduit la synthèse de collagène par les cellules tubulaires. Des explorations complémentaires sont donc indispensables et font l'objet de la suite du travail.

3 – Le blocage du récepteur cannabinoïde de type 1 réduit la dysfonction rénale à la phase tardive de l'ischémie reperfusion

Il n'y a pas de preuve à ce jour que le blocage de CB1R pourrait protéger la fonction rénale au cours de néphropathies non métaboliques et bloquer la progression de la MRC. La contribution relative des différents types cellulaires impliqués dans la modulation de la fibrose médiée par CB1R reste débattue. En effet, Lecru et al. (2015) ont montré que l'UUO s'accompagne d'une augmentation significative de l'expression de CB1R dans le parenchyme rénal, intéressant tout particulièrement les cellules épithéliales tubulaires. Dans ce modèle cependant, le blocage de CB1R réduit la fibrose interstitielle par une action directe paracrine/autocrine sur les myofibroblastes, sans nette participation des cellules tubulaires. De la même manière, au cours de la DCA, l'expression majoritaire de CB1R est tubulaire. Cependant, *in vitro*, le blocage de CB1R réduit la synthèse de collagène par les cellules tubulaires dans un modèle de fibrogenèse médiée par le tacrolimus (Dao et al., 2019).

3.1 – Objectif

L'objectif principal de ce travail est donc de documenter *in vivo* l'effet du blocage génétique et pharmacologique de CB1R sur la fonction rénale et la progression de la MRC. Nous avons utilisé pour ce faire un modèle expérimental murin d'I/R, modèle de transition IRA-MRC qui permet d'étudier concomitamment la fonction rénale et la progression de la fibrose interstitielle. Notre objectif secondaire est d'identifier la contribution relative des myofibroblastes et des cellules épithéliales tubulaires dans la modulation de la fibrose médiée par CB1R. Pour ce faire, nous avons développé des lignées murines transgéniques avec une délétion inductible de CB1R dans différents types cellulaires.

3.2 – Matériel et méthodes

3.2.1 – Animaux

Toutes les procédures animales ont été approuvées par le Comité d'éthique en expérimentation animale Charles Darwin N°5 / Sorbonne Université (projet #26941 HF-02). Nous avons utilisé des souris mâles élevées localement, âgées de 4 à 6 mois, sur un fond génétique C57Bl/6J. Les premières expériences ont été faites sur fond mixte à partir de 5 backcross (modèle d'IRA, modèle de MRC avec délétion génétique globale de CB1R). Les expériences suivantes (modèle de MRC avec blocage pharmacologique de CB1R) ont été faites sur fond congénique pur (> 9 backcross). Les souris sont maintenues dans une animalerie de statut EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques), dans un cycle jour-nuit de 12 heures. Elles reçoivent une alimentation standard normosodée et ont libre accès à l'eau de boisson. Les souris *Cnr1*^{-/-} (Ledent et al., 1999) et les souris CNRO (souris *Cnr1*^{lox/lox}) (Han et al., 2017), qui ont une séquence LoxP devant l'exon 2 du gène *Cnr1*, ont été gracieusement fournies respectivement par C. Ledent (Université Libre de Bruxelles) et J. Egan (NIA/NIH, USA), puis élevées localement. Leur fond génétique est mixte. Les souris *Cnr1*^{lox/lox} ont été inter-croisées avec des souris *Pax8-LCI.cre* (Kormann et al., 2020) et *P0.cre* (Asada et al., 2011), disponibles localement, pour obtenir une délétion spécifique de CB1R dans respectivement les cellules épithéliales tubulaires et les myofibroblastes. La délétion tubulaire de CB1R chez les souris *Cnr1*^{lox/lox}*Pax8-LCI.cre* était induite par l'administration de doxycycline 0.2 mg/mL et sucrose 3% dans l'eau de boisson pendant 2 semaines.

3.2.2 – Traitements expérimentaux

Le JD5037, un inhibiteur périphérique de CB1R qui ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, était administré aux souris par gavage quotidien à la posologie de 3 mg/kg, dans une solution composée de 99% d'huile de maïs et 1% de diméthylsulfoxyde (DMSO).

Le composé X (agrément de confidentialité en cours, compagnie Y), un inhibiteur périphérique de CB1R de 3^{ème} génération couplé à une activation de l'AMPK, était administré aux souris par gavage quotidien à la posologie de 3 mg/kg, dans une solution composée de 5% de DMSO, 5% de Tween 80 et 90% de NaCl 0,9%.

3.2.3 – Modèles expérimentaux d'ischémie reperfusion

Les procédures étaient réalisées sous anesthésie générale après injection intrapéritonéale de kétamine 100 mg/kg et Xylazine 20 mg/kg, avec un volume d'injection de 100 µl/10 g. En post-opératoire, une injection de buprénorphine 0,05 mg/kg était réalisée par voie sous-cutanée. Durant toute l'intervention chirurgicale, la température corporelle des souris était contrôlée et maintenue à 37°C.

Dans le modèle d'insuffisance rénale aiguë après I/R (I/R-AKI), nous avons réalisé simultanément une ischémie rénale gauche de 30 minutes et une néphrectomie droite concomitante. Les animaux étaient sacrifiés 24, 48 et 72 heures après l'intervention.

Dans le modèle d'insuffisance rénale chronique après I/R (I/R-CKD), nous avons réalisé à J0 une ischémie rénale gauche de 30 minutes. La néphrectomie droite était pratiquée 2 semaines après l'ischémie rénale gauche. Les souris étaient sacrifiées 48h ou 4 semaines après la néphrectomie.

3.2.4 – Evaluation de la fonction rénale

Les dosages plasmatiques d'urée et de créatinine ont été réalisés sur un automate multiparamétrique Olympus AU 400 au Centre de Recherche de l'Inflammation de l'Institut Claude Bernard (Paris).

Le cas échéant, nous avons mesuré le DFG par clairance de la sinistrin-isothiocyanate de fluorescéine (FITC). La sinistrin est un analogue de l'inuline. Son couplage à la FITC permet

de mesurer la décroissance de l'intensité de fluorescence à l'aide d'une caméra transdermique (Scarfe et al., 2018; Schreiber et al., 2012). Nous avons administré 15 mg/100 g de sinistrin-FITC par voie rétro-orbitaire aux souris. La durée d'enregistrement était de 1h 15.

3.2.5 – Histologie et immunohistochimie

Les prélèvements tissulaires ont été fixés dans une solution d'alcool-formol-acide acétique, inclus en paraffine et des coupes de 3 µm d'épaisseur ont été déposées sur des lames SuperFrost. Les colorations histologiques (trichrome de Masson et rouge Sirius) ont été réalisées au laboratoire d'Anatomie Cytologie Pathologique de l'hôpital de Bicêtre (Université Paris Sud). Les lésions élémentaires suivantes ont été évaluées en double aveugle (Dr Charlotte Mussini, laboratoire d'Anatomie Cytologie Pathologique de l'hôpital de Bicêtre / M. Dao) : inflammation corticale et médullaire, dilatations tubulaires, présence de cylindres tubulaires, fibrose interstitielle corticale (ci). Le score semi-quantitatif suivant a été utilisé : 0, absence de lésion ; 1, lésions intéressant moins de 10% du parenchyme analysé ; 2, lésions intéressant 10 à 25% du parenchyme analysé ; 3, lésions intéressant 25 à 50% du parenchyme analysé ; 4, lésions intéressant plus de 50% du parenchyme analysé.

Les immunohistochimies ont été réalisées sur lames de tissu fixé déparaffiné après démasquage thermique dans une solution à pH 6 et blocage de la peroxydase endogène dans une solution de méthanol 1%. Nous avons utilisé le système de détection DakoREAL™ EnVision™ Detection System, Peroxydase/DAB+, Rabbit or Rat (DakoCytomation, CA, USA). Les anticorps utilisés sont listés dans le **Tableau 1**. L'interprétation des IHC a été réalisée en double aveugle (Dr Charlotte Mussini, laboratoire d'Anatomie Cytologie Pathologique de l'hôpital de Bicêtre / M. Dao). Le cortex et la médullaire ont été analysés séparément. Le score semi-quantitatif suivant a été utilisé : 0, absence de lésion ; 1, lésions intéressant moins de 10% du parenchyme analysé ; 2, lésions intéressant 10 à 25% du parenchyme analysé ; 3, lésions

intéressant 25 à 50% du parenchyme analysé ; 4, lésions intéressant plus de 50% du parenchyme analysé.

Tableau 1 – Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie

Cible	Référence	Hôte	Dilution	Incubation
αSMA	ab5694 (Abcam, Cambridge)	Lapin	1/200	Toute la nuit, 4°C
CD3	ab5690 (Abcam, Cambridge)	Lapin	1/500	Toute la nuit, 4°C
F4/80	MCA497R (Bio Rad, Californie)	Rat	1/150	Toute la nuit, 4°C

3.4.6 – Extraction de l'ARN et RT-qPCR

L'ARN de tissu a été extrait avec le kit MRC-trizol (TRI Reagent®, Molecular Research Center MRC, Cincinnati, Etats-Unis) et l'ARN de cellules avec le kit EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-preps Super Kit (Bio Basic Inc) selon les instructions du fournisseur. La concentration d'ARN était mesurée avec le spectrophotomètre NanoDrop1000 (Thermo Scientific). Le brin d'ADN complémentaire a été synthétisé avec le kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientifique) et la PCR réalisée avec du SYBR green sur un Ligh Cycler 480 (Roche). La quantification relative des transcrits était réalisée par rapport aux gènes de ménage suivants : *gusb* pour les tissus, *hprt* pour les cellules. Les séquences des amorces utilisées sont listées dans le Tableau 2.

Tableau 2 – Séquences des primers utilisés pour les RTqPCR

Gène	Sens	Séquence
<i>arg1</i>	Sens	5' -CCTGAAGGAACTGAAAGGAAAG-3'
	Antisens	5' -TTGGCAGATATGCAGGGAGT-3'
<i>cnr1</i>	Sens	5' -GGGCAAATTTCCCTGTAGCA-3'
	Antisens	5' -GGCTCAACGTGACTGAGAAA-3'
<i>colla2</i>	Sens	5' -GCAGGTTACCTACTCTGTCCT-3'
	Antisens	5' -CTTGCCCCATTCATTTGTCT-3'
<i>col3a1</i>	Sens	5' -TCCCCTGGAATCTGTGAATC-3'
	Antisens	5' -TGAGTCGAATTGGGGAGAAT-3'
<i>gusb</i>	Sens	5' -CTCTGGTGGCCTTACCTGAT-3'
	Antisens	5' -CAGTTGTTGTCACCTTCACCTC-3'
<i>hprt</i>	Sens	5' -CCTCCTCAGACCGCTTTTT-3'
	Antisens	5' -AACCTGGTTCATCATCGCTAA-3'
<i>iNOS</i>	Sens	5' -GGGCTGTCACGGAGATCA-3'
	Antisens	5' -CCATGATGGTCACATTCTGC-3'
<i>IL23</i>	Sens	5' -TCCCTACTAGGACTCAGCCAAC-3'
	Antisens	5' -TGGGCATCTGTTGGGTCT-3'
<i>mcp1</i>	Sens	5' -GGCTGGAGAGCTACAAGAGG-3'
	Antisens	5' -CTCTTGAGCTTGGTGACAAAAA-3'
<i>mrc1</i>	Sens	5' -CCACAGCATTGAGGAGTTTG-3'
	Antisens	5' -ACAGCTCATCATTTGGCTCA-3'
<i>renin</i>	Sens	5' -GCCGCCTCTACCTTGCTTGTG-3'
	Antisens	5' -GGGGCAGCTCGGTGACCTCT-3'
<i>tgfβ-induced</i>	Sens	5' -GAGCTGCTTATCCCAGATTCA-3'
	Antisens	5' -GGCAGTGGAGACGTCAGATT-3'

3.4.7 – Lignées cellulaires

Les myofibroblastes murins primaires étaient obtenus par la technique de l'explant publiée par Lecru et al. (2015). Les PTEC murines primaires étaient obtenues selon la technique préalablement mise au point dans notre laboratoire et publiée par Legouis et al. (2015). Les expériences de *Live Imaging* ont été réalisées après transfection des cellules avec un lentivirus Perceval (Tantama et al., 2013). Cette technique a déjà été utilisée par un des chercheurs de l'unité (doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.24.054643>).

3.4.8 - Statistiques

Les méthodes statistiques descriptives usuelles (moyennes, médianes, écart-types et rangs) ont été utilisées pour décrire la distribution des variables. Pour rechercher une association entre les variables catégorielles, nous avons utilisé le test exact de Fisher. Dans le cas des variables quantitatives, nous avons utilisé le test de Mann-Whitney. Les recherches de corrélation entre variables quantitatives ont été pratiquées à l'aide du test de corrélation linéaire de Bravais-Pearson. Une *p value* < 0,05 a été considérée comme significative pour l'ensemble des analyses statistiques. Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide des logiciels InStat 3 et Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3.3 – Résultats

3.3.1 – La délétion génétique globale de CB1R ne modifie pas la fonction rénale de base des souris

Nous avons mesuré la clairance de la sinistrin-FITC chez 2 souris *Cnr1*^{-/-} et chez 3 souris sauvages (WT) issues de la même portée. Tous les animaux étaient des mâles âgés de 4 mois au moment de la mesure. Le DFG mesuré était identique dans les deux groupes d'animaux : 691, 869 et 884 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{ g}$ chez les animaux WT ; 670 et 846 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{ g}$ chez les animaux *Cnr1*^{-/-}.

3.3.2 – CB1R ne joue pas de rôle dans l'insuffisance rénale aiguë à la phase aiguë de l'ischémie-reperfusion (I/R-AKI)

Dans le modèle d'I/R-AKI, nous avons réalisé simultanément une ischémie rénale gauche de 30 minutes et une néphrectomie droite concomitante. Nous n'avons pas mis en évidence d'élévation significative des transcrits de *Cnr1* entre le rein contrôle droit et le rein ischémié gauche à 24, 48 et 72h de l'intervention : *Cnr1* restait faiblement exprimé à ces trois temps post-opératoires avec un Ct > 40 cycles (n=4/groupe). Nous avons comparé l'effet de la délétion génétique de *Cnr1* 24 heures après la chirurgie. La fonction rénale évaluée par l'urée et la créatinine plasmatiques était identique entre les souris WT et les souris *Cnr1*^{-/-} (Figures 1A et 1B). Des lésions sévères de nécrose tubulaire aiguë étaient observées dans les deux groupes avec une perte de la bordure en brosse intéressant la totalité des PTEC et des cylindres intratubulaires. Le score de dilatation tubulaire était identique entre les deux groupes, $2,3 \pm 1,0$ chez les WT et $2,2 \pm 1,2$ chez les souris *Cnr1*^{-/-} (p=0,73) (Figure 1C). L'inflammation interstitielle cortico-médullaire n'était pas non plus modifiée par la délétion génétique de CB1R (Figure 1D).

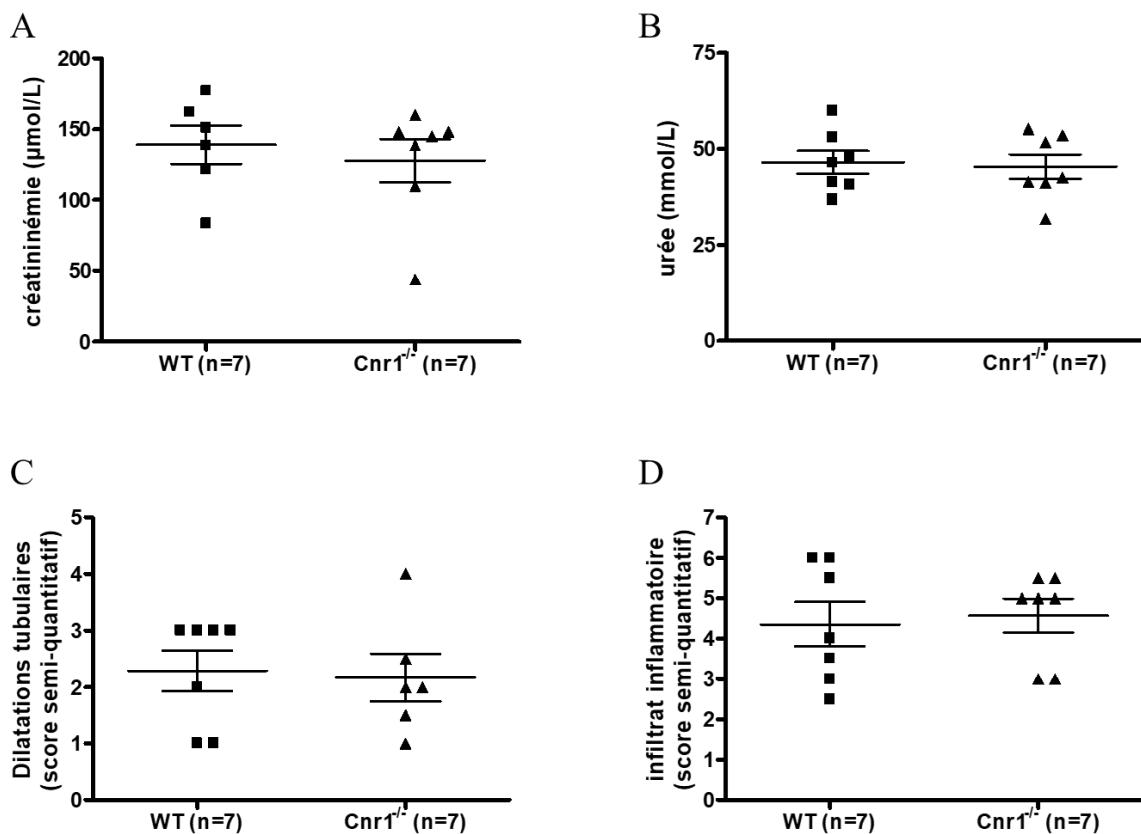


Figure 1 - CB1R ne joue pas de rôle à la phase aiguë de l'ischémie reperfusion. (A, B) La délétion génétique de CB1R n'a pas d'impact sur la sévérité de l'insuffisance rénale aiguë évaluée par l'urée (B) et la créatinine plasmatique (C) chez les souris WT (n=7) et *Cnr1*^{-/-} (n=7). (C) La délétion génétique de CB1R n'a pas d'effet sur les lésions histologiques tubulaires (score semi-quantitatif, cortex + médullaire). (D) La délétion génétique de CB1R n'a pas d'effet sur l'infiltrat inflammatoire (score semi-quantitatif, cortex + médullaire). Moyenne ± SEM.

Nous avons étudié par spectrométrie de masse les ligands de CB1R, prélevés 2 heures après les 30 minutes d'ischémie rénale. Nous n'avons pas mis en évidence de modification de la concentration du 2 arachidonoyl glycérol, le ligand principal de CB1R (Figure 2A). La concentration des autres ligands (2 arachidonoyl glycérol éther, anandamide, docohexanoyl éthanamide, palmitoyl éthanamide et oléamide) était très faible et n'était pas non plus modifiée (Figures 2B à 2F).

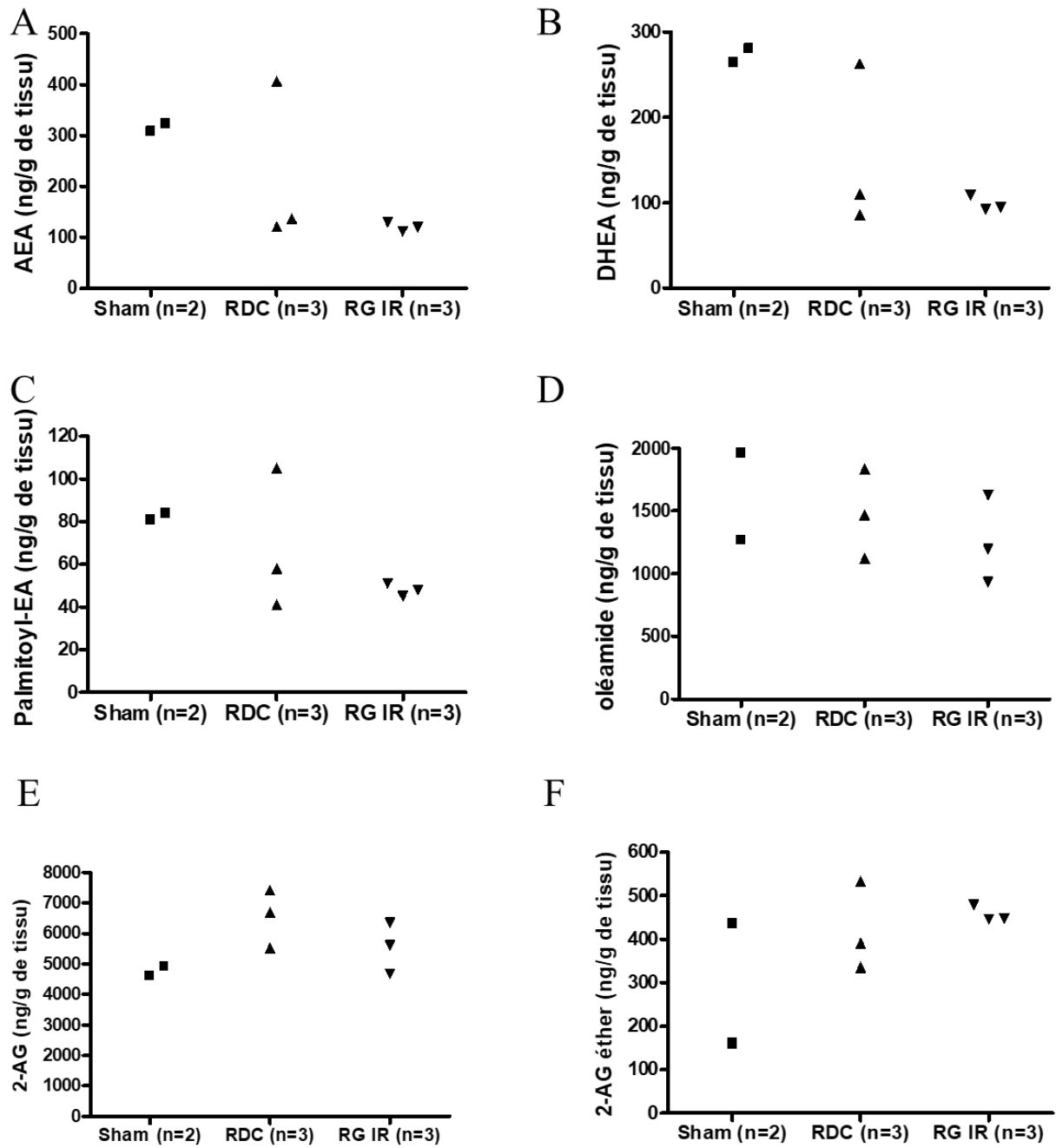


Figure 2 – Les ligands de CB1R ne sont pas modifiés à la phase aiguë de l'ischémie-reperfusion. Abréviations : AEA, anandamide ; AG, arachidonoylglycérol ; DHEA, docohexanoyl éthanolamide ; EA, éthanolamide ; RDC, rein droit contrôle ; RG IR, rein gauche ischémié.

3.3.3 – L'inhibition génétique de CB1R prévient la fibrose rénale dans le modèle d'I/R-CKD

Dans le modèle d'I/R-CKD chez des souris WT (n=15) et *Cnr1*^{-/-} (n=13), nous avons réalisé une ischémie rénale gauche de 30 minutes à J10, suivie d'une néphrectomie droite à J14 (Figure 3A). Les animaux étaient sacrifiés 6 semaines après l'I/R (fond mixte). Chez les souris WT, les transcrits de *Cnr1* étaient significativement augmentés dans le rein gauche ischémié par rapport au rein droit contrôle (Figure 3B). Alors que l'urée plasmatique était similaire dans les deux groupes, la créatininémie était plus basse chez les souris *Cnr1*^{-/-} par rapport aux souris sauvages ($43 \mu\text{mol/L} \pm 23 \mu\text{mol/L}$ versus $27 \mu\text{mol/L} \pm 9 \mu\text{mol/L}$, $p=0,03$) (Figures 3C et 3D). La fibrose interstitielle était significativement moindre chez les souris *Cnr1*^{-/-} par rapport aux souris WT ($2,3 \pm 0,9$ versus $1,5 \pm 0,9$, $p=0,04$) (Figure 3E). La fibrose interstitielle était significativement corrélée à la fonction rénale évaluée par la créatininémie dans ce modèle ($R=0,46$ [0,06-0,73], $p=0,03$).

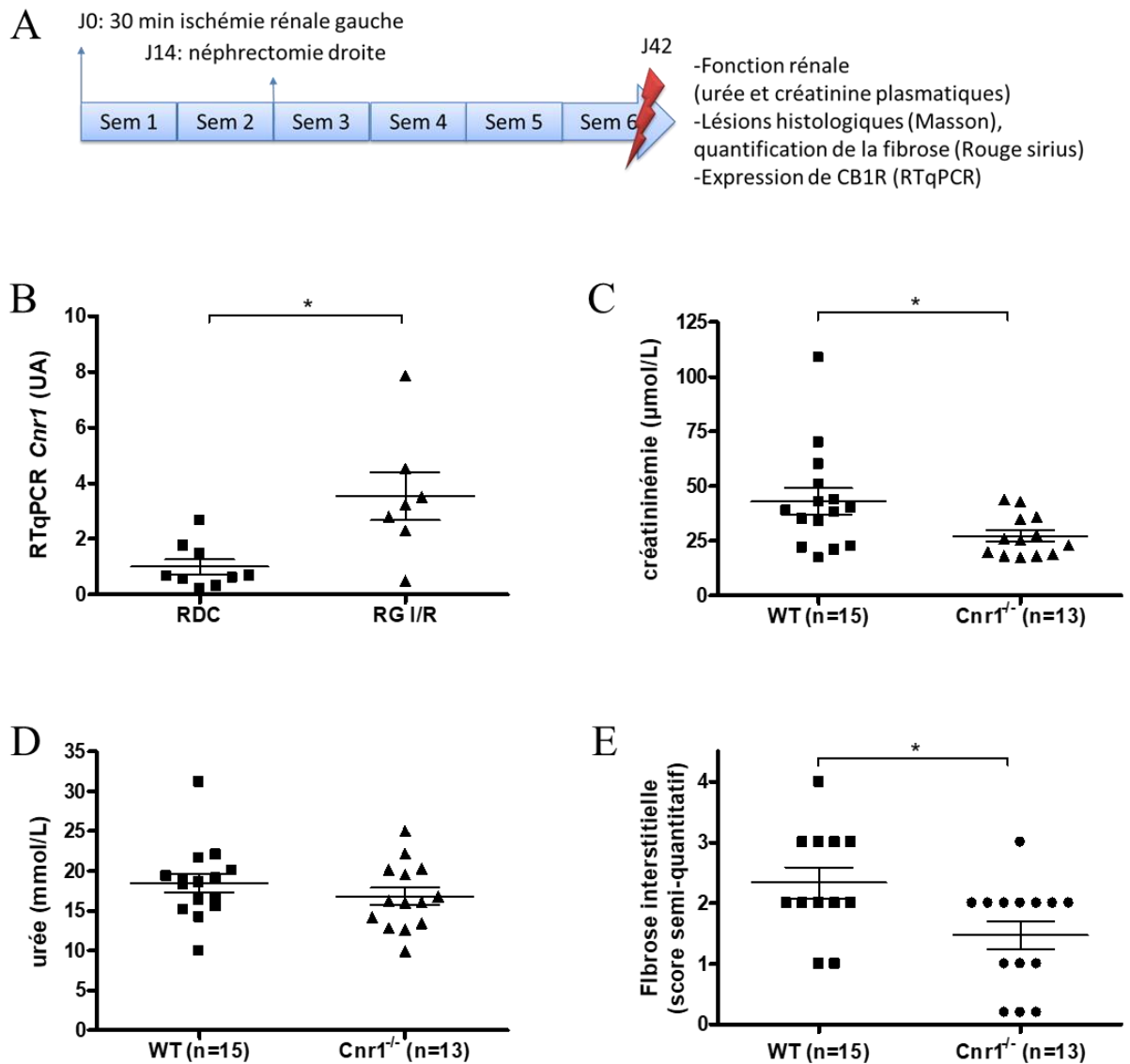


Figure 3 – L’inhibition génétique globale de CB1R prévient la MRC dans le modèle d’I/R-CKD. (A) Modèle expérimental. (B) Les transcrits de *Cnr1* sont significativement plus élevés dans les reins ischémiés que dans les reins contrôles (souris WT, n=9, p=0,006). (C) La créatininémie est significativement plus basse chez les souris *Cnr1*^{-/-} (n=13) que chez les souris WT (n=15). (D) La délétion génétique de CB1R n’a pas de conséquence sur l’urée plasmatique. (E) La fibrose interstitielle (ci, score semi-quantitatif) est significativement plus basse chez les souris *Cnr1*^{-/-} (n=13) que chez les souris WT (n=15). * p < 0,05. Moyenne ± SEM. Abréviations : CB1R, récepteur cannabinoïde de type 1 ; RDC, reins droits contrôles ; RG I/R, reins gauches ischémiés ; WT, souris sauvages.

Chez les souris congéniques utilisées dans les modèles avec blocage pharmacologique de CB1R, en raison d'une importante mortalité post-opératoire (identique entre les groupes), nous avons réduit le délai entre la néphrectomie et le sacrifice. Les animaux étaient alors sacrifiés 3 jours et non plus 4 semaines après la néphrectomie (Figure 4A). Dans ce modèle, la fonction rénale était identique entre les souris WT (n=9) et *Cnr1*^{-/-} (n=8) (Figures 4B et 4C). En revanche, la fibrose interstitielle était significativement plus importante chez les souris WT que chez les souris *Cnr1*^{-/-} ($3,1 \pm 1,2$ versus $1,7 \pm 0,7$, $p=0,02$) (Figures 4D, 4F, 4G). Les lésions aiguës (dilatations tubulaires, cylindres intra-tubulaires) étaient encore marquées au moment du sacrifice, sans différence entre les groupes (Figure 4E). L'infiltrat inflammatoire n'était pas modifié par le blocage génétique de CB1R ($1,3 \pm 0,5$ dans le groupe WT versus $1,3 \pm 0,7$ dans le groupe *Cnr1*^{-/-}, $p=0,91$).

La créatininémie au moment du sacrifice était significativement corrélée de façon positive avec les lésions aiguës ($R=0,48$ [0,01-0,78], $p=0,047$) mais pas avec la fibrose interstitielle ($R=0,32$ [-0,19-0,70], $p=0,21$). De façon intéressante, la créatininémie et la fibrose interstitielle tendaient à être corrélées chez les souris WT ($R=0,56$ [-0,16-0,89], $p=0,11$) alors que la créatininémie tendait à être corrélée avec les lésions aiguës chez les souris *Cnr1*^{-/-} ($R=0,63$ [-0,14-0,92], $p=0,09$). Ces résultats suggèrent que dans le modèle expérimental d'I/R-CKD avec sacrifice à 72h de la néphrectomie droite, l'insuffisance rénale des animaux WT est davantage liée à des lésions chroniques alors que les animaux *Cnr1*^{-/-} sont encore en phase aiguë.

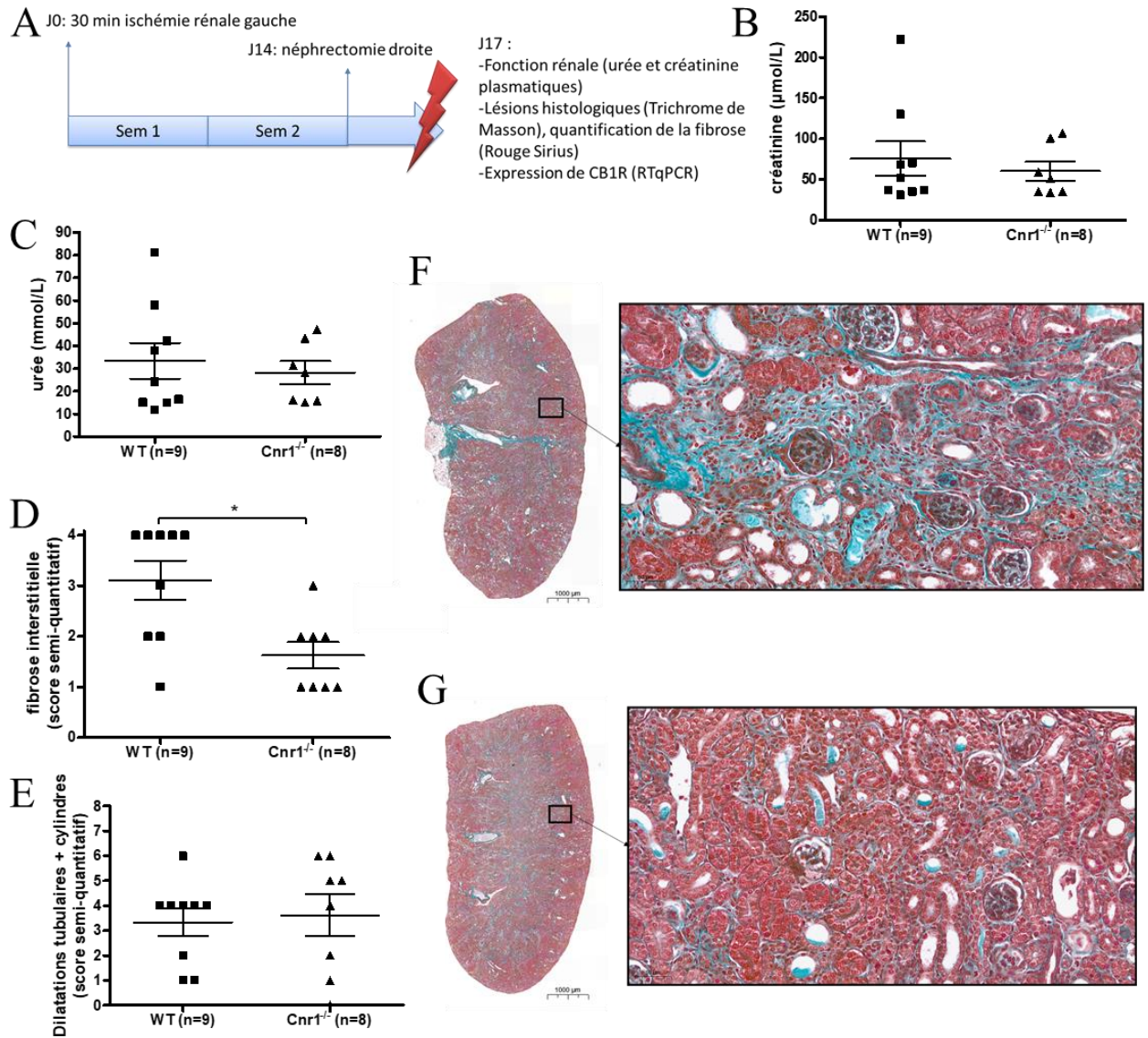


Figure 4 – L’inhibition génétique globale de CB1R réduit la fibrose interstitielle précocement après la néphrectomie dans le modèle d’I/R-CKD. (A) Modèle expérimental. (B) La créatininémie et (C) l’urée plasmatique sont identiques chez les souris WT (n=9) et les souris $Cnr1^{-/-}$ (n=8). (D) La fibrose interstitielle (ci, score semi-quantitatif) est significativement plus basse chez les souris $Cnr1^{-/-}$ (n=8) que chez les souris WT (n=9). (E) Les lésions aiguës (score semi-quantitatif, dilatations tubulaires + cylindres intratubulaires) sont identiques chez les souris WT (n=9) et les souris $Cnr1^{-/-}$ (n=8). (F) Coupe de rein gauche ischémié d’une souris WT, trichrome de Masson, vue d’ensemble et X10. Le parenchyme rénal est traversé de travées fibreuses. (G) Coupe de rein gauche ischémié d’une souris $Cnr1^{-/-}$, trichrome de Masson, vue d’ensemble et X10.

* $p < 0,05$. Moyenne \pm SEM.

Abréviations : CB1R, récepteur cannabinoïde de type 1 ; WT, souris sauvages.

3.3.4 – L'inhibition pharmacologique de CB1 par le JD5037 préserve la fonction rénale dans le modèle d'I/R-CKD

Nous avons utilisé dans ce modèle les souris WT congéniques de la lignée CB1R. Nous avons administré le traitement (JD5037 3 mg/kg, n=7) et son excipient (DMSO 1%, groupe Vehicle, n=7) par gavage quotidien. En raison d'une importante mortalité péri-opératoire, les animaux ont été sacrifiés 3 jours après la néphrectomie droite (Figure 4A). L'expression de CB1R, quantifiée par RTqPCR de *Cnr1*, augmentait significativement ($p = 6.10^{-4}$) dans les reins gauches ischémiés par rapport aux reins droits controlatéraux (Figure 5A). Les transcrits de *Cnr1* n'étaient pas modifiés par le JD5037. La créatininémie était significativement plus basse chez les souris ayant reçu le JD5037 que chez les souris du groupe Vehicle ($87 \mu\text{mol/L} \pm 56 \mu\text{mol/L}$ versus $167 \mu\text{mol/L} \pm 58 \mu\text{mol/L}$, $p=0,03$) (Figure 5B). L'urée tendait également à être plus basse chez les souris ayant reçu le JD5037 ($p=0,09$) (Figure 5C). La perte de poids ($28\% \pm 8\%$ dans le groupe Vehicle, $27\% \pm 9\%$ dans le groupe JD5037, $p=1$) et les transcrits de la rénine ($1,1 \pm 1,0$ dans le groupe Vehicle, $0,9 \pm 0,7$ dans le groupe JD5037, $p=1$) étaient identiques entre les groupes, allant à l'encontre d'une cause fonctionnelle par hypovolémie vraie dans notre modèle (Figure 5D).

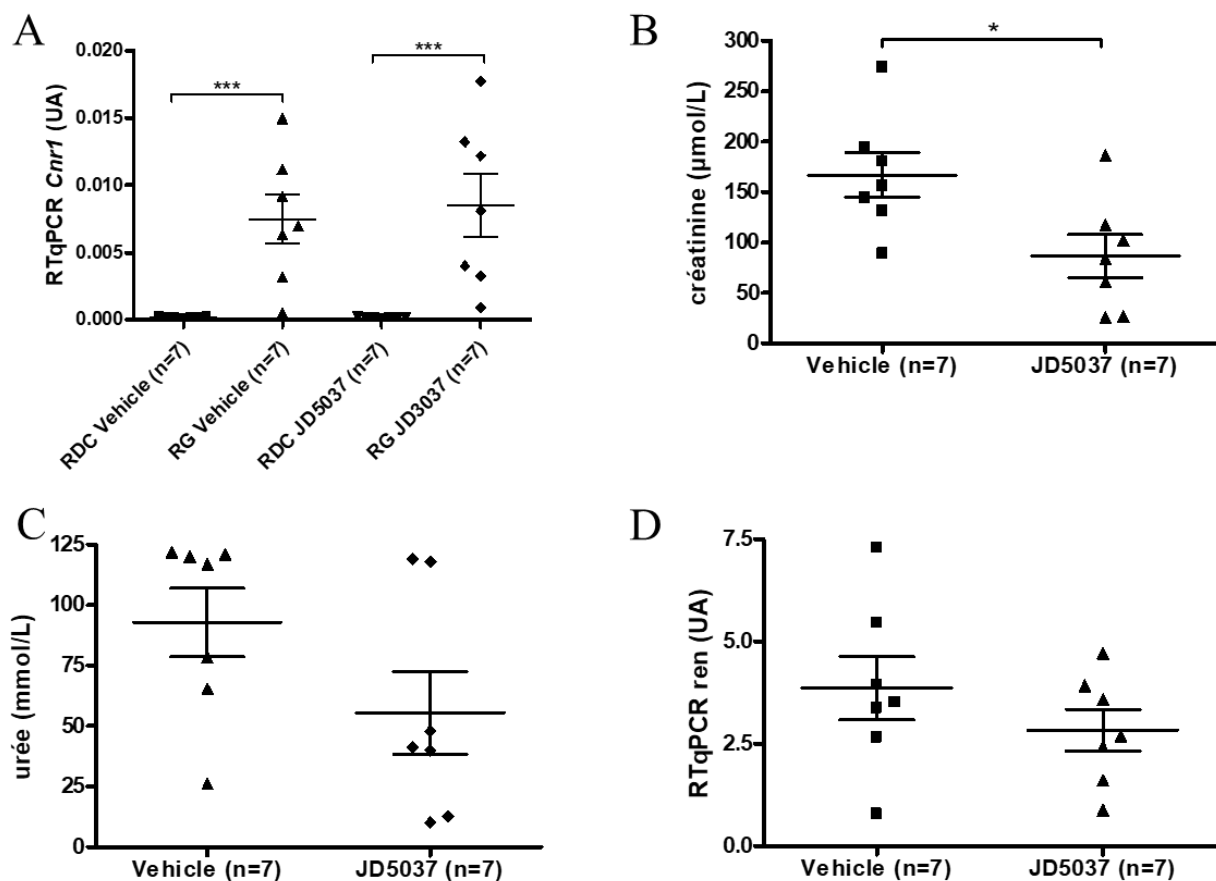


Figure 5 – L’inhibition pharmacologique de CB1R par le JD5037 (3 mg/kg) préserve la fonction rénale dans le modèle d’I/R-CKD (A) L’expression de CB1R augmente dans les reins gauches ischémiés par rapport aux reins contrôles droits (RTqPCR de *Cnr1*). (B) La créatininémie est significativement plus basse chez les souris ayant reçu le JD5037 (n=7/groupe). (C) L’urée tend à être plus basse chez les souris ayant reçu le JD5037 (p=0,09). (D) La rénine n’est pas modifiée par le JD5037 (RTqPCR de *ren*).
 Abréviations : RDC, rein droit contrôle ; RG, rein gauche ischémié ; UA, unités arbitraires
 * p < 0,05 ; *** p < 10⁻³. Moyenne ± SEM.

L’examen histologique a montré que les souris du groupe JD5037 avaient significativement moins de fibrose interstitielle que les souris du groupe Vehicle ($1,3 \pm 0,5$ versus $2,3 \pm 0,8$, p=0,03) (Figure 6A). L’immunomarquage par l’ α SMA était également moindre chez les souris ayant reçu le JD5037 ($5,7 \pm 0,5$ dans le groupe Vehicle, $3,3 \pm 1,0$ dans le groupe JD5037, p=0,0012) (Figure 6). Alors que l’inflammation en microscopie optique était identique entre les deux groupes (Figure 7A), l’immunomarquage F4/80 était significativement moindre chez les souris ayant reçu le JD5037 (Figure 7B). Les transcrits des macrophages de type M1 (*iNOS*,

mcp1, *IL23*) et M2 (*arg1*, *mrc1*) étaient identiques entre les groupes (Figure 7). L'immunomarquage CD3 était très faible (<1% des cellules inflammatoires) et n'était pas modifié par le JD5037.

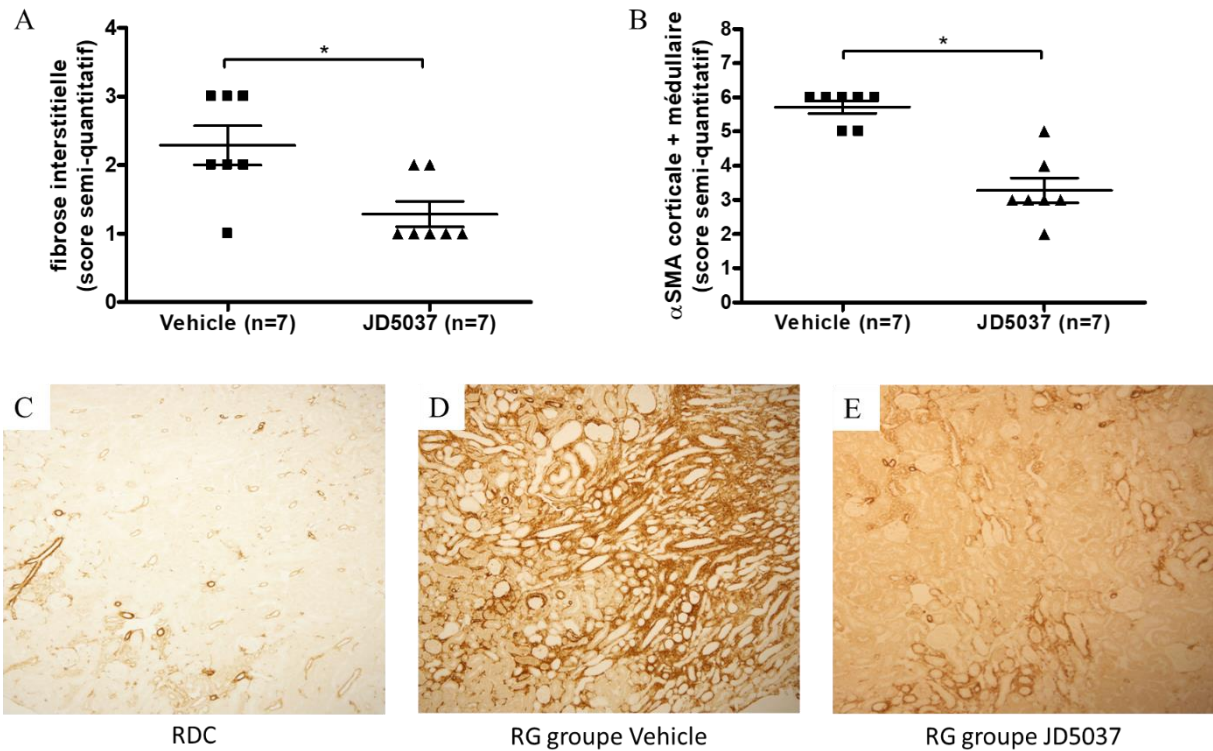


Figure 6 – L’inhibition pharmacologique de CB1R par le JD5037 (3 mg/kg) prévient la fibrose rénale dans le modèle d’I/R-CKD (A) La fibrose interstitielle (ci, score semi-quantitatif) est significativement réduite chez les souris ayant reçu le JD5037. (B) L’infiltration myofibroblastique évaluée par l’immunomarquage αSMA (score semi-quantitatif, αSMA corticale + médullaire), est significativement moindre chez les souris ayant reçu le JD5037. (C) Immunohistochimie αSMA d’un rein droit contrôle, X10. (D) Immunohistochimie αSMA d’un rein gauche ischémié du groupe Vehicle, X10. (E) Immunohistochimie αSMA d’un rein gauche ischémié du groupe JD5037, X10.

Abréviations : RDC, rein droit contrôle ; RG, rein gauche ischémié

* $p < 0,05$. Moyenne ± SEM.

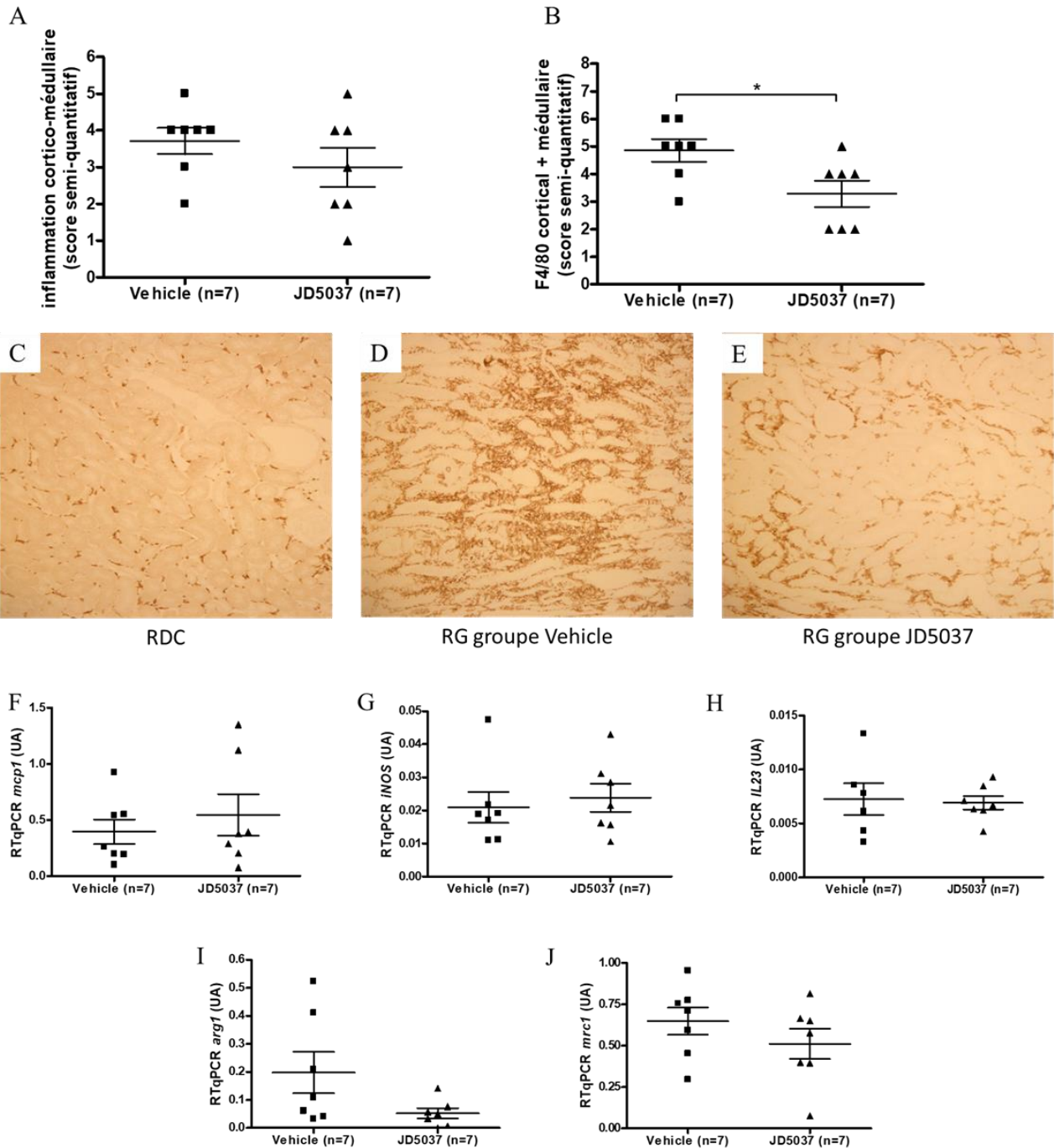


Figure 7 – L’inhibition pharmacologique de CB1R par le JD5037 (3 mg/kg) réduit l’infiltrat macrophagique dans le modèle d’I/R-CKD. (A) L’inflammation cortico-médullaire (ci, score semi-quantitatif) n’est pas modifiée par le JD5037. (B) L’infiltration macrophagique évaluée par l’immunomarquage F4/80 (score semi-quantitatif, F4/80 corticale + médullaire), est significativement moindre chez les souris ayant reçu le JD5037. (C) Immunohistochimie F4/80 d’un rein droit contrôle, X10. (D) Immunohistochimie F4/80 d’un rein gauche ischémié du groupe Vehicle, X10. (E) Immunohistochimie F4/80 d’un rein gauche ischémié du groupe JD5037, X10. (F à J) Les transcrits des macrophages de type M1, (F) *mcp1*, (G) *iNOS* et (H) *IL23* ne sont pas modifiés par le JD5037. Les transcrits des macrophages de type M2, (I) *arg1* et (J) *mrc1* ne sont pas modifiés par le JD5037. Abréviations : RDC, rein droit contrôle ; RG, rein gauche ischémié ; UA, unités arbitraires * $p < 0,05$. Moyenne \pm SEM.

3.3.5 – L’inhibition pharmacologique de CB1 par le composé X préserve la fonction rénale dans le modèle d’I/R-CKD

Nous avons utilisé dans ce modèle les mêmes souris WT congéniques de la lignée CB1R que celles utilisées pour tester le JD5037. Nous avons administré le composé X (n=6) et son excipient (DMSO 5%, Tween 80 5%, NaCl 0,9% 80%, n=9) par gavage quotidien. Les animaux étaient sacrifiés 3 jours après la néphrectomie droite, c’est-à-dire 17 jours après l’ischémie-reperfusion rénale gauche (Figure 4A). La créatininémie était significativement plus basse chez les souris ayant reçu le composé X par rapport aux souris du groupe Vehicle ($120 \mu\text{mol/L} \pm 75 \mu\text{mol/L}$ versus $211 \mu\text{mol/L} \pm 53 \mu\text{mol/L}$, $p=0,03$) (Figure 8A) et l’urée tendait à l’être également ($85 \text{ mmol/L} \pm 13 \text{ mmol/L}$ dans le groupe Vehicle, $54 \text{ mmol/L} \pm 30 \text{ mmol/L}$ dans le groupe composé X, $p=0,06$) (Figure 8B). Là encore, la perte de poids ($23\% \pm 4\%$ dans le groupe Vehicle, $21\% \pm 8\%$ dans le groupe composé X, $p=0,95$) et les transcrits de la rénine ($1,1 \pm 0,5$ dans le groupe Vehicle, $0,9 \pm 0,7$ dans le groupe composé X, $p=0,61$) (Figure 8C) étaient identiques entre les groupes, allant à l’encontre d’une cause fonctionnelle par hypovolémie vraie. L’expression de CB1R, quantifiée par RTqPCR de *Cnr1*, augmentait significativement ($p < 10^{-3}$) dans les reins gauches ischémiés par rapport aux reins droits controlatéraux (Figure 8D). Les transcrits de *Cnr1* n’étaient pas modifiés par le composé X.

Histologiquement, le composé X réduisait significativement la fibrose interstitielle ($3,2 \pm 0,8$ dans le groupe Vehicle, $1,6 \pm 0,5$ dans le groupe composé X, $p=0,002$) (Figures 9A, 9D, 9E). La fibrose interstitielle était significativement corrélée à la fonction rénale évaluée par la créatininémie dans ce modèle ($R=0,66$ [0,22-0,88], $p=0,008$). L’inflammation interstitielle et les dilatations tubulaires étaient identiques entre les groupes (Figures 9B, 9C, 9F, 9G). Les transcrits des marqueurs de fibrose (*colla2*, *col3a1*, *tgfb-induced*) n’étaient pas modifiés par le composé X. De façon étonnante, les transcrits de *mcp1* étaient plus élevés dans le groupe composé X ($1,7 \pm 1,0$) que dans le groupe Vehicle ($0,7 \pm 0,2$; $p = 0,049$). Les autres marqueurs

macrophagiques de type 1 (*iNOS*, *IL23*) ainsi que les marqueurs macrophagiques de type 2 (*arg1*, *mrc1*) étaient identiques entre les groupes.

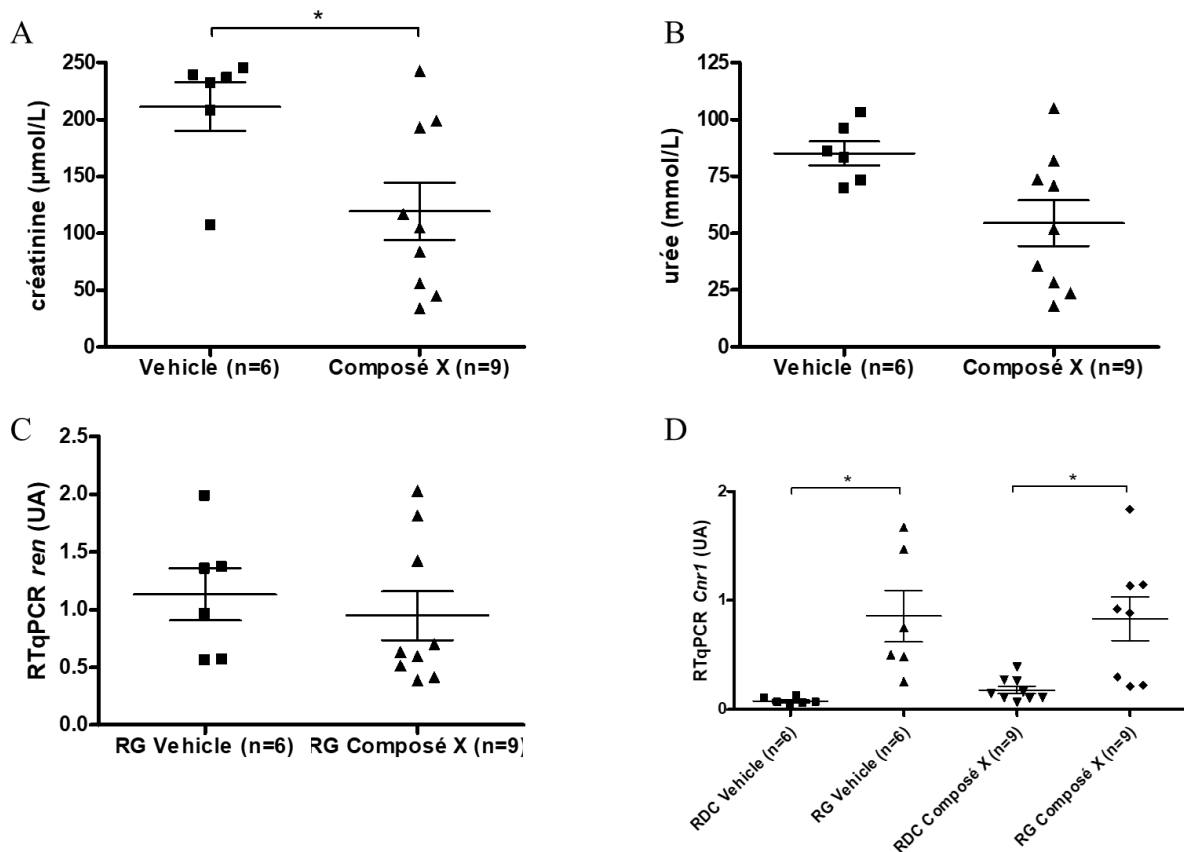


Figure 8 – L’inhibition pharmacologique de CB1R par le composé X (3 mg/kg) préserve la fonction rénale dans le modèle d’I/R-CKD (A) La créatinémie est significativement plus basse chez les souris ayant reçu le composé X. (C) L’urée n’est pas modifiée par le composé X. (D) La rénine n’est pas modifiée par le composé X (RTqPCR de *ren*). (A) L’expression de CB1R augmente dans les reins gauches ischémiés par rapport aux reins contrôles droits (RTqPCR de *Cnr1*). Abréviations : RDC, rein droit contrôle ; RG, rein gauche ischémié ; UA, unités arbitraires. * $p < 0,05$; * $p < 10^{-3}$. Moyenne \pm SEM.**

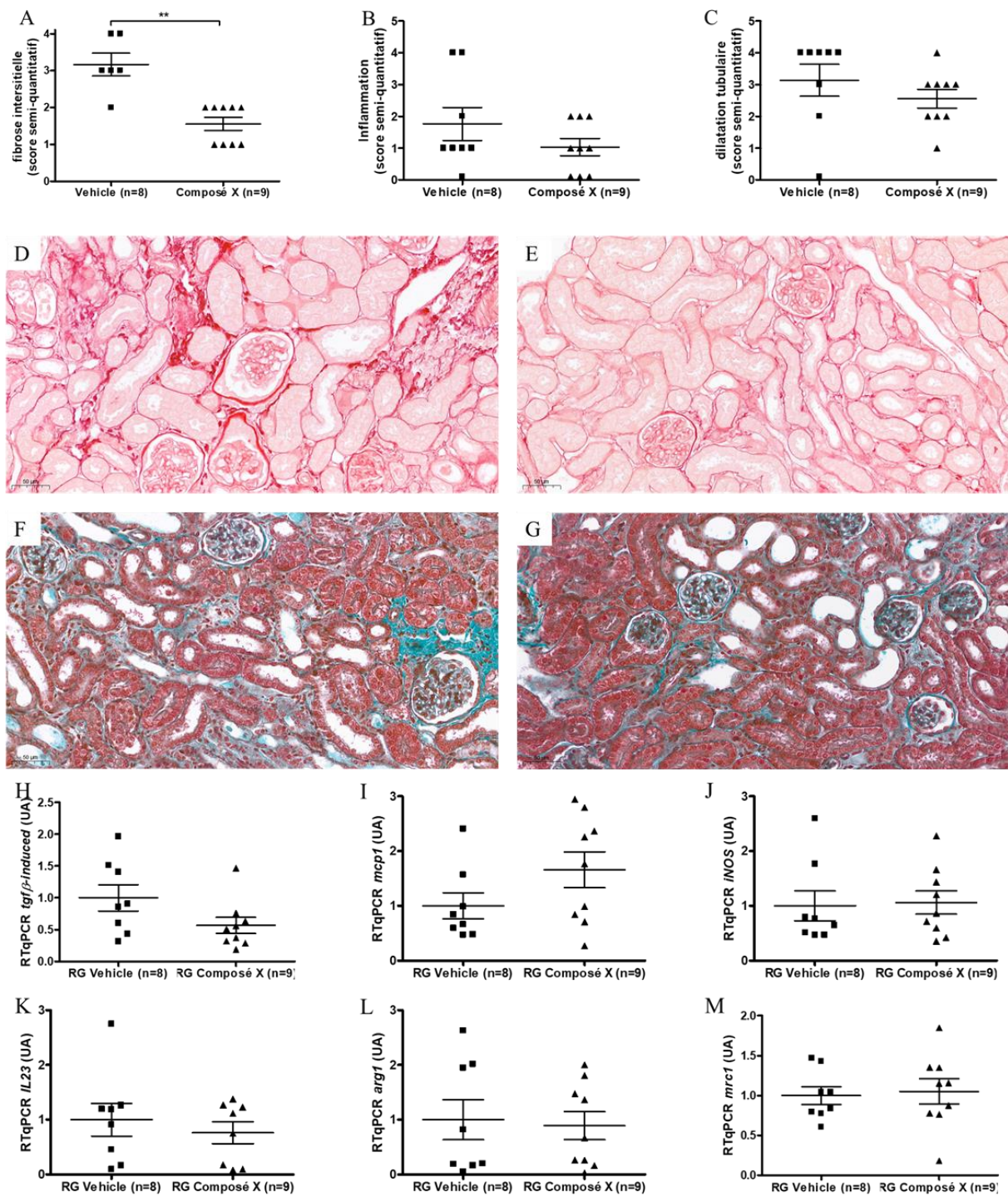


Figure 9 – L’inhibition pharmacologique de CB1R par le composé X (3 mg/kg) prévient la fibrose rénale dans le modèle d’I/R-CKD (A) Le composé X réduit la fibrose interstitielle (ci, score semi-quantitatif). (B) L’inflammation cortico-médullaire (score semi-quantitatif) et (C) les dilatations tubulaires ne sont pas modifiées par le composé X. (D) Fibrose interstitielle d’un rein gauche ischemié du groupe Vehicle, X20, Rouge Sirius. (E) Fibrose interstitielle d’un rein gauche ischemié du groupe composé X, X20, Rouge Sirius. (F) Dilatations tubulaires d’un rein gauche ischemié du groupe Vehicle, X20, trichrome de Masson. (G) Dilatations tubulaires d’un rein gauche ischemié du groupe composé X, X20, trichrome de Masson. (H) Les transcrits du *TGFβ-induced* ne sont pas modifiés par le composé X. (I) Les transcrits de *mcp1* sont significativement plus élevés dans le groupe composé X ($p=0,049$). (J à M) Les autres transcrits des macrophages de type M1, (J) *iNOS* et (K) *IL23* ne sont pas modifiés par le composé X. Les transcrits des macrophages de type M2, (L) *arg1* et (M) *mrc1* ne sont pas modifiés par le composé X. Abréviations : RDC, rein droit contrôle ; RG, rein gauche ischemié ; UA, unités arbitraires. * $p < 0,05$. Moyenne \pm SEM. Scale bars 50 μ M.

3.3.6 – Caractérisation de la lignée CNRO Pax8-LC1.cre : délétion tubulaire induction de *Cnr1*

Afin de préciser *in vivo* le rôle des cellules tubulaires dans la réduction de la fibrose médiée par l'inhibition de CB1R, nous avons développé des souris transgéniques avec inhibition tubulaire inductible de *Cnr1* par inter-croisement des souris *Pax8-LC1.cre* avec les souris CNRO (Figure 10A). Le DFG mesuré des souris *Cnr1^{lox/lox} Pax8-LC1.cre* après induction de la délétion par administration de doxycycline restait identique à celui des souris *Cnr1^{+/+} Pax8-LC1.cre* (Figure 10B).

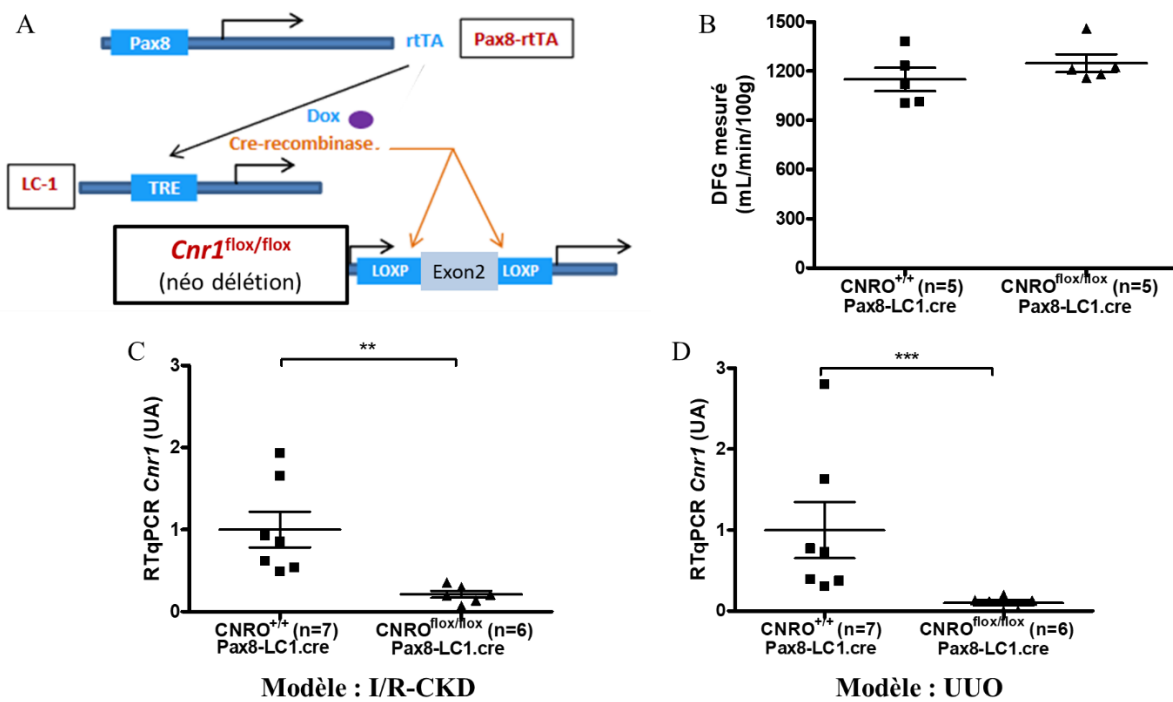


Figure 10 – Caractérisation de la lignée CNRO Pax8-LC1.cre. (A) Construction génétique. (B) La délétion tubulaire de *Cnr1* ne modifie pas la fonction rénale basale des souris ; DFG mesuré par clairance de la sinistrin-FITC. (C) L'expression de CB1R évaluée par RTqPCR de *Cnr1* est significativement diminuée dans les reins gauches ischémiés des souris *Cnr1^{lox/lox} Pax8-LC1.cre* (n=7) par rapport aux souris *Cnr1^{+/+} Pax8-LC1.cre* (n=6) (D) ainsi que dans les reins gauches obstrués des souris *Cnr1^{lox/lox} Pax8-LC1.cre* (n=7) par rapport aux souris *Cnr1^{+/+} Pax8-LC1.cre* (n=6). Abréviations : DFG, débit de filtration glomérulaire ; I/R-CKD, modèle de maladie rénale chronique après ischémie reperfusion avec néphrectomie retardée ; UA, unités arbitraires ; UUO, obstruction urétérale unilatérale. ** p < 0,01 ; *** p < 10⁻³ ; Moyennes ± SEM.

Nous avons contrôlé l'efficacité de la délétion par étude des transcrits de *Cnr1* après ischémie-reperfusion (Figure 10C) et obstruction urétérale unilatérale (Figure 10D). Dans ces deux modèles expérimentaux, les transcrits de *Cnr1* étaient significativement diminués chez les souris *Cnr1^{lox/lox} Pax8-LC1.cre* par rapport aux souris *Cnr1^{+/+} Pax8-LC1.cre* (respectivement $1,0 \pm 0,57$ versus $0,21 \pm 0,10$ dans l'I/R-CKD, $p < 0,01$; et $1,0 \pm 0,92$ versus $0,10 \pm 0,10$ dans l'UUO, $p < 10^{-3}$). Nous n'avons pas pu réaliser d'immunomarquage CB1R dans ces modèles faute d'anticorps fiable disponible actuellement. Une analyse des transcrits de *Cnr1* dans chacun des compartiments rénaux après microdissection laser des prélèvements est en cours.

3.3.7 – L'inhibition tubulaire de CB1R aggrave la fonction rénale dans le modèle d'I/R-CKD

Nous avons étudié l'impact de la délétion tubulaire spécifique de CB1R sur la fonction rénale dans le modèle d'I/R-CKD (Figure 11A). Contrairement à ce que nous attendions, la créatininémie et l'urée plasmatique étaient significativement plus élevées dans le groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{lox/lox}* (respectivement 155 ± 61 $\mu\text{mol/L}$ et 91 ± 28 mmol/L) que dans le groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{+/+}* (respectivement 65 ± 59 $\mu\text{mol/L}$ et 46 ± 38 mmol/L , $p=0,03$ et $0,05$), traduisant une insuffisance rénale plus sévère chez les souris ayant une délétion tubulaire de CB1R (Figures 11B et 11C). La perte de poids et les transcrits de la rénine étaient identiques dans les deux groupes, écartant l'hypothèse d'une insuffisance rénale par hypovolémie vraie (Figures 11D et 11E).

La délétion tubulaire de CB1R s'accompagnait également d'une aggravation des lésions histologiques. La fibrose interstitielle était plus importante dans le groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{lox/lox}* ($2,8 \pm 0,8$) que dans le groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{+/+}* ($1,4 \pm 0,5$, $p=0,008$) (Figure 12A), de même que les transcrits du *TGF β -induced* ($p=0,03$) (Figure 12D). Dans ce modèle également, la fibrose interstitielle était significativement et positivement corrélée avec la

créatininémie (R=0,74 [0,33-0,92], p=0,004). L'infiltrat myofibroblastique corticomédullaire, évalué après immunomarquage α SMA, tendait également à être plus marqué dans le groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{lox/lox}* ($5,8 \pm 0,4$) que dans le groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{+/+}* ($5,0 \pm 0,8$, p=0,07) (Figure 12C). Les lésions tubulaires, incluant les dilatations tubulaires et la présence de cylindres intratubulaires, étaient également plus importantes dans le groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{lox/lox}* ($6,3 \pm 0,8$) que dans le groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{+/+}* ($4,9 \pm 0,7$, p=0,01) (Figures 12B, 12E et 12F).

Lors de l'inhibition globale de CB1R, tant génétique que pharmacologique, l'inflammation était, au moins en microscopie optique, identique entre les groupes. Dans le modèle d'I/R-CKD avec inhibition tubulaire spécifique de CB1R au contraire, l'inflammation cortico-médullaire était plus importante dans le groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{lox/lox}* ($3,7 \pm 0,8$) que dans le groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{+/+}* ($2,1 \pm 0,9$, p=0,04) (Figure 13A). L'infiltrat inflammatoire était majoritairement macrophagique, mis en évidence par l'immunomarquage F4/80 ($5,3 \pm 0,8$ dans le groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{lox/lox}* versus $3,9 \pm 0,9$ dans le groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{+/+}*, p=0,02) (Figure 13B). L'infiltrat lymphocytaire, étudié par immunomarquage CD3, était minime (<5% des cellules inflammatoires) et identique entre les groupes. L'étude par RTqPCR a montré que les transcrits de *mcp1*, *iNOS* et *mrc1* n'étaient pas modifiés par l'inhibition tubulaire de CB1R (Figures 13C à 13E). Seuls les transcrits d'*arg1* étaient significativement plus élevés dans le groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{lox/lox}* (p=0,005) (Figure 13F).

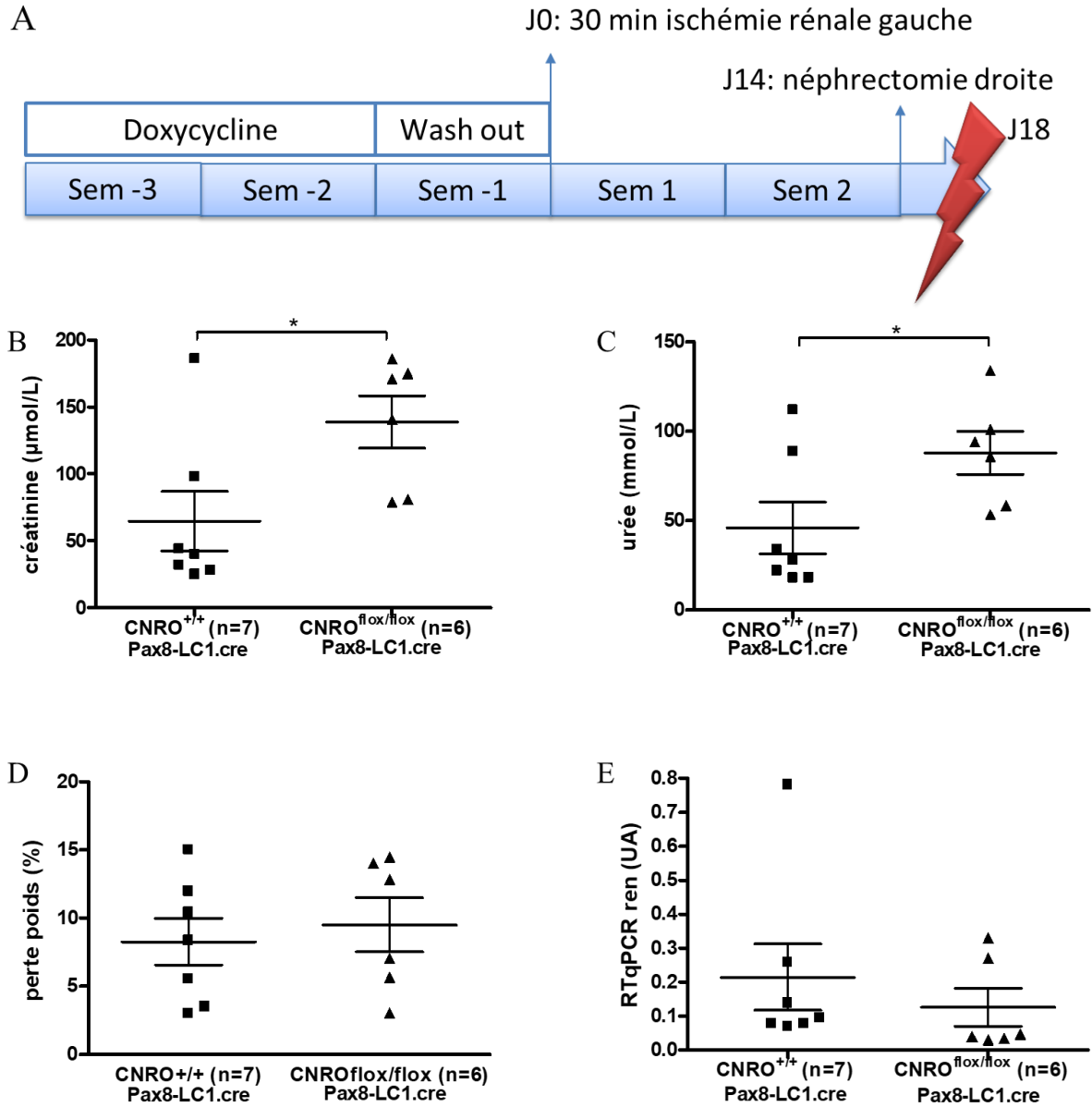


Figure 11 – La délétion tubulaire de CB1R aggrave l’insuffisance rénale dans l’I/R-CKD. (A) Plan expérimental. (B) La créatinine plasmatique et (C) l’urée plasmatique sont significativement plus élevées chez les souris *Cnr1^{lox/lox} Pax8-LC1.cre* (n=6) par rapport aux souris *Cnr1^{+/+} Pax8-LC1.cre* (n=7). (D) La perte de poids et (E) l’expression de la rénine évaluée par RTqPCR des transcrits de *ren* dans les reins gauches ischémiés ne sont pas modifiées par la délétion tubulaire de CB1R. Abréviations : CB1R, récepteur cannabinoïde de type 1 ; UA, unités arbitraires ; * p < 0,05 ; Moyennes \pm SEM.

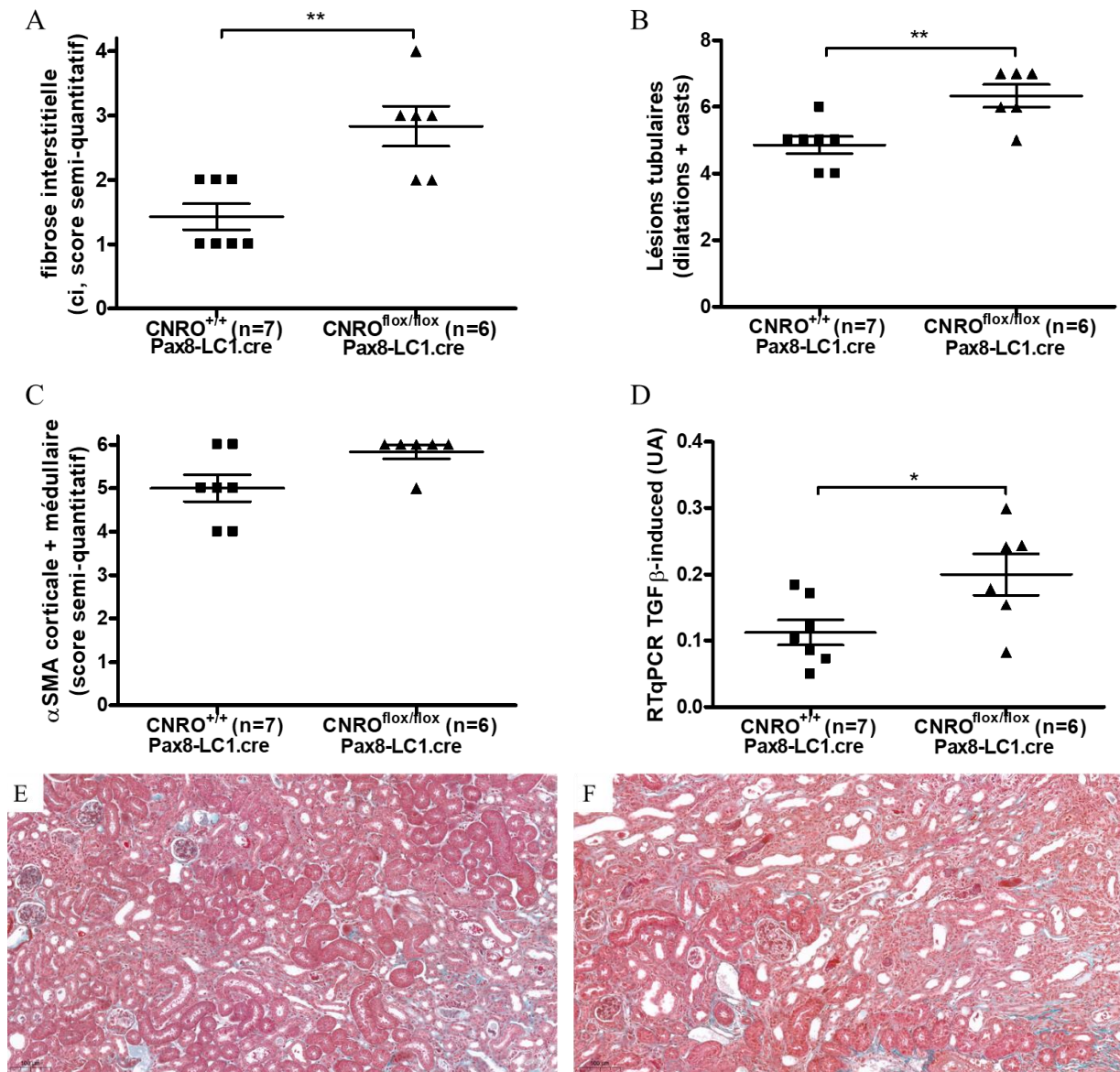


Figure 12 – La délétion tubulaire de CB1R aggrave la fibrose interstitielle et les lésions tubulaires dans l’I/R-CKD. (A) Les scores de fibrose interstitielle (ci, score semi-quantitatif) et (B) les lésions tubulaires (dilatations tubulaires + cylindres tubulaires, score semi-quantitatif) sont significativement plus élevés chez les souris *Cnr1^{lox/lox} Pax8-LC1.cre* (n=6) par rapport aux souris *Cnr1^{+/+} Pax8-LC1.cre* (n=7). (C) Immunomarquage α-SMA des reins gauches ischémiés, score semi-quantitatif (p=0,07). (D) Les transcrits du TGFβ-induced sont significativement plus élevés dans les reins gauches ischémiés des souris *Cnr1^{lox/lox} Pax8-LC1.cre* (n=6) par rapport aux souris *Cnr1^{+/+} Pax8-LC1.cre* (n=7). (E) Vue à faible grossissement (X10) du rein gauche ischémié d’une souris *Cnr1^{+/+} Pax8-LC1.cre*, trichrome de Masson. (F) Vue à faible grossissement (X10) du rein gauche ischémié d’une souris *Cnr1^{lox/lox} Pax8-LC1.cre*, trichrome de Masson.

Abréviations : CB1R, récepteur cannabinoïde de type 1 ; UA, unités arbitraires

* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; Scale bars 100 μM. Moyennes ± SEM.

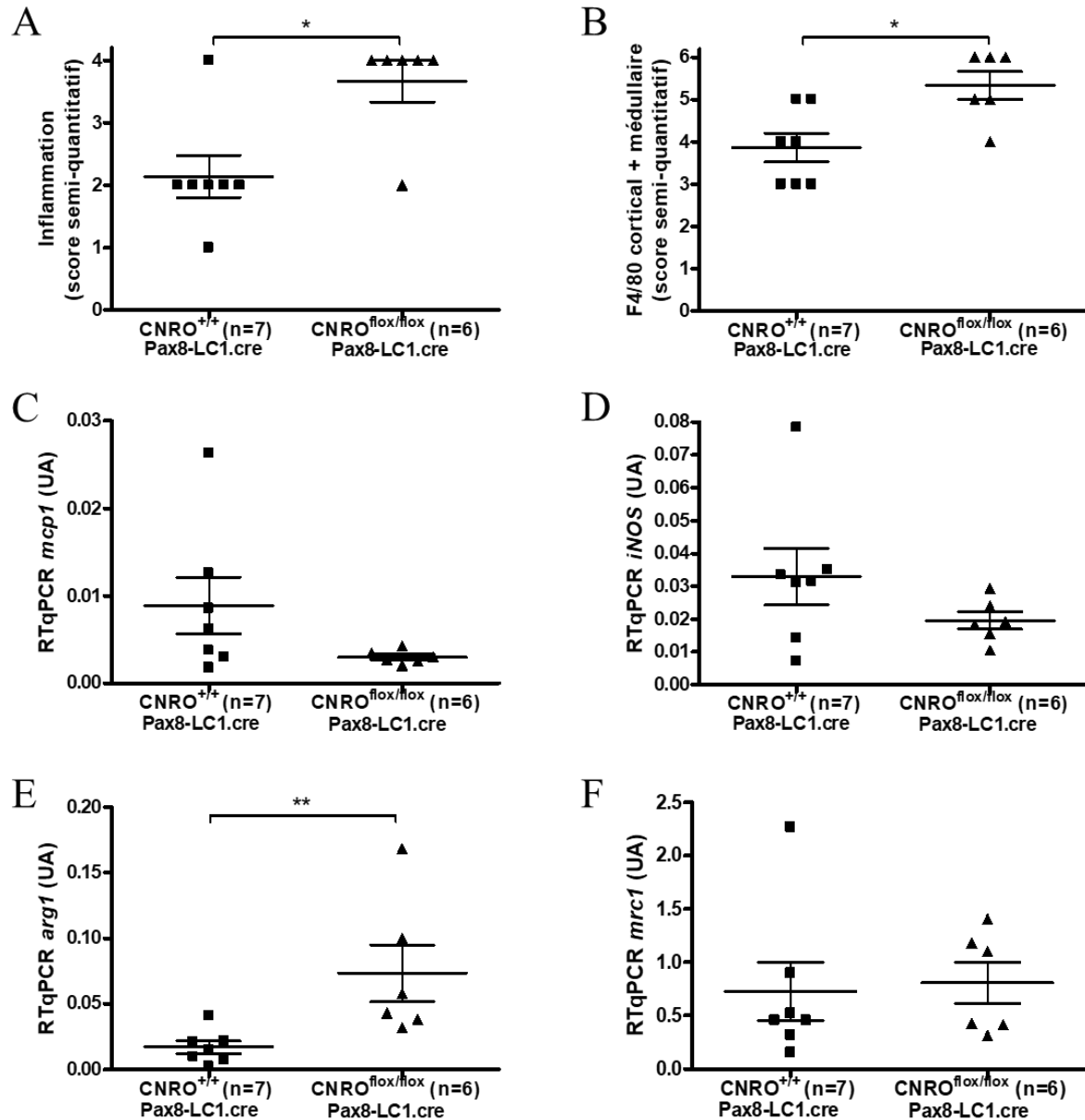


Figure 13 – La délétion tubulaire de CB1R aggrave l’inflammation à la phase tardive de l’I/R-CKD. (A) L’inflammation (score semi-quantitatif) et (B) l’infiltrat macrophagique cortico-médullaire évalué par un immunomarquage F4/80 (score semi-quantitatif) sont significativement plus importants dans les reins gauches ischémiés des souris *Cnr1^{flox/flox} Pax8-LC1.cre* (n=6) par rapport aux souris *Cnr1^{+/+} Pax8-LC1.cre* (n=7). (C-D) Les transcrits des macrophages de type M1, (C) *mcp1* et (D) *iNOS* ne sont pas modifiés par la délétion tubulaire de CB1R. (E) Les transcrits de l’*arg1*, marqueur des macrophages de type M2, sont significativement plus élevés dans les reins gauches ischémiés des souris *Cnr1^{flox/flox} Pax8-LC1.cre* (n=6) par rapport aux souris *Cnr1^{+/+} Pax8-LC1.cre* (n=7). (F) Les transcrits de *mcp1*, marqueur macrophagique de type 2, ne sont pas modifiés par la délétion tubulaire de CB1R. Abréviations : CB1R, récepteur cannabinoïde de type 1 ; UA, unités arbitraires
* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; Moyennes ± SEM.

Afin de confirmer le rôle délétère de l'inhibition sélective tubulaire de CB1R, nous avons réalisé un modèle expérimental murin d'obstruction urétérale unilatérale (Figure 14A). Comme dans l'I/R-CKD, la fibrose interstitielle par analyse morphométrique après coloration par le rouge Sirius était significativement plus marquée dans les reins gauches obstrués du groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{lox/lox}* (6,6% ± 0,4%) que du groupe *Pax8-LC1.cre Cnr1^{+/+}* (4,6% ± 0,8%, p=0,002) (Figure 14B).

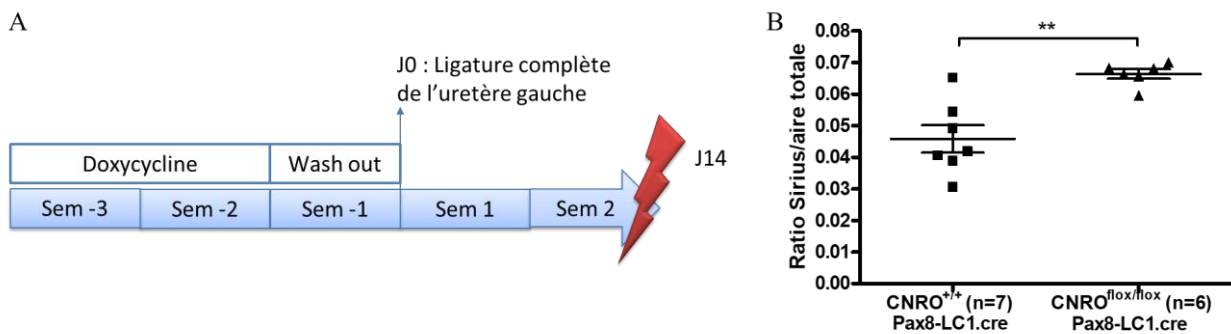


Figure 14 – La délétion tubulaire de CB1R aggrave la fibrose rénale à la phase tardive de l'obstruction urétérale unilatérale. (A) Modèle expérimental. (B) La fibrose interstitielle corticale des reins gauches obstrués évaluée par analyse morphométrique après coloration par le Rouge Sirius est plus importante dans le groupe *Cnr1^{lox/lox} Pax8-LC1.cre* (n=6) que dans le groupe *Cnr1^{+/+} Pax8-LC1.cre* (n=7 ; p=0,002).

** p < 0,01

3.3.8 – Le blocage pharmacologique de CB1R réduit la synthèse de collagène par les myofibroblastes *in vitro*

In vitro, nous avons stimulé des myofibroblastes primaires murins avec du TGFβ (5 ng/mL) et étudié les conséquences du blocage pharmacologique de CB1R par le JD5037 (100 ng/mL) et le composé X (50 ng/mL) sur les transcrits de *cnr1* et de *col3a1*. Le JD5037 et le composé X réduisaient significativement les transcrits de *cnr1* (p=0,049) mais également les transcrits de *col3a1* (p-value respectivement 0,03 et 0,008) (Figures 16A et 16B).

De nombreuses données de la littérature ainsi que nos observations des cellules suggèrent que le blocage de CB1R impacte les capacités de prolifération et de migration des myofibroblastes.

Nous avons essayé d'étudier l'incorporation du 5-éthynyl-2'-déoxyuridine (EdU) et du Ki67 :

les myofibroblastes primaires ont résisté aux différents protocoles de fixation et de perméabilisation ou ont été détruits par ceux-ci. Ces approches ne nous ont donc pas permis jusqu'à présent de répondre à la question. Pour étudier le rôle de CB1R sur les propriétés migratoires des myofibroblastes, nous avons développé des techniques de *Live imaging*. Les expérimentations sont en cours.

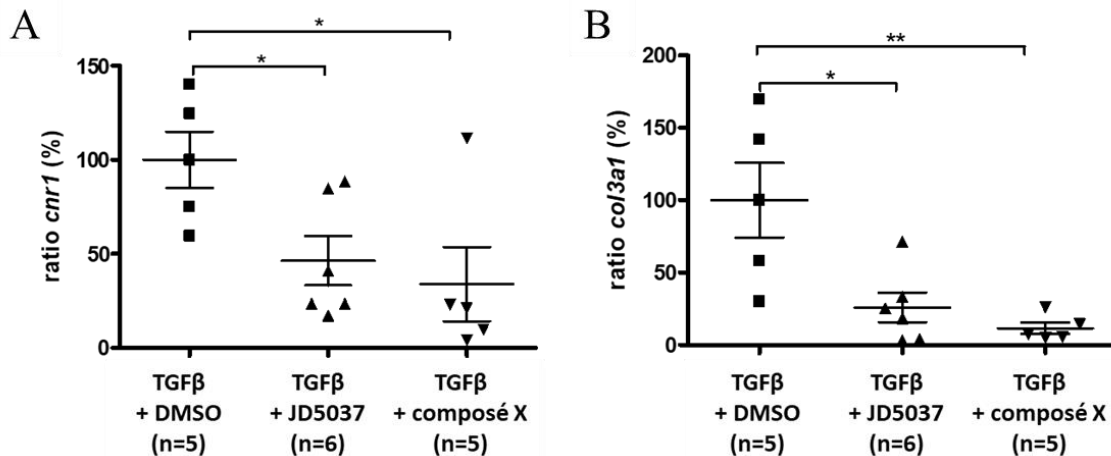


Figure 15 – *In vitro*, le blocage pharmacologique de CB1R réduit la synthèse de collagène par les myofibroblastes primaires murins. (A) Le JD5037 (100 ng/mL) et le composé X (50 ng/mL) réduisent significativement les transcrits de *Cnr1* (RTqPCR après 24h de traitement, 3 expériences indépendantes, n=1 à 2/expérience). (B) Le JD5037 (100 ng/mL) et le composé X (50 ng/mL) réduisent significativement les transcrits de *col3a1* (RTqPCR après 24h de traitement, 3 expériences indépendantes, n=1 à 2/expérience).

3.4 – Discussion

Nous avons montré que l'inhibition globale de CB1R, qu'elle soit génétique ou pharmacologique, prévenait la maladie rénale chronique à la phase tardive de l'ischémie reperfusion dans un modèle d'I/R-CKD. Pour la première fois dans un modèle expérimental murin de néphropathie chronique d'origine non métabolique, nous avons montré que des inhibiteurs périphériques de CB1R de seconde génération (le JD5037) et de troisième génération (le composé X) réduisaient aussi bien l'insuffisance rénale que la progression de la fibrose interstitielle. Ces résultats sont concordants avec ceux de Lecru et *al.* (2015) qui ont montré que l'inhibition de CB1R réduisait la fibrose rénale dans l'UUO. Dans le travail de

Lecru et al. (2015) cependant, la présence du rein sain controlatéral ne permettait pas d'étudier la fonction rénale. De plus, la molécule utilisée pour le blocage pharmacologique de CB1R était le rimonabant, un inhibiteur de première génération qui a été retiré du marché en raison de ses effets secondaires neuropsychiatriques sévères.

Les raisons pour lesquelles nous avons choisi d'utiliser le modèle expérimental murin d'I/R-CKD sont détaillées dans le paragraphe 5.3 de l'introduction générale. Nos résultats ont confirmé la pertinence de ce choix. En effet, nous n'avons pas mis en évidence d'élévation significative des transcrits de *Cnr1* entre le rein contrôle droit et le rein ischémié gauche à la phase aiguë de l'I/R, et ce jusqu'à 72h après l'intervention. Nous avons également étudié les ligands de CB1R à la phase précoce de l'I/R (deux heures après l'intervention). A la différence de ce qui a été rapporté dans l'UUO (Lecru et al., 2015), nous n'avons pas mis en évidence de modification du 2-AG, le ligand principal de CB1R. La concentration des autres ligands (2-AG éther, AEA, docohexanoyl éthanamide, palmitoyl éthanamide et oléamide) était également très faible et n'était pas non plus modifiée. Enfin, dans l'I/R-AKI, la délétion génétique de CB1R ne modifiait ni la dysfonction rénale ni l'intensité des lésions histologiques. Les données de la littérature montrent que CB1R est faiblement exprimé chez l'homme et chez les rongeurs dans le parenchyme rénal normal (Barutta et al., 2010; Deutsch et al., 1997; Janiak et al., 2007; Jenkin et al., 2010; Koura et al., 2004; Larrinaga et al., 2010; Lecru et al., 2015; Mukhopadhyay et al., 2010; Nam et al., 2012; Shire et al., 1995; Silva et al., 2013). Tous ces éléments renforcent donc l'hypothèse selon laquelle CB1R ne joue pas de rôle dans l'IRA, son recrutement étant plus tardif. Le modèle expérimental que nous avons utilisé présentait donc de nombreux intérêts. Il nous a permis non seulement de reproduire la transition IRA-MRC, situation fréquente en pratique clinique discutée dans la partie 5 de l'introduction générale (Bao et al., 2018; Fu et al., 2018; Ruiz-Ortega et al., 2020; Scarfe et al., 2019) et d'évaluer la fonction rénale, mais également d'étudier spécifiquement l'impact du blocage de CB1R dans la MRC,

CB1R n'étant pas recruté à la phase précoce de l'I/R. Nous avons également étudié l'impact du blocage génétique de CB1R dans un modèle de glomérulonéphrite aiguë induite par administration de sérum néphrotoxique (données non présentées) selon un protocole expérimental utilisé dans notre laboratoire (Mesnard et al., 2009). Ce modèle ne permettait pas d'observer d'infiltrat myofibroblastique ni le développement de lésions de fibrose interstitielle. Alors que les transcrits de *Cnr1* augmentaient significativement après l'administration du sérum néphrotoxique, l'inactivation génétique de CB1R restait sans effet sur le syndrome néphrotique, sur la fonction rénale et sur l'atteinte histologique. Ce résultat renforce notre hypothèse selon laquelle CB1R ne joue pas de rôle à la phase aiguë des maladies rénales.

Le protocole expérimental initial d'I/R-CKD (Figure 3A) a été mis au point sur des souris de fond mixte CD1/C57Bl/6J à partir de 5 backcross. La néphrectomie droite était réalisée deux semaines après l'I/R gauche. Retarder la néphrectomie permettait en effet d'une part de s'affranchir de la mortalité liée à l'IRA initiale, d'autre part d'aggraver les lésions chroniques, le flux sanguin rénal étant dirigé de façon préférentielle vers le rein sain controlatéral (Fu et al., 2018; Gao et al., 2013; Scarfe et al., 2019). Le sacrifice intervenait 4 semaines après la néphrectomie droite, c'est-à-dire 6 semaines après l'I/R gauche. La première série expérimentale d'I/R-CKD comparant les souris *Cnr1*^{-/-} et les souris WT issues des mêmes portées a été faite sur le fond mixte CD1/C57Bl/6J à partir de 5 backcross. Les expériences suivantes, notamment celles évaluant l'impact du blocage pharmacologique périphérique de CB1R par le JD5037 et le composé X, ont quant à elles été faites sur fond congénique pur C57Bl/6J (> 9 backcross). Le fond génétique des souris module leur sensibilité aux modèles expérimentaux et les souris congéniques pures sur un fond génétique C57Bl/6J sont plus sensibles aux agressions rénales (Ma & Fogo, 2003; Nogueira et al., 2017). Nous avons de ce fait observé une importante augmentation de la mortalité après la néphrectomie droite, qui n'était pas modifiée par le blocage de CB1R. Nous avons donc réduit la durée du modèle

expérimental de 6 semaines à 17 jours (Figure 4A). Ce délai restait néanmoins suffisant pour observer le développement de lésions marquées de fibrose interstitielle. L'inhibition globale de CB1R, aussi bien génétique que pharmacologique, réduisait significativement la fibrose interstitielle dans ce nouveau modèle expérimental (respectivement $1,7 \pm 0,7$ dans le groupe *Cnr1*^{-/-} versus $3,1 \pm$ dans le groupe WT, $p=0,02$; $1,3 \pm 0,5$ dans le groupe JD5037 versus $2,3 \pm 0,8$ dans le groupe contrôle, $p=0,03$; et $1,6 \pm 0,5$ dans le groupe composé X versus $3,0 \pm 0,8$ dans le groupe contrôle, $p=0,002$). De plus, tant le JD5037 que le composé X réduisaient significativement l'insuffisance rénale, avec une efficacité comparable d'environ 50% (créatininémie respectivement $87 \pm 56 \mu\text{mol/L}$ dans le groupe JD5037 versus $167 \pm 58 \mu\text{mol/L}$ dans le groupe contrôle, $p=0,03$; et $120 \pm 75 \mu\text{mol/L}$ dans le groupe composé X versus $211 \pm 53 \mu\text{mol/L}$ dans le groupe contrôle, $p=0,03$). Les inhibiteurs périphériques de CB1R sont de sérieux candidats dans la prise en charge de la MRC, comme discuté dans la partie 4 de l'introduction générale. A l'inverse des inhibiteurs de première génération, ils ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique, prévenant ainsi le risque d'effets indésirables neuropsychologiques (Cinar et al., 2020). Des études précliniques de toxicité du JD5037 ont déjà été réalisées chez les rats et les chiens (Kale et al., 2019). Il n'a pas été mis en évidence d'effets indésirables de la molécule avec des posologies très supérieures à celle que nous avons utilisé, allant jusqu'à 150 mg/kg/j chez les rats et jusqu'à 75 mg/kg/j chez les chiens. Nous l'avons utilisé à la dose de 3 mg/kg/j sans constater d'effet indésirable. Nous n'avons pas non plus relevé d'effets indésirables liés au composé X au cours de l'I/R-CKD. Les points limites, incluant la mortalité et la perte de poids, étaient identiques chez les souris traitées par les inhibiteurs pharmacologiques de CB1R et dans les groupes contrôles. Des modifications de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique pouvant survenir au cours de l'IRA (Burek et al., 2020; M. Liu et al., 2008; Malek, 2018; Ratliff et al., 2013), des études spécifiques de

tolérance des inhibiteurs périphériques de CB1R dans ce contexte mériteraient cependant d'être conduites.

Une réduction de la fibrose interstitielle rénale était observée dans tous les modèles d'I/R-CKD avec blocage de CB1R, aussi bien génétique que pharmacologique, indépendamment du délai entre l'I/R et le sacrifice. Cependant, dans le modèle d'I/R-CKD comparant les souris *Cnr1*^{-/-} et leurs contrôles WT, les résultats sur la fonction rénale dépendaient du délai entre l'I/R et le sacrifice. Dans les premières expériences réalisées sur les souris de fond mixte CD1/C57Bl/6J, moins sensibles aux agressions rénales et sacrifiées 6 semaines après l'I/R, la fonction rénale était significativement meilleure dans le groupe *Cnr1*^{-/-} (créatininémie $27 \pm 9 \mu\text{mol/L}$ versus $43 \pm 23 \mu\text{mol/L}$ dans le groupe WT, $p=0,03$). En revanche, dans les expériences réalisées sur les souris de fond congénique pur C57Bl/6J (> 9 backcross) sacrifiées 17 jours après l'I/R, l'inhibition génétique de CB1R n'améliorait pas la fonction rénale. L'étude histologique a révélé que les animaux présentaient encore des lésions tubulaires aiguës marquées 17 jours après l'I/R. La créatininémie au moment du sacrifice était significativement et positivement corrélée avec les lésions aiguës ($R=0,48$ [0,01-0,78], $p=0,047$). Contrairement à ce que nous avons pu observer dans d'autres séries, il n'y avait pas de corrélation entre la créatininémie et la fibrose interstitielle dans ce modèle. De façon toute à fait intéressante cependant, la créatininémie tendait à être corrélée avec la fibrose interstitielle chez les souris WT ($p=0,12$) alors qu'elle tendait à être corrélée avec les lésions aiguës chez les souris *Cnr1*^{-/-} ($p=0,09$). Un sacrifice plus tardif aurait donc peut-être permis aux souris *Cnr1*^{-/-} de cicatriser des lésions tubulaires aiguës et d'améliorer leur fonction rénale.

Il est également possible que l'amélioration de la fonction rénale observée lors du blocage pharmacologique de CB1R soit favorisée par des effets non canoniques (i.e. indépendants de CB1R) des inhibiteurs et médiée en partie par un meilleur contrôle de l'inflammation interstitielle rénale. Au cours de l'UUO en effet, Lecru et al. (2015) ont montré que le blocage

pharmacologique de CB1R par le rimonabant réduisait l'infiltrat inflammatoire mais que le blocage génétique de CB1R ne le modifiait pas, suggérant un effet non-canonique du rimonabant. Dans l'I/R-CKD, le JD5037 réduisait significativement l'infiltrat macrophagique évalué par l'immunomarquage F4/80. La suite de notre projet prévoit de compléter l'exploration de l'infiltrat macrophagique avec un immunomarquage F4/80 dans toutes les séries d'I/R-CKD (blocage génétique de CB1R et blocage pharmacologique de CB1R par le composé X).

Au plan physiopathologique, comme précédemment discuté dans les paragraphes 3.3 de l'introduction générale et 2.3 des résultats expérimentaux, la contribution relative des différents types cellulaires impliqués dans la modulation de la fibrose médiée par CB1R reste débattue. Tant chez l'homme au cours de diverses néphropathies, incluant la DCA (Dao et al., 2019), que chez l'animal au cours de l'UUO, l'expression prédominante de CB1R est tubulaire (Lecru et al., 2015). Notre projet prévoyait de préciser par immunohistochimie la topographie de l'expression de CB1R dans l'I/R-CKD mais nous n'avons pas trouvé d'anticorps commerciaux anti-CB1R fiables. CB1R étant une GPCR, elle possède en effet de nombreuses homologies de séquence avec les autres GPCR. Des contrôles positifs et négatifs robustes sont donc indispensables afin de s'assurer de la spécificité du marquage (Torlakovic et al., 2014, 2015). Le mode de production de l'anticorps que nous utilisons (Dao et al., 2019; Lecru et al., 2015) a été modifié. Nous avons testé les anticorps commerciaux disponibles actuellement. Les contrôles négatifs réalisés sur du tissu de souris *Cnr1*^{-/-} sont revenus positifs, soulignant l'absence de spécificité de ces anticorps.

Dans l'UUO, Lecru et al. (2015) ont montré que le blocage de CB1R réduisait la fibrose interstitielle par une action directe paracrine/autocrine sur les myofibroblastes ; que le blocage génétique ou pharmacologique de CB1R ne modifiait pas les lésions histologiques tubulaires et qu'*in vitro*, CB1R ne jouait pas de rôle dans la synthèse de collagène par les HK2 après

stimulation par le TGF β . Il faut cependant souligner que les HK2 sont une lignée cellulaire immortalisée dans laquelle l'expression basale de CB1R est très supérieure à ce qui peut être observé *in vivo* sur des tubules sains, qui expriment peu voire pas CB1R. Contrairement à ce que Lecru et *al.* (2015) ont observé après stimulation par le TGF β , dans un modèle *in vitro* de fibrose médiée par le tacrolimus, le blocage de CB1R réduisait la synthèse de collagène par les cellules tubulaires, qu'il s'agisse de PTEC murines ou d'HK2 (Dao et al., 2019). Dans un modèle de néphropathie associée à l'obésité, Udi et al. (2017) ont montré que l'inhibition tubulaire spécifique de CB1R réduisait les lésions rénales en favorisant la β -oxydation des acides gras dans les PTEC. Il est donc possible que l'amélioration médiée par le blocage de CB1R dans ce modèle soit due au contrôle des paramètres métaboliques locaux.

Afin de préciser la contribution des cellules épithéliales tubulaires dans la modulation de la fibrose médiée par CB1R, nous avons étudié l'effet de la délétion tubulaire spécifique de CB1R dans le modèle d'I/R-CKD. En l'absence d'anticorps fiable disponible actuellement pour une étude immunohistochimique, la microdissection laser des compartiments tubulaires et glomérulaires nous permettra de confirmer que l'absence d'expression de CB1R est restreinte aux cellules tubulaires. De façon inattendue, la délétion tubulaire de CB1R aggravait l'insuffisance rénale, la fibrose interstitielle, les lésions tubulaires et l'infiltrat inflammatoire. Des résultats similaires étaient observés 15 jours après une UUO : la délétion tubulaire de CB1R aggravait la fibrose interstitielle. L'effet anti-fibrosant du blocage de CB1R est donc vraisemblablement médié par l'inhibition myofibroblastique de CB1R. Pour confirmer cette hypothèse et répondre à la question, nous avons développé une nouvelle lignée transgénique murine permettant d'inhiber CB1R dans les myofibroblastes, la lignée CNRO P0.cre. L'aggravation de la MRC constatée lors du blocage tubulaire spécifique de CB1R dans deux modèles expérimentaux différents suggère que CB1R pourrait être impliqué dans les mécanismes de réparation épithéliale tubulaire après une agression aiguë et dans la préservation

du phénotype épithélial. Le rôle de CB1R dans la différenciation cellulaire a été montré dans d'autres organes, notamment le cerveau, les canaux biliaires et les adipocytes (Hebert-Chatelain et al., 2016; Lipina et al., 2014; Tedesco et al., 2010; Teixeira-Clerc et al., 2006). Nous avons extrait des cellules tubulaires proximales murines de souris *Cnr1*^{-/-} et de souris WT issues des mêmes portées. Ces cellules nous permettront de préciser *in vitro* les différences phénotypiques liées à l'inhibition de CB1R et de caractériser la réponse épithéliale tubulaire à une agression. De la même manière, il est tout à fait possible que CB1R favorise la différenciation myofibroblastique et, par suite, la synthèse des protéines de la MEC, en particulier du collagène, par les myofibroblastes. *In vitro*, Lecru et al. (2015) ont déjà montré que le blocage de CB1R, qu'il soit génétique ou pharmacologique avec le rimonabant, réduisait la synthèse de collagène par les myofibroblastes. Nous avons confirmé cet effet avec les inhibiteurs périphériques de CB1R de seconde et de troisième génération. Les résultats de notre travail et les hypothèses soulevées par celui-ci sont synthétisés dans la Figure 16.

Blocage global de CB1R (génétique ou pharmacologique)



∇ synthèse collagène



∇ Insuffisance rénale
∇ Fibrose interstitielle
Inflammation ?

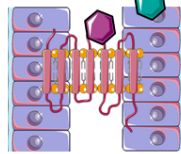
Inhibition myofibroblastique de CB1R



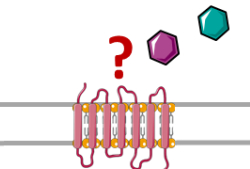
∇ différenciation
= ∇ synthèse collagène



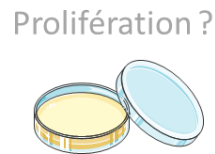
∇ Insuffisance rénale ?
∇ Fibrose interstitielle ?
∇ Inflammation ?



↗ réparation ? Préserve
le caractère épithélial ?

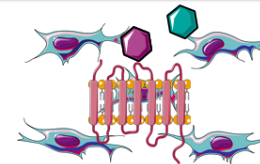


Inter-relation
myofibroblastes-
tubules ?



Prolifération ?

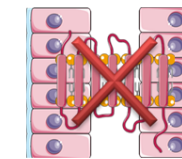
Inhibition tubulaire de CB1R



↗ différenciation :
= ↗ synthèse collagène



↗ Insuffisance rénale
↗ Fibrose interstitielle
↗ Inflammation



∇ Réparation ?
Favorise TEM ?

Figure 16 – Synthèse des principaux résultats et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Un nombre croissant de travaux scientifiques démontrent que CB1R participe à la fibrogenèse rénale, qu'elle soit d'origine métabolique ou non et que le blocage de CB1R pourrait constituer une nouvelle piste thérapeutique dans la prise en charge de la MRC. Les résultats présentés ici renforcent cette hypothèse.

Dans une étude translationnelle chez l'homme, nous avons montré que l'expression de CB1R augmentait fortement au cours de la DCA. Il existait 3 mois après la greffe une corrélation positive entre l'expression de CB1R et la fibrose interstitielle. CB1R pourrait donc être un marqueur prédictif du développement de la fibrose interstitielle et de la DCA.

In vivo, dans un modèle expérimental murin d'I/R-CKD, nous avons montré que le blocage génétique global ou pharmacologique de CB1R prévenait la MRC. La préservation de la fonction rénale était plus marquée lorsque nous utilisons des inhibiteurs de deuxième (le JD5037) ou de troisième génération (le composé X) par rapport au blocage génétique. Dans tous les cas, le blocage de CB1R réduisait significativement la fibrose interstitielle mais n'avait pas de conséquence sur la sévérité des lésions tubulaires. *In vitro*, l'inhibition pharmacologique de CB1R réduisait la synthèse de collagène par les myofibroblastes.

De façon inattendue, l'induction d'une délétion de CB1R restreinte aux cellules tubulaires rénales aggravait aussi bien la fonction rénale que la fibrose interstitielle et les lésions tubulaires dans le modèle d'I/R-CKD. Ce résultat surprenant a été confirmé dans un modèle d'UUO. L'effet protecteur du blocage global de CB1R est donc probablement lié à un effet prépondérant sur les myofibroblastes. Il est possible que CB1R joue un rôle protecteur dans la réparation des cellules épithéliales au cours de la nécrose tubulaire aiguë. Des travaux supplémentaires sont nécessaires afin de caractériser plus finement le rôle de CB1R dans les myofibroblastes et dans les cellules tubulaires. L'étude comparative du phénotype et des propriétés de migration, de prolifération, de réponse au TGF β , de cultures primaires murines myofibroblastiques et

tubulaires *Cnr1*^{+/+} et *Cnr1*^{-/-} permettra d'apporter des éléments de réponse. L'utilisation d'une lignée murine transgénique avec délétion myofibroblastique de CB1R permettra également de mieux documenter la contribution de l'inhibition myofibroblastique de CB1R dans la réduction de la MRC.

Enfin, les voies de signalisation engagées dans la fibrogenèse rénale médiée par CB1R ne sont pas connues. Les explorer permettrait d'adapter au mieux la modulation pharmacologique de CB1R.

Au total, il existe un nombre croissant d'arguments suggérant un rôle de CB1R dans de nombreuses pathologies rénales. Il semble que CB1R favorise la fibrogenèse rénale au cours de néphropathies métaboliques et non métaboliques. Le rimonabant, un antagoniste CB1R de première génération, a été brièvement utilisé en clinique mais son utilisation a été arrêtée en raison d'importants effets secondaires neuropsychiatriques et il a été définitivement retiré du marché en 2008. A ce jour, des antagonistes de CB1R de deuxième et de troisième génération, ne traversant pas la barrière hémato-méningée, sont en cours de développement. Les données expérimentales dans les néphropathies d'origine métabolique sont prometteuses et nos travaux dans l'I/R-CKD suggèrent que ces molécules pourraient également prévenir la progression de la fibrose rénale au cours de néphropathies d'origine non métabolique. L'industrie a bien compris le potentiel thérapeutique de ces molécules et certaines sont d'ores et déjà en cours d'évaluation clinique chez l'homme, dans des études de phases I et IIa. Ainsi, le blocage pharmacologique de CB1R pourrait constituer un nouvel outil dans la prise en charge thérapeutique de la maladie rénale chronique, indépendamment de son origine métabolique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abadji, V., Lin, S., Taha, G., Griffin, G., Stevenson, L. A., Pertwee, R. G., & Makriyannis, A. (1994). (R)-methanandamide : A chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability. *Journal of Medicinal Chemistry*, 37(12), 1889-1893. <https://doi.org/10.1021/jm00038a020>
- Addy, C., Wright, H., Van Laere, K., Gantz, I., Erondy, N., Musser, B. J., Lu, K., Yuan, J., Sanabria-Bohórquez, S. M., Stoch, A., Stevens, C., Fong, T. M., De Lepeleire, I., Cilissen, C., Cote, J., Rosko, K., Gendrano, I. N., Nguyen, A. M., Gumbiner, B., ... Heymsfield, S. B. (2008). The acyclic CB1R inverse agonist taranabant mediates weight loss by increasing energy expenditure and decreasing caloric intake. *Cell Metabolism*, 7(1), 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.012>
- Agarwal, A., Dong, Z., Harris, R., Murray, P., Parikh, S. M., Rosner, M. H., Kellum, J. A., Ronco, C., & Acute Dialysis Quality Initiative XIII Working Group. (2016). Cellular and Molecular Mechanisms of AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(5), 1288-1299. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015070740>
- Ames, F. (1958). A clinical and metabolic study of acute intoxication with Cannabis sativa and its role in the model psychoses. *The Journal of Mental Science*, 104(437), 972-999. <https://doi.org/10.1192/bjp.104.437.972>
- Annes, J. P., Munger, J. S., & Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 2), 217-224. <https://doi.org/10.1242/jcs.00229>
- Aronne, L. J., Finer, N., Hollander, P. A., England, R. D., Klioze, S. S., Chew, R. D., Fountaine, R. J., Powell, C. M., & Obourn, J. D. (2011). Efficacy and safety of CP-945,598, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, on weight loss and maintenance. *Obesity*, 19(7), 1404-1414. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.352>
- Arreaza, G., Devane, W. A., Omeir, R. L., Sajnani, G., Kunz, J., Cravatt, B. F., & Deutsch, D. G. (1997). The cloned rat hydrolytic enzyme responsible for the breakdown of anandamide also catalyzes its formation via the condensation of arachidonic acid and ethanolamine. *Neuroscience Letters*, 234(1), 59-62. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00673-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00673-3)
- Asada, N., Takase, M., Nakamura, J., Oguchi, A., Asada, M., Suzuki, N., Yamamura, K., Nagoshi, N., Shibata, S., Rao, T. N., Fehling, H. J., Fukatsu, A., Minegishi, N., Kita, T., Kimura, T., Okano, H., Yamamoto, M., & Yanagita, M. (2011). Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(10), 3981-3990
- Ayoub, M. A., Zhang, Y., Kelly, R. S., See, H. B., Johnstone, E. K. M., McCall, E. A., Williams, J. H., Kelly, D. J., & Pflieger, K. D. G. (2015). Functional interaction between angiotensin II receptor type 1 and chemokine (C-C motif) receptor 2 with implications for chronic kidney disease. *PloS One*, 10(3), e0119803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119803>
- Bábíčková, J., Klinkhammer, B. M., Buhl, E. M., Djudjaj, S., Hoss, M., Heymann, F., Tacke, F., Floege, J., Becker, J. U., & Boor, P. (2017). Regardless of etiology, progressive renal disease causes ultrastructural and functional alterations of peritubular capillaries. *Kidney International*, 91(1), 70-85. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.07.038>

- Baisantry, A., Berkenkamp, B., Rong, S., Bhayadia, R., Sørensen-Zender, I., Schmitt, R., & Melk, A. (2019). Time-dependent p53 inhibition determines senescence attenuation and long-term outcome after renal ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology*, *316*(6), F1124-F1132. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00333.2018>
- Bao, Y.-W., Yuan, Y., Chen, J.-H., & Lin, W.-Q. (2018). Kidney disease models : Tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets. *Zoological Research*, *39*(2), 72-86. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2017.055>
- Barki-Harrington, L., Luttrell, L. M., & Rockman, H. A. (2003). Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist : A functional role for receptor-receptor interaction in vivo. *Circulation*, *108*(13), 1611-1618. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000092166.30360.78>
- Barutta, F., Bellini, S., Mastrocola, R., Gambino, R., Piscitelli, F., di Marzo, V., Corbetta, B., Vemuri, V. K., Makriyannis, A., Annaratone, L., Bruno, G., & Gruden, G. (2018). Reversal of albuminuria by combined AM6545 and perindopril therapy in experimental diabetic nephropathy. *British Journal of Pharmacology*, *175*(23), 4371-4385. <https://doi.org/10.1111/bph.14495>
- Barutta, F., Corbelli, A., Mastrocola, R., Gambino, R., Di Marzo, V., Pinach, S., Rastaldi, M. P., Perin, P. C., & Gruden, G. (2010). Cannabinoid receptor 1 blockade ameliorates albuminuria in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes*, *59*(4), 1046-1054. <https://doi.org/10.2337/db09-1336>
- Barutta, F., Grimaldi, S., Franco, I., Bellini, S., Gambino, R., Pinach, S., Corbelli, A., Bruno, G., Rastaldi, M. P., Aveta, T., Hirsch, E., Di Marzo, V., & Gruden, G. (2014). Deficiency of cannabinoid receptor of type 2 worsens renal functional and structural abnormalities in streptozotocin-induced diabetic mice. *Kidney International*, *86*(5), 979-990. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.165>
- Barutta, F., Grimaldi, S., Gambino, R., Vemuri, K., Makriyannis, A., Annaratone, L., di Marzo, V., Bruno, G., & Gruden, G. (2017). Dual therapy targeting the endocannabinoid system prevents experimental diabetic nephropathy. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, *32*(10), 1655-1665. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfx010>
- Barutta, F., Piscitelli, F., Pinach, S., Bruno, G., Gambino, R., Rastaldi, M. P., Salvidio, G., Di Marzo, V., Cavallo Perin, P., & Gruden, G. (2011). Protective role of cannabinoid receptor type 2 in a mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetes*, *60*(9), 2386-2396. <https://doi.org/10.2337/db10-1809>
- Basith, S., Cui, M., Macalino, S. J. Y., Park, J., Clavio, N. A. B., Kang, S., & Choi, S. (2018). Exploring G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) Ligand Space via Cheminformatics Approaches : Impact on Rational Drug Design. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 128. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00128>
- Bátkai, S., Pacher, P., Osei-Hyiaman, D., Radaeva, S., Liu, J., Harvey-White, J., Offertáler, L., Mackie, K., Rudd, M. A., Bukoski, R. D., & Kunos, G. (2004). Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation*, *110*(14), 1996-2002.
- Bellot, M., Galandrin, S., Boullaran, C., Matthies, H. J., Despas, F., Denis, C., Javitch, J., Mazères, S., Sanni, S. J., Pons, V., Seguelas, M.-H., Hansen, J. L., Pathak, A., Galli, A., Sénard, J.-M., & Galés, C. (2015). Dual agonist occupancy of AT1-R- α 2C-AR heterodimers results in atypical Gs-PKA signaling. *Nature Chemical Biology*, *11*(4), 271-279. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1766>

- Benowitz, N. L., & Jones, R. T. (1975). Cardiovascular effects of prolonged delta-9-tetrahydrocannabinol ingestion. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 18(3), 287-297. <https://doi.org/10.1002/cpt1975183287>
- Berden, J. A., & Slater, E. C. (1972). The allosteric binding of antimycin to cytochrome b in the mitochondrial membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 256(2), 199-215. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(72\)90053-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(72)90053-9)
- Berger, C., Schmid, P. C., Schabitz, W.-R., Wolf, M., Schwab, S., & Schmid, H. H. O. (2004). Massive accumulation of N-acylethanolamines after stroke. Cell signalling in acute cerebral ischemia? *Journal of Neurochemistry*, 88(5), 1159-1167. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02244.x>
- Betz, B., & Conway, B. R. (2014). Recent advances in animal models of diabetic nephropathy. *Nephron. Experimental Nephrology*, 126(4), 191-195.
- Bian, E.-B., Huang, C., Wang, H., Chen, X.-X., Zhang, L., Lv, X.-W., & Li, J. (2014). Repression of Smad7 mediated by DNMT1 determines hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats. *Toxicology Letters*, 224(2), 175-185. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.038>
- Bisogno, T., Melck, D., Bobrov MYu, null, Gretskaya, N. M., Bezuglov, V. V., De Petrocellis, L., & Di Marzo, V. (2000). N-acyl-dopamines : Novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *The Biochemical Journal*, 351 Pt 3, 817-824.
- Blankman, J. L., & Cravatt, B. F. (2013). Chemical Probes of Endocannabinoid Metabolism. *Pharmacological Reviews*, 65(2), 849-871. <https://doi.org/10.1124/pr.112.006387>
- Bonventre, J. V., & Yang, L. (2011). Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(11), 4210-4221.
- Bonz, A., Laser, M., Küllmer, S., Kniesch, S., Babin-Ebell, J., Popp, V., Ertl, G., & Wagner, J. A. (2003). Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 41(4), 657-664.
- Border, W. A., Okuda, S., Languino, L. R., & Ruoslahti, E. (1990). Transforming growth factor-beta regulates production of proteoglycans by mesangial cells. *Kidney International*, 37(2), 689-695. <https://doi.org/10.1038/ki.1990.35>
- Border, W. A., Okuda, S., Languino, L. R., Sporn, M. B., & Ruoslahti, E. (1990). Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature*, 346(6282), 371-374. <https://doi.org/10.1038/346371a0>
- Borouhaki, M. T., Asadpour, E., Sadeghnia, H. R., & Dolati, K. (2014). Effect of pomegranate seed oil against gentamicin -induced nephrotoxicity in rat. *Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 3510-3514. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0881-y>
- Boutet, A., De Frutos, C. A., Maxwell, P. H., Mayol, M. J., Romero, J., & Nieto, M. A. (2006). Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *The EMBO Journal*, 25(23), 5603-5613. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601421>
- Brenner, B. M., Cooper, M. E., de Zeeuw, D., Keane, W. F., Mitch, W. E., Parving, H. H., Remuzzi, G., Snapinn, S. M., Zhang, Z., Shahinfar, S., & RENAAL Study Investigators. (2001). Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *The New England Journal of Medicine*, 345(12), 861-869. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011161>

- Breyer, M. D., & Harris, R. C. (2001). Cyclooxygenase 2 and the kidney. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 10(1), 89-98. <https://doi.org/10.1097/00041552-200101000-00014>
- Brodsky, S. V. (2014). Anticoagulants and acute kidney injury: Clinical and pathology considerations. *Kidney Research and Clinical Practice*, 33(4), 174-180. <https://doi.org/10.1016/j.krcp.2014.11.001>
- Brodsky, S. V., Nadasdy, T., Rovin, B. H., Satoskar, A. A., Nadasdy, G. M., Wu, H. M., Bhatt, U. Y., & Hebert, L. A. (2011). Warfarin-related nephropathy occurs in patients with and without chronic kidney disease and is associated with an increased mortality rate. *Kidney International*, 80(2), 181-189. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.44>
- Bronova, I., Smith, B., Aydogan, B., Weichselbaum, R. R., Vemuri, K., Erdelyi, K., Makriyannis, A., Pacher, P., & Berdyshev, E. V. (2015). Protection from Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis by Peripheral Targeting of Cannabinoid Receptor-1. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 53(4), 555-562. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0331OC>
- Burek, M., Burmester, S., Salvador, E., Möller-Ehrlich, K., Schneider, R., Roewer, N., Nagai, M., & Förster, C. Y. (2020). Kidney Ischemia/Reperfusion Injury Induces Changes in the Drug Transporter Expression at the Blood-Brain Barrier in vivo and in vitro. *Frontiers in Physiology*, 11, 569881. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.569881>
- Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L., & Piomelli, D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *The Journal of Neuroscience*, 16(12), 3934-3942.
- Calignano, A., La Rana, G., Beltramo, M., Makriyannis, A., & Piomelli, D. (1997). Potentiation of anandamide hypotension by the transport inhibitor, AM404. *European Journal of Pharmacology*, 337(1), R1-2. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(97\)01297-1](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)01297-1)
- Calvaruso, V., Burroughs, A. K., Standish, R., Manousou, P., Grillo, F., Leandro, G., Maimone, S., Pleguezuelo, M., Xirouchakis, I., Guerrini, G. P., Patch, D., Yu, D., O'Beirne, J., & Dhillon, A. P. (2009). Computer-assisted image analysis of liver collagen: Relationship to Ishak scoring and hepatic venous pressure gradient. *Hepatology*, 49(4), 1236-1244. <https://doi.org/10.1002/hep.22745>
- Canaud, G., Brooks, C. R., Kishi, S., Taguchi, K., Nishimura, K., Magassa, S., Scott, A., Hsiao, L.-L., Ichimura, T., Terzi, F., Yang, L., & Bonventre, J. V. (2019). Cyclin G1 and TASC2 regulate kidney epithelial cell G2-M arrest and fibrotic maladaptive repair. *Science Translational Medicine*, 11(476), eaav4754.
- Cavero, I., Buckley, J. P., & Jandhyala, B. S. (1973). Hemodynamic and myocardial effects of (-)-delta9-trans-tetrahydrocannabinol in anesthetized dogs. *European Journal of Pharmacology*, 24(2), 243-251. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(73\)90078-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(73)90078-2)
- Chau, B. N., Xin, C., Hartner, J., Ren, S., Castano, A. P., Linn, G., Li, J., Tran, P. T., Kaimal, V., Huang, X., Chang, A. N., Li, S., Kalra, A., Grafals, M., Portilla, D., MacKenna, D. A., Orkin, S. H., & Duffield, J. S. (2012). MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Science Translational Medicine*, 4(121), 121ra18. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003205>
- Chawla, L. S., Eggers, P. W., Star, R. A., & Kimmel, P. L. (2014). Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *The New England Journal of Medicine*, 371(1), 58-66. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1214243>

- Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Nargeot, J., & Lory, P. (2001). Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *The EMBO Journal*, *20*(24), 7033-7040. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7033>
- Chen, S. J., Yuan, W., Mori, Y., Levenson, A., Trojanowska, M., & Varga, J. (1999). Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta : Involvement of Smad 3. *The Journal of Investigative Dermatology*, *112*(1), 49-57. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00477.x>
- Chevalier, R. L., Forbes, M. S., & Thornhill, B. A. (2009). Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney international*, *75*(11), 1145-1152.
- Chichger, H., Cleasby, M. E., Srai, S. K., Unwin, R. J., Debnam, E. S., & Marks, J. (2016). Experimental type II diabetes and related models of impaired glucose metabolism differentially regulate glucose transporters at the proximal tubule brush border membrane. *Experimental Physiology*, *101*(6), 731-742.
- Chin, E., Zamah, A. M., Landau, D., Grønbeck, H., Flyvbjerg, A., LeRoith, D., & Bondy, C. A. (1997). Changes in facilitative glucose transporter messenger ribonucleic acid levels in the diabetic rat kidney. *Endocrinology*, *138*(3), 1267-1275. <https://doi.org/10.1210/endo.138.3.5015>
- Chin, E., Zhou, J., & Bondy, C. (1993). Anatomical and developmental patterns of facilitative glucose transporter gene expression in the rat kidney. *The Journal of Clinical Investigation*, *91*(4), 1810-1815. <https://doi.org/10.1172/JCI116392>
- Choi, B. S., Shin, M. J., Shin, S. J., Kim, Y. S., Choi, Y. J., Kim, Y.-S., Moon, I. S., Kim, S. Y., Koh, Y. B., Bang, B. K., & Yang, C. W. (2005). Clinical significance of an early protocol biopsy in living-donor renal transplantation : Ten-year experience at a single center. *American Journal of Transplantation*, *5*(6), 1354-1360. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00830.x>
- Chopda, G. R., Vemuri, V. K., Sharma, R., Thakur, G. A., Makriyannis, A., & Paronis, C. A. (2013). Diuretic effects of cannabinoid agonists in mice. *European Journal of Pharmacology*, *721*(1-3), 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.09.053>
- Chorvat, R. J. (2013). Peripherally restricted CB1 receptor blockers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *23*(17), 4751-4760. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.06.066>
- Chorvat, R. J., Berbaum, J., Seriacki, K., & McElroy, J. F. (2012). JD-5006 and JD-5037 : Peripherally restricted (PR) cannabinoid-1 receptor blockers related to SLV-319 (Ibipinabant) as metabolic disorder therapeutics devoid of CNS liabilities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *22*(19), 6173-6180.
- Chung, A. C.-K., & Lan, H. Y. (2015). MicroRNAs in renal fibrosis. *Frontiers in Physiology*, *6*, 50. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00050>
- Cinar, R., Gochuico, B. R., Iyer, M. R., Jourdan, T., Yokoyama, T., Park, J. K., Coffey, N. J., Pri-Chen, H., Szanda, G., Liu, Z., Mackie, K., Gahl, W. A., & Kunos, G. (2017). Cannabinoid CB1 receptor overactivity contributes to the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight*, *2*(8). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92281>
- Cinar, R., Iyer, M. R., & Kunos, G. (2020). The therapeutic potential of second and third generation CB1R antagonists. *Pharmacology & Therapeutics*, *208*, 107477. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107477>

- Cinar, R., Iyer, M. R., Liu, Z., Cao, Z., Jourdan, T., Erdelyi, K., Godlewski, G., Szanda, G., Liu, J., Park, J. K., Mukhopadhyay, B., Rosenberg, A. Z., Liow, J.-S., Lorenz, R. G., Pacher, P., Innis, R. B., & Kunos, G. (2016). Hybrid inhibitor of peripheral cannabinoid-1 receptors and inducible nitric oxide synthase mitigates liver fibrosis. *JCI Insight*, *1*(11). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.87336>
- Cinar, R., Park, J. K., Zawatsky, C. N., Coffey, N. J., Bodine, S. P., Abdalla, J., Yokoyama, T., Jourdan, T., Jay, L., Zuo, M. X. G., O'Brien, K. J., Huang, J., Mackie, K., Alimardanov, A., Iyer, M. R., Gahl, W. A., Kunos, G., Gochuico, B. R., & Malicdan, M. C. V. (2021). CB1 R and iNOS are distinct players promoting pulmonary fibrosis in Hermansky-Pudlak syndrome. *Clinical and Translational Medicine*, *11*(7), e471. <https://doi.org/10.1002/ctm2.471>
- Cluny, N. L., Vemuri, V. K., Chambers, A. P., Limebeer, C. L., Bedard, H., Wood, J. T., Lutz, B., Zimmer, A., Parker, L. A., Makriyannis, A., & Sharkey, K. A. (2010). A novel peripherally restricted cannabinoid receptor antagonist, AM6545, reduces food intake and body weight, but does not cause malaise, in rodents. *British Journal of Pharmacology*, *161*(3), 629-642. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00908.x>
- Cohen, M., Kitsberg, D., Tsytkin, S., Shulman, M., Aroeti, B., & Nahmias, Y. (2014). Live imaging of GLUT2 glucose-dependent trafficking and its inhibition in polarized epithelial cysts. *Open Biology*, *4*(7). <https://doi.org/10.1098/rsob.140091>
- Cosio, F. G., El Ters, M., Cornell, L. D., Schinstock, C. A., & Stegall, M. D. (2016). Changing Kidney Allograft Histology Early Posttransplant : Prognostic Implications of 1-Year Protocol Biopsies. *American Journal of Transplantation*, *16*(1), 194-203. <https://doi.org/10.1111/ajt.13423>
- Cosio, F. G., Grande, J. P., Wadei, H., Larson, T. S., Griffin, M. D., & Stegall, M. D. (2005). Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. *American Journal of Transplantation*, *5*(10), 2464-2472. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01050.x>
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., & Gilula, N. B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, *384*(6604), 83-87. <https://doi.org/10.1038/384083a0>
- Crowley, S. D., & Coffman, T. M. (2008). In hypertension, the kidney breaks your heart. *Current Cardiology Reports*, *10*(6), 470-476. <https://doi.org/10.1007/s11886-008-0074-5>
- Crowley, S. D., Gurley, S. B., Oliverio, M. I., Pazmino, A. K., Griffiths, R., Flannery, P. J., Spurney, R. F., Kim, H.-S., Smithies, O., Le, T. H., & Coffman, T. M. (2005). Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(4), 1092-1099. <https://doi.org/10.1172/JCI23378>
- Dai, E., Zhang, J., Zhang, D., Yang, L., Wang, Y., Jiang, X., Ye, L., Li, X., Liu, H., Ma, J., & Jiang, H. (2014). Rimonabant inhibits proliferation, collagen secretion and induces apoptosis in hepatic stellate cells. *Hepato-Gastroenterology*, *61*(135), 2052-2061.
- Dannert, M. T., Alsasua, A., Herradon, E., Martín, M. I., & López-Miranda, V. (2007). Vasorelaxant effect of Win 55,212-2 in rat aorta : New mechanisms involved. *Vascular Pharmacology*, *46*(1), 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.06.005>

- Dao, M., & François, H. (2021). Cannabinoid Receptor 1 Inhibition in Chronic Kidney Disease : A New Therapeutic Toolbox. *Frontiers in Endocrinology*, *12*, 720734. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.720734>
- Dao, M., Lecru, L., Vandermeersch, S., Ferreira, M., Ferlicot, S., Posseme, K., Dürrbach, A., Hermeziu, B., Mussini, C., Chatziantoniou, C., & François, H. (2019). The cannabinoid receptor 1 is involved in renal fibrosis during chronic allograft dysfunction : Proof of concept. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *23*(11), 7279-7288. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14570>
- Dao, M., Pouliquen, C., Duquesne, A., Posseme, K., Mussini, C., Dürrbach, A., Guettier, C., François, H., & Ferlicot, S. (2020). Usefulness of morphometric image analysis with Sirius Red to assess interstitial fibrosis after renal transplantation from uncontrolled circulatory death donors. *Scientific Reports*, *10*(1), 6894.
- De Palma, M., Venneri, M. A., Galli, R., Sergi, L., Politi, L. S., Sampaolesi, M., & Naldini, L. (2005). Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell*, *8*(3), 211-226. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.08.002>
- De Palma, M., Venneri, M. A., Roca, C., & Naldini, L. (2003). Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nature Medicine*, *9*(6), 789-795. <https://doi.org/10.1038/nm871>
- De Petrocellis, L., Bisogno, T., Maccarrone, M., Davis, J. B., Finazzi-Agro, A., & Di Marzo, V. (2001). The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(16), 12856-12863. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008555200>
- Defer, N., Wan, J., Souktani, R., Escoubet, B., Perier, M., Caramelle, P., Manin, S., Deveaux, V., Bourin, M.-C., Zimmer, A., Lotersztajn, S., Pecker, F., & Pavoine, C. (2009). The cannabinoid receptor type 2 promotes cardiac myocyte and fibroblast survival and protects against ischemia/reperfusion-induced cardiomyopathy. *The FASEB Journal*, *23*(7), 2120-2130. <https://doi.org/10.1096/fj.09-129478>
- Deng, Y., Guo, Y., Liu, P., Zeng, R., Ning, Y., Pei, G., Li, Y., Chen, M., Guo, S., Li, X., Han, M., & Xu, G. (2016). Blocking protein phosphatase 2A signaling prevents endothelial-to-mesenchymal transition and renal fibrosis : A peptide-based drug therapy. *Scientific Reports*, *6*, 19821. <https://doi.org/10.1038/srep19821>
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., & Gauthier, J. M. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *The EMBO Journal*, *17*(11), 3091-3100. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.11.3091>
- Després, J.-P., Golay, A., Sjöström, L., & Rimonabant in Obesity-Lipids Study Group. (2005). Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *The New England Journal of Medicine*, *353*(20), 2121-2134. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044537>
- Després, J.-P., Ross, R., Boka, G., Alméras, N., Lemieux, I., & ADAGIO-Lipids Investigators. (2009). Effect of rimonabant on the high-triglyceride/ low-HDL-cholesterol dyslipidemia, intraabdominal adiposity, and liver fat : The ADAGIO-Lipids trial. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(3), 416-423. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.176362>

- Deutsch, D. G., Goligorsky, M. S., Schmid, P. C., Krebsbach, R. J., Schmid, H. H., Das, S. K., Dey, S. K., Arreaza, G., Thorup, C., Stefano, G., & Moore, L. C. (1997). Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(6), 1538-1546. <https://doi.org/10.1172/JCI119677>
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946-1949.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C., & Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372(6507), 686-691. <https://doi.org/10.1038/372686a0>
- Di, S., Boudaba, C., Popescu, I. R., Weng, F.-J., Harris, C., Marcheselli, V. L., Bazan, N. G., & Tasker, J. G. (2005). Activity-dependent release and actions of endocannabinoids in the rat hypothalamic supraoptic nucleus. *The Journal of Physiology*, 569(Pt 3), 751-760. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.097477>
- Diaz Encarnacion, M. M., Griffin, M. D., Slezak, J. M., Bergstralh, E. J., Stegall, M. D., Velosa, J. A., & Grande, J. P. (2004). Correlation of quantitative digital image analysis with the glomerular filtration rate in chronic allograft nephropathy. *American Journal of Transplantation*, 4(2), 248-256.
- Ding, Y., Kim, S. Il, Lee, S.-Y., Koo, J. K., Wang, Z., & Choi, M. E. (2014). Autophagy regulates TGF- β expression and suppresses kidney fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(12), 2835-2846. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013101068>
- Djudjaj, S., Martin, I. V., Buhl, E. M., Nothofer, N. J., Leng, L., Piecychna, M., Floege, J., Bernhagen, J., Bucala, R., & Boor, P. (2017). Macrophage Migration Inhibitory Factor Limits Renal Inflammation and Fibrosis by Counteracting Tubular Cell Cycle Arrest. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(12), 3590-3604. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017020190>
- Ellison, D. H., Velázquez, H., & Wright, F. S. (1989). Adaptation of the distal convoluted tubule of the rat. Structural and functional effects of dietary salt intake and chronic diuretic infusion. *The Journal of Clinical Investigation*, 83(1), 113-126. <https://doi.org/10.1172/JCI113847>
- Ergür, B. U., Çilaker Mıcılı, S., Yılmaz, O., & Akokay, P. (2015). The effects of α -lipoic acid on aortic injury and hypertension in the rat remnant kidney (5/6 nephrectomy) model. *Anatolian Journal of Cardiology*, 15(6), 443-449.
- Farris, A. B., Adams, C. D., Brousaides, N., Della Pelle, P. A., Collins, A. B., Moradi, E., Smith, R. N., Grimm, P. C., & Colvin, R. B. (2011). Morphometric and visual evaluation of fibrosis in renal biopsies. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(1), 176-186. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009091005>
- François, H., Jacquet, A., Beaudreuil, S., Seidowsky, A., Hebibi, H., Charpentier, B., & Durrbach, A. (2011). Emerging strategies to preserve renal function. *Journal of Nephrology*, 24(2), 133-141.
- Francois, H., & Lecru, L. (2018). The Role of Cannabinoid Receptors in Renal Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 25(7), 793-801. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170911170020>

- Fu, Y., Tang, C., Cai, J., Chen, G., Zhang, D., & Dong, Z. (2018). Rodent models of AKI-CKD transition. *American Journal of Physiology*, 315(4), F1098-F1106. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00199.2018>
- Furness, P. N., Taub, N., & Convergence of European Renal Transplant Pathology Assessment Procedures (CERTPAP) Project. (2001). International variation in the interpretation of renal transplant biopsies : Report of the CERTPAP Project. *Kidney International*, 60(5), 1998-2012. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00030.x>
- Gao, G., Zhang, B., Ramesh, G., Betterly, D., Tadagavadi, R. K., Wang, W., & Reeves, W. B. (2013). TNF- α mediates increased susceptibility to ischemic AKI in diabetes. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 304(5), F515-521. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00533.2012>
- Gatley, S. J., Gifford, A. N., Volkow, N. D., Lan, R., & Makriyannis, A. (1996). 123I-labeled AM251 : A radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *European Journal of Pharmacology*, 307(3), 331-338. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00279-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00279-8)
- Geng, Y., Zhang, L., Fu, B., Zhang, J., Hong, Q., Hu, J., Li, D., Luo, C., Cui, S., Zhu, F., & Chen, X. (2014). Mesenchymal stem cells ameliorate rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via the activation of M2 macrophages. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(3), 80. <https://doi.org/10.1186/scrt469>
- Giang, D. K., & Cravatt, B. F. (1997). Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6), 2238-2242. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2238>
- Gohara, A., Eltaki, N., Sabry, D., Murtagh, D., Jankun, J., Selman, S. H., & Skrzypczak-Jankun, E. (2012). Human 5-, 12- and 15-lipoxygenase-1 coexist in kidney but show opposite trends and their balance changes in cancer. *Oncology Reports*, 28(4), 1275-1282. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1924>
- Gomes, I., Grushko, J. S., Golebiewska, U., Hoogendoorn, S., Gupta, A., Heimann, A. S., Ferro, E. S., Scarlata, S., Fricker, L. D., & Devi, L. A. (2009). Novel endogenous peptide agonists of cannabinoid receptors. *FASEB Journal*, 23(9), 3020-3029. <https://doi.org/10.1096/fj.09-132142>
- Gong, W., Mao, S., Yu, J., Song, J., Jia, Z., Huang, S., & Zhang, A. (2016). NLRP3 deletion protects against renal fibrosis and attenuates mitochondrial abnormality in mouse with 5/6 nephrectomy. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 310(10), F1081-1088. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00534.2015>
- González-Núñez, D., Solé, M., Natarajan, R., & Poch, E. (2005). 12-Lipoxygenase metabolism in mouse distal convoluted tubule cells. *Kidney International*, 67(1), 178-186. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00068.x>
- Goupil, E., Fillion, D., Clément, S., Luo, X., Devost, D., Sleno, R., Pétrin, D., Saragovi, H. U., Thorin, É., Laporte, S. A., & Hébert, T. E. (2015). Angiotensin II type I and prostaglandin F2 α receptors cooperatively modulate signaling in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(5), 3137-3148. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.631119>
- Graham, M. L., & Schuurman, H.-J. (2015). Validity of animal models of type 1 diabetes, and strategies to enhance their utility in translational research. *European Journal of Pharmacology*, 759, 221-230. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.02.054>

- Greco, E. V., Russo, G., Giandalia, A., Viazzi, F., Pontremoli, R., & De Cosmo, S. (2019). GLP-1 Receptor Agonists and Kidney Protection. *Medicina*, 55(6). <https://doi.org/10.3390/medicina55060233>
- Grimm, P. C., Nickerson, P., Gough, J., McKenna, R., Jeffery, J., Birk, P., & Rush, D. N. (1999). Quantitation of allograft fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Pediatric Transplantation*, 3(4), 257-270. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3046.1999.00044.x>
- Grimm, P. C., Nickerson, P., Gough, J., McKenna, R., Stern, E., Jeffery, J., & Rush, D. N. (2003). Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(6), 1662-1668.
- Gruden, G., Perin, P. C., & Camussi, G. (2005). Insight on the pathogenesis of diabetic nephropathy from the study of podocyte and mesangial cell biology. *Current Diabetes Reviews*, 1(1), 27-40. <https://doi.org/10.2174/1573399052952622>
- Guo, Z., Sun, H., Zhang, H., & Zhang, Y. (2015). Anti-hypertensive and renoprotective effects of berberine in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Hypertension*, 37(4), 332-339. <https://doi.org/10.3109/10641963.2014.972560>
- Gyombolai, P., Pap, D., Turu, G., Catt, K. J., Bagdy, G., & Hunyady, L. (2012). Regulation of endocannabinoid release by G proteins : A paracrine mechanism of G protein-coupled receptor action. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 353(1-2), 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.10.011>
- Haas, M. (2014). Chronic allograft nephropathy or interstitial fibrosis and tubular atrophy : What is in a name? *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 23(3), 245-250. <https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000444811.26884.2d>
- Haberstroh, U., Zahner, G., Disser, M., Thaiss, F., Wolf, G., & Stahl, R. A. (1993). TGF-beta stimulates rat mesangial cell proliferation in culture : Role of PDGF beta-receptor expression. *The American Journal of Physiology*, 264(2 Pt 2), F199-205. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1993.264.2.F199>
- Han, X., He, Y., Bi, G.-H., Zhang, H.-Y., Song, R., Liu, Q.-R., Egan, J. M., Gardner, E. L., Li, J., & Xi, Z.-X. (2017). CB1 Receptor Activation on VgluT2-Expressing Glutamatergic Neurons Underlies Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)-Induced Aversive Effects in Mice. *Scientific Reports*, 7(1), 12315. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12399-z>
- Hansen, H. H., Azcoitia, I., Pons, S., Romero, J., García-Segura, L. M., Ramos, J. A., Hansen, H. S., & Fernández-Ruiz, J. (2002). Blockade of cannabinoid CB(1) receptor function protects against in vivo disseminating brain damage following NMDA-induced excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 82(1), 154-158.
- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., Kustanovich, I., & Mechoulam, R. (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 3662-3665. <https://doi.org/10.1073/pnas.061029898>
- Hart, A., Smith, J. M., Skeans, M. A., Gustafson, S. K., Stewart, D. E., Cherikh, W. S., Wainright, J. L., Kucheryavaya, A., Woodbury, M., Snyder, J. J., Kasiske, B. L., & Israni, A. K. (2017). OPTN/SRTR 2015 Annual Data Report : Kidney. *American Journal of Transplantation*, 17 Suppl 1, 21-116. <https://doi.org/10.1111/ajt.14124>
- Haspula, D., & Clark, M. A. (2020). Cannabinoid Receptors : An Update on Cell Signaling, Pathophysiological Roles and Therapeutic Opportunities in Neurological,

- Cardiovascular, and Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20). <https://doi.org/10.3390/ijms21207693>
- He, L., Peng, X., Zhu, J., Liu, G., Chen, X., Tang, C., Liu, H., Liu, F., & Peng, Y. (2015). Protective effects of curcumin on acute gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 93(4), 275-282. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0459>
- Hebert-Chatelain, E., Desprez, T., Serrat, R., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Busquets-Garcia, A., Pagano Zottola, A. C., Delamarre, A., Cannich, A., Vincent, P., Varilh, M., Robin, L. M., Terral, G., García-Fernández, M. D., Colavita, M., Mazier, W., Drago, F., Puente, N., Reguero, L., ... Marsicano, G. (2016). A cannabinoid link between mitochondria and memory. *Nature*, 539(7630), 555-559. <https://doi.org/10.1038/nature20127>
- Heemann, U., & Lutz, J. (2013). Pathophysiology and treatment options of chronic renal allograft damage. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(10), 2438-2446. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft087>
- Heerspink, H. J. L., Kosiborod, M., Inzucchi, S. E., & Cherney, D. Z. I. (2018). Renoprotective effects of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors. *Kidney International*, 94(1), 26-39. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.12.027>
- Heerspink, H. J. L., Stefánsson, B. V., Correa-Rotter, R., Chertow, G. M., Greene, T., Hou, F.-F., Mann, J. F. E., McMurray, J. J. V., Lindberg, M., Rossing, P., Sjöström, C. D., Toto, R. D., Langkilde, A.-M., Wheeler, D. C., & DAPA-CKD Trial Committees and Investigators. (2020). Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *The New England Journal of Medicine*, 383(15), 1436-1446.
- Heidarian, E., Jafari-Dehkordi, E., Valipour, P., Ghatreh-Samani, K., & Ashrafi-Eshkaftaki, L. (2017). Nephroprotective and Anti-Inflammatory Effects of Pistacia atlantica Leaf Hydroethanolic Extract Against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Journal of Dietary Supplements*, 14(5), 489-502.
- Heimann, A. S., Gomes, I., Dale, C. S., Pagano, R. L., Gupta, A., de Souza, L. L., Luchessi, A. D., Castro, L. M., Giorgi, R., Rioli, V., Ferro, E. S., & Devi, L. A. (2007). Hemopressin is an inverse agonist of CB1 cannabinoid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51), 20588-20593. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706980105>
- Henstridge, C. M. (2012). Off-target cannabinoid effects mediated by GPR55. *Pharmacology*, 89(3-4), 179-187. <https://doi.org/10.1159/000336872>
- Hermann, H., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Schiano Moriello, A., Lutz, B., & Di Marzo, V. (2003). Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(3), 607-616. <https://doi.org/10.1007/s000180300052>
- Hinden, L., Udi, S., Drori, A., Gammal, A., Nemirovski, A., Hadar, R., Baraghithy, S., Permyakova, A., Geron, M., Cohen, M., Tsytkin-Kirschenzweig, S., Riahi, Y., Leibowitz, G., Nahmias, Y., Priel, A., & Tam, J. (2018). Modulation of Renal GLUT2 by the Cannabinoid-1 Receptor: Implications for the Treatment of Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(2), 434-448. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017040371>

- Hirsch, S., & Tam, J. (2019). Cannabis : From a Plant That Modulates Feeding Behaviors toward Developing Selective Inhibitors of the Peripheral Endocannabinoid System for the Treatment of Obesity and Metabolic Syndrome. *Toxins*, *11*(5), E275. <https://doi.org/10.3390/toxins11050275>
- Hodgkins, K. S., & Schnaper, H. W. (2012). Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*, *27*(6), 901-909. <https://doi.org/10.1007/s00467-011-1992-9>
- Hosohata, Y., Quock, R. M., Hosohata, K., Makriyannis, A., Consroe, P., Roeske, W. R., & Yamamura, H. I. (1997). AM630 antagonism of cannabinoid-stimulated [35S]GTP gamma S binding in the mouse brain. *European Journal of Pharmacology*, *321*(1), R1-3. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(97\)00047-2](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)00047-2)
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., & Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacological Reviews*, *54*(2), 161-202.
- Howlett, A. C., Blume, L. C., & Dalton, G. D. (2010). CB1 cannabinoid receptors and their associated proteins. *Current medicinal chemistry*, *17*(14), 1382.
- Huang, Y., de Boer, W. B., Adams, L. A., MacQuillan, G., Rossi, E., Rigby, P., Raftopoulos, S. C., Bulsara, M., & Jeffrey, G. P. (2013). Image analysis of liver collagen using sirius red is more accurate and correlates better with serum fibrosis markers than trichrome. *Liver International*, *33*(8), 1249-1256. <https://doi.org/10.1111/liv.12184>
- Huffman, J. W., Liddle, J., Yu, S., Aung, M. M., Abood, M. E., Wiley, J. L., & Martin, B. R. (1999). 3-(1',1'-Dimethylbutyl)-1-deoxy-delta8-THC and related compounds : Synthesis of selective ligands for the CB2 receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *7*(12), 2905-2914. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(99\)00219-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(99)00219-9)
- Humphreys, B. D. (2018). Mechanisms of Renal Fibrosis. *Annual Review of Physiology*, *80*, 309-326. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034227>
- Humphreys, B. D., Lin, S.-L., Kobayashi, A., Hudson, T. E., Nowlin, B. T., Bonventre, J. V., Valerius, M. T., McMahon, A. P., & Duffield, J. S. (2010). Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *The American Journal of Pathology*, *176*(1), 85-97. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090517>
- Inoue, M., Tsuboi, K., Okamoto, Y., Hidaka, M., Uyama, T., Tsutsumi, T., Tanaka, T., Ueda, N., & Tokumura, A. (2017). Peripheral tissue levels and molecular species compositions of N-acyl-phosphatidylethanolamine and its metabolites in mice lacking N-acyl-phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D. *Journal of Biochemistry*, *162*(6), 449-458. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx054>
- Isaka, Y., Fujiwara, Y., Ueda, N., Kaneda, Y., Kamada, T., & Imai, E. (1993). Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *The Journal of Clinical Investigation*, *92*(6), 2597-2601. <https://doi.org/10.1172/JCI116874>
- Iyer, M. R., Cinar, R., Katz, A., Gao, M., Erdelyi, K., Jourdan, T., Coffey, N. J., Pacher, P., & Kunos, G. (2017). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel, Non-Brain-Penetrant, Hybrid Cannabinoid CB1R Inverse Agonist/Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Inhibitors for the Treatment of Liver Fibrosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, *60*(3), 1126-1141. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01504>

- Janiak, P., Poirier, B., Bidouard, J. P., Cadrouvele, C., Pierre, F., Gouraud, L., Barbosa, I., Dedio, J., Maffrand, J. P., & Le Fur, G. (2007). Blockade of cannabinoid CB1 receptors improves renal function, metabolic profile, and increased survival of obese Zucker rats. *Kidney international*, 72(11), 1345-1357.
- Járai, Z., Wagner, J. A., Goparaju, S. K., Wang, L., Razdan, R. K., Sugiura, T., Zimmer, A. M., Bonner, T. I., Zimmer, A., & Kunos, G. (2000). Cardiovascular effects of 2-arachidonoyl glycerol in anesthetized mice. *Hypertension*, 35(2), 679-684. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.35.2.679>
- Jenkin, K. A., McAinch, A. J., Grinfeld, E., & Hryciw, D. H. (2010). Role for cannabinoid receptors in human proximal tubular hypertrophy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 26(6), 879-886. <https://doi.org/10.1159/000323997>
- Jenkin, K. A., McAinch, A. J., Zhang, Y., Kelly, D. J., & Hryciw, D. H. (2015). Elevated cannabinoid receptor 1 and G protein-coupled receptor 55 expression in proximal tubule cells and whole kidney exposed to diabetic conditions. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 42(3), 256-262. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12355>
- Jin, H., Zhang, Y., Ding, Q., Wang, S. S., Rastogi, P., Dai, D.-F., Lu, D., Purvis, M., Cao, C., Wang, A., Liu, D., Ren, C., Elhadi, S., Hu, M.-C., Chai, Y., Zepeda-Orozco, D., Campisi, J., & Attanasio, M. (2019). Epithelial innate immunity mediates tubular cell senescence after kidney injury. *JCI Insight*, 4(2), 125490. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.125490>
- Jin, X.-H., Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., & Ueda, N. (2007). Discovery and characterization of a Ca²⁺-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferase generating the anandamide precursor and its congeners. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(6), 3614-3623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606369200>
- Jourdan, T., Godlewski, G., Cinar, R., Bertola, A., Szanda, G., Liu, J., Tam, J., Han, T., Mukhopadhyay, B., Skarulis, M. C., Ju, C., Aouadi, M., Czech, M. P., & Kunos, G. (2013). Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. *Nature Medicine*, 19(9), 1132-1140. <https://doi.org/10.1038/nm.3265>
- Jourdan, T., Park, J. K., Varga, Z. V., Pálóczi, J., Coffey, N. J., Rosenberg, A. Z., Godlewski, G., Cinar, R., Mackie, K., Pacher, P., & Kunos, G. (2018). Cannabinoid-1 receptor deletion in podocytes mitigates both glomerular and tubular dysfunction in a mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 20(3), 698-708. <https://doi.org/10.1111/dom.13150>
- Jourdan, T., Szanda, G., Rosenberg, A. Z., Tam, J., Earley, B. J., Godlewski, G., Cinar, R., Liu, Z., Liu, J., Ju, C., Pacher, P., & Kunos, G. (2014). Overactive cannabinoid 1 receptor in podocytes drives type 2 diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(50), E5420-5428. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419901111>
- Julien, B., Grenard, P., Teixeira-Clerc, F., Van Nhieu, J. T., Li, L., Karsak, M., Zimmer, A., Mallat, A., & Lotersztajn, S. (2005). Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology*, 128(3), 742-755.
- Junqueira, L. C., Bignolas, G., & Brentani, R. R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical Journal*, 11(4), 447-455.

- Kaissling, B., Bachmann, S., & Kriz, W. (1985). Structural adaptation of the distal convoluted tubule to prolonged furosemide treatment. *The American Journal of Physiology*, 248(3 Pt 2), F374-381. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1985.248.3.F374>
- Kaissling, B., & Stanton, B. A. (1988). Adaptation of distal tubule and collecting duct to increased sodium delivery. I. Ultrastructure. *The American Journal of Physiology*, 255(6 Pt 2), F1256-1268. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1988.255.6.F1256>
- Kale, V. P., Gibbs, S., Taylor, J. A., Zmarowski, A., Novak, J., Patton, K., Sparrow, B., Gorospe, J., Anand, S., Cinar, R., Kunos, G., Chorvat, R. J., & Terse, P. S. (2019). Preclinical toxicity evaluation of JD5037, a peripherally restricted CB1 receptor inverse agonist, in rats and dogs for treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*: 109, 104483.
- Kapusta, D. R., & Obih, J. C. (1993). Central kappa opioid receptor-evoked changes in renal function in conscious rats : Participation of renal nerves. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 267(1), 197-204.
- Kapusta, D. R., & Obih, J. C. (1995). Central kappa opioids blunt the renal excretory responses to volume expansion by a renal nerve-dependent mechanism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273(1), 199-205.
- KDIGO. (2013). Chapter 1 : Definition and classification of CKD. *Kidney International Supplements*, 3(1), 19-62. <https://doi.org/10.1038/kisup.2012.64>
- Kim, D. H., Moon, S.-O., Jung, Y. J., Lee, A. S., Kang, K. P., Lee, T. H., Lee, S., Chai, O. H., Song, C. H., Jang, K. Y., Sung, M. J., Zhang, X., Park, S. K., & Kim, W. (2009). Mast cells decrease renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney International*, 75(10), 1031-1038. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.1>
- Kim, J. H., Lee, D.-W., Jung, M. H., Cho, H.-S., Jeon, D.-H., Chang, S.-H., & Park, D. J. (2014). Macrophage depletion ameliorates glycerol-induced acute kidney injury in mice. *Nephron. Experimental Nephrology*, 128(1-2), 21-29.
- Kim, J., Welch, W. J., Cannon, J. K., Tisher, C. C., & Madsen, K. M. (1992). Immunocytochemical response of type A and type B intercalated cells to increased sodium chloride delivery. *The American Journal of Physiology*, 262(2 Pt 2), F288-302. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1992.262.2.F288>
- Kitada, M., Ogura, Y., & Koya, D. (2016). Rodent models of diabetic nephropathy : Their utility and limitations. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 9, 279-290. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S103784>
- Ko, J.-W., Lee, I.-C., Park, S.-H., Moon, C., Kang, S.-S., Kim, S.-H., & Kim, J.-C. (2014). Protective effects of pine bark extract against cisplatin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Laboratory Animal Research*, 30(4), 174-180. <https://doi.org/10.5625/lar.2014.30.4.174>
- Koesters, R., Kaissling, B., Lahir, M., Picard, N., Theilig, F., Gebhardt, R., Glick, A. B., Hähnel, B., Hossler, H., Gröne, H.-J., & Kriz, W. (2010). Tubular overexpression of transforming growth factor-beta1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells. *The American Journal of Pathology*, 177(2), 632-643. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091012>
- Köfalvi, A., Vizi, E. S., Ledent, C., & Sperlágh, B. (2003). Cannabinoids inhibit the release of [3H]glutamate from rodent hippocampal synaptosomes via a novel CB1 receptor-

- independent action. *The European Journal of Neuroscience*, 18(7), 1973-1978. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02897.x>
- Kormann, R., Kavvadas, P., Placier, S., Vandermeersch, S., Dorison, A., Dussaule, J.-C., Chadjichristos, C. E., Prakoura, N., & Chatziantoniou, C. (2020). Periostin Promotes Cell Proliferation and Macrophage Polarization to Drive Repair after AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, 31(1), 85-100.
- Kosersky, D. S. (1978). Antihypertensive effects of delta9-tetrahydrocannabinol. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie*, 233(1), 76-81.
- Koura, Y., Ichihara, A., Tada, Y., Kaneshiro, Y., Okada, H., Temm, C. J., Hayashi, M., & Saruta, T. (2004). Anandamide decreases glomerular filtration rate through predominant vasodilation of efferent arterioles in rat kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(6), 1488-1494.
- Koye, D. N., Shaw, J. E., Reid, C. M., Atkins, R. C., Reutens, A. T., & Magliano, D. J. (2017). Incidence of chronic kidney disease among people with diabetes : A systematic review of observational studies. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 34(7), 887-901. <https://doi.org/10.1111/dme.13324>
- Kramann, R., Schneider, R. K., DiRocco, D. P., Machado, F., Fleig, S., Bondzie, P. A., Henderson, J. M., Ebert, B. L., & Humphreys, B. D. (2015). Perivascular gli1(+) progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell*, 16(1), 51-66. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.11.004>
- Kristensen, S. L., Rørth, R., Jhund, P. S., Docherty, K. F., Sattar, N., Preiss, D., Køber, L., Petrie, M. C., & McMurray, J. J. V. (2019). Cardiovascular, mortality, and kidney outcomes with GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes : A systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 7(10), 776-785. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30249-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30249-9)
- Kumar, D., Singla, S. K., Puri, V., & Puri, S. (2015). The restrained expression of NF-κB in renal tissue ameliorates folic acid induced acute kidney injury in mice. *PloS One*, 10(1), e115947. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115947>
- Lake, K. D., Compton, D. R., Varga, K., Martin, B. R., & Kunos, G. (1997). Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats mediated by CB1-like cannabinoid receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 281(3), 1030-1037.
- Lake, K. D., Martin, B. R., Kunos, G., & Varga, K. (1997). Cardiovascular effects of anandamide in anesthetized and conscious normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*, 29(5), 1204-1210. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.29.5.1204>
- Lamb, K. E., Lodhi, S., & Meier-Kriesche, H.-U. (2011). Long-term renal allograft survival in the United States : A critical reappraisal. *American Journal of Transplantation*, 11(3), 450-462. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03283.x>
- Lan, R., Gatley, J., Lu, Q., Fan, P., Fernando, S. R., Volkow, N. D., Pertwee, R., & Makriyannis, A. (1999). Design and synthesis of the CB1 selective cannabinoid antagonist AM281 : A potential human SPECT ligand. *AAPS PharmSci*, 1(2), E4.
- Lan, R., Liu, Q., Fan, P., Lin, S., Fernando, S. R., McCallion, D., Pertwee, R., & Makriyannis, A. (1999). Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(4), 769-776. <https://doi.org/10.1021/jm980363y>

- Lange, J. H. M., Coolen, H. K. A. C., van Stuivenberg, H. H., Dijksman, J. A. R., Herremans, A. H. J., Ronken, E., Keizer, H. G., Tipker, K., McCreary, A. C., Veerman, W., Wals, H. C., Stork, B., Verveer, P. C., den Hartog, A. P., de Jong, N. M. J., Adolfs, T. J. P., Hoogendoorn, J., & Kruse, C. G. (2004). Synthesis, biological properties, and molecular modeling investigations of novel 3,4-diarylpyrazolines as potent and selective CB(1) cannabinoid receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*(3), 627-643. <https://doi.org/10.1021/jm031019q>
- Larrinaga, G., Varona, A., Pérez, I., Sanz, B., Ugalde, A., Cándenas, M. L., Pinto, F. M., Gil, J., & López, J. I. (2010). Expression of cannabinoid receptors in human kidney. *Histology and Histopathology*, *25*(9), 1133-1138.
- Lazzerini, P. E., Natale, M., Gianhecchi, E., Capecchi, P. L., Montilli, C., Zimbone, S., Castrichini, M., Balistreri, E., Ricci, G., Selvi, E., Garcia-Gonzalez, E., Galeazzi, M., & Laghi-Pasini, F. (2012). Adenosine A2A receptor activation stimulates collagen production in sclerodermic dermal fibroblasts either directly and through a cross-talk with the cannabinoid system. *Journal of Molecular Medicine*, *90*(3), 331-342. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0824-5>
- Le Clef, N., Verhulst, A., D'Haese, P. C., & Vervaet, B. A. (2016). Unilateral Renal Ischemia-Reperfusion as a Robust Model for Acute to Chronic Kidney Injury in Mice. *PLoS One*, *11*(3), e0152153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152153>
- Le Foll, B., Gorelick, D. A., & Goldberg, S. R. (2009). The future of endocannabinoid-oriented clinical research after CB1 antagonists. *Psychopharmacology*, *205*(1), 171-174. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1506-7>
- Leaf, I. A., & Duffield, J. S. (2017). What can target kidney fibrosis? *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, *32*(suppl_1), i89-i97. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw388>
- LeBleu, V. S., Taduri, G., O'Connell, J., Teng, Y., Cooke, V. G., Woda, C., Sugimoto, H., & Kalluri, R. (2013). Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nature Medicine*, *19*(8), 1047-1053. <https://doi.org/10.1038/nm.3218>
- Lecru, L., Desterke, C., Grassin-Delyle, S., Chatziantoniou, C., Vandermeersch, S., Devocelle, A., Vernochet, A., Ivanovski, N., Ledent, C., Ferlicot, S., Dalia, M., Saïd, M., Beaudreuil, S., Charpentier, B., Vazquez, A., Giron-Michel, J., Azzarone, B., Durrbach, A., & François, H. (2015). Cannabinoid receptor 1 is a major mediator of renal fibrosis. *Kidney International*, *88*(1), 72-84. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.63>
- Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J. F., Beslot, F., Böhme, G. A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B. P., Vassart, G., Fratta, W., & Parmentier, M. (1999). Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*, *283*(5400), 401-404.
- Legouis, D., Bataille, A., Hertig, A., Vandermeersch, S., Simon, N., Rondeau, E., & Galichon, P. (2015). Ex vivo analysis of renal proximal tubular cells. *BMC Cell Biology*, *16*, 12. <https://doi.org/10.1186/s12860-015-0058-4>
- Leishman, E., Mackie, K., Luquet, S., & Bradshaw, H. B. (2016). Lipidomics profile of a NAPE-PLD KO mouse provides evidence of a broader role of this enzyme in lipid metabolism in the brain. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1861*(6), 491-500. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2016.03.003>

- Lenoir, O., Tharaux, P.-L., & Huber, T. B. (2016). Autophagy in kidney disease and aging : Lessons from rodent models. *Kidney International*, 90(5), 950-964. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.04.014>
- Leung, D., Saghatelian, A., Simon, G. M., & Cravatt, B. F. (2006). Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry*, 45(15), 4720-4726. <https://doi.org/10.1021/bi060163l>
- Lewis, E. J., Hunsicker, L. G., Clarke, W. R., Berl, T., Pohl, M. A., Lewis, J. B., Ritz, E., Atkins, R. C., Rohde, R., Raz, I., & Collaborative Study Group. (2001). Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 345(12), 851-860. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011303>
- Li, J., & Wang, D. H. (2006). Differential mechanisms mediating depressor and diuretic effects of anandamide. *Journal of Hypertension*, 24(11), 2271-2276. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000249706.42230.a8>
- Lin, S.-L., Kisseleva, T., Brenner, D. A., & Duffield, J. S. (2008). Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *The American Journal of Pathology*, 173(6), 1617-1627. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080433>
- Linkermann, A., Chen, G., Dong, G., Kunzendorf, U., Krautwald, S., & Dong, Z. (2014). Regulated cell death in AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(12), 2689-2701. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014030262>
- Lipina, C., Irving, A. J., & Hundal, H. S. (2014). Mitochondria : A possible nexus for the regulation of energy homeostasis by the endocannabinoid system? *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 307(1), E1-13. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00100.2014>
- Liu, J., Li, Q. X., Wang, X. J., Zhang, C., Duan, Y. Q., Wang, Z. Y., Zhang, Y., Yu, X., Li, N. J., Sun, J. P., & Yi, F. (2016). β -Arrestins promote podocyte injury by inhibition of autophagy in diabetic nephropathy. *Cell Death & Disease*, 7, e2183. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.89>
- Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Osei-Hyiaman, D., Razdan, R., Gong, Q., Chan, A. C., Zhou, Z., Huang, B. X., Kim, H.-Y., & Kunos, G. (2006). A biosynthetic pathway for anandamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(36), 13345-13350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601832103>
- Liu, M., Liang, Y., Chigurupati, S., Lathia, J. D., Pletnikov, M., Sun, Z., Crow, M., Ross, C. A., Mattson, M. P., & Rabb, H. (2008). Acute kidney injury leads to inflammation and functional changes in the brain. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(7), 1360-1370. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007080901>
- Liu, Z., Iyer, M. R., Godlewski, G., Jourdan, T., Liu, J., Coffey, N. J., Zawatsky, C. N., Puhl, H. L., Wess, J., Meister, J., Liow, J.-S., Innis, R. B., Hassan, S. A., Lee, Y. S., Kunos, G., & Cinar, R. (2021). Functional Selectivity of a Biased Cannabinoid-1 Receptor (CB1R) Antagonist. *ACS Pharmacology & Translational Science*. <https://doi.org/10.1021/acspsci.1c00048>

- Long, J. Z., LaCava, M., Jin, X., & Cravatt, B. F. (2011). An anatomical and temporal portrait of physiological substrates for fatty acid amide hydrolase. *Journal of Lipid Research*, 52(2), 337-344. <https://doi.org/10.1194/jlr.M012153>
- López-De León, A., & Rojkind, M. (1985). A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33(8), 737-743. <https://doi.org/10.1177/33.8.2410480>
- López-Hernández, F. J., & López-Novoa, J. M. (2012). Role of TGF- β in chronic kidney disease: An integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell and Tissue Research*, 347(1), 141-154. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1275-6>
- Ma, L.-J., & Fogo, A. B. (2003). Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: Importance of genetic background. *Kidney International*, 64(1), 350-355. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00058.x>
- Malek, M. (2018). Brain consequences of acute kidney injury: Focusing on the hippocampus. *Kidney Research and Clinical Practice*, 37(4), 315-322. <https://doi.org/10.23876/j.krcp.18.0056>
- Malinowska, B., Baranowska-Kuczko, M., & Schlicker, E. (2012). Triphasic blood pressure responses to cannabinoids: Do we understand the mechanism? *British Journal of Pharmacology*, 165(7), 2073-2088. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01747.x>
- Maluf, D. G., Dumur, C. I., Suh, J. L., Lee, J. K., Cathro, H. P., King, A. L., Gallon, L., Brayman, K. L., & Mas, V. R. (2014). Evaluation of molecular profiles in calcineurin inhibitor toxicity post-kidney transplant: Input to chronic allograft dysfunction. *American Journal of Transplantation*, 14(5), 1152-1163. <https://doi.org/10.1111/ajt.12696>
- Manabe, N., Chevallier, M., Chossegros, P., Causse, X., Guerret, S., Trépo, C., & Grimaud, J. A. (1993). Interferon-alpha 2b therapy reduces liver fibrosis in chronic non-A, non-B hepatitis: A quantitative histological evaluation. *Hepatology*, 18(6), 1344-1349.
- Marcussen, N., Olsen, T. S., Benediktsson, H., Racusen, L., & Solez, K. (1995). Reproducibility of the Banff classification of renal allograft pathology. Inter- and intraobserver variation. *Transplantation*, 60(10), 1083-1089.
- Marks, J., Carvou, N. J. C., Debnam, E. S., Srani, S. K., & Unwin, R. J. (2003). Diabetes increases facilitative glucose uptake and GLUT2 expression at the rat proximal tubule brush border membrane. *The Journal of Physiology*, 553(Pt 1), 137-145. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046268>
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), 561-564. <https://doi.org/10.1038/346561a0>
- Matsui, K., Kamijo-Ikemorif, A., Sugaya, T., Yasuda, T., & Kimura, K. (2011). Renal liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) attenuates acute kidney injury in aristolochic acid nephrotoxicity. *The American Journal of Pathology*, 178(3), 1021-1032. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.002>
- McClelland, A. D., Herman-Edelstein, M., Komers, R., Jha, J. C., Winbanks, C. E., Hagiwara, S., Gregorevic, P., Kantharidis, P., & Cooper, M. E. (2015). MiR-21 promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by targeting PTEN and SMAD7. *Clinical Science*, 129(12), 1237-1249. <https://doi.org/10.1042/CS20150427>

- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., & Compton, D. R. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, *50*(1), 83-90.
- Meng, X.-M., Nikolic-Paterson, D. J., & Lan, H. Y. (2016). TGF- β : The master regulator of fibrosis. *Nature Reviews. Nephrology*, *12*(6), 325-338. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48>
- Mesnard, L., Keller, A. D. C., Michel, M.-L., Vandermeersch, S., Rafat, C., Letavernier, E., Tillet, Y., Rondeau, E., & Leite-de-Moraes, M. C. (2009). Invariant Natural Killer T Cells and TGF- Attenuate Anti-GBM Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, *20*(6), 1282-1292. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008040433>
- Misseri, R., Rink, R. C., Meldrum, D. R., & Meldrum, K. K. (2004). Inflammatory mediators and growth factors in obstructive renal injury. *Journal of Surgical Research*, *119*(2), 149-159. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.02.016>
- Moon, J.-A., Kim, H.-T., Cho, I.-S., Sheen, Y. Y., & Kim, D.-K. (2006). IN-1130, a novel transforming growth factor-beta type I receptor kinase (ALK5) inhibitor, suppresses renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney International*, *70*(7), 1234-1243. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001775>
- Moragas, A., Allende, H., Sans, M., Vidal, M. T., García-Bonafé, M., & Huguet, P. (1992). Cirrhotic changes in livers from children undergoing transplantation. Image analysis. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, *14*(5), 359-366.
- Morsy, M. A., & Heeba, G. H. (2016). Nebivolol Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *118*(6), 449-455. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12538>
- Mukhopadhyay, P., Pan, H., Rajesh, M., Bátkai, S., Patel, V., Harvey-White, J., Mukhopadhyay, B., Haskó, G., Gao, B., Mackie, K., & Pacher, P. (2010). CB1 cannabinoid receptors promote oxidative/nitrosative stress, inflammation and cell death in a murine nephropathy model. *British Journal of Pharmacology*, *160*(3), 657-668. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00769.x>
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, *365*(6441), 61-65. <https://doi.org/10.1038/365061a0>
- Nam, D. H., Lee, M. H., Kim, J. E., Song, H. K., Kang, Y. S., Lee, J. E., Kim, H. W., Cha, J. J., Hyun, Y. Y., Kim, S. H., Han, S. Y., Han, K. H., Han, J. Y., & Cha, D. R. (2012). Blockade of Cannabinoid Receptor 1 Improves Insulin Resistance, Lipid Metabolism, and Diabetic Nephropathy in db/db Mice. *Endocrinology*, *153*(3), 1387-1396. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1423>
- Natarajan, V., Schmid, P. C., Reddy, P. V., Zuzarte-Augustin, M. L., & Schmid, H. H. (1983). Biosynthesis of N-acylethanolamine phospholipids by dog brain preparations. *Journal of Neurochemistry*, *41*(5), 1303-1312. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1983.tb00825.x>
- Neal, B., Perkovic, V., Mahaffey, K. W., de Zeeuw, D., Fulcher, G., Erond, N., Shaw, W., Law, G., Desai, M., Matthews, D. R., & CANVAS Program Collaborative Group. (2017). Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *The New England Journal of Medicine*, *377*(7), 644-657. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611925>

- Niedermeier, M., Reich, B., Gomez, M. R., Denzel, A., Schmidbauer, K., Göbel, N., Talke, Y., Schweda, F., & MACK, M. (2009). CD4⁺ T cells control the differentiation of Gr1⁺ monocytes into fibrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(42), 17892-17897. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906070106>
- Nishimura, A., Sunggip, C., Tozaki-Saitoh, H., Shimauchi, T., Numaga-Tomita, T., Hirano, K., Ide, T., Boeynaems, J.-M., Kurose, H., Tsuda, M., Robaye, B., Inoue, K., & Nishida, M. (2016). Purinergic P2Y6 receptors heterodimerize with angiotensin AT1 receptors to promote angiotensin II-induced hypertension. *Science Signaling*, *9*(411), ra7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aac9187>
- Nissen, S. E., Nicholls, S. J., Wolski, K., Rodés-Cabau, J., Cannon, C. P., Deanfield, J. E., Després, J.-P., Kastelein, J. J. P., Steinhubl, S. R., Kapadia, S., Yasin, M., Ruzyllo, W., Gaudin, C., Job, B., Hu, B., Bhatt, D. L., Lincoff, A. M., Tuzcu, E. M., & STRADIVARIUS Investigators. (2008). Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: The STRADIVARIUS randomized controlled trial. *JAMA*, *299*(13), 1547-1560. <https://doi.org/10.1001/jama.299.13.1547>
- Nogueira, A., Pires, M. J., & Oliveira, P. A. (2017). Pathophysiological Mechanisms of Renal Fibrosis: A Review of Animal Models and Therapeutic Strategies. *In Vivo*, *31*(1), 1-22. <https://doi.org/10.21873/invivo.11019>
- Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., & Ueda, N. (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(7), 5298-5305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306642200>
- O'Keefe, L., Simcocks, A. C., Hryciw, D. H., Mathai, M. L., & McAinch, A. J. (2014). The cannabinoid receptor 1 and its role in influencing peripheral metabolism. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, *16*(4), 294-304. <https://doi.org/10.1111/dom.12144>
- Ortiz, A., Lorz, C., González-Cuadrado, S., Garcia del Moral, R., O'Valle, F., & Egido, J. (1997). Cytokines and Fas regulate apoptosis in murine renal interstitial fibroblasts. *Journal of the American Society of Nephrology*, *8*(12), 1845-1854. <https://doi.org/10.1681/ASN.V8121845>
- Østergaard, M. V., Pinto, V., Stevenson, K., Worm, J., Fink, L. N., & Coward, R. J. M. (2017). DBA2J db/db mice are susceptible to early albuminuria and glomerulosclerosis that correlate with systemic insulin resistance. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *312*(2), F312-F321. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00451.2016>
- O'Sullivan, S. E., Kendall, D. A., & Randall, M. D. (2005a). Vascular effects of delta 9-tetrahydrocannabinol (THC), anandamide and N-arachidonoyldopamine (NADA) in the rat isolated aorta. *European Journal of Pharmacology*, *507*(1-3), 211-221. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.11.056>
- O'Sullivan, S. E., Kendall, D. A., & Randall, M. D. (2005b). The effects of Delta9-tetrahydrocannabinol in rat mesenteric vasculature, and its interactions with the endocannabinoid anandamide. *British Journal of Pharmacology*, *145*(4), 514-526. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706218>
- Ozbek, E., Ilbey, Y. O., Ozbek, M., Simsek, A., Cekmen, M., & Somay, A. (2009). Melatonin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal injury by reducing oxidative stress, iNOS, MAPK, and NF-κB expression. *Journal of Endourology*, *23*(7), 1165-1173. <https://doi.org/10.1089/end.2009.0035>

- Ozcan, A., Ware, K., Calomeni, E., Nadasdy, T., Forbes, R., Satoskar, A. A., Nadasdy, G., Rovin, B. H., Hebert, L. A., & Brodsky, S. V. (2012). 5/6 nephrectomy as a validated rat model mimicking human warfarin-related nephropathy. *American Journal of Nephrology*, 35(4), 356-364. <https://doi.org/10.1159/000337918>
- Pacher, P., Bátkai, S., & Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 389-462. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.2>
- Pan, X., Chen, Z., Huang, R., Yao, Y., & Ma, G. (2013). Transforming growth factor β 1 induces the expression of collagen type I by DNA methylation in cardiac fibroblasts. *PLoS One*, 8(4), e60335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060335>
- Pape, L., Henne, T., Offner, G., Strehlau, J., Ehrich, J. H. H., Mengel, M., & Grimm, P. C. (2003). Computer-assisted quantification of fibrosis in chronic allograft nephropathy by picosirius red-staining: A new tool for predicting long-term graft function. *Transplantation*, 76(6), 955-958. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000078899.62040.E5>
- Paronis, C. A., Thakur, G. A., Bajaj, S., Nikas, S. P., Vemuri, V. K., Makriyannis, A., & Bergman, J. (2013). Diuretic effects of cannabinoids. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 344(1), 8-14. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.199331>
- Pascual, J., Pérez-Sáez, M. J., Mir, M., & Crespo, M. (2012). Chronic renal allograft injury: Early detection, accurate diagnosis and management. *Transplantation Reviews*, 26(4), 280-290. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2012.07.002>
- Patsenker, E., Stoll, M., Millonig, G., Agaimy, A., Wissniowski, T., Schneider, V., Mueller, S., Brenneisen, R., Seitz, H. K., Ocker, M., & Stickel, F. (2011). Cannabinoid receptor type I modulates alcohol-induced liver fibrosis. *Molecular medicine*, 17(11-12), 1285-1294. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00149>
- Pegorini, S., Zani, A., Braida, D., Guerini-Rocco, C., & Sala, M. (2006). Vanilloid VR1 receptor is involved in rimonabant-induced neuroprotection. *British Journal of Pharmacology*, 147(5), 552-559. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706656>
- Perkovic, V., Jardine, M. J., Neal, B., Bompoint, S., Heerspink, H. J. L., Charytan, D. M., Edwards, R., Agarwal, R., Bakris, G., Bull, S., Cannon, C. P., Capuano, G., Chu, P.-L., de Zeeuw, D., Greene, T., Levin, A., Pollock, C., Wheeler, D. C., Yavin, Y., ... CREDENCE Trial Investigators. (2019). Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *The New England Journal of Medicine*, 380(24), 2295-2306. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1811744>
- Pertwee, R. G., Howlett, A. C., Abood, M. E., Alexander, S. P. H., Marzo, V. D., Elphick, M. R., Greasley, P. J., Hansen, H. S., Kunos, G., Mackie, K., Mechoulam, R., & Ross, R. A. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacological Reviews*, 62(4), 588-631. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003004>
- Phua, Y. L., Martel, N., Pennisi, D. J., Little, M. H., & Wilkinson, L. (2013). Distinct sites of renal fibrosis in Crim1 mutant mice arise from multiple cellular origins. *The Journal of Pathology*, 229(5), 685-696. <https://doi.org/10.1002/path.4155>
- Piek, E., Ju, W. J., Heyer, J., Escalante-Alcalde, D., Stewart, C. L., Weinstein, M., Deng, C., Kucherlapati, R., Bottinger, E. P., & Roberts, A. B. (2001). Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts.

- The Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 19945-19953.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M102382200>
- Pi-Sunyer, F. X., Aronne, L. J., Heshmati, H. M., Devin, J., Rosenstock, J., & RIO-North America Study Group. (2006). Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients : RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA*, 295(7), 761-775.
<https://doi.org/10.1001/jama.295.7.761>
- Quack, I., Rump, L. C., Gerke, P., Walther, I., Vinke, T., Vonend, O., Grunwald, T., & Sellin, L. (2006). Beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(38), 14110-14115. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602587103>
- Quack, I., Woznowski, M., Potthoff, S. A., Palmer, R., Königshausen, E., Sivritas, S., Schiffer, M., Stegbauer, J., Vonend, O., Rump, L. C., & Sellin, L. (2011). PKC alpha mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 12959-12970.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.204024>
- Racusen, L. C., & Regele, H. (2010). The pathology of chronic allograft dysfunction. *Kidney International. Supplement*, 119, S27-32. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.419>
- Rahmoune, H., Thompson, P. W., Ward, J. M., Smith, C. D., Hong, G., & Brown, J. (2005). Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes*, 54(12), 3427-3434.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.54.12.3427>
- Ratliff, B. B., Rabadi, M. M., Vasko, R., Yasuda, K., & Goligorsky, M. S. (2013). Messengers without borders : Mediators of systemic inflammatory response in AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(4), 529-536.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2012060633>
- Reich, B., Schmidbauer, K., Rodriguez Gomez, M., Johannes Hermann, F., Göbel, N., Brühl, H., Ketelsen, I., Talke, Y., & Mack, M. (2013). Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model. *Kidney International*, 84(1), 78-89.
<https://doi.org/10.1038/ki.2013.84>
- Reilkoff, R. A., Bucala, R., & Herzog, E. L. (2011). Fibrocytes : Emerging effector cells in chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 11(6), 427-435.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Néliat, G., & Caput, D. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Letters*, 350(2-3), 240-244.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00773-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00773-x)
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Millan, J., Derocq, J. M., Casellas, P., Congy, C., Oustric, D., Sarran, M., Bouaboula, M., Calandra, B., Portier, M., Shire, D., Brelière, J. C., & Le Fur, G. L. (1998). SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284(2), 644-650.
- Risdon, R. A., Sloper, J. C., & De Wardener, H. E. (1968). Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet*, 2(7564), 363-366. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(68\)90589-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(68)90589-8)

- Ritter, J. K., Ahmad, A., Mummalaneni, S., Daneva, Z., Dempsey, S. K., Li, N., Li, P.-L., & Lyall, V. (2021). Mechanism of Diuresis and Natriuresis by Cannabinoids : Evidence for Inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase in Mouse Kidney Thick Ascending Limb Tubules. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 376(1), 1-11. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000163>
- Ritter, J. K., Li, C., Xia, M., Poklis, J. L., Lichtman, A. H., Abdullah, R. A., Dewey, W. L., & Li, P.-L. (2012). Production and actions of the anandamide metabolite prostamide E2 in the renal medulla. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342(3), 770-779. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.196451>
- Ritter, J. K., Li, G., Xia, M., & Boini, K. (2016). Anandamide and its metabolites : What are their roles in the kidney? *Frontiers in Bioscience*, 8, 264-277. <https://doi.org/10.2741/s461>
- Robertson, I. B., Horiguchi, M., Zilberberg, L., Dabovic, B., Hadjiolova, K., & Rifkin, D. B. (2015). Latent TGF- β -binding proteins. *Matrix Biology*, 47, 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.05.005>
- Roger, C., Buch, C., Muller, T., Leemput, J., Demizieux, L., Passilly-Degrace, P., Cinar, R., Iyer, M. R., Kunos, G., Vergès, B., Degrace, P., & Jourdan, T. (2020). Simultaneous Inhibition of Peripheral CB1R and iNOS Mitigates Obesity-Related Dyslipidemia Through Distinct Mechanisms. *Diabetes*, 69(10), 2120-2132. <https://doi.org/10.2337/db20-0078>
- Rosenstock, J., Hollander, P., Chevalier, S., Iranmanesh, A., & SERENADE Study Group. (2008). SERENADE : The Study Evaluating Rimonabant Efficacy in Drug-naive Diabetic Patients: effects of monotherapy with rimonabant, the first selective CB1 receptor antagonist, on glycemic control, body weight, and lipid profile in drug-naive type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 31(11), 2169-2176. <https://doi.org/10.2337/dc08-0386>
- Roufosse, C., Simmonds, N., Groningen, M. C., Haas, M., Henriksen, K. J., Horsfield, C., Loupy, A., Mengel, M., Perkowska-Ptasińska, A., Rabant, M., Racusen, L. C., Solez, K., & Becker, J. U. (2018). A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation*. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002366>
- Rowshani, A. T., Scholten, E. M., Bemelman, F., Eikmans, M., Idu, M., Roos-van Groningen, M. C., van Groningen, M. C. R., Surachno, J. S., Mallat, M. J. K., Paul, L. C., de Fijter, J. W., Bajema, I. M., ten Berge, I., & Florquin, S. (2006). No difference in degree of interstitial Sirius red-stained area in serial biopsies from area under concentration-over-time curves-guided cyclosporine versus tacrolimus-treated renal transplant recipients at one year. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(1), 305-312. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005030249>
- Rozenfeld, R., Gupta, A., Gagnidze, K., Lim, M. P., Gomes, I., Lee-Ramos, D., Nieto, N., & Devi, L. A. (2011). AT1R-CB₁R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *The EMBO Journal*, 30(12), 2350-2363. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.139>
- Rudnicki, M., Beckers, A., Neuwirt, H., & Vandesompele, J. (2015). RNA expression signatures and posttranscriptional regulation in diabetic nephropathy. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 30 Suppl 4, iv35-42. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv079>
- Ruiz-Ortega, M., Rayego-Mateos, S., Lamas, S., Ortiz, A., & Rodrigues-Diez, R. R. (2020). Targeting the progression of chronic kidney disease. *Nature Reviews. Nephrology*, 16(5), 269-288. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0248-y>

- Russo, L. M., del Re, E., Brown, D., & Lin, H. Y. (2007). Evidence for a role of transforming growth factor (TGF)-beta1 in the induction of postglomerular albuminuria in diabetic nephropathy : Amelioration by soluble TGF-beta type II receptor. *Diabetes*, *56*(2), 380-388. <https://doi.org/10.2337/db06-1018>
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.-O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., & Greasley, P. J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*, *152*(7), 1092-1101. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460>
- Sainz-Cort, A., & Heeroma, J. H. (2020). The interaction between the endocannabinoid system and the renin angiotensin system and its potential implication for COVID-19 infection. *Journal of Cannabis Research*, *2*(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s42238-020-00030-4>
- Sampaio, L. S., Iannotti, F. A., Veneziani, L., Borelli-Tôrres, R. T., De Maio, F., Piscitelli, F., Reis, R. A. M., Di Marzo, V., & Einicker-Lamas, M. (2018). Experimental ischemia/reperfusion model impairs endocannabinoid signaling and Na⁺/K⁺ ATPase expression and activity in kidney proximal tubule cells. *Biochemical Pharmacology*, *154*, 482-491. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.06.005>
- Sampaio, L. S., Taveira Da Silva, R., Lima, D., Sampaio, C. L. C., Iannotti, F. A., Mazzarella, E., Di Marzo, V., Vieyra, A., Reis, R. a. M., & Einicker-Lamas, M. (2015). The endocannabinoid system in renal cells : Regulation of Na⁽⁺⁾ transport by CB1 receptors through distinct cell signalling pathways. *British Journal of Pharmacology*, *172*(19), 4615-4625. <https://doi.org/10.1111/bph.13050>
- Sancho-Martínez, S. M., López-Novoa, J. M., & López-Hernández, F. J. (2015). Pathophysiological role of different tubular epithelial cell death modes in acute kidney injury. *Clinical Kidney Journal*, *8*(5), 548-559. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfv069>
- Sanderson, N., Factor, V., Nagy, P., Kopp, J., Kondaiah, P., Wakefield, L., Roberts, A. B., Sporn, M. B., & Thorgeirsson, S. S. (1995). Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(7), 2572-2576. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2572>
- Sanz, A. B., Santamaría, B., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., & Ortiz, A. (2008). Mechanisms of renal apoptosis in health and disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, *19*(9), 1634-1642. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007121336>
- Sarott, R. C., Westphal, M. V., Pfaff, P., Korn, C., Sykes, D. A., Gazzi, T., Brennecke, B., Atz, K., Weise, M., Mostinski, Y., Hompluem, P., Koers, E., Miljuš, T., Roth, N. J., Asmelash, H., Vong, M. C., Piovesan, J., Guba, W., Rufer, A. C., ... Carreira, E. M. (2020). Development of High-Specificity Fluorescent Probes to Enable Cannabinoid Type 2 Receptor Studies in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society*, *142*(40), 16953-16964. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c05587>
- Scarfe, L., Menshikh, A., Newton, E., Zhu, Y., Delgado, R., Finney, C., & de Caestecker, M. P. (2019). Long-term outcomes in mouse models of ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *American Journal of Physiology*, *317*(4), F1068-F1080. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00305.2019>
- Scarfe, L., Schock-Kusch, D., Ressel, L., Friedemann, J., Shulhevich, Y., Murray, P., Wilm, B., & de Caestecker, M. (2018). Transdermal Measurement of Glomerular Filtration Rate in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, *140*. <https://doi.org/10.3791/58520>

- Schaich, C. L., Shaltout, H. A., Brosnihan, K. B., Howlett, A. C., & Diz, D. I. (2014). Acute and chronic systemic CB1 cannabinoid receptor blockade improves blood pressure regulation and metabolic profile in hypertensive (mRen2)²⁷ rats. *Physiological Reports*, 2(8), e12108. <https://doi.org/10.14814/phy2.12108>
- Schainuck, L. I., Striker, G. E., Cutler, R. E., & Benditt, E. P. (1970). Structural-functional correlations in renal disease. II. The correlations. *Human Pathology*, 1(4), 631-641. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(70\)80061-2](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(70)80061-2)
- Schrankl, J., Fuchs, M., Broecker, K., Daniel, C., Kurtz, A., & Wagner, C. (2021). Localization of angiotensin II type 1 receptor gene expression in rodent and human kidneys. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 320(4), F644-F653. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00550.2020>
- Schreiber, A., Shulhevich, Y., Geraci, S., Hesser, J., Stsepankou, D., Neudecker, S., Koenig, S., Heinrich, R., Hoecklin, F., Pill, J., Friedemann, J., Schweda, F., Gretz, N., & Schock-Kusch, D. (2012). Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 303(5), F783-788. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00279.2012>
- Seagard, J. L., Dean, C., Patel, S., Rademacher, D. J., Hopp, F. A., Schmeling, W. T., & Hillard, C. J. (2004). Anandamide content and interaction of endocannabinoid/GABA modulatory effects in the NTS on baroreflex-evoked sympathoinhibition. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 286(3), H992-1000. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00870.2003>
- Serón, D., Moreso, F., Fulladosa, X., Hueso, M., Carrera, M., & Grinyó, J. M. (2002). Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies. *Kidney International*, 61(2), 727-733. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00174.x>
- Servais, A., Meas-Yedid, V., Buchler, M., Morelon, E., Olivo-Marin, J.-C., Lebranchu, Y., Legendre, C., & Thervet, E. (2007). Quantification of interstitial fibrosis by image analysis on routine renal biopsy in patients receiving cyclosporine. *Transplantation*, 84(12), 1595-1601. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000295749.50525.bd>
- Servais, A., Meas-Yedid, V., Noël, L. H., Martinez, F., Panterne, C., Kreis, H., Zuber, J., Timsit, M. O., Legendre, C., Olivo-Marin, J. C., & Thervet, E. (2011). Interstitial fibrosis evolution on early sequential screening renal allograft biopsies using quantitative image analysis. *American Journal of Transplantation*, 11(7), 1456-1463. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03594.x>
- Servettaz, A., Kavian, N., Nicco, C., Deveaux, V., Chéreau, C., Wang, A., Zimmer, A., Lotersztajn, S., Weill, B., & Batteux, F. (2010). Targeting the cannabinoid pathway limits the development of fibrosis and autoimmunity in a mouse model of systemic sclerosis. *The American journal of pathology*, 177(1), 187-196.
- Sharfuddin, A. A., & Molitoris, B. A. (2011). Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews. Nephrology*, 7(4), 189-200. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.16>
- Shire, D., Carillon, C., Kaghad, M., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Caput, D., & Ferrara, P. (1995). An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(8), 3726-3731. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.8.3726>

- Showalter, V. M., Compton, D. R., Martin, B. R., & Abood, M. E. (1996). Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): Identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 278(3), 989-999.
- Silva, G. B., Atchison, D. K., Juncos, L. I., & García, N. H. (2013). Anandamide inhibits transport-related oxygen consumption in the loop of Henle by activating CB1 receptors. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 304(4), F376-381. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00239.2012>
- Simon, G. M., & Cravatt, B. F. (2006). Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26465-26472. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604660200>
- Simon, N., & Hertig, A. (2015). Alteration of Fatty Acid Oxidation in Tubular Epithelial Cells: From Acute Kidney Injury to Renal Fibrogenesis. *Frontiers in Medicine*, 2, 52. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00052>
- Siqueira, S. W., Lapa, A. J., & Ribeiro do Valle, J. (1979). The triple effect induced by delta 9-tetrahydrocannabinol on the rat blood pressure. *European Journal of Pharmacology*, 58(4), 351-357. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(79\)90305-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(79)90305-4)
- Slavic, S., Lauer, D., Sommerfeld, M., Kemnitz, U. R., Grzesiak, A., Trappiel, M., Thöne-Reineke, C., Baulmann, J., Paulis, L., Kappert, K., Kintscher, U., Unger, T., & Kaschina, E. (2013). Cannabinoid receptor 1 inhibition improves cardiac function and remodelling after myocardial infarction and in experimental metabolic syndrome. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 91(7), 811-823. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1034-0>
- Snider, N. T., Kornilov, A. M., Kent, U. M., & Hollenberg, P. F. (2007). Anandamide metabolism by human liver and kidney microsomal cytochrome p450 enzymes to form hydroxyeicosatetraenoic and epoxyeicosatrienoic acid ethanolamides. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321(2), 590-597. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.119321>
- Soethoudt, M., Grether, U., Fingerle, J., Grim, T. W., Fezza, F., de Petrocellis, L., Ullmer, C., Rothenhäusler, B., Perret, C., van Gils, N., Finlay, D., MacDonald, C., Chicca, A., Gens, M. D., Stuart, J., de Vries, H., Mastrangelo, N., Xia, L., Alachouzos, G., ... van der Stelt, M. (2017). Cannabinoid CB2 receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. *Nature Communications*, 8, 13958. <https://doi.org/10.1038/ncomms13958>
- Sofia, R. D., Knobloch, L. C., Harakal, J. J., & Erikson, D. J. (1977). Comparative diuretic activity of delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol, cannabinol and hydrochlorothiazide in the rat. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie*, 225(1), 77-87.
- Soofi, A., Zhang, P., & Dressler, G. R. (2013). Kielin/chordin-like protein attenuates both acute and chronic renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(6), 897-905. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012070759>
- Soya, A., Serino, R., Fujihara, H., Onaka, T., Ozaki, Y., Saito, T., Nakamura, J., & Ueta, Y. (2005). Cannabinoids modulate synaptic activity in the rat supraoptic nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, 17(9), 609-615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2005.01350.x>

- Sridar, C., Snider, N. T., & Hollenberg, P. F. (2011). Anandamide oxidation by wild-type and polymorphically expressed CYP2B6 and CYP2D6. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 39(5), 782-788. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.036707>
- Stegall, M. D., Cornell, L. D., Park, W. D., Smith, B. H., & Cosio, F. G. (2017). Renal Allograft Histology at 10 Years After Transplantation in the Tacrolimus Era: Evidence of Pervasive Chronic Injury. *American Journal of Transplantation*. <https://doi.org/10.1111/ajt.14431>
- Street, J. M., Souza, A. C. P., Alvarez-Prats, A., Horino, T., Hu, X., Yuen, P. S. T., & Star, R. A. (2014). Automated quantification of renal fibrosis with Sirius Red and polarization contrast microscopy. *Physiological Reports*, 2(7). <https://doi.org/10.14814/phy2.12088>
- Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S., & Gokoh, M. (2006). Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Progress in Lipid Research*, 45(5), 405-446. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.03.003>
- Sugiura, T., Kobayashi, Y., Oka, S., & Waku, K. (2002). Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 66(2-3), 173-192. <https://doi.org/10.1054/plef.2001.0356>
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., & Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 215(1), 89-97. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2437>
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Tonegawa, T., Nakane, S., Yamashita, A., & Waku, K. (1996). Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: Involvement of Ca(2+)-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218(1), 113-117. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0020>
- Sun, Y.-X., Tsuboi, K., Okamoto, Y., Tonai, T., Murakami, M., Kudo, I., & Ueda, N. (2004). Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *The Biochemical Journal*, 380(Pt 3), 749-756. <https://doi.org/10.1042/BJ20040031>
- Sund, S., Grimm, P., Reisaeter, A. V., & Hovig, T. (2004). Computerized image analysis vs semiquantitative scoring in evaluation of kidney allograft fibrosis and prognosis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 19(11), 2838-2845. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh490>
- Szczyпка, M. S., Westover, A. J., Clouthier, S. G., Ferrara, J. L. M., & Humes, H. D. (2005). Rare incorporation of bone marrow-derived cells into kidney after folic acid-induced injury. *Stem Cells*, 23(1), 44-54. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0111>
- Szekeres, M., Nádas, G. L., Soltész-Katona, E., & Hunyady, L. (2018). Control of myogenic tone and agonist induced contraction of intramural coronary resistance arterioles by cannabinoid type 1 receptors and endocannabinoids. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 134, 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2017.10.001>

- Szekeres, M., Nádasy, G. L., Turu, G., Soltész-Katona, E., Benyó, Z., Offermanns, S., Ruisanchez, É., Szabó, E., Takáts, Z., Bátkai, S., Tóth, Z. E., & Hunyady, L. (2015). Endocannabinoid-mediated modulation of Gq/11 protein-coupled receptor signaling-induced vasoconstriction and hypertension. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *403*, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.012>
- Szekeres, M., Nádasy, G. L., Turu, G., Soltész-Katona, E., Tóth, Z. E., Balla, A., Catt, K. J., & Hunyady, L. (2012). Angiotensin II induces vascular endocannabinoid release, which attenuates its vasoconstrictor effect via CB1 cannabinoid receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(37), 31540-31550. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.346296>
- Tam, J. (2016). The emerging role of the endocannabinoid system in the pathogenesis and treatment of kidney diseases. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, *27*(3), 267-276. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0055>
- Tam, J., Cinar, R., Liu, J., Godlewski, G., Wesley, D., Jourdan, T., Szanda, G., Mukhopadhyay, B., Chedester, L., Liow, J.-S., Innis, R. B., Cheng, K., Rice, K. C., Deschamps, J. R., Chorvat, R. J., McElroy, J. F., & Kunos, G. (2012). Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing leptin resistance. *Cell Metabolism*, *16*(2), 167-179. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.002>
- Tam, J., Vemuri, V. K., Liu, J., Bátkai, S., Mukhopadhyay, B., Godlewski, G., Osei-Hyiaman, D., Ohnuma, S., Ambudkar, S. V., Pickel, J., Makriyannis, A., & Kunos, G. (2010). Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(8), 2953-2966. <https://doi.org/10.1172/JCI42551>
- Tampe, B., Tampe, D., Müller, C. A., Sugimoto, H., LeBleu, V., Xu, X., Müller, G. A., Zeisberg, E. M., Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2014). Tet3-mediated hydroxymethylation of epigenetically silenced genes contributes to bone morphogenic protein 7-induced reversal of kidney fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, *25*(5), 905-912. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013070723>
- Tantama, M., Martínez-François, J. R., Mongeon, R., & Yellen, G. (2013). Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio. *Nature Communications*, *4*, 2550. <https://doi.org/10.1038/ncomms3550>
- Tapia, E., Soto, V., Ortiz-Vega, K. M., Zarco-Márquez, G., Molina-Jijón, E., Cristóbal-García, M., Santamaría, J., García-Niño, W. R., Correa, F., Zazueta, C., & Pedraza-Chaverri, J. (2012). Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2012*, 269039. <https://doi.org/10.1155/2012/269039>
- Tedesco, L., Valerio, A., Dossena, M., Cardile, A., Ragni, M., Pagano, C., Pagotto, U., Carruba, M. O., Vettor, R., & Nisoli, E. (2010). Cannabinoid receptor stimulation impairs mitochondrial biogenesis in mouse white adipose tissue, muscle, and liver : The role of eNOS, p38 MAPK, and AMPK pathways. *Diabetes*, *59*(11), 2826-2836. <https://doi.org/10.2337/db09-1881>
- Teixeira-Clerc, F., Julien, B., Grenard, P., Tran Van Nhieu, J., Deveaux, V., Li, L., Serriere-Lanneau, V., Ledent, C., Mallat, A., & Lotersztajn, S. (2006). CB1 cannabinoid receptor antagonism : A new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nature Medicine*, *12*(6), 671-676. <https://doi.org/10.1038/nm1421>

- Thorens, B. (1996). Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *The American Journal of Physiology*, 270(4 Pt 1), G541-553. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1996.270.4.G541>
- Tiyerili, V., Zimmer, S., Jung, S., Wassmann, K., Naehle, C. P., Lütjohann, D., Zimmer, A., Nickenig, G., & Wassmann, S. (2010). CB1 receptor inhibition leads to decreased vascular AT1 receptor expression, inhibition of oxidative stress and improved endothelial function. *Basic Research in Cardiology*, 105(4), 465-477. <https://doi.org/10.1007/s00395-010-0090-7>
- Topol, E. J., Bousser, M.-G., Fox, K. A. A., Creager, M. A., Despres, J.-P., Easton, J. D., Hamm, C. W., Montalescot, G., Steg, P. G., Pearson, T. A., Cohen, E., Gaudin, C., Job, B., Murphy, J. H., Bhatt, D. L., & CRESCENDO Investigators. (2010). Rimonabant for prevention of cardiovascular events (CRESCENDO): A randomised, multicentre, placebo-controlled trial. *Lancet*, 376(9740), 517-523. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60935-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60935-X)
- Torlakovic, E. E., Francis, G., Garratt, J., Gilks, B., Hyjek, E., Ibrahim, M., Miller, R., Nielsen, S., Petcu, E. B., Swanson, P. E., Taylor, C. R., Vyberg, M., & International Ad Hoc Expert Panel. (2014). Standardization of negative controls in diagnostic immunohistochemistry: Recommendations from the international ad hoc expert panel. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 22(4), 241-252. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000069>
- Torlakovic, E. E., Nielsen, S., Francis, G., Garratt, J., Gilks, B., Goldsmith, J. D., Hornick, J. L., Hyjek, E., Ibrahim, M., Miller, K., Petcu, E., Swanson, P. E., Zhou, X., Taylor, C. R., & Vyberg, M. (2015). Standardization of positive controls in diagnostic immunohistochemistry: Recommendations from the International Ad Hoc Expert Committee. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 23(1), 1-18. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000163>
- Tóth, A. D., Turu, G., Hunyady, L., & Balla, A. (2018). Novel mechanisms of G-protein-coupled receptors functions: AT1 angiotensin receptor acts as a signaling hub and focal point of receptor cross-talk. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 32(2), 69-82. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.02.003>
- Toyama, T., Neuen, B. L., Jun, M., Ohkuma, T., Neal, B., Jardine, M. J., Heerspink, H. L., Wong, M. G., Ninomiya, T., Wada, T., & Perkovic, V. (2019). Effect of SGLT2 inhibitors on cardiovascular, renal and safety outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 21(5), 1237-1250. <https://doi.org/10.1111/dom.13648>
- Triay, J., Mundi, M., Klein, S., Toledo, F. G., Smith, S. R., Abu-Lebdeh, H., & Jensen, M. (2012). Does rimonabant independently affect free fatty acid and glucose metabolism? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(3), 819-827. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2486>
- Tsuboi, K., Okamoto, Y., Ikematsu, N., Inoue, M., Shimizu, Y., Uyama, T., Wang, J., Deutsch, D. G., Burns, M. P., Ulloa, N. M., Tokumura, A., & Ueda, N. (2011). Enzymatic formation of N-acylethanolamines from N-acylethanolamine plasmalogen through N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D-dependent and -independent pathways. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1811(10), 565-577. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.07.009>

- Tsuboi, K., Uyama, T., Okamoto, Y., & Ueda, N. (2018). Endocannabinoids and related N-acylethanolamines: Biological activities and metabolism. *Inflammation and Regeneration*, *38*. <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0086-5>
- Udi, S., Hinden, L., Ahmad, M., Drori, A., Iyer, M. R., Cinar, R., Herman-Edelstein, M., & Tam, J. (2020). Dual inhibition of cannabinoid CB1 receptor and inducible NOS attenuates obesity-induced chronic kidney disease. *British Journal of Pharmacology*, *177*(1), 110-127. <https://doi.org/10.1111/bph.14849>
- Udi, S., Hinden, L., Earley, B., Drori, A., Reuveni, N., Hadar, R., Cinar, R., Nemirovski, A., & Tam, J. (2017). Proximal Tubular Cannabinoid-1 Receptor Regulates Obesity-Induced CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, *28*(12), 3518-3532. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016101085>
- Valentijn, F. A., Falke, L. L., Nguyen, T. Q., & Goldschmeding, R. (2018). Cellular senescence in the aging and diseased kidney. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *12*(1), 69-82. <https://doi.org/10.1007/s12079-017-0434-2>
- Van Gaal, L. F., Rissanen, A. M., Scheen, A. J., Ziegler, O., Rössner, S., & RIO-Europe Study Group. (2005). Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*, *365*(9468), 1389-1397. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66374-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66374-X)
- Varga, K., Lake, K., Martin, B. R., & Kunos, G. (1995). Novel antagonist implicates the CB1 cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide. *European Journal of Pharmacology*, *278*(3), 279-283. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00181-j](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00181-j)
- Venner, J. M., Famulski, K. S., Reeve, J., Chang, J., & Halloran, P. F. (2016). Relationships among injury, fibrosis, and time in human kidney transplants. *JCI Insight*, *1*(1), e85323. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.85323>
- Vidrio, H., Sánchez-Salvatori, M. A., & Medina, M. (1996). Cardiovascular effects of (-)-11-OH-delta 8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *28*(2), 332-336. <https://doi.org/10.1097/00005344-199608000-00022>
- Vollmer, R. R., Cavero, I., Ertel, R. J., Solomon, T. A., & Buckley, J. P. (1974). Role of the central autonomic nervous system in the hypotension and bradycardia induced by (-)-delta 9-trans-tetrahydrocannabinol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *26*(3), 186-192. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1974.tb09252.x>
- Wagner, J. A., Abesser, M., Karcher, J., Laser, M., & Kunos, G. (2005). Coronary vasodilator effects of endogenous cannabinoids in vasopressin-precontracted unpaired rat isolated hearts. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *46*(3), 348-355. <https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000175437.87283.f2>
- Ware, K., Brodsky, P., Satoskar, A. A., Nadasdy, T., Nadasdy, G., Wu, H., Rovin, B. H., Bhatt, U., Von Visger, J., Hebert, L. A., & Brodsky, S. V. (2011). Warfarin-related nephropathy modeled by nephron reduction and excessive anticoagulation. *Journal of the American Society of Nephrology*, *22*(10), 1856-1862. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010101110>
- Wei, B. Q., Mikkelsen, T. S., McKinney, M. K., Lander, E. S., & Cravatt, B. F. (2006). A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(48), 36569-36578. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606646200>

- Wen, X., Peng, Z., Li, Y., Wang, H., Bishop, J. V., Chedwick, L. R., Singbartl, K., & Kellum, J. A. (2012). One dose of cyclosporine A is protective at initiation of folic acid-induced acute kidney injury in mice. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 27(8), 3100-3109. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr766>
- White, R., Ho, W. S., Bottrill, F. E., Ford, W. R., & Hiley, C. R. (2001). Mechanisms of anandamide-induced vasorelaxation in rat isolated coronary arteries. *British Journal of Pharmacology*, 134(4), 921-929. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704333>
- Wilson, H. M., Reid, F. J., Brown, P. A., Power, D. A., Haites, N. E., & Booth, N. A. (1993). Effect of transforming growth factor-beta 1 on plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in renal glomerular cells. *Experimental Nephrology*, 1(6), 343-350.
- Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society, Cattran, D. C., Coppo, R., Cook, H. T., Feehally, J., Roberts, I. S. D., Troyanov, S., Alpers, C. E., Amore, A., Barratt, J., Berthoux, F., Bonsib, S., Bruijn, J. A., D'Agati, V., D'Amico, G., Emancipator, S., Emma, F., Ferrario, F., Fervenza, F. C., ... Zhang, H. (2009). The Oxford classification of IgA nephropathy: Rationale, clinicopathological correlations, and classification. *Kidney International*, 76(5), 534-545. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.243>
- Wu, J., Liu, X., Fan, J., Chen, W., Wang, J., Zeng, Y., Feng, X., Yu, X., & Yang, X. (2014). Bardoxolone methyl (BARD) ameliorates aristolochic acid (AA)-induced acute kidney injury through Nrf2 pathway. *Toxicology*, 318, 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.01.008>
- Xiao, X., Tang, W., Yuan, Q., Peng, L., & Yu, P. (2015). Epigenetic repression of Krüppel-like factor 4 through Dnmt1 contributes to EMT in renal fibrosis. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(6), 1596-1602. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2189>
- Xu, Y., Ma, H., Shao, J., Wu, J., Zhou, L., Zhang, Z., Wang, Y., Huang, Z., Ren, J., Liu, S., Chen, X., & Han, J. (2015). A Role for Tubular Necroptosis in Cisplatin-Induced AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(11), 2647-2658. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014080741>
- Yang, B., Lan, S., Dieudé, M., Sabo-Vatasescu, J.-P., Karakeussian-Rimbaud, A., Turgeon, J., Qi, S., Gunaratnam, L., Patey, N., & Hébert, M.-J. (2018). Caspase-3 Is a Pivotal Regulator of Microvascular Rarefaction and Renal Fibrosis after Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(7), 1900-1916. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017050581>
- Yang, L., Besschetnova, T. Y., Brooks, C. R., Shah, J. V., & Bonventre, J. V. (2010). Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nature Medicine*, 16(5), 535-543, 1p following 143. <https://doi.org/10.1038/nm.2144>
- Yao, B. B., Mukherjee, S., Fan, Y., Garrison, T. R., Daza, A. V., Grayson, G. K., Hooker, B. A., Dart, M. J., Sullivan, J. P., & Meyer, M. D. (2006). In vitro pharmacological characterization of AM1241: A protean agonist at the cannabinoid CB2 receptor? *British Journal of Pharmacology*, 149(2), 145-154. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706838>
- Yuan, W., & Varga, J. (2001). Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38502-38510. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107081200>

- Zarjou, A., Yang, S., Abraham, E., Agarwal, A., & Liu, G. (2011). Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: Role of miR-21. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 301(4), F793-801. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00273.2011>
- Zeisberg, E. M., Potenta, S. E., Sugimoto, H., Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2008). Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(12), 2282-2287. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008050513>
- Zha, D., Cheng, H., Li, W., Wu, Y., Li, X., Zhang, L., Feng, Y.-H., & Wu, X. (2017). High glucose instigates tubulointerstitial injury by stimulating hetero-dimerization of adiponectin and angiotensin II receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(1), 840-846. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.047>
- Zhong, X., Chung, A. C. K., Chen, H. Y., Dong, Y., Meng, X. M., Li, R., Yang, W., Hou, F. F., & Lan, H. Y. (2013). MiR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 56(3), 663-674. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2804-x>
- Zhong, X., Chung, A. C. K., Chen, H.-Y., Meng, X.-M., & Lan, H. Y. (2011). Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(9), 1668-1681. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010111168>
- Zhou, L., Zhou, S., Yang, P., Tian, Y., Feng, Z., Xie, X.-Q., & Liu, Y. (2018). Targeted inhibition of the type 2 cannabinoid receptor is a novel approach to reduce renal fibrosis. *Kidney International*, 94(4), 756-772. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.05.023>
- Zhou, S., Wu, Q., Lin, X., Ling, X., Miao, J., Liu, X., Hu, C., Zhang, Y., Jia, N., Hou, F. F., Liu, Y., & Zhou, L. (2021). Cannabinoid receptor type 2 promotes kidney fibrosis through orchestrating β -catenin signaling. *Kidney International*, 99(2), 364-381. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.09.025>
- Ziegler, C. G., Mohn, C., Lamounier-Zepter, V., Rettori, V., Bornstein, S. R., Krug, A. W., & Ehrhart-Bornstein, M. (2010). Expression and function of endocannabinoid receptors in the human adrenal cortex. *Hormone and Metabolic Research*, 42(2), 88-92. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1241860>
- Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sørsgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., & Högestätt, E. D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400(6743), 452-457. <https://doi.org/10.1038/22761>

ANNEXE 1 - Dao M, François H. Cannabinoid Receptor 1 Inhibition in Chronic Kidney Disease: A New Therapeutic Toolbox. Front Endocrinol (Lausanne). 2021;12:720734.



Cannabinoid Receptor 1 Inhibition in Chronic Kidney Disease: A New Therapeutic Toolbox

Myriam Dao^{1,2} and Helene François^{1,3*}

¹INSERM UMR_S 1155, Hôpital Tenon, Sorbonne Université, Paris, France, ²AP-HP, Néphrologie et Transplantation Rénale Adulte, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France, ³AP-HP, Soins Intensifs Néphrologiques et Rein Aigu (SINRA), Hôpital Tenon, Sorbonne Université, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Tony Jourdan,
INSERM U1231 Lipides, Nutrition,
Cancer (LNC), France

Reviewed by:

Deanne Helena Hryciw,
Griffith University, Australia
Liad Hinden,
Hebrew University of Jerusalem, Israel

*Correspondence:

Helene François
helene.francois@aphp.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 04 June 2021

Accepted: 22 June 2021

Published: 07 July 2021

Citation:

Dao M and François H (2021)
Cannabinoid Receptor 1 Inhibition
in Chronic Kidney Disease:
A New Therapeutic Toolbox.
Front. Endocrinol. 12:720734.
doi: 10.3389/fendo.2021.720734

Chronic kidney disease (CKD) concerns millions of individuals worldwide, with few therapeutic strategies available to date. Recent evidence suggests that the endocannabinoid system (ECS) could be a new therapeutic target to prevent CKD. ECS combines receptors, cannabinoid receptor type 1 (CB1R) and type 2 (CB2R), and ligands. The most prominent receptor within the kidney is CB1R, its endogenous local ligands being anandamide and 2-arachidonoylglycerol. Therefore, the present review focuses on the therapeutic potential of CB1R and not CB2R. In the normal kidney, CB1R is expressed in many cell types, especially in the vasculature where it contributes to the regulation of renal hemodynamics. CB1R could also participate to water and sodium balance and to blood pressure regulation but its precise role remains to decipher. CB1R promotes renal fibrosis in both metabolic and non-metabolic nephropathies. In metabolic syndrome, obesity and diabetes, CB1R inhibition not only improves metabolic parameters, but also exerts a direct role in preventing renal fibrosis. In non-metabolic nephropathies, its inhibition reduces the development of renal fibrosis. There is a growing interest of the industry to develop new CB1R antagonists without central nervous side-effects. Experimental data on renal fibrosis are encouraging and some molecules are currently under early-stage clinical phases (phases I and IIa studies). In the present review, we will first describe the role of the endocannabinoid receptors, especially CB1R, in renal physiology. We will next explore the role of endocannabinoid receptors in both metabolic and non-metabolic CKD and renal fibrosis. Finally, we will discuss the therapeutic potential of CB1R inhibition using the new pharmacological approaches. Overall, the new pharmacological blockers of CB1R could provide an additional therapeutic toolbox in the management of CKD and renal fibrosis from both metabolic and non-metabolic origin.

Keywords: cannabinoid, cannabinoid receptor type 1, chronic kidney disease, endocannabinoids, renal fibrosis

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is an important problem worldwide and remains a burden for public health (1). CKD corresponds to the replacement of renal functional tissue by extracellular matrix proteins that progressively and irreversibly alter renal function, i.e. renal fibrogenesis. Although only 1% of people with CKD reach end-stage renal disease (ESRD), it remains the most expensive of chronic diseases and significantly reduces lifespan (1). To date, only the renin angiotensin system (RAS) blockade using either angiotensin converting enzyme inhibitors or angiotensin II receptor blockers has been shown to be effective in slowing the progression of CKD (2). Recently, new therapeutic classes have improved the management of diabetic nephropathy, which is the main cause of CKD and ESRD worldwide (3), particularly sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors (4–8) and glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) agonists (9, 10). SGLT2 inhibitors can prevent CKD progression, ESRD and death from renal or cardiovascular causes and are currently approved for use in adults with type 2 diabetes by the U.S. Food and Drug Administration. Interestingly, SGLT2 inhibitors could be efficient regardless of the presence or absence of diabetes (4–8). There is therefore a critical need for new therapeutics in CKD especially in non-metabolic nephropathies. A growing body of evidence suggests that the endocannabinoid system (ECS) could be a new therapeutic target to prevent CKD (11–18). The ECS includes two receptors, the cannabinoid receptor type 1 (CB1R) and the cannabinoid receptor type 2 (CB2R), and about sixty endogenous ligands. The foremost exogenous ligand is Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC). CB1R was the first endocannabinoid receptor to be identified within the brain (19). CB1R belongs to the 7-transmembrane regions receptor family and is a G-protein coupled receptor (19, 20). CB1R is best known to be involved in the regulation of addictive behavior, emotional behavior, analgesia, and memory (21, 22). CB1R is also involved in metabolic pathways in peripheral tissues (11, 23). A second G-protein coupled receptor, CB2R, was later discovered. CB2R is

mainly expressed in the immune system and it contributes to its regulation (20). The best-known endogenous ligands are N-arachidonylethanolamine (anandamide, AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG). Most endogenous ligands are eicosanoids which derive from phospholipids of cellular membranes (24, 25). Whereas CB1R expression is low in normal kidneys (12, 26–28), we previously found that its expression increased in metabolic CKD but also in non-metabolic CKD such as IgA nephropathy, acute interstitial nephritis, and chronic allograft nephropathy (12, 28). Recent studies have demonstrated that CB1R is involved in CKD during diabetes and/or obesity (13, 15–18) by its role on metabolism but also through a direct action on podocytes and tubules. Activation of CB1R enhances oxidative stress, inflammation, and fibrosis within the kidney, whereas CB2R exerts opposite effects. However, CB2R agonists do not provide any additive effect to CB1R inhibition (11, 12). We will therefore mainly focus on CB1R inhibition as a novel target in CKD. The first human clinical trials exploring the therapeutic potential of the ECS were designed to investigate the effect of CB1R inhibition in obesity and metabolic syndrome. Rimonabant, a CB1R inverse agonist which belongs to the first generation of CB1R antagonists, was the first approved for clinical use (29–36). However, due to central nervous side effects, mainly depression, rimonabant was withdrawn from the market in 2007. Since then, compounds with minimal blood brain barrier (BBB) penetration, such as AM645 or JD5037, have been developed (12, 16, 18, 37–40). Recently, third generation CB1R antagonists, which are peripherally restricted dual-target CB1R antagonists, have been designed to improve therapeutic efficacy by targeting a second pathway involved in the pathological conditions (37, 41). More and more compounds are under development to both prevent BBB penetration and enhance peripheral CB1R inhibition efficacy, including β -Arrestin-2 biased peripheral CB1R antagonist (42) and CB1R blocking antibodies (NCT03261739; NCT03900325 clinical studies ongoing). In the present review, we will first describe the role of the endocannabinoid receptors, especially CB1R, in renal physiology. We will next explore the role of endocannabinoid receptors in both metabolic and non-metabolic CKD and renal fibrosis. Finally, we will discuss the therapeutic potential of CB1R inhibition using the newest pharmacological approaches.

Abbreviations: 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; ACC, acetyl-CoA carboxylase; AEA, anandamide; AMPK, AMP-activated kinase; Ang II, angiotensin II; AT1, Ang II type 1 receptors; BBB, blood brain barrier; BP, blood pressure; CAD, chronic kidney allograft dysfunction; CB1R, cannabinoid receptor type 1; CB2R, cannabinoid receptor type 2; CCR2, CC chemokine receptor 2; CKD, chronic kidney disease; COX-2, cyclooxygenase type 2; DAGL, sn-1-specific diacylglycerol lipase; ECS, endocannabinoid system; ESRD, end-stage renal disease; FAAH, fatty acid amide hydrolase; GFR, glomerular filtration rate; GLUT2, glucose transporter 2; HK2, human proximal tubular cell line; HP, hemopressin; HTN, hypertension; IHC, immunohistochemical assay; LKB1, tumor suppressor liver kinase B1; MAGL, monoacylglycerol lipase; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NAPE, N-arachidonoyl phosphatidyl ethanolamine; NAPE-PLD, NAPE-specific phospholipase D; PIP2, 2-arachidonoyl-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; RAS, renin angiotensin system; SGLT2, sodium glucose co-transporter 2; SHR, spontaneously hypertensive rat; RPTC, renal proximal tubular epithelial cells; RT-PCR, Reverse transcription and polymerase chain reaction; SR141716A, rimonabant; STZ, streptozotocin; TAL, thick ascending limb; THC, tetrahydrocannabinol; TGF β , transforming growth factor β ; TRPV1, transient receptor potential vanilloid type I channels; UUU, unilateral ureteral obstruction; WB, western blot; WIN, WIN55,212-2; ZDF, Zucker diabetic fatty.

THE ROLE OF THE ENDOCANNABINOID SYSTEM IN RENAL PHYSIOLOGY

The Endocannabinoid System Within the Kidney

Little is known about the exact role of the ECS within the kidney, data being rather scarce and controversial (11) (**Figure 1**). As previously stated, ECS combines receptors, CB1R and CB2R, and ligands, the most prominent within the kidney being AEA and 2-AG. We will first describe what is known within the kidney about CB1R and CB2R expression, the pathways involved in endocannabinoid synthesis and the relationship between cannabinoid receptors and their ligands. Secondly, we will

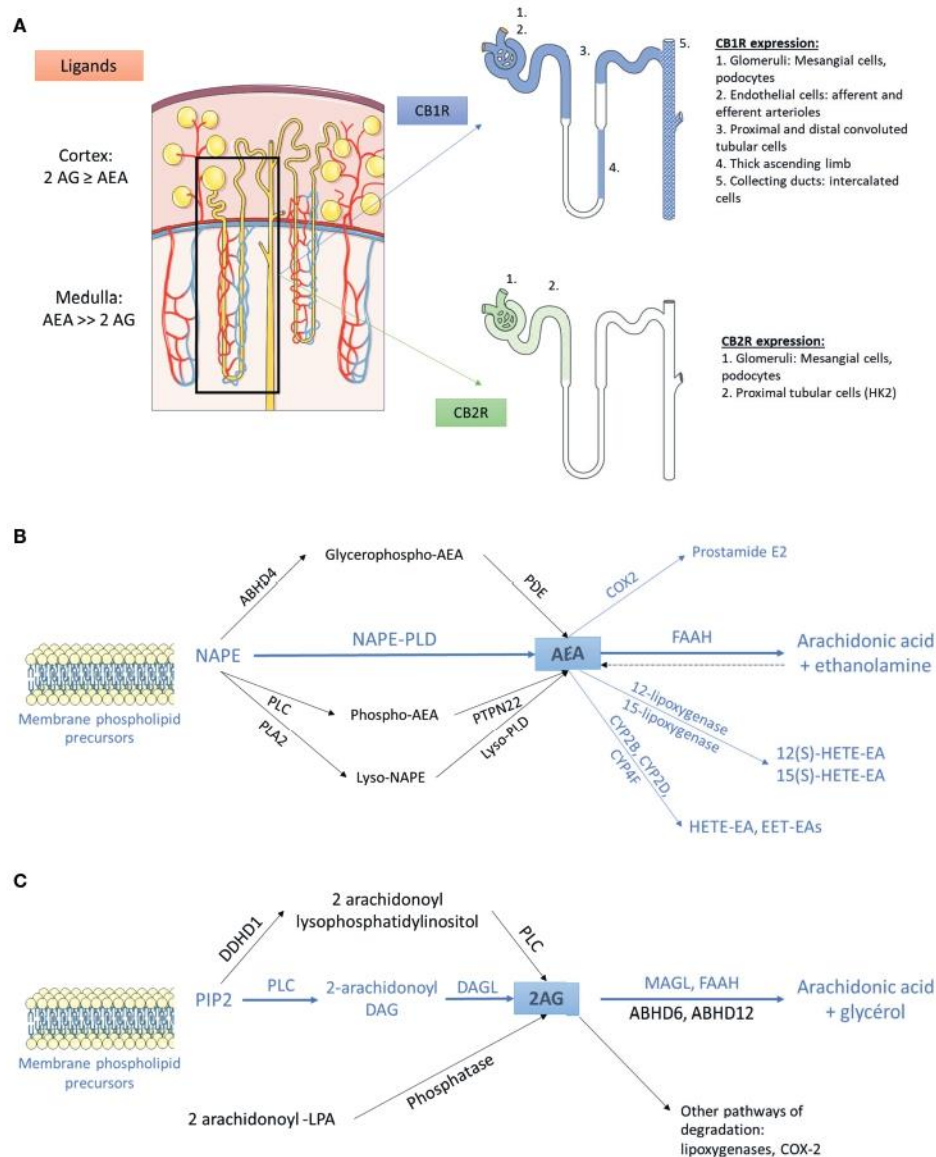


FIGURE 1 | The endocannabinoid system within the kidney **(A)** Distribution of main endogenous ligands and cannabinoid receptors in healthy kidneys. **(B)** Biosynthesis and degradation of anandamide. The pathways that were demonstrated within the kidney are in blue. The other pathways are in black. **(C)** Biosynthesis and degradation of 2-arachidonoyl-glycerol. The pathways that were demonstrated within the kidney are in blue. The other pathways are in black. 2AG, 2-arachidonoyl-glycerol; ABHD, α/β -Hydrolase domain containing; AEA, anandamide; CB1R, cannabinoid receptor type 1; CB2R, cannabinoid receptor type 2; COX2, cyclooxygenase 2; CYP, cytochrome P450; DAG, diacylglycerol; DAGL, *sn*-1-specific diacylglycerol lipase; DDHD1, phosphatidic acid-preferring phospholipase A1; EET-EA, epoxyeicosatrienoic acid-ethanolamine; FAAH, fatty acyl amide hydrolase; HETE-EA, hydroxyeicosatetraenoic acid-ethanolamine; LPA, lysophosphatidic acid; MAGL, monoacylglycerol lipase; NAPE, N-arachidonoyl phosphatidyl ethanolamine; PDE, phosphodiesterase; PIP2, 2-arachidonoyl-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PLA2, phospholipase A2; PLC, phospholipase C; PLD, phospholipase D.

detail the role of the ECS in renal physiology and will mainly focus on the aspects that could be involved in the therapeutic management of CKD.

The Cannabinoid Receptors Within the Kidney

The cannabinoid receptors expression within the kidney was studied using transcriptional and protein approaches. Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) for *Cnr1*,

the gene encoding for CB1R, western blot (WB) and immunohistochemical assays (IHC) demonstrated that CB1R was present in human and rodents (12–14, 27, 43–48). Assessing the specificity of proteins expression by IHC and WB, especially G-protein coupled receptor, needs adequate positive and negative controls to prevent improper interpretation of results (49, 50). Therefore, in the present review, we paid particular attention to the negative and positive controls used to confirm

staining specificity (Table 1). Whereas CB1R expression was extremely low in healthy kidneys, we and others found that it was expressed in many cell types, especially in the vasculature (12, 26, 43). Its expression was also documented in other parts of the nephron including glomeruli (podocytes and mesangial cells) (13, 14, 43, 45) and tubular cells (27, 46, 48) (Figure 1A). Unlike CB1R, the expression of CB2R within the kidney remains controversial (52). Several groups failed to detect *Cnr2* mRNA, encoding for CB2R, and to demonstrate protein expression by WB and IHC (27, 46). Conversely, other groups found that CB2R may be expressed in normal renal cortex (43, 48, 53). In rats, *Cnr2* mRNA was found in mesangial cells (43). In human and mice, the pattern of CB2R staining by IHC was suggestive of podocyte labeling (53). Transcripts and proteins by WB were also found in human proximal tubular cell line (HK2), suggesting that CB2R could also be expressed in proximal tubules within the kidney (48) (Figure 1A). Taken together, these conflicting results suggest that CB2R is expressed at an extremely low level in normal kidneys. As previously stated, assessing the protein expression of G-protein by IHC is very tricky and antibodies specificity had to be carefully checked (49, 50). Transcriptional approach is helpful, especially when it targets a specific cell type. To date, data about the physiological role of CB2R within the kidney are lacking. Therefore, we will mainly focus on the role of CB1R.

The Endogenous Ligands of the Endocannabinoid System Within the Kidney

Whereas AEA was the first endogenous cannabinoid receptor ligand to be discovered (24), later evidence indicated that 2-AG was both the most abundant and the most efficacious endogenous natural ligand for the cannabinoid receptors in several tissues (54). Data about the main cannabinoid endogenous ligand within the kidney are contradictory: we and others found that 2-AG was the main endogenous ligand (12, 44), conversely to authors finding that AEA was more abundant than 2-AG (26, 43, 55, 56). This difference is possibly explained by the difference in the renal compartment analyzed in these studies: while kidney cortex exhibits similar or higher levels of

AEA and 2-AG, AEA is the major endocannabinoid ligand of CB1R within the medulla.

AEA and 2-AG are eicosanoids that are synthesized on-demand from arachidonic acid containing phospholipids (57–59). The main source of AEA depends on the conversion of the membrane-bound N-arachidonoyl phosphatidyl ethanolamine (NAPE) (60–64). To date, the exact system responsible for NAPE's synthesis within the kidney remains unknown (56). The next step is the conversion of NAPE to AEA. Several pathways have been described so far (54, 56, 60, 65). A direct mechanism involves the conversion of NAPE to AEA by the NAPE-specific phospholipase D (NAPE-PLD) (66). In addition, using NAPE-PLD^{-/-} mice, at least 3 groups demonstrated that multi-step NAPE-PDL-independent pathways were also able to convert NAPE to AEA, involving the formation of intermediate compounds which are thereafter converted to AEA (Figure 1B) (67–73). The NAPE-PDL could play a major role within the kidney as NAPE-PDL^{-/-} mice exhibited significantly higher NAPE level in kidney than wild-type mice (70). The presence of NAPE-PDL within the kidney was assessed by RT-PCR in immortalized epithelial cells derived from pig kidney proximal tubule (LLC-PK1 cells) (74). After biosynthesis, AEA is rapidly catalyzed by the fatty acid amide hydrolase (FAAH), an integral membrane serine hydrolase, to form arachidonic acid and ethanolamine (75, 76). Former studies demonstrated that FAAH hydrolyzed various N-acyl ethanolamines with a higher reactivity toward AEA and that FAAH was ubiquitously present in various tissues, including the kidney (75, 77, 78). Biochemical analysis revealed a higher relative FAAH activity in renal cortex than medulla, which could explain the high content of AEA in renal medulla (79). In addition to FAAH, other enzymes could also be involved in the degradation of AEA, such as cyclooxygenase type 2 (COX-2), lipoxygenases and cytochrome P450s. All these enzymes are expressed in the kidney (56, 80–84).

As for the biosynthesis of AEA, multiple pathways are involved in the biosynthesis of 2-AG (64, 85, 86) (Figure 1C). 2-arachidonoyl-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) is the main precursor of 2-AG. PIP2 is hydrolyzed by phospholipase C to form 2-arachidonoyl-diacylglycerol, which is further deacylated

TABLE 1 | CB1R expression within healthy kidneys.

Structure	Species	Technical approaches	References
Whole kidney	Human	RT-PCR, IHC, WB	(27, 47, 51)
	Rats	RT-PCR, WB	(47, 48)
	Mice	RT-PCR, WB	(13, 44)
Endothelial cells	Human	IHC*	(12)
	Rats	RT-PCR, IHC#	(26, 43, 45)
Glomerular cells	Rats	RT-PCR, IHC (mesangial cells)	(43, 45)
	Mice	RT-PCR, IHC	(13, 14)
			RT-PCR, IHC**/IF (podocytes)
Tubular cells	Human	IHC (proximal and distal convoluted tubule cells; intercalated cells in the collecting ducts)	(27)
		RT-PCR, WB (HK2)	(48)
	Rats	WB (TAL tubule cells)	(46)

*Mice *cnr1*^{-/-} tissue was used to assess the specificity of IHC staining (12).

**Specificity of the antibody binding was confirmed by disappearance of the staining when antibody was preabsorbed with a 10-fold excess of control peptide (26).

#Two-photon microscopy revealed a greater immunostaining for CB1R in afferent arterioles compared with efferent arterioles.

CB1R, cannabinoid receptor type 1; HK2, human proximal tubular cell line; IF, immunofluorescence; IHC, immunohistochemistry; RT-PCR, reverse transcription/polymerase chain reaction; TAL, thick ascending limb; WB, western blot.

by *sn*-1-specific diacylglycerol lipase (DAGL) to yield 2-AG. 2-AG is then hydrolyzed to arachidonic acid and glycerol (64). This reaction can be catalyzed by several enzymes, including monoacylglycerol lipase (MAGL), FAAH, lipase α - β hydrolase (ABHD) 6 and ABHD12. The relative contribution of these enzymes differs among tissues and cells. Data about the pathways involved in biosynthesis and degradation of 2-AG in the kidney are scarce. To our knowledge, only Sampaio et al. demonstrated by RT-PCR that DAGL and MAGL were expressed in LLC-PK1 cells (74) (Figure 1C). Other endocannabinoids include N-acyl dopamine and 2-arachidonyl glyceryl ether, both of which binding strongly CB1R (87, 88). In addition to lipid compounds, some endogenous peptides could also bind to cannabinoid receptors. Recent studies found that hemopressin (HP), a peptide produced by the cleavage of the α 1 chain of hemoglobin, behaved as an inverse agonist of CB1R (89, 90).

Relationship Between Ligands and the Cannabinoid Receptors

AEA and 2-AG bind both CB1R and CB2R, although with different affinities. Both ligands exhibit much higher affinity for CB1R than for CB2R: K_i of AEA were respectively 61–565 nM for CB1R versus 279–1940 nM for CB2R and K_i of 2-AG were respectively 58–472 nM for CB1R versus 145–1400 nM for CB2R (43, 54, 91). Numerous studies demonstrated that endogenous ligands also acted through non-cannabinoid receptors, the most studied being the transient receptor potential vanilloid type I channels (TRPV1) (92–100). TRPV1 belong to the transient receptor potential cation channel receptor family. Its activation was found to elicit renoprotection in rodent models of acute kidney injury (AKI) following ischemia/reperfusion (101–104). AEA could activate TRPV1, even though with a 20-fold lower affinity than CB1R (92, 95, 99). Experimental studies also demonstrated that AEA directly inhibited T-type calcium channels (100). Therefore, ECS is a complex system with numerous ligands lacking specificity and precisely decipher its role

within the kidney remains challenging. However, as stated earlier, not only CB1R is the main cannabinoid receptor within the kidney, but also kidneys are enriched in AEA and in enzymes involved in its metabolism. As AEA had a better affinity for CB1R than for other receptors, many groups studying the ECS within the kidney used AEA infusion to explore the role of CB1R, although non-canonical effects of AEA may blur the results. Indeed, an effect of AEA through non-CB1R, such as TRPV1, could not be completely excluded. Many synthetic ligands were also developed to clarify the role of the ECS. These ligands behave as CB1R agonist or antagonist and exhibit various affinities for the cannabinoid receptors. Pharmacological properties of both endogenous and exogenous ligands that we cite in the present review, are summarized in Table 2. The most-studied pharmacological ligand is SR141716A (rimonabant), a CB1R inverse agonist which belongs to the first generation of CB1R antagonists. Rimonabant was briefly approved for clinical use but it was withdrawn from the market in 2007 due to severe central nervous side effects, mainly depression (29–36). Pharmacological studies demonstrated that rimonabant bound CB1R with much higher affinity than CB2R, K_i being respectively 1.98–12.3 nM for CB1R and 702–13200 nM for CB2R (108). However, like endogenous ligands, exogenous ligands also exert non-canonical effect and bound non-cannabinoid receptor as TRPV1 (93). However, directly targeting the endocannabinoid receptors seems the better approach to explore the therapeutic potential of the ECS since endogenous ligands are synthesized on-demand from arachidonic acid containing phospholipids through numerous pathways and bind both canonical than non-canonical receptors.

The Vascular Functions of the Endocannabinoid System Within the Kidney

In the normal kidney, CB1R expression is more prominent in the vasculature where it contributes to the regulation of renal

TABLE 2 | Affinity of ligands for CB1R and CB2R.

Ligands	K_i for CB1R (nM)	K_i for CB2R (nM)	References
Endogenous ligands			
2-arachidonolglycerol	58.3–472	145–1400	(43, 54, 91)
Anandamide	61–543	279–1940	(43, 54, 91)
Exogenous ligands			
MRI-1867 [#]	1.2–8.0	>1000	(105)
WIN55,212-2	1.89–123	0.28–16.2	(106, 107)
SR141716A (rimonabant)	1.98–12.3	702–13200	(108)
JD5037	2	>1000	(109, 110)
AM6545	3.3	624	(38, 111)
Δ 9-THC	5.05–80.3	3.13–75.3	(107)
AM251	7.49	2290	(112, 113)
(S)-SLV 319 (ibipinabant)	7.8	7.9	(114)
AM281	12	4200	(115)
(R)-Methanandamide	17.9–28.3	815–868	(116)
SR144528	400	0.6	(117)
AM1241	580	7	(118)
JWH-133	677	3.4	(119)
AM630	5152	31.2	(120)

CB1R, cannabinoid receptor type 1; CB2R, cannabinoid receptor type 2; K_i , inhibition constant; THC, tetrahydrocannabinol.

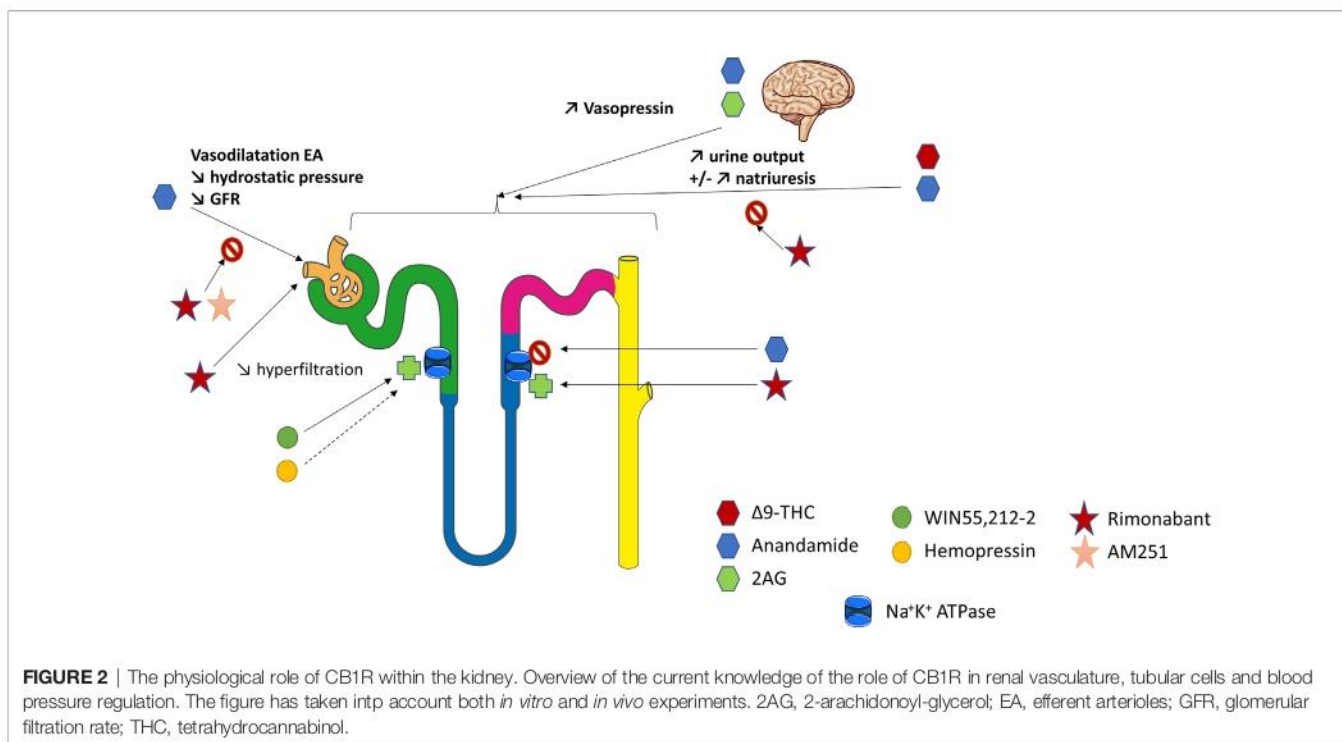
[#]MRI-1867 is a dual CB1R/inducible NOS antagonist.

hemodynamic (12, 26, 43). Deutsch et al. demonstrated that renal endothelial cells express mRNA for CB1R, and selectively bind AEA (43). In rats, AEA injection induced afferent arterioles vasodilation through CB1R binding by increasing nitrogen monoxide (NO) production since this response was inhibited by SR141716A (43) (**Figure 2**). The arteriolar responses to AEA were also assessed *ex vivo* by the blood-perfused juxtamedullary nephron technique (26). Whereas high doses of AEA significantly increased the diameter of both afferent and efferent arterioles, lower doses were responsible for predominant efferent arteriolar dilation, inducing a fall in glomerular filtration rate (GFR). In this model, selective antagonism of CB1R by AM251 (**Table 2**) attenuated the afferent arteriolar response to AEA and inhibited the efferent arteriolar response to AEA. Conversely, AM281, a nonselective antagonist of cannabinoid receptors inhibited responses to AEA in both afferent and efferent arterioles. Taken together, these results suggest that efferent arterioles are more sensitive to AEA and that AEA causes greater efferent arteriolar dilation *via* CB1R, which is consistent with a decreased hydrostatic pressure in glomerular capillaries and therefore a decrease in GFR (26, 56). However, the best way to fully decipher the vascular role of CB1R within the kidney would be to study endothelial cells specific CB1R knockout rodents. To our knowledge, such studies are lacking nowadays. As both endogenous and pharmacological ligands may also act through non-cannabinoid receptors, afferent arteriolar dilatation by high doses of AEA could therefore be amplified by non-cannabinoid effect of AEA. In CKD, the increase of capillary pressure participates to nephron reduction. Thus, the decrease of capillary pressure possibly mediated by CB1R activation could be beneficial in CKD. Conversely, an acute drop of capillary pressure could be damaging in normal kidneys, similarly to what is observed

during RAS inhibition. Therefore, a better understanding of the vascular effects of CB1R and of its inhibition is mandatory if CB1R inhibition become a therapeutic target in CKD.

The Role of the Endocannabinoid System in Tubular Cells

The ECS could also be involved in tubular functions, especially in the regulation of water and sodium balance (**Figure 2**). Thus, it could offer therapeutic perspectives in the management of hypertension (HTN) or conversely promote sodium retention. Former studies investigating the renal effects of marijuana shown that $\Delta 9$ -THC, binding both CB1R and CB2R with similar affinity (**Table 2**), increased urine production (121, 122). This effect was first thought to be centrally mediated (123–126). Indeed, both AEA and 2-AG, released from the hypothalamus, act directly on the hypophysis to modulate glutaminergic and GABAergic pathways that induce hormone release such as vasopressin (125, 126). However, recent data shown that a peripheral modulation could also be involved (46, 79, 127–129). As mentioned above, several studies confirmed that tubular cells express the main components of ECS, including CB1R and possibly CB2R as well as the enzymes for biosynthesis and degradation of their ligands (74, 130). However, not only the physiological role of CB1R in tubular cells, but also the mechanism responsible for an aquaretic and/or diuretic effect of ECS, remain controversial. In rat kidneys, the effect of oral THC administration on urine and Na^+ output was comparable to the thiazide diuretic, hydrochlorothiazide (122). More recently, Ritter et al. reported a natriuretic effect of AEA (79, 130). They found that AEA infusion into the mouse renal medulla increased both sodium excretion and urine output (79, 130). The authors



initially reported that a non-canonical CB receptor-based mechanism could be involved (79). Indeed, celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, blocked the effects of AEA. Therefore, the action of AEA could be mediated indirectly by its COX-2 metabolite, prostamide E2. Their hypothesis was reinforced by the fact that infusion of prostamide E2 mimicked the effects of AEA in stimulating natriuresis and diuresis in mice. More recently, Ritter et al. found that rimonabant also blocked the effects of AEA, suggesting a CB1R-dependent effect of intramedullary AEA on flow rate and natriuresis (130). Using *ex vivo* experiments on isolated mouse kidney thick ascending limb (TAL) tubule cells, they demonstrated an inhibitory effect of AEA on the Na^+/K^+ -ATPase activity (130). Another team measured oxygen consumption in rat TAL suspensions to monitor the effects of AEA (46). AEA reduced oxygen consumption in a concentration-dependent manner. WIN55,212-2 (WIN), a non-selective lipid cannabinoid agonist binding both CB1R and CB2R with a better affinity for CB2R (Table 2), also reduced oxygen consumption whereas rimonabant blocked the effect of AEA. Conversely, both the CB2R-selective agonist JHW-133 and the CB2R antagonist AM630 were ineffective (Table 2). The authors concluded that AEA inhibited TAL Na transport-related oxygen consumption by activating CB1R and NO stimulation, which, in turn, could block apical transporters and therefore be associated with a natriuretic effect (Figure 2).

Conversely, other authors found that ECS was involved in sodium retention (26, 128). In rats, intramedullary infusion of methanadamide (Table 2), a stable analogue of AEA, increased diuresis without any effect on natriuresis (128). Similarly, intrarenal AEA injection did not alter urinary sodium excretion (26). These results were enhanced by an *in vitro* study on LLC-PK1 cells in which the authors have shown that ECS could decrease renal sodium reabsorption by directly stimulating Na^+/K^+ -ATPase (74). WIN was responsible for an early and sustained increase of Na^+/K^+ -ATPase activity whereas HP displayed a biphasic effect leading to an early significant increase in the Na^+/K^+ -ATPase activity and acting as a potent inhibitor of the pump after 15 min. The CB1R antagonist AM251 (Table 2) was used to demonstrate that the fast effect of both WIN and HP on Na^+/K^+ -ATPase activity was independent of CB1R whereas the slow one was dependent on CB1R. Different signaling pathways were stimulated by WIN and HP, respectively protein kinase C (PKC) and protein kinase A (PKA), resulting in different effects on the Na^+/K^+ -ATPase (74). Sampaio et al. also studied the role of ECS in an acute model of experimental ischemia reperfusion, both *in vivo* in Wistar rats and *in vitro* using antimycin A treatment on LLC-PK1 epithelial cells (131). Antimycin A induced ATP depletion and was therefore used as an *in vitro* model of ischemia reperfusion. The authors demonstrated that the ECS and Na^+/K^+ ATPase were downregulated 24 hours after the ischemia reperfusion. *In vitro*, they found that the downregulation of Na^+/K^+ ATPase could be reversed by WIN in a CB1R dependent manner (131).

Thus, the role of ECS in tubular cells within the kidney remains largely unknown. Either CB1R may promote natriuresis and its therapeutic inhibition will give HTN and sodium

retention (like endothelin-1 antagonists), or conversely CB1R inhibition could cause natriuresis and be beneficial in HTN treatment. Effects of AEA may depend on dose, route of injection, cells (TAL *versus* renal proximal tubular epithelial cells, RPTC). Different pathways and sodium channels are involved in sodium reabsorption throughout the various tubular segments within the nephron and AEA may act through different mechanisms. Once again, as not only endogenous ligands but also pharmacological compounds could exert CB1R-independent effects, the best way to fully decipher the tubular role of CB1R within the kidney would be to study tubular-specific CB1R knockout rodents. As explained earlier for CB1R and vascular function, a better understanding of CB1R role in water and sodium balance is paramount if CB1R become a new therapeutic tool in CKD.

The Role of the Endocannabinoid System on Blood Pressure Regulation

Both the vascular functions of the endocannabinoid system within the kidney and the role of the ECS in tubular cells highly suggest an involvement of the ECS on blood pressure (BP) regulation, which represents a major factor in the management of CKD progression (1) (Figure 2). Former studies demonstrated that chronic use of Δ^9 -THC not only increased urine production, but also decreased heart rate and BP, both in human and animals (132–135). The same effect was observed in rats after intravenous perfusion of Δ^9 -THC (133, 136). A triphasic response was described involving a vagal-mediated fall in blood pressure (phase I), followed by a brief pressor effect (phase II) and finally a prolonged hypotensive effect (phase III) (136–138). Multiple mechanisms seemed to be involved, both central, mainly through cardiovascular centers of brainstem and hypothalamus, and peripheral (58). Central mechanisms of BP regulation by the ECS were deciphered first. Several studies demonstrated that activation of CB1R was responsible for a decrease of sympathetic activity leading to neurologic-mediated hypotension (132, 133, 136, 139). AEA could modulate the baroreflex through activation of CB1R within the nucleus tractus solitarius, possibly by modulating effectiveness of GABA and/or glutamate neurotransmission (140). CB1R also participates to the pressor effect of angiotensin II (Ang II) infusion in the brain (58, 141).

Next, peripheral mechanisms of BP regulation by the ECS were also identified. Cardiac activation of CB1R exerted negative chronotropic and inotropic effects independently of the central nervous system, therefore promoting a decrease in BP (58, 142). In addition to direct cardiodepressant effects, studies highlighted a vasodilatory effect of the ECS ligands in aorta and coronary arteries, through both CB1R-dependent and independent pathways that could also participate to a decrease in BP (143–148). Interestingly, *Cnr1*^{-/-} mice have the same baseline BP than their wild-type littermates (21, 149). Treatment of normotensive rats and mice with the CB1R antagonist SR141716A alone has also little effect on BP (133, 136), as well as inhibition of AEA transport (150). Taken together, these results suggest that, under baseline conditions, CB1R is not tonically active in vessels and do not participate to

baseline BP regulation (56). Conversely, effects of the ECS through CB1R modulation were observed in 3 experimental models of hypertension (HTN): the spontaneously hypertensive rat (SHR) model, the Dahl salt-sensitive and salt-resistant rat model and chronic Ang II infusion-induced hypertension in Sprague Dawley rats (151–153). Once again, BP of the normotensive control rats was not altered by either CB1R agonists (Δ^9 -THC, AEA) or CB1R antagonists (SR141716A, AM251) which were used in these studies (151–153). Bátkai et al. demonstrated the involvement of CB1R in BP regulation: the CB1R antagonists SR141716A and AM251 aggravated HTN in SHR whereas URB597, an inhibitor of FAAH, reduced BP in SHR and in the chronic Ang II infusion induced HTN (151). Conversely, in SHR, not only the CB2R antagonist SR144528 (**Table 2**) did not affect BP, but also the TRPV1 antagonist capsazepine did not alter BP decrease by AEA intra-venous administration (151). The mechanisms of BP reduction in these models were attributed to the effects of endocannabinoids on cardiac contractility and vascular resistance. Endocannabinoids tonically suppressed cardiac contractility in hypertension and could normalize blood pressure by enhancing the CB1R-mediated cardiopressor and vasodilator effects of endogenous AEA (151). Furthermore, an interaction between the RAS and the ECS was identified in rodent peripheral arterioles. Ang II stimulated vascular endocannabinoid formation, which attenuated its vasoconstrictor effect, suggesting that endocannabinoid release from the vascular wall and CB1R activation reduced the vasoconstrictor and hypertensive effects of Ang II (154, 155).

CB1R may also modulate the Ang II pressor effect by its action on sodium and water balance. As described earlier, CB1R may be involved in the regulation of salt and water balance (46, 79, 122, 127–130). Furthermore, Ang II type 1 receptors (AT1) are largely expressed within the kidney. A recent review highlighted that the juxtaglomerular and tubulo-interstitial areas were conserved expression sites for AT1 across species and could represent the main target sites for Ang II in adult human and rodent kidneys (156). In addition, as demonstrated using tissue-specific AT1a knockout mice (157), AT1 receptors within the kidney (and not in the heart) promote the pressor response to Ang II. Several studies found interactions between AT1 and the ECS in numerous organs and systems (58, 141, 154, 155). On the molecular basis, the signal integration between CB1R and AT1 could be due to AT1R–CB1R heteromerization (15, 158). AT1R–CB1R heteromerization was first demonstrated in Neuro2A cells, a neuroblastoma cell line that contains endogenous CB1R (158). In hepatic stellate cells from ethanol-administered rats in which CB1R is upregulated, Rozenfeld et al. found a significant upregulation of AT1R–CB1R heteromers and enhancement of angiotensin II-mediated signaling. Moreover, CB1R inhibition by rimonabant prevented angiotensin II-mediated mitogenic signaling and profibrogenic gene expression (158). Therefore, the interaction with CB1R could confer new signaling properties to AT1R and enhanced responsiveness to Ang II. Jourdan et al. found that losartan, an AT1R antagonist, attenuated diabetic nephropathy in rats by downregulating the expression of CB1R in podocytes, reinforcing this hypothesis (15). Thus, a role for the ECS and

CB1R within the kidney in the physiopathology of HTN cannot be excluded and it deserves to be studied, especially because a large proportion of CKD patient, who could be treated by CB1R antagonists, may suffer from HTN.

THE ROLE OF CANNABINOID RECEPTORS IN CHRONIC KIDNEY DISEASES AND RENAL FIBROSIS

CB1R, and Not CB2R, Is the Main Actor of the Endocannabinoid System Promoting Renal Fibrosis

Fibrogenesis is a multifactorial process leading to excessive extracellular matrix deposition, regardless of the organ and cause. Several studies demonstrated that endocannabinoids acting *via* CB1R promote fibrosis and that CB1R blockage reduces fibrogenesis in many organs including the liver (159–161), the heart (162), the lungs (163, 164) and the skin (165). As for the kidneys, CB1R is also an active direct player in renal fibrogenesis. This was first suggested by a microarray analysis performed by our team (12). Using the unilateral ureteral obstruction (UUO) experimental model, a rapid and reproducible model of renal fibrosis in mice, we compared the gene expression profile of fibrotic kidneys with contralateral undamaged kidneys by microarrays analysis (12). As expected, we found many overexpressed genes well-known to be involved in renal fibrosis, such as *tgfb*, *mmmps* and *timp*. Remarkably, *Cnr1* was among the ten most significantly upregulated genes during renal fibrosis (12). In addition, a growing body of evidence highlighted that CB1R could also be a new therapeutic target to prevent renal fibrosis in both metabolic and non-metabolic diseases, as we will discuss next in our review (11–18). Conversely, the role of CB2R during renal fibrosis remains largely unknown, studies being scarce and contradictory. Several studies elicited that CB2R blockage promoted fibrosis in the liver (166), the heart (167) and the skin (168), whereas CB2R agonists decreased fibrogenesis (166–168). Surprisingly, Zhou et al. found that CB2R overexpression could promote renal fibrosis (169, 170). We and others found opposite results with a protective effect of CB2R activation in various models of CKD (12, 53, 171). During UUO, we demonstrated that CB2R antagonist alone (SR144528) increased the development of renal fibrosis whereas CB2R agonist (JWH 133) alone blunted it (12). However, neither SR144528 nor JWH133 further reduced the development of fibrosis when compare with CB1R pharmacological blockade by rimonabant (12). Barutta et al. demonstrated that CB2R was downregulated in kidney biopsies from patients with advanced diabetic nephropathy (53). They also found that AM1241, a CB2R agonist (**Table 2**), ameliorated albuminuria, podocyte protein downregulation, and glomerular monocyte infiltration, without affecting early markers of fibrosis. In addition, AM1241 reduced CC chemokine receptor 2 (CCR2) expression in both renal cortex and cultured podocytes, suggesting that CB2R activation may interfere with the deleterious effects of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) signaling (53). In streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice, the genetic

deletion of CB2R exacerbated the downregulation of podocin and nephrin, mesangial expansion, monocyte infiltration, and reduced renal function overexpression of extracellular matrix. The deletion of CB2R also enhanced the expression of fibrosis marker (171). Given the contradictory results of the various studies, the exact role of CB2R in renal fibrosis needs to be further explored. To date, there is no ongoing clinical study investigating the effect of CB2R on renal function. We will therefore focus on the therapeutic potential of CB1R inhibition in renal fibrosis.

CB1R Promotes Renal Fibrosis Associated With Metabolic Disorders

The role of CB1R in renal fibrosis was first documented during diabetes and metabolic syndrome (13, 15–18, 45) (Figure 3). We and others demonstrated that renal CB1R expression was increased in diabetic nephropathy, both in humans (12, 45) and rodents (14, 15, 17, 18). Numerous studies demonstrated that CB1R blockade improves multiple parameters involved in metabolic syndrome and diabetes, such as waist circumference, glycemia, glycated hemoglobin, HDL and LDL cholesterol and triglycerides (13, 29, 30, 45). Both global genetic CB1R inactivation and pharmacological blockade by first generation CB1R antagonists dramatically improves metabolic parameters (13, 14, 45) (Figure 3). Indeed, CB1R inhibition may protect the kidney from metabolic induced fibrosis and injury by improving systemic metabolic parameters. Thus, experimental studies in rodents demonstrated that rimonabant and AM251, belonging to the first generation CB1R antagonists with BBB crossing, protect the kidney from the development of albuminuria, CKD, renal fibrosis, glomerulosclerosis and renal inflammation in diabetes

(13, 14, 45). However, recent studies also exhibited a role of peripheral CB1R in metabolic nephropathies. Udi et al. highlighted that CB1R regulated obesity-induced CKD by acting on RPTC (16). Indeed, specific deletion of CB1R in RPTC (RPTC-CB1R^{-/-}) did not prevent obesity in mice, but significantly reduced the obesity-induced lipid accumulation in the kidney as well as renal dysfunction, urinary albumin-to-creatinine ratio (ACR), inflammation, and renal fibrosis. Deciphering the pathways involved in this experimental model, the authors found that CB1R acted through the Gα_{i/o}-PKA axis. Therefore, CB1R blockade mediated the downstream activation of the tumor suppressor liver kinase B1 (LKB1), which modulates AMP-activated kinase (AMPK) activity by inducing its phosphorylation. AMPK inactivates acetyl-CoA carboxylase (ACC) by its phosphorylation, increasing fatty β-oxidation in renal proximal tubules. *In vitro*, CB1R blockade by JD5037 increased fatty acid β-oxidation in proximal tubular cells and protected the kidney from obesity-induced fibrosis.

Similarly, the peripheral role of CB1R during renal fibrosis in diabetic nephropathy was recently documented. The first data supporting a peripheral role of CB1R in diabetic nephropathy and an antifibrotic effect independent from the improvement of systemic metabolic parameters were reported by Janiak et al. (45). Rimonabant, the most-known first generation CB1R antagonists crossing BBB, significantly reduced body weight, blood glucose and improved lipid profile in rodents (14, 45). Comparing obese Zucker rats receiving either rimonabant or vehicle for 12 months to pair-fed but untreated group of obese rats, Janiak et al. demonstrated that rimonabant significantly reduced proteinuria and renal failure as well as tubulo-interstitial

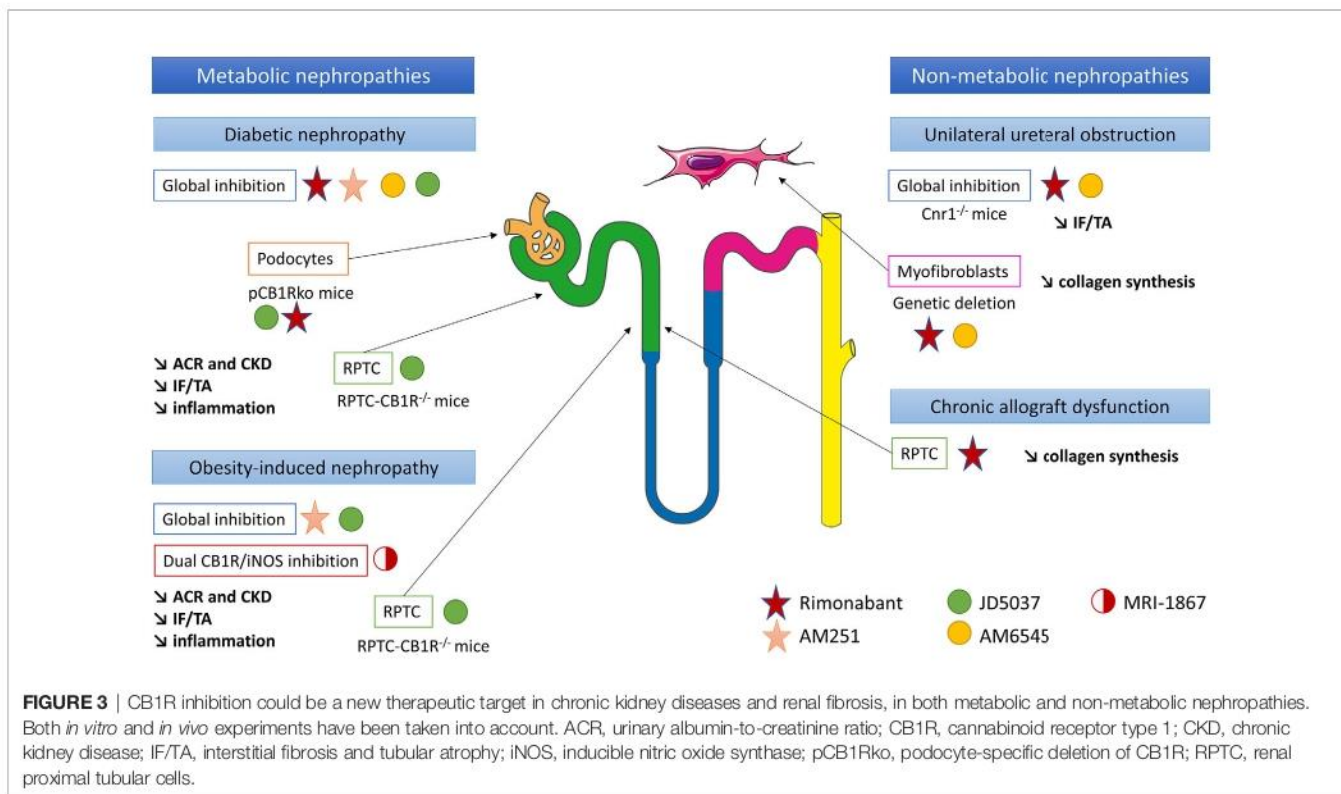


FIGURE 3 | CB1R inhibition could be a new therapeutic target in chronic kidney diseases and renal fibrosis, in both metabolic and non-metabolic nephropathies. Both *in vitro* and *in vivo* experiments have been taken into account. ACR, urinary albumin-to-creatinine ratio; CB1R, cannabinoid receptor type 1; CKD, chronic kidney disease; IF/TA, interstitial fibrosis and tubular atrophy; iNOS, inducible nitric oxide synthase; pCB1Rko, podocyte-specific deletion of CB1R; RPTC, renal proximal tubular cells.

fibrosis and glomerulosclerosis compared to per-fed animals (45). In addition, in cultured podocytes *in vitro*, high glucose stimulation increased CB1R expression whereasrimonabant abolished high-glucose-induced up-regulation of collagen and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis, also suggesting that CB1R blockade protected against renal injury through both metabolic and antifibrotic effects in type 2 diabetic nephropathy (14). A study of Barutta et al. reinforced this hypothesis (13). Whereas CB1R blockade by AM251 in STZ-induced diabetic mice had no effect on body weight, blood glucose and BP, it significantly reduced ACR and prevented down-regulation of nephrin, podocin and zonula occludens 1 (ZO-1). Because histological lesions, including renal fibrosis, were very mild, a possible beneficial effect of CB1R blockade preventing overt lesions in diabetic nephropathy could not be demonstrated (13).

The same results were observed using JD5037 and AM6545, peripherally restricted CB1R antagonists that did not cross BBB. Whereas JD5037 and AM6545 were quite ineffective in controlling blood glucose and glycated hemoglobin levels (13, 15, 17, 18), they significantly improved renal parameters, especially renal function, ACR and renal inflammation (13–15, 17, 18, 39, 40, 45) in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats (13, 15), STZ-induced diabetic mice and Akita diabetic mice (17). Several pathways seem to be involved. In ZDF rats, Barutta et al. found that JD5037 improved glomerular filtration and reversed albuminuria, activation of the RAS, oxidative/nitrative stress and podocyte loss (13). However, no evidence of chronicity (glomerulosclerosis, interstitial fibrosis or tubular atrophy) was observed at the point (90 days) at which the cohort was sampled for histopathological analysis, preventing any conclusion regarding a decrease in overt renal diabetic lesions (13). Thus, these results suggest that improvement mainly depends on renal hemodynamic in this model. Another work published by Jourdan et al. in ZDF rats reinforces this hypothesis (15). Indeed, not only the authors demonstrated that CB1R signaling in podocytes increased RAS activity, which was down-regulated by CB1R blockade, but also they found a direct link between AT1 activation and CB1R expression *in vivo* in ZDF rats (15). In podocytes *in vitro*, they demonstrated a cross talk between reactive oxygen species, angiotensin II and slit-diaphragm protein expression such as nephrin (15). In STZ-induced diabetic nephropathy, some authors extended the delay before analysis to allow time for renal lesions, especially renal fibrosis, to develop (18, 39, 40). After 14 weeks, Barutta et al. found that AM6545 reduced mesangial expression, upregulation of glomerular fibronectin and collagen deposition in both the mesangial and the interstitial area (39). AM6545 also significantly reduced down-regulation of nephrin and podocin (40) and prevented diabetic-induced downregulation of markers of anti-inflammatory M2 macrophages which play a key role in resolving inflammation and promoting repair (39, 40). To precisely assess the role of CB1R podocyte expression in diabetic nephropathy, Jourdan et al. reported a mouse model with podocyte-specific deletion of CB1R (pCB1Rko) STZ-induced diabetic nephropathy (18). Whereas hyperglycemia was similar in both pCB1Rko and their wild-type littermate, pCB1Rko mice exhibited less ACR, podocytes loss,

tubular dysfunction and interstitial fibrosis. These parameters were mediated in part by podocyte-derived endocannabinoids acting *via* CB1R on proximal tubular cells (18). In addition, the role of CB1R expression in RPTCs in diabetic nephropathy was studied by Hinden et al. in STZ-induced diabetic mice using RPTC-specific deletion of CB1 (RPTC-CB1R^{-/-}) (17). RPTC-CB1R^{-/-} mice developed only mild diabetes manifesting by modest hyperglycemia and were almost completely protected from the development of diabetic nephropathy compared to their littermate counterparts, with a better renal function and a decrease of ACR, kidney inflammation and tubule interstitial fibrosis. These effects were due to a downregulation of glucose transporter 2 (GLUT2) expression in RPTC. Indeed, GLUT2, localized in RPTCs, affects the basolateral efflux of glucose from the tubular cell back to the circulation (172, 173). Its expression is increased in humans with diabetes and in murine models of diabetes (174–177). Hyperglycemia increases tubular GLUT2 expression and shifts its localization from basolateral membrane to the apical/brush border membrane, contributing to increase glucose reabsorption (174, 178). CB1R blockade was related with the disruption of glucose-induced Ca²⁺-dependent PKC-β1 activation which, in turn, modulated GLUT2 translocation and/or expression in RPTC, through the G_{q/11} signaling. *In vitro*, CB1R stimulation mimics these effects whereas blockade of CB1R by JD5037 blunts these effects (18).

Thus, all these studies documented that the beneficial effect of CB1R blockade was not only due to its role on metabolic parameters, but also through a direct action on renal cells (podocytes and RPTCs) independently of metabolism. These studies also demonstrated that different cellular pathways are involved in renal fibrogenesis during metabolic nephropathies.

CB1R Activation Promotes Non-Metabolic Renal Fibrosis

So far, only our group studied the role of CB1R in an experimental model of non-metabolic renal fibrosis *in vivo* in mice (12) (Figure 3). Whereas CB1R expression was low in normal kidneys, it was increased both in metabolic (diabetic nephropathy) and non-metabolic (acute interstitial nephritis, IgA nephropathy) nephropathies (12). Furthermore, there was a significant negative correlation between CB1R expression and kidney function. In mice in the UO model, both the pharmacological blockade byrimonabant or by AM6545 and the genetic disruption of CB1R profoundly reduced the development of renal fibrosis. This effect was mainly due to a direct paracrine/autocrine role of CB1R in myofibroblasts, which are the final effector cells in renal fibrogenesis. We also found that upon transforming growth factor β (TGFβ) stimulation, renal myofibroblasts expressed CB1R and secreted endocannabinoid ligands, whereas CB1R blockade reduced collagen synthesis (12). During chronic kidney allograft dysfunction (CAD) in humans, we found that CB1R was highly expressed in tubular cells (28). CAD remains the first cause of graft loss (179) and corresponds to the progressive and inevitable impairment of renal graft function. It is a multifactorial and complex process, in which a lot of immunological and non-immunological causes are involved (180–184). Recently,

antibody-mediated rejection as emerged as one of the major causes of CAD (184–186). During CAD, the functional renal tissue is replaced by extracellular matrix proteins, mainly collagens, leading to both interstitial fibrosis and tubular atrophy. Other histological damages associated glomerulosclerosis and vascular intimal hyperplasia (187). We highlighted that CB1R expression significantly increased in the first three months after kidney transplantation, and it remained stable thereafter. CB1R expression in preimplantation kidney graft biopsies was higher than CB1 expression we previously found in normal kidneys ($23\% \pm 15\%$ versus $6.5 \pm 4.8\%$) and was not correlated with renal fibrosis at this particular time-point (12, 28). Therefore, we hypothesized that the high level of CB1R expression in preimplantation biopsies could be a consequence of cold ischemia-induced acute tubular necrosis and could be predictive for the development of further renal graft fibrosis. Next, we found a significant positive correlation between CB1R expression and renal graft fibrosis at 3 months post-transplantation (28) (Figure 3). Moreover, patients with stable renal fibrosis during the first-year post-transplantation tended to have lower increase in CB1R expression than patients in whom renal fibrosis increased. Thus, CB1R could promote the early steps of the development of CAD or at least be a marker of renal fibrosis. *In vitro*, we found that an anticalcineurin treatment by tacrolimus significantly induced mRNA and protein expression of CB1R, concomitantly to collagen up-regulation. Administration of rimonabant blunted collagen synthesis. The impact of cannabinoid system modulation during CAD as well as the cellular and molecular pathways involved, remains to be clarified.

Overall, we found evidence of a profibrotic role of CB1R in experimental mice models, human renal biopsies and *in vitro* studies. However, the respective contribution of tubules and myofibroblasts remains to decipher. In the UO model, we found that whereas CB1 expression was drastically increased in the tubules, interstitium and glomeruli, CB1R blockade significantly reduced the increase of renal fibrosis through a direct paracrine/autocrine role of CB1R in myofibroblasts with no strong evidence for a direct role of CB1R expressed in tubules (12). During CAD, we found that CB1R was highly expressed in tubular cells and that CB1R blockade reduced collagen synthesis by tubular cells. Thus, identifying the respective role of CB1R in tubules and myofibroblasts during non-metabolic renal fibrosis remains to be established. The best way to fully answer the question would be to study cell-specific CB1R knockout rodents. The cellular pathways involved in non-metabolic renal fibrosis mediated by CB1R also remain to be elucidated.

CB1R INHIBITION: A NEW PROMISING THERAPEUTIC TARGET IN CHRONIC KIDNEY DISEASES

As presented earlier, experimental data highlighted the therapeutic potential of CB1R blockade in renal fibrosis and CKD, regardless of the cause (metabolic or not) (12, 13, 15–18, 45). Therefore, there is a growing interest for the industry to

develop CB1R inhibitors with no BBB passage to improve tolerance compared with rimonabant (188).

The First Generation CB1R Antagonists: Rimonabant

Rimonabant was the only CB1R antagonist approved for clinical use in obesity. However, clinical trials with rimonabant mainly focused on metabolic syndrome and patients with CKD were excluded from these studies (29–36). The RIALTO study (NCT00458081) aimed to assess the effect of rimonabant on microalbuminuria in patients with metabolic syndrome. Assessment of glomerular filtration rate was a secondary objective of the study. Due to central nervous system adverse events, especially an important risk of severe depression, rimonabant was withdrawn in 2008, before the end of the RIALTO study. The study was also prematurely terminated. Therefore, to date, no clinical trial investigated the effect of CB1R inhibition on CKD course in diabetes and obesity.

The Second Generation CB1R Antagonists: Peripherally Restricted CB1R Antagonists

Multiple peripherally CB1R antagonists, without central nervous system side-effects, were developed these past 10 years (37). As discussed earlier in the present review, experimental studies demonstrated that some molecules, such as AM6545 or JD5037, could be useful to prevent renal fibrosis and therefore be good candidates to be part of the therapeutic tools against CKD (12, 16, 18, 37–39). AM6545 is a non-brain-penetrant neutral CB1R antagonist, based on the rimonabant template but with an alkynyl chain off the 4-aryl group. It retains high affinity and selectivity for CB1R with K_i of 3.3 nM for CB1R, which is similar to K_i of rimonabant (38). Importantly, AM6545 displays markedly reduced brain penetrance (38, 111). AM6545 significantly reduced diabetic-induced albuminuria in diabetic mice (39, 40) as well as collagen deposition in both the mesangial and the interstitial area (39). Using UO, a non-metabolic experimental model of renal fibrosis, we demonstrated a 25 to 60% reduction of renal fibrosis in AM6545 compared to vehicle treated mice.

While the rimonabant template was the most common choice for developing peripherally restricted CB1R antagonists, the Jenrin group developed JD5037 from ibipinabant, another first generation CB1R antagonist (109, 189). It was found that modifications of the central N-methyl group of ibipinabant with polar pendants provided analogs that followed physicochemical guidelines for diminishing blood brain barrier penetration. JD5037 contained pendants of N-substituted valinamide and exhibited 15-fold greater affinity for CB1R (IC_{50} 1.5 nM) than ibipinabant (109). Preclinical toxicity studies were performed with high doses of JD5037 in rats and dogs (respectively 150 mg/kg/d and 20–75 mg/kg/d) without observed adverse effects. Experimental studies in rodents demonstrated that JD5037 was effective in mitigating both diabetic nephropathy by blocking overactive CB1R in podocytes (15) and regulating renal GLUT2 in proximal tubular cells (18) and obesity-induced nephropathy by blocking overactive CB1R in proximal tubular cells (16). The CB1R blockade by JD5037 increases fatty acid β -oxidation in proximal tubular cells and protects the kidney from obesity-induced dysfunction and injury.

To date, data about the effect of JD5037 in non-metabolic renal fibrosis are lacking. Therefore, peripherally restricted CB1R antagonists may be good candidates for slowing CKD progression, especially during metabolic nephropathies, and experimental data are encouraging to move up forward clinical trials in the short term. JD5037 is now developed under the name of CRB-4001 (Corbus Pharma) and a Phase II study in patients with non-alcoholic steatohepatitis is underway. Recently, Liu et al. described a peripheral CB1R antagonist (MRI-1891) highly biased toward inhibiting CB1R-induced β -arrestin-2 recruitment over G-protein activation. In mice, MRI-1891 reduced food intake, body weight and obesity-induced muscle insulin resistance *via* β -arrestin-2 signaling (42).

The Third Generation CB1R Antagonists: Peripherally Restricted Dual-Target CB1R Antagonists

Recently, hybrid CB1R antagonists were designed to improve therapeutic efficacy for instance in liver fibrosis (105, 190) and in pulmonary fibrosis (164). Experimental studies demonstrated the usefulness of peripherally restricted hybrid CB1R/inducible nitric oxide synthase (iNOS) antagonists during CKD (37, 41). Indeed, both CB1R and iNOS are increased during CKD (51). iNOS overactivity was found to contribute to tubular dysfunction in obesity-induced CKD in mice (191). Interestingly, iNOS overactivity was also found to contribute to renal fibrosis in UUO, a non-metabolic experimental model of renal fibrosis (192). Udi et al. demonstrated that MRI-1867, a dual CB1R/iNOS antagonist, was more efficient than JD5037 or an iNOS inhibitor (1400W) alone to prevent obesity-induced kidney injury, inflammation, fibrosis and kidney dysfunction in mice (51). Similarly, data about the effect of MRI-1867 on non-metabolic renal fibrosis are lacking.

Another hybrid molecule could also be an activator for the secondary target, such as AMPK activator (37). Supplemental experimental data are mandatory to move forwards to therapeutics. No phase II trial is ongoing yet. Assessing safety and tolerability, especially central nervous system, would be the first stage of clinical development in human pathologies.

CB1R Blocking Antibodies

Blocking antibodies targeting CB1R is another interesting approach to prevent central nervous system side-effects induced by CB1R inhibition. The Bird Rock Bio, Inc group developed RYI-018 (nimacimab), a negative-allosteric modulating antibody targeting CB1R. Early-stage clinical development is ongoing. Clinical trials are assessing safety, tolerability and pharmacokinetics of RYI-018 in

patients with non-alcoholic fatty liver disease (phase 1 study, NCT03261739) and diabetic gastroparesis (phase 2a study, NCT03900325). The Goldinch Bio, Inc group also developed GFB-024, another peripherally restricted CB1R inverse agonist monoclonal antibody, targeting patients at high risk of CKD due to severe insulin resistant patients. Phase 1 study in healthy volunteers is ongoing. To date, there is no published studies with RYI-018 nor GFB-024.

CONCLUSION

There is now a growing body of evidence for a prominent role of CB1R in a broad range of renal diseases. In metabolic syndrome, obesity and diabetes, CB1R inhibition not only improves metabolic parameters, but also exerted a direct role in the protection of renal function. Since diabetic nephropathy remains one of the main causes of CKD and ESRD and since a large proportion of CKD patients suffer from metabolic syndrome and obesity, the metabolic benefits of CB1R inhibition represents a major advantage in the therapeutic management of these patients. In addition, recent studies highlighted that CB1R also promotes renal fibrosis in non-metabolic nephropathies and that its inhibition reduced the development of renal fibrosis. Rimonabant, belonging to the first generation CB1R antagonists, was approved for clinical use but its development was stopped due to an important risk of severe depression, and it was definitively withdrawn in 2008. To date, second and third generation CB1R antagonists without central nervous side-effects are under development with encouraging experimental data on renal fibrosis prevention. Due to the weak expression of CB1R in healthy kidneys, few side effects of its peripheral blockage are expected, although, as detailed in our review, CB1R could impact GFR and sodium and water balance. There is a growing interest of the industry to develop new CB1R antagonists and some molecules are currently under early-stage clinical phases (phases I and IIa studies), paying a peculiar attention to safety and tolerability. These new pharmacological blockers of CB1R could therefore provide an additional therapeutic toolbox in the management of CKD and renal fibrosis from both metabolic and non-metabolic origin.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Both MD and HF authors contributed to the final version of the manuscript. HF supervised the project. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

REFERENCES

1. "KDIGO Chapter 1: Definition and Classification of CKD". In: *Kidney Int Suppl*, vol. 3. p. 19–62. doi: 10.1038/kisup.2012.64
2. François H, Jacquet A, Beaudreuil S, Seidowsky A, Hebibi H, Charpentier B, et al. Emerging Strategies to Preserve Renal Function. *J Nephrol* (2011) 24:133–41. doi: 10.5301/JN.2011.6355
3. Koye DN, Shaw JE, Reid CM, Atkins RC, Reutens AT, Magliano DJ. Incidence of Chronic Kidney Disease Among People With Diabetes: A Systematic Review of Observational Studies. *Diabetes Med J Br Diabetes Assoc* (2017) 34:887–901. doi: 10.1111/dme.13324
4. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D, Fulcher G, Erondou N, et al. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* (2017) 377:644–57. doi: 10.1056/NEJMoa1611925

5. Heerspink HJL, Kosiborod M, Inzucchi SE, Cherney DZI. Renoprotective Effects of Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors. *Kidney Int* (2018) 94:26–39. doi: 10.1016/j.kint.2017.12.027
6. Perkovic V, Jardine MJ, Neal B, Bompoint S, Heerspink HJL, Charytan DM, et al. Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *N Engl J Med* (2019) 380:2295–306. doi: 10.1056/NEJMoa1811744
7. Toyama T, Neuen BL, Jun M, Ohkuma T, Neal B, Jardine MJ, et al. Effect of SGLT2 Inhibitors on Cardiovascular, Renal and Safety Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diabetes Obes Metab* (2019) 21:1237–50. doi: 10.1111/dom.13648
8. Heerspink HJL, Stefánsson BV, Correa-Rotter R, Chertov GM, Greene T, Hou F-F, et al. Dapagliflozin in Patients With Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med* (2020) 383:1436–46. doi: 10.1056/NEJMoa2024816
9. Greco EV, Russo G, Giandalia A, Viazzi F, Pontremoli R, De Cosmo S. GLP-1 Receptor Agonists and Kidney Protection. *Med Kaunas Lith* (2019) 55 (6):233. doi: 10.3390/medicina55060233
10. Kristensen SL, Rørth R, Jhund PS, Docherty KF, Sattar N, Preiss D, et al. Cardiovascular, Mortality, and Kidney Outcomes With GLP-1 Receptor Agonists in Patients With Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cardiovascular Outcome Trials. *Lancet Diabetes Endocrinol* (2019) 7:776–85. doi: 10.1016/S2213-8587(19)30249-9
11. Francois H, Lecru L. The Role of Cannabinoid Receptors in Renal Diseases. *Curr Med Chem* (2018) 25:793–801. doi: 10.2174/0929867324666170911170020
12. Lecru L, Desterke C, Grassin-Delye S, Chatziantoniou C, Vandermeersch S, Devocelle A, et al. Cannabinoid Receptor 1 is a Major Mediator of Renal Fibrosis. *Kidney Int* (2015) 88:72–84. doi: 10.1038/ki.2015.63
13. Barutta F, Corbelli A, Mastrocola R, Gambino R, Di Marzo V, Pinach S, et al. Cannabinoid Receptor 1 Blockade Ameliorates Albuminuria in Experimental Diabetic Nephropathy. *Diabetes* (2010) 59:1046–54. doi: 10.2337/db09-1336
14. Nam DH, Lee MH, Kim JE, Song HK, Kang YS, Lee JE, et al. Blockade of Cannabinoid Receptor 1 Improves Insulin Resistance, Lipid Metabolism, and Diabetic Nephropathy in Db/Db Mice. *Endocrinology* (2012) 153:1387–96. doi: 10.1210/en.2011-1423
15. Jourdan T, Szanda G, Rosenberg AZ, Tam J, Earley BJ, Godlewski G, et al. Overactive Cannabinoid 1 Receptor in Podocytes Drives Type 2 Diabetic Nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111:E5420–8. doi: 10.1073/pnas.1419901111
16. Udi S, Hinden L, Earley B, Drori A, Reuveni N, Hadar R, et al. Proximal Tubular Cannabinoid-1 Receptor Regulates Obesity-Induced CKD. *J Am Soc Nephrol JASN* (2017) 28:3518–32. doi: 10.1681/ASN.2016101085
17. Hinden L, Udi S, Drori A, Gammal A, Nemirovski A, Hadar R, et al. Modulation of Renal GLUT2 by the Cannabinoid-1 Receptor: Implications for the Treatment of Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol JASN* (2018) 29:434–48. doi: 10.1681/ASN.2017040371
18. Jourdan T, Park JK, Varga ZV, Pálóczi J, Coffey NJ, Rosenberg AZ, et al. Cannabinoid-1 Receptor Deletion in Podocytes Mitigates Both Glomerular and Tubular Dysfunction in a Mouse Model of Diabetic Nephropathy. *Diabetes Obes Metab* (2018) 20:698–708. doi: 10.1111/dom.13150
19. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a Cannabinoid Receptor and Functional Expression of the Cloned cDNA. *Nature* (1990) 346:561–4. doi: 10.1038/346561a0
20. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular Characterization of a Peripheral Receptor for Cannabinoids. *Nature* (1993) 365:61–5. doi: 10.1038/365061a0
21. Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitot F, Aubert JF, Beslot F, et al. Unresponsiveness to Cannabinoids and Reduced Addictive Effects of Opiates in CB1 Receptor Knockout Mice. *Science* (1999) 283:401–4. doi: 10.1126/science.283.5400.401
22. Howlett AC, Blume LC, Dalton GD. CB1 Cannabinoid Receptors and Their Associated Proteins. *Curr Med Chem* (2010) 17:1382. doi: 10.2174/092986710790980023
23. O’Keefe L, Simcocks AC, Hryciw DH, Mathai ML, McAinch AJ. The Cannabinoid Receptor 1 and its Role in Influencing Peripheral Metabolism. *Diabetes Obes Metab* (2014) 16:294–304. doi: 10.1111/dom.12144
24. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science* (1992) 258:1946–9. doi: 10.1126/science.1470919
25. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an Endogenous 2-Monoglyceride, Present in Canine Gut, That Binds to Cannabinoid Receptors. *Biochem Pharmacol* (1995) 50:83–90. doi: 10.1016/0006-2952(95)00109-D
26. Koura Y, Ichihara A, Tada Y, Kaneshiro Y, Okada H, Temm CJ, et al. Anandamide Decreases Glomerular Filtration Rate Through Predominant Vasodilation of Efferent Arterioles in Rat Kidneys. *J Am Soc Nephrol JASN* (2004) 15:1488–94. doi: 10.1097/01.ASN.0000130561.82631.BC
27. Larrinaga G, Varona A, Pérez I, Sanz B, Ugalde A, Cándenas ML, et al. Expression of Cannabinoid Receptors in Human Kidney. *Histol Histopathol* (2010) 25:1133–8. doi: 10.14670/HH-25.1133
28. Dao M, Lecru L, Vandermeersch S, Ferreira M, Ferlicot S, Posseme K, et al. The Cannabinoid Receptor 1 is Involved in Renal Fibrosis During Chronic Allograft Dysfunction: Proof of Concept. *J Cell Mol Med* (2019) 23 (11):7279–88. doi: 10.1111/jcmm.14570
29. Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rössner S. RIO-Europe Study Group. Effects of the Cannabinoid-1 Receptor Blocker Rimonabant on Weight Reduction and Cardiovascular Risk Factors in Overweight Patients: 1-Year Experience From the RIO-Europe Study. *Lancet Lond Engl* (2005) 365:1389–97. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66374-X
30. Després J-P, Golay A, Sjöström L. Rimonabant in Obesity-Lipids Study Group. Effects of Rimonabant on Metabolic Risk Factors in Overweight Patients With Dyslipidemia. *N Engl J Med* (2005) 353:2121–34. doi: 10.1056/NEJMoa044537
31. Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J. RIO-North America Study Group. Effect of Rimonabant, a Cannabinoid-1 Receptor Blocker, on Weight and Cardiometabolic Risk Factors in Overweight or Obese Patients: RIO-North America: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* (2006) 295:761–75. doi: 10.1001/jama.295.7.761
32. Triay J, Mundi M, Klein S, Toledo FG, Smith SR, Abu-Lebdeh H, et al. Does Rimonabant Independently Affect Free Fatty Acid and Glucose Metabolism? *J Clin Endocrinol Metab* (2012) 97:819–27. doi: 10.1210/jc.2011-2486
33. Després J-P, Ross R, Boka G, Alméras N, Lemieux I. ADAGIO-Lipids Investigators. Effect of Rimonabant on the High-Triglyceride/Low-HDL-Cholesterol Dyslipidemia, Intraabdominal Adiposity, and Liver Fat: The ADAGIO-Lipids Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2009) 29:416–23. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.176362
34. Rosenstock J, Hollander P, Chevalier S, Iranmanesh A. SERENADE Study Group. SERENADE: The Study Evaluating Rimonabant Efficacy in Drug-Naive Diabetic Patients: Effects of Monotherapy With Rimonabant, the First Selective CB1 Receptor Antagonist, on Glycemic Control, Body Weight, and Lipid Profile in Drug-Naive Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* (2008) 31:2169–76. doi: 10.2337/dc08-0386
35. Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K, Rodés-Cabau J, Cannon CP, Deanfield JE, et al. Effect of Rimonabant on Progression of Atherosclerosis in Patients With Abdominal Obesity and Coronary Artery Disease: The STRADIVARIUS Randomized Controlled Trial. *JAMA* (2008) 299:1547–60. doi: 10.1001/jama.299.13.1547
36. Topol EJ, Bousser M-G, Fox KAA, Creager MA, Despres J-P, Easton JD, et al. Rimonabant for Prevention of Cardiovascular Events (CRESCENDO): A Randomised, Multicentre, Placebo-Controlled Trial. *Lancet Lond Engl* (2010) 376:517–23. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60935-X
37. Cinar R, Iyer MR, Kunos G. The Therapeutic Potential of Second and Third Generation CB1R Antagonists. *Pharmacol Ther* (2020) 208:107477. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107477
38. Tam J, Vemuri VK, Liu J, Bätikai S, Mukhopadhyay B, Godlewski G, et al. Peripheral CB1 Cannabinoid Receptor Blockade Improves Cardiometabolic Risk in Mouse Models of Obesity. *J Clin Invest* (2010) 120:2953–66. doi: 10.1172/JCI42551
39. Barutta F, Grimaldi S, Gambino R, Vemuri K, Makriyannis A, Annaratone L, et al. Dual Therapy Targeting the Endocannabinoid System Prevents Experimental Diabetic Nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* (2017) 32:1655–65. doi: 10.1093/ndt/gfx010
40. Barutta F, Bellini S, Mastrocola R, Gambino R, Piscitelli F, di Marzo V, et al. Reversal of Albuminuria by Combined AM6545 and Perindopril Therapy in

- Experimental Diabetic Nephropathy. *Br J Pharmacol* (2018) 175:4371–85. doi: 10.1111/bph.14495
41. Roger C, Buch C, Muller T, Leemput J, Demizieux L, Passilly-Degrace P, et al. Simultaneous Inhibition of Peripheral CB1R and iNOS Mitigates Obesity-Related Dyslipidemia Through Distinct Mechanisms. *Diabetes* (2020) 69:2120–32. doi: 10.2337/db20-0078
 42. Liu Z, Iyer MR, Godlewski G, Jourdan T, Liu J, Coffey NJ, et al. Functional Selectivity of a Biased Cannabinoid-1 Receptor (CB1R) Antagonist. *ACS Pharmacol Transl Sci* (2021) 4(3):1175–87. doi: 10.1021/acspsci.1c00048
 43. Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Das SK, et al. Production and Physiological Actions of Anandamide in the Vasculature of the Rat Kidney. *J Clin Invest* (1997) 100:1538–46. doi: 10.1172/JCI119677
 44. Mukhopadhyay P, Pan H, Rajesh M, Bátkai S, Patel V, Harvey-White J, et al. CB1 Cannabinoid Receptors Promote Oxidative/Nitrosative Stress, Inflammation and Cell Death in a Murine Nephropathy Model. *Br J Pharmacol* (2010) 160:657–68. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00769.x
 45. Janiak P, Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C, Pierre F, Gouraud L, et al. Blockade of Cannabinoid CB1 Receptors Improves Renal Function, Metabolic Profile, and Increased Survival of Obese Zucker Rats. *Kidney Int* (2007) 72:1345–57. doi: 10.1038/sj.ki.5002540
 46. Silva GB, Atchison DK, Juncos LI, García NH. Anandamide Inhibits Transport-Related Oxygen Consumption in the Loop of Henle by Activating CB1 Receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* (2013) 304:F376–81. doi: 10.1152/ajprenal.00239.2012
 47. Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, et al. An Amino-Terminal Variant of the Central Cannabinoid Receptor Resulting From Alternative Splicing. *J Biol Chem* (1995) 270:3726–31. doi: 10.1074/jbc.270.8.3726
 48. Jenkin KA, McAinch AJ, Grinfeld E, Hryciw DH. Role for Cannabinoid Receptors in Human Proximal Tubular Hypertrophy. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* (2010) 26:879–86. doi: 10.1159/000323997
 49. Torlakovic EE, Francis G, Garratt J, Gilks B, Hyjek E, Ibrahim M, et al. Standardization of Negative Controls in Diagnostic Immunohistochemistry: Recommendations From the International Ad Hoc Expert Panel. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM* (2014) 22:241–52. doi: 10.1097/PAL.0000000000000069
 50. Torlakovic EE, Nielsen S, Francis G, Garratt J, Gilks B, Goldsmith JD, et al. Standardization of Positive Controls in Diagnostic Immunohistochemistry: Recommendations From the International Ad Hoc Expert Committee. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM* (2015) 23:1–18. doi: 10.1097/PAL.0000000000000163
 51. Udi S, Hinden L, Ahmad M, Drori A, Iyer MR, Cinar R, et al. Dual Inhibition of Cannabinoid CB1 Receptor and Inducible NOS Attenuates Obesity-Induced Chronic Kidney Disease. *Br J Pharmacol* (2020) 177:110–27. doi: 10.1111/bph.14849
 52. Tam J. The Emerging Role of the Endocannabinoid System in the Pathogenesis and Treatment of Kidney Diseases. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* (2016) 27:267–76. doi: 10.1515/jbcpp-2015-0055
 53. Barutta F, Piscitelli F, Pinach S, Bruno G, Gambino R, Rastaldi MP, et al. Protective Role of Cannabinoid Receptor Type 2 in a Mouse Model of Diabetic Nephropathy. *Diabetes* (2011) 60:2386–96. doi: 10.2337/db10-1809
 54. Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and Degradation of Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol and Their Possible Physiological Significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (2002) 66:173–92. doi: 10.1054/plef.2001.0356
 55. Long JZ, LaCava M, Jin X, Cravatt BF. An Anatomical and Temporal Portrait of Physiological Substrates for Fatty Acid Amide Hydrolase. *J Lipid Res* (2011) 52:337–44. doi: 10.1194/jlr.M012153
 56. Ritter JK, Li G, Xia M, Boini K. Anandamide and its Metabolites: What are Their Roles in the Kidney? *Front Biosci Sch Ed* (2016) 8:264–77. doi: 10.2741/s461
 57. Basith S, Cui M, Macalino SFY, Park J, Clavio NAB, Kang S, et al. Exploring G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) Ligand Space via Cheminformatics Approaches: Impact on Rational Drug Design. *Front Pharmacol* (2018) 9:128. doi: 10.3389/fphar.2018.00128
 58. Haspula D, Clark MA. Cannabinoid Receptors: An Update on Cell Signaling, Pathophysiological Roles and Therapeutic Opportunities in Neurological, Cardiovascular, and Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci* (2020) 21(20):7693. doi: 10.3390/ijms21207693
 59. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* (2006) 58:389–462. doi: 10.1124/pr.58.3.2
 60. Natarajan V, Schmid PC, Reddy PV, Zuzarte-Augustin ML, Schmid HH. Biosynthesis of N-Acylethanolamine Phospholipids by Dog Brain Preparations. *J Neurochem* (1983) 41:1303–12. doi: 10.1111/j.1471-4159.1983.tb00825.x
 61. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, et al. Formation and Inactivation of Endogenous Cannabinoid Anandamide in Central Neurons. *Nature* (1994) 372:686–91. doi: 10.1038/372686a0
 62. Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D. Biosynthesis of an Endogenous Cannabinoid Precursor in Neurons and its Control by Calcium and cAMP. *J Neurosci* (1996) 16:3934–42. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-12-03934.1996
 63. Jin X-H, Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Discovery and Characterization of a Ca²⁺-Independent Phosphatidylethanolamine N-Acyltransferase Generating the Anandamide Precursor and its Congeners. *J Biol Chem* (2007) 282:3614–23. doi: 10.1074/jbc.M606369200
 64. Tsuboi K, Uyama T, Okamoto Y, Ueda N. Endocannabinoids and Related N-Acylethanolamines: Biological Activities and Metabolism. *Inflammation Regen* (2018) 38:28. doi: 10.1186/s41232-018-0086-5
 65. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Tonegawa T, Nakane S, Yamashita A, et al. Enzymatic Synthesis of Anandamide, an Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand, Through N-Acylphosphatidylethanolamine Pathway in Testis: Involvement of Ca(2+)-Dependent Transacylase and Phosphodiesterase Activities. *Biochem Biophys Res Commun* (1996) 218:113–7. doi: 10.1006/bbrc.1996.0020
 66. Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Molecular Characterization of a Phospholipase D Generating Anandamide and its Congeners. *J Biol Chem* (2004) 279:5298–305. doi: 10.1074/jbc.M306642200
 67. Leung D, Saghatelian A, Simon GM, Cravatt BF. Inactivation of N-Acyl Phosphatidylethanolamine Phospholipase D Reveals Multiple Mechanisms for the Biosynthesis of Endocannabinoids. *Biochemistry* (2006) 45:4720–6. doi: 10.1021/bi060163l
 68. Tsuboi K, Okamoto Y, Ikematsu N, Inoue M, Shimizu Y, Uyama T, et al. Enzymatic Formation of N-Acylethanolamines From N-Acylethanolamine Plasmalogen Through N-Acylphosphatidylethanolamine-Hydrolyzing Phospholipase D-Dependent and -Independent Pathways. *Biochim Biophys Acta* (2011) 1811:565–77. doi: 10.1016/j.bbali.2011.07.009
 69. Leishman E, Mackie K, Luquet S, Bradshaw HB. Lipidomics Profile of a NAPE-PLD KO Mouse Provides Evidence of a Broader Role of This Enzyme in Lipid Metabolism in the Brain. *Biochim Biophys Acta* (2016) 1861:491–500. doi: 10.1016/j.bbali.2016.03.003
 70. Inoue M, Tsuboi K, Okamoto Y, Hidaka M, Uyama T, Tsutsumi T, et al. Peripheral Tissue Levels and Molecular Species Compositions of N-Acyl-Phosphatidylethanolamine and its Metabolites in Mice Lacking N-Acyl-Phosphatidylethanolamine-Specific Phospholipase D. *J Biochem (Tokyo)* (2017) 162:449–58. doi: 10.1093/jb/mvx054
 71. Simon GM, Cravatt BF. Endocannabinoid Biosynthesis Proceeding Through Glycerophospho-N-Acyl Ethanolamine and a Role for Alpha/Beta-Hydrolase 4 in This Pathway. *J Biol Chem* (2006) 281:26465–72. doi: 10.1074/jbc.M604660200
 72. Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, et al. A Biosynthetic Pathway for Anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103:13345–50. doi: 10.1073/pnas.0601832103
 73. Sun Y-X, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I, et al. Biosynthesis of Anandamide and N-Palmitoylethanolamine by Sequential Actions of Phospholipase A2 and Lysophospholipase D. *Biochem J* (2004) 380:749–56. doi: 10.1042/BJ20040031
 74. Sampaio LS, Taveira Da Silva R, Lima D, Sampaio CLC, Iannotti FA, Mazzarella E, et al. The Endocannabinoid System in Renal Cells: Regulation of Na(+) Transport by CB1 Receptors Through Distinct Cell Signalling Pathways. *Br J Pharmacol* (2015) 172:4615–25. doi: 10.1111/bph.13050
 75. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular Characterization of an Enzyme That Degrades Neuromodulatory Fatty-Acid Amides. *Nature* (1996) 384:83–7. doi: 10.1038/384083a0

76. Arreaza G, Devane WA, Omeir RL, Sajjani G, Kunz J, Cravatt BF, et al. The Cloned Rat Hydrolytic Enzyme Responsible for the Breakdown of Anandamide Also Catalyzes its Formation via the Condensation of Arachidonic Acid and Ethanolamine. *Neurosci Lett* (1997) 234:59–62. doi: 10.1016/s0304-3940(97)00673-3

77. Giang DK, Cravatt BF. Molecular Characterization of Human and Mouse Fatty Acid Amide Hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94:2238–42. doi: 10.1073/pnas.94.6.2238

78. Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF. A Second Fatty Acid Amide Hydrolase With Variable Distribution Among Placental Mammals. *J Biol Chem* (2006) 281:36569–78. doi: 10.1074/jbc.M606646200

79. Ritter JK, Li C, Xia M, Poklis JL, Lichtman AH, Abdullah RA, et al. Production and Actions of the Anandamide Metabolite Prostaglandin E2 in the Renal Medulla. *J Pharmacol Exp Ther* (2012) 342:770–9. doi: 10.1124/jpet.112.196451

80. Breyer MD, Harris RC. Cyclooxygenase 2 and the Kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2001) 10:89–98. doi: 10.1097/00041552-200101000-00014

81. González-Núñez D, Solé M, Natarajan R, Poch E. 12-Lipoxygenase Metabolism in Mouse Distal Convoluted Tubule Cells. *Kidney Int* (2005) 67:178–86. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00068.x

82. Gohara A, Eltaki N, Sabry D, Murtagh D, Jankun J, Selman SH, et al. Human 5-, 12- and 15-Lipoxygenase-1 Coexist in Kidney But Show Opposite Trends and Their Balance Changes in Cancer. *Oncol Rep* (2012) 28:1275–82. doi: 10.3892/or.2012.1924

83. Sridar C, Snider NT, Hollenberg PF. Anandamide Oxidation by Wild-Type and Polymorphically Expressed CYP2B6 and CYP2D6. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* (2011) 39:782–8. doi: 10.1124/dmd.110.036707

84. Snider NT, Kornilov AM, Kent UM, Hollenberg PF. Anandamide Metabolism by Human Liver and Kidney Microsomal Cytochrome P450 Enzymes to Form Hydroxyeicosatetraenoic and Epoxyeicosatrienoic Acid Ethanolamides. *J Pharmacol Exp Ther* (2007) 321:590–7. doi: 10.1124/jpet.107.119321

85. Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, Pharmacology and Physiology of 2-Arachidonoylglycerol, an Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand. *Prog Lipid Res* (2006) 45:405–46. doi: 10.1016/j.plipres.2006.03.003

86. Blankman JL, Cravatt BF. Chemical Probes of Endocannabinoid Metabolism. *Pharmacol Rev* (2013) 65:849–71. doi: 10.1124/pr.112.006387

87. Bisogno T, Melck D, Bobrov M, Gretskey NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, et al. N-Acyl-Dopamines: Novel Synthetic CB(1) Cannabinoid-Receptor Ligands and Inhibitors of Anandamide Inactivation With Cannabinomimetic Activity *In Vitro* and *In Vivo*. *Biochem J* (2000) 351 Pt 3:817–24. doi: 10.1042/bj3510817

88. Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, et al. 2-Arachidonoyl Glyceryl Ether, an Endogenous Agonist of the Cannabinoid CB1 Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98:3662–5. doi: 10.1073/pnas.061029898

89. Heimann AS, Gomes I, Dale CS, Pagano RL, Gupta A, de Souza LL, et al. Hemopressin is an Inverse Agonist of CB1 Cannabinoid Receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104:20588–93. doi: 10.1073/pnas.0706980105

90. Gomes I, Grushko JS, Golebiewska U, Hoogendoorn S, Gupta A, Heimann AS, et al. Novel Endogenous Peptide Agonists of Cannabinoid Receptors. *FASEB J* (2009) 23:3020–9. doi: 10.1096/fj.09-132142

91. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol Rev* (2002) 54:161–202. doi: 10.1124/pr.54.2.161

92. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sörgård M, Di Marzo V, et al. Vanilloid Receptors on Sensory Nerves Mediate the Vasodilator Action of Anandamide. *Nature* (1999) 400:452–7. doi: 10.1038/22761

93. Pegorini S, Zani A, Braidà D, Guerini-Rocco C, Sala M. Vanilloid VR1 Receptor is Involved in Rimobant-Induced Neuroprotection. *Br J Pharmacol* (2006) 147:552–9. doi: 10.1038/sj.bjp.0706656

94. Hansen HH, Azcoitia I, Pons S, Romero J, Garcia-Segura LM, Ramos JA, et al. Blockade of Cannabinoid CB(1) Receptor Function Protects Against *In Vivo* Disseminating Brain Damage Following NMDA-Induced Excitotoxicity. *J Neurochem* (2002) 82:154–8. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00961.x

95. De Petrocellis L, Bisogno T, Maccarrone M, Davis JB, Finazzi-Agro A, Di Marzo V. The Activity of Anandamide at Vanilloid VR1 Receptors Requires Facilitated Transport Across the Cell Membrane and is Limited by Intracellular Metabolism. *J Biol Chem* (2001) 276:12856–63. doi: 10.1074/jbc.M00855200

96. Köfalvi A, Vizi ES, Ledent C, Sperlág B. Cannabinoids Inhibit the Release of ³H]Glutamate From Rodent Hippocampal Synaptosomes via a Novel CB1 Receptor-Independent Action. *Eur J Neurosci* (2003) 18:1973–8. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02897.x

97. Berger C, Schmid PC, Schabitz W-R, Wolf M, Schwab S, Schmid HHO. Massive Accumulation of N-Acylethanolamines After Stroke. Cell Signalling in Acute Cerebral Ischemia? *J Neurochem* (2004) 88:1159–67. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02244.x

98. Berdyshev EV, Schmid PC, Krebsbach RJ, Hillard CJ, Huang C, Chen N, et al. Cannabinoid-Receptor-Independent Cell Signalling by N-Acylethanolamines. *Biochem J* (2001) 360:67–75. doi: 10.1042/0264-6021:3600067

99. Hermann H, De Petrocellis L, Bisogno T, Schiano Moriello A, Lutz B, Di Marzo V. Dual Effect of Cannabinoid CB1 Receptor Stimulation on a Vanilloid VR1 Receptor-Mediated Response. *Cell Mol Life Sci CMLS* (2003) 60:607–16. doi: 10.1007/s00180300052

100. Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P. Direct Inhibition of T-Type Calcium Channels by the Endogenous Cannabinoid Anandamide. *EMBO J* (2001) 20:7033–40. doi: 10.1093/emboj/20.24.7033

101. Markó L, Mannaa M, Haschler TN, Krämer S, Gollasch M. Renoprotection: Focus on TRPV1, TRPV4, TRPC6 and TRPM2. *Acta Physiol Oxf Engl* (2017) 219:589–612. doi: 10.1111/apha.12828

102. Chen L, Markó L, Kaßmann M, Zhu Y, Wu K, Gollasch M. Role of TRPV1 Channels in Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury. *PLoS One* (2014) 9:e109842. doi: 10.1371/journal.pone.0109842

103. Ueda K, Tsuji F, Hirata T, Takaoka M, Matsumura Y. Preventive Effect of TRPV1 Agonists Capsaicin and Resiniferatoxin on Ischemia/Reperfusion-Induced Renal Injury in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol* (2008) 51:513–20. doi: 10.1097/FJC.0b013e31816f6884

104. Tsagogiorgas C, Wedel J, Hottenrott M, Schneider MO, Binzen U, Greffrath W, et al. N-Octanoyl-Dopamine is an Agonist at the Capsaicin Receptor TRPV1 and Mitigates Ischemia-Induced [Corrected] Acute Kidney Injury in Rat. *PLoS One* (2012) 7:e43525. doi: 10.1371/journal.pone.0043525

105. Cinar R, Iyer MR, Liu Z, Cao Z, Jourdan T, Erdelyi K, et al. Hybrid Inhibitor of Peripheral Cannabinoid-1 Receptors and Inducible Nitric Oxide Synthase Mitigates Liver Fibrosis. *JCI Insight* (2016) 1(11):e87336. doi: 10.1172/jci.insight.87336

106. Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Abood ME. Evaluation of Binding in a Transfected Cell Line Expressing a Peripheral Cannabinoid Receptor (CB2): Identification of Cannabinoid Receptor Subtype Selective Ligands. *J Pharmacol Exp Ther* (1996) 278:989–99.

107. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SPH, Marzo VD, Elphick MR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev* (2010) 62:588–631. doi: 10.1124/pr.110.003004

108. Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, et al. SR141716A, a Potent and Selective Antagonist of the Brain Cannabinoid Receptor. *FEBS Lett* (1994) 350:240–4. doi: 10.1016/0014-5793(94)00773-x

109. Chorvat RJ, Berbaum J, Seniacki K, McElroy JF. JD-5006 and JD-5037: Peripherally Restricted (PR) Cannabinoid-1 Receptor Blockers Related to SLV-319 (Ibipinabant) as Metabolic Disorder Therapeutics Devoid of CNS Liabilities. *Bioorg Med Chem Lett* (2012) 22:6173–80. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.08.004

110. Tam J, Cinar R, Liu J, Godlewski G, Wesley D, Jourdan T, et al. Peripheral Cannabinoid-1 Receptor Inverse Agonism Reduces Obesity by Reversing Leptin Resistance. *Cell Metab* (2012) 16:167–79. doi: 10.1016/j.cmet.2012.07.002

111. Cluny NL, Vemuri VK, Chambers AP, Limebeer CL, Bedard H, Wood JT, et al. A Novel Peripherally Restricted Cannabinoid Receptor Antagonist, AM6545, Reduces Food Intake and Body Weight, But Does Not Cause Malaise, in Rodents. *Br J Pharmacol* (2010) 161:629–42. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00908.x

112. Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A. ¹²³I-Labeled AM251: A Radioiodinated Ligand Which Binds *in vivo* to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* (1996) 307:331–8. doi: 10.1016/0014-2999(96)00279-8

113. Lan R, Liu Q, Fan P, Lin S, Fernando SR, McCallion D, et al. Structure-Activity Relationships of Pyrazole Derivatives as Cannabinoid Receptor Antagonists. *J Med Chem* (1999) 42:769–76. doi: 10.1021/jm980363y

114. Lange JHM, Coolen HKAC, van Stuivenberg HH, Dijkman JAR, Herremans AHJ, Ronken E, et al. Synthesis, Biological Properties, and Molecular Modeling Investigations of Novel 3,4-Diarylpyrazolines as Potent and Selective CB(1) Cannabinoid Receptor Antagonists. *J Med Chem* (2004) 47:627–43. doi: 10.1021/jm031019q

115. Lan R, Gatley J, Lu Q, Fan P, Fernando SR, Volkow ND, et al. Design and Synthesis of the CB1 Selective Cannabinoid Antagonist AM281: A Potential Human SPECT Ligand. *AAPS PharmSci* (1999) 1:E4. doi: 10.1208/ps010204

116. Abadji V, Lin S, Taha G, Griffin G, Stevenson LA, Pertwee RG, et al. (R)-Methanandamide: A Chiral Novel Anandamide Possessing Higher Potency and Metabolic Stability. *J Med Chem* (1994) 37:1889–93. doi: 10.1021/jm00038a020

117. Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, et al. SR 144528, the First Potent and Selective Antagonist of the CB2 Cannabinoid Receptor. *J Pharmacol Exp Ther* (1998) 284:644–50.

118. Yao BB, Mukherjee S, Fan Y, Garrison TR, Daza AV, Grayson GK, et al. In Vitro Pharmacological Characterization of AM1241: A Protean Agonist at the Cannabinoid CB2 Receptor? *Br J Pharmacol* (2006) 149:145–54. doi: 10.1038/sj.bjp.0706838

119. Huffman JW, Liddle J, Yu S, Aung MM, Abood ME, Wiley JL, et al. 3-(1',1'-Dimethylbutyl)-1-Deoxy-Delta8-THC and Related Compounds: Synthesis of Selective Ligands for the CB2 Receptor. *Bioorg Med Chem* (1999) 7:2905–14. doi: 10.1016/s0968-0896(99)00219-9

120. Hosohata Y, Quock RM, Hosohata K, Makriyannis A, Consroe P, Roeske WR, et al. AM630 Antagonism of Cannabinoid-Stimulated [35S]GTP Gamma S Binding in the Mouse Brain. *Eur J Pharmacol* (1997) 321:R1–3. doi: 10.1016/s0014-2999(97)00047-2

121. Ames F. A Clinical and Metabolic Study of Acute Intoxication With Cannabis Sativa and its Role in the Model Psychoses. *J Ment Sci* (1958) 104:972–99. doi: 10.1192/bjp.104.437.972

122. Sofia RD, Knobloch LC, Harakal JJ, Erikson DJ. Comparative Diuretic Activity of Delta9-Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol, Cannabinol and Hydrochlorothiazide in the Rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther* (1977) 225:77–87.

123. Kapusta DR, Obih JC. Central Kappa Opioid Receptor-Evoked Changes in Renal Function in Conscious Rats: Participation of Renal Nerves. *J Pharmacol Exp Ther* (1993) 267:197–204.

124. Kapusta DR, Obih JC. Central Kappa Opioids Blunt the Renal Excretory Responses to Volume Expansion by a Renal Nerve-Dependent Mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* (1995) 273:199–205.

125. Di S, Boudaba C, Popescu IR, Weng F-J, Harris C, Marcheselli VL, et al. Activity-Dependent Release and Actions of Endocannabinoids in the Rat Hypothalamic Supraoptic Nucleus. *J Physiol* (2005) 569:751–60. doi: 10.1113/jphysiol.2005.097477

126. Soya A, Serino R, Fujihara H, Onaka T, Ozaki Y, Saito T, et al. Cannabinoids Modulate Synaptic Activity in the Rat Supraoptic Nucleus. *J Neuroendocrinol* (2005) 17:609–15. doi: 10.1111/j.1365-2826.2005.01350.x

127. Chopda GR, Vemuri VK, Sharma R, Thakur GA, Makriyannis A, Paronis CA. Diuretic Effects of Cannabinoid Agonists in Mice. *Eur J Pharmacol* (2013) 721:64–9. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.09.053

128. Li J, Wang DH. Differential Mechanisms Mediating Depressor and Diuretic Effects of Anandamide. *J Hypertens* (2006) 24:2271–6. doi: 10.1097/01.hjh.0000249706.42230.a8

129. Paronis CA, Thakur GA, Bajaj S, Nikas SP, Vemuri VK, Makriyannis A, et al. Diuretic Effects of Cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther* (2013) 344:8–14. doi: 10.1124/jpet.112.199331

130. Ritter JK, Ahmad A, Mummalaneni S, Daneva Z, Dempsey SK, Li N, et al. Mechanism of Diuresis and Natriuresis by Cannabinoids: Evidence for Inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase in Mouse Kidney Thick Ascending Limb Tubules. *J Pharmacol Exp Ther* (2021) 376:1–11. doi: 10.1124/jpet.120.000163

131. Sampaio LS, Iannotti FA, Veneziani L, Borelli-Tórres RT, De Maio F, Piscitelli F, et al. Experimental Ischemia/Reperfusion Model Impairs Endocannabinoid Signaling and Na⁺/K⁺ ATPase Expression and Activity in Kidney Proximal Tubule Cells. *Biochem Pharmacol* (2018) 154:482–91. doi: 10.1016/j.bcp.2018.06.005

132. Vollmer RR, Cavero I, Ertel RJ, Solomon TA, Buckley JP. Role of the Central Autonomic Nervous System in the Hypotension and Bradycardia Induced by (-)-Delta 9-Trans-Tetrahydrocannabinol. *J Pharm Pharmacol* (1974) 26:186–92. doi: 10.1111/j.2042-7158.1974.tb09252.x

133. Lake KD, Compton DR, Varga K, Martin BR, Kunos G. Cannabinoid-Induced Hypotension and Bradycardia in Rats Mediated by CB1-Like Cannabinoid Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* (1997) 281:1030–7.

134. Benowitz NL, Jones RT. Cardiovascular Effects of Prolonged Delta-9-Tetrahydrocannabinol Ingestion. *Clin Pharmacol Ther* (1975) 18:287–97. doi: 10.1002/cpt1975183287

135. Cavero I, Buckley JP, Jandhyala BS. Hemodynamic and Myocardial Effects of (-)-Delta9-Trans-Tetrahydrocannabinol in Anesthetized Dogs. *Eur J Pharmacol* (1973) 24:243–51. doi: 10.1016/0014-2999(73)90078-2

136. Varga K, Lake K, Martin BR, Kunos G. Novel Antagonist Implicates the CB1 Cannabinoid Receptor in the Hypotensive Action of Anandamide. *Eur J Pharmacol* (1995) 278:279–83. doi: 10.1016/0014-2999(95)00181-j

137. Siqueira SW, Lapa AJ, Ribeiro do Valle J. The Triple Effect Induced by Delta 9-Tetrahydrocannabinol on the Rat Blood Pressure. *Eur J Pharmacol* (1979) 58:351–7. doi: 10.1016/0014-2999(79)90305-4

138. Malinowska B, Baranowska-Kuczko M, Schlicker E. Triphasic Blood Pressure Responses to Cannabinoids: Do We Understand the Mechanism? *Br J Pharmacol* (2012) 165:2073–88. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01747.x

139. Vidrio H, Sánchez-Salvatori MA, Medina M. Cardiovascular Effects of (-)-11-OH-Delta 8-Tetrahydrocannabinol-Dimethylheptyl in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol* (1996) 28:332–6. doi: 10.1097/00005344-199608000-00022

140. Seagard JL, Dean C, Patel S, Rademacher DJ, Hopp FA, Schmeling WT, et al. Anandamide Content and Interaction of Endocannabinoid/GABA Modulatory Effects in the NTS on Baroreflex-Evoked Sympathoinhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2004) 286:H992–1000. doi: 10.1152/ajpheart.00870.2003

141. Gyombolai P, Pap D, Turu G, Catt KJ, Bagdy G, Hunyady L. Regulation of Endocannabinoid Release by G Proteins: A Paracrine Mechanism of G Protein-Coupled Receptor Action. *Mol Cell Endocrinol* (2012) 353:29–36. doi: 10.1016/j.mce.2011.10.011

142. Bonz A, Laser M, Küllmer S, Kniesch S, Babin-Ebell J, Popp V, et al. Cannabinoids Acting on CB1 Receptors Decrease Contractile Performance in Human Atrial Muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* (2003) 41:657–64. doi: 10.1097/00005344-200304000-00020

143. White R, Ho WS, Bottrill FE, Ford WR, Hiley CR. Mechanisms of Anandamide-Induced Vasorelaxation in Rat Isolated Coronary Arteries. *Br J Pharmacol* (2001) 134:921–9. doi: 10.1038/sj.bjp.0704333

144. O'Sullivan SE, Kendall DA, Randall MD. The Effects of Delta9-Tetrahydrocannabinol in Rat Mesenteric Vasculature, and its Interactions With the Endocannabinoid Anandamide. *Br J Pharmacol* (2005) 145:514–26. doi: 10.1038/sj.bjp.0706218

145. O'Sullivan SE, Kendall DA, Randall MD. Vascular Effects of Delta 9-Tetrahydrocannabinol (THC), Anandamide and N-Arachidonoyldopamine (NADA) in the Rat Isolated Aorta. *Eur J Pharmacol* (2005) 507:211–21. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.11.056

146. Wagner JA, Abesser M, Karcher J, Laser M, Kunos G. Coronary Vasodilator Effects of Endogenous Cannabinoids in Vasopressin-Precontracted Unpaced Rat Isolated Hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* (2005) 46:348–55. doi: 10.1097/01.fjc.0000175437.87283.f2

147. Dannert MT, Alsasua A, Herradon E, Martín MI, López-Miranda V. Vasorelaxant Effect of Win 55,212-2 in Rat Aorta: New Mechanisms Involved. *Vasc Pharmacol* (2007) 46:16–23. doi: 10.1016/j.vph.2006.06.005

148. Szekeres M, Nádasy GL, Soltész-Katona E, Hunyady L. Control of Myogenic Tone and Agonist Induced Contraction of Intramural Coronary Resistance Arterioles by Cannabinoid Type 1 Receptors and Endocannabinoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2018) 134:77–83. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2017.10.001

149. Járαι Z, Wagner JA, Goparaju SK, Wang L, Razdan RK, Sugiura T, et al. Cardiovascular Effects of 2-Arachidonoyl Glycerol in Anesthetized Mice. *Hypertens Dallas Tex* 1979 (2000) 35:679–84. doi: 10.1161/01.hyp.35.2.679

150. Calignano A, La Rana G, Beltramo M, Makriyannis A, Piomelli D. Potentiation of Anandamide Hypotension by the Transport Inhibitor, AM404. *Eur J Pharmacol* (1997) 337:R1–2. doi: 10.1016/s0014-2999(97)01297-1

151. Bátkai S, Pacher P, Osei-Hyiaman D, Radaeva S, Liu J, Harvey-White J, et al. Endocannabinoids Acting at Cannabinoid-1 Receptors Regulate Cardiovascular Function in Hypertension. *Circulation* (2004) 110:1996–2002. doi: 10.1161/01.CIR.0000143230.23252.D2

152. Kosersky DS. Antihypertensive Effects of Delta9-Tetrahydrocannabinol. *Arch Int Pharmacodyn Ther* (1978) 233:76–81.

153. Lake KD, Martin BR, Kunos G, Varga K. Cardiovascular Effects of Anandamide in Anesthetized and Conscious Normotensive and Hypertensive Rats. *Hypertens Dallas Tex* 1979 (1997) 29:1204–10. doi: 10.1161/01.hyp.29.5.1204

154. Szekeres M, Nádasy GL, Turu G, Soltész-Katona E, Tóth ZE, Balla A, et al. Angiotensin II Induces Vascular Endocannabinoid Release, Which Attenuates its Vasoconstrictor Effect via CB1 cannabinoid receptors. *J Biol Chem* (2012) 287:31540–50. doi: 10.1074/jbc.M112.346296

155. Szekeres M, Nádasy GL, Turu G, Soltész-Katona E, Benyó Z, Offermanns S, et al. Endocannabinoid-Mediated Modulation of Gq/11 Protein-Coupled Receptor Signaling-Induced Vasoconstriction and Hypertension. *Mol Cell Endocrinol* (2015) 403:46–56. doi: 10.1016/j.mce.2015.01.012

156. Schrankl J, Fuchs M, Broecker K, Daniel C, Kurtz A, Wagner C. Localization of Angiotensin II Type 1 Receptor Gene Expression in Rodent and Human Kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* (2021) 320:F644–53. doi: 10.1152/ajprenal.00550.2020

157. Crowley SD, Coffman TM. In Hypertension, the Kidney Breaks Your Heart. *Curr Cardiol Rep* (2008) 10:470–6. doi: 10.1007/s11886-008-0074-5

158. Rozenfeld R, Gupta A, Gagnidze K, Lim MP, Gomes I, Lee-Ramos D, et al. AT1R-Cb1R Heteromerization Reveals a New Mechanism for the Pathogenic Properties of Angiotensin II. *EMBO J* (2011) 30:2350–63. doi: 10.1038/emboj.2011.139

159. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran Van Nhieu J, Deveaux V, Li L, et al. CB1 Cannabinoid Receptor Antagonism: A New Strategy for the Treatment of Liver Fibrosis. *Nat Med* (2006) 12:671–6. doi: 10.1038/nm1421

160. Patsenker E, Stoll M, Millonig G, Agaimy A, Wissniowski T, Schneider V, et al. Cannabinoid Receptor Type I Modulates Alcohol-Induced Liver Fibrosis. *Mol Med Camb Mass* (2011) 17:1285–94. doi: 10.2119/molmed.2011.00149

161. Dai E, Zhang J, Zhang D, Yang L, Wang Y, Jiang X, et al. Rimonabant Inhibits Proliferation, Collagen Secretion and Induces Apoptosis in Hepatic Stellate Cells. *Hepatogastroenterology* (2014) 61:2052–61.

162. Slavic S, Lauer D, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Grzesiak A, Trappiel M, et al. Cannabinoid Receptor 1 Inhibition Improves Cardiac Function and Remodelling After Myocardial Infarction and in Experimental Metabolic Syndrome. *J Mol Med Berl Ger* (2013) 91:811–23. doi: 10.1007/s00109-013-1034-0

163. Bronova I, Smith B, Aydogan B, Weichselbaum RR, Vemuri K, Erdelyi K, et al. Protection From Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis by Peripheral Targeting of Cannabinoid Receptor-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2015) 53:555–62. doi: 10.1165/rcmb.2014-0331OC

164. Cinar R, Gochuico BR, Iyer MR, Jourdan T, Yokoyama T, Park JK, et al. Cannabinoid CB1 Receptor Overactivity Contributes to the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *JCI Insight* (2017) 2(8):e92281. doi: 10.1172/jci.insight.92281

165. Lazzerini PE, Natale M, Giancchetti E, Capecchi PL, Montilli C, Zimbone S, et al. Adenosine A2A Receptor Activation Stimulates Collagen Production in Sclerodermic Dermal Fibroblasts Either Directly and Through a Cross-Talk With the Cannabinoid System. *J Mol Med Berl Ger* (2012) 90:331–42. doi: 10.1007/s00109-011-0824-5

166. Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Van Nhieu JT, Li L, Karsak M, et al. Antifibrogenic Role of the Cannabinoid Receptor CB2 in the Liver. *Gastroenterology* (2005) 128:742–55. doi: 10.1053/j.gastro.2004.12.050

167. Defer N, Wan J, Souktani R, Escoubet B, Perier M, Caramelle P, et al. The Cannabinoid Receptor Type 2 Promotes Cardiac Myocyte and Fibroblast Survival and Protects Against Ischemia/Reperfusion-Induced Cardiomyopathy. *FASEB J* (2009) 23:12120–30. doi: 10.1096/fj.09-129478

168. Servettaz A, Kavian N, Nicco C, Deveaux V, Chéreau C, Wang A, et al. Targeting the Cannabinoid Pathway Limits the Development of Fibrosis and Autoimmunity in a Mouse Model of Systemic Sclerosis. *Am J Pathol* (2010) 177:187–96. doi: 10.2353/ajpath.2010.090763

169. Zhou L, Zhou S, Yang P, Tian Y, Feng Z, Xie X-Q, et al. Targeted Inhibition of the Type 2 Cannabinoid Receptor is a Novel Approach to Reduce Renal Fibrosis. *Kidney Int* (2018) 94:756–72. doi: 10.1016/j.kint.2018.05.023

170. Zhou S, Wu Q, Lin X, Ling X, Miao J, Liu X, et al. Cannabinoid Receptor Type 2 Promotes Kidney Fibrosis Through Orchestrating β -Catenin Signaling. *Kidney Int* (2021) 99:364–81. doi: 10.1016/j.kint.2020.09.025

171. Barutta F, Grimaldi S, Franco I, Bellini S, Gambino R, Pinach S, et al. Deficiency of Cannabinoid Receptor of Type 2 Worsens Renal Functional and Structural Abnormalities in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Kidney Int* (2014) 86(5):979–90. doi: 10.1038/ki.2014.165

172. Chin E, Zhou J, Bondy C. Anatomical and Developmental Patterns of Facilitative Glucose Transporter Gene Expression in the Rat Kidney. *J Clin Invest* (1993) 91:1810–5. doi: 10.1172/JCI116392

173. Thorens B. Glucose Transporters in the Regulation of Intestinal, Renal, and Liver Glucose Fluxes. *Am J Physiol* (1996) 270:G541–553. doi: 10.1152/ajpgi.1996.270.4.G541

174. Marks J, Carvou NJC, Debnam ES, Srail SK, Unwin RJ. Diabetes Increases Facilitative Glucose Uptake and GLUT2 Expression at the Rat Proximal Tubule Brush Border Membrane. *J Physiol* (2003) 553:137–45. doi: 10.1113/jphysiol.2003.046268

175. Chichger H, Cleasby ME, Srail SK, Unwin RJ, Debnam ES, Marks J. Experimental Type II Diabetes and Related Models of Impaired Glucose Metabolism Differentially Regulate Glucose Transporters at the Proximal Tubule Brush Border Membrane. *Exp Physiol* (2016) 101:731–42. doi: 10.1113/EP085670

176. Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, Brown J. Glucose Transporters in Human Renal Proximal Tubular Cells Isolated From the Urine of Patients With non-Insulin-Dependent Diabetes. *Diabetes* (2005) 54:3427–34. doi: 10.2337/diabetes.54.12.3427

177. Chin E, Zama AM, Landau D, Grönbeck H, Flyvbjerg A, LeRoith D, et al. Changes in Facilitative Glucose Transporter Messenger Ribonucleic Acid Levels in the Diabetic Rat Kidney. *Endocrinology* (1997) 138:1267–75. doi: 10.1210/endo.138.3.5015

178. Cohen M, Kitsberg D, Tsytkin S, Shulman M, Aroeti B, Nahmias Y. Live Imaging of GLUT2 Glucose-Dependent Trafficking and its Inhibition in Polarized Epithelial Cysts. *Open Biol* (2014) 4(7):140091. doi: 10.1098/rsob.140091

179. Haas M. Chronic Allograft Nephropathy or Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy: What is in a Name? *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2014) 23:245–50. doi: 10.1097/01.mnh.0000444811.26884.2d

180. Racusen LC, Regele H. The Pathology of Chronic Allograft Dysfunction. *Kidney Int Suppl* (2010) (119):S27–32. doi: 10.1038/ki.2010.419

181. Pascual J, Pérez-Sáez MJ, Mir M, Crespo M. Chronic Renal Allograft Injury: Early Detection, Accurate Diagnosis and Management. *Transplant Rev Orlando Fla* (2012) 26:280–90. doi: 10.1016/j.trre.2012.07.002

182. Heemann U, Lutz J. Pathophysiology and Treatment Options of Chronic Renal Allograft Damage. *Nephrol Dial Transplant* (2013) 28:2438–46. doi: 10.1093/ndt/gft087

183. Maluf DG, Dumur CI, Suh JL, Lee JK, Cathro HP, King AL, et al. Evaluation of Molecular Profiles in Calcineurin Inhibitor Toxicity Post-Kidney Transplant: Input to Chronic Allograft Dysfunction. *Am J Transplant* (2014) 14:1152–63. doi: 10.1111/ajt.12696

184. Venner JM, Famulski KS, Reeve J, Chang J, Halloran PF. Relationships Among Injury, Fibrosis, and Time in Human Kidney Transplants. *JCI Insight* (2016) 1:e85323. doi: 10.1172/jci.insight.85323

185. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, et al. Identifying Specific Causes of Kidney Allograft Loss. *Am J Transplant* (2009) 9:527–35. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02519.x

186. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the Causes of Kidney Transplant Failure: The Dominant Role of Antibody-Mediated Rejection and Nonadherence. *Am J Transplant Surg* (2012) 12:388–99. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03840.x

187. Roufosse C, Simmonds N, Groningen MC, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, et al. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation* (2018) 102(11):1795–814. doi: 10.1097/TP.0000000000002366

188. Hirsch S, Tam J. Cannabis: From a Plant That Modulates Feeding Behaviors Toward Developing Selective Inhibitors of the Peripheral Endocannabinoid System for the Treatment of Obesity and Metabolic Syndrome. *Toxins* (2019) 11:E275. doi: 10.3390/toxins11050275
189. Chorvat RJ. Peripherally Restricted CB1 Receptor Blockers. *Bioorg Med Chem Lett* (2013) 23:4751–60. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.06.066
190. Iyer MR, Cinar R, Katz A, Gao M, Erdelyi K, Jourdan T, et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel, Non-Brain-Penetrant, Hybrid Cannabinoid CB1R Inverse Agonist/Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Inhibitors for the Treatment of Liver Fibrosis. *J Med Chem* (2017) 60:1126–41. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01504
191. Martin B, Caron N, Jadot I, Colombaro V, Federici G, Depommier C, et al. Evaluation of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibition on Kidney Function and Structure in High-Fat Diet-Induced Kidney Disease. *Exp Physiol* (2018) 103:125–40. doi: 10.1113/EP086594
192. Ozbek E, Ilbey YO, Ozbek M, Simsek A, Cekmen M, Somay A. Melatonin Attenuates Unilateral Ureteral Obstruction-Induced Renal Injury by Reducing Oxidative Stress, iNOS, MAPK, and NF- κ B Expression. *J Endourol* (2009) 23:1165–73. doi: 10.1089/end.2009.0035

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Dao and François. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Le blocage du récepteur cannabinoïde de type 1 : une nouvelle piste thérapeutique dans la maladie rénale chronique

La maladie rénale chronique (MRC) est un enjeu mondial de santé publique. Peu de traitements permettent à ce jour de prévenir sa progression. De plus en plus d'arguments expérimentaux suggèrent que la modulation du système endocannabinoïde, et en particulier de son récepteur de type 1 (CB1R), pourrait être un outil thérapeutique dans la prise en charge de la MRC. CB1R favorise la fibrogenèse rénale indépendamment de l'origine métabolique ou non de la néphropathie. Au cours du syndrome métabolique, de l'obésité et du diabète, le blocage de CB1R améliore les paramètres métaboliques. Il exerce également un rôle anti-fibrosant direct. Dans l'obstruction urétérale unilatérale (UUO), un modèle expérimental murin de fibrose non métabolique, des travaux précédents de notre laboratoire ont montré que le blocage de CB1R réduisait la fibrogenèse rénale par un effet direct sur le myofibroblaste. Notre hypothèse principale était que CB1R favorise la fibrogenèse rénale, indépendamment de sa cause, aussi bien sur les reins natifs que sur les greffons rénaux. Son blocage, génétique ou pharmacologique, pourrait protéger le rein contre la progression de la MRC. Nous avons étayé notre hypothèse par une triple approche : translationnelle, expérimentale chez la souris et *in vitro* avec des lignées de cellules épithéliales tubulaires proximales et de myofibroblastes.

Nous avons tout d'abord développé une nouvelle technique morphométrique d'analyse informatisée de la fibrose rénale après coloration par le rouge Sirius, sans polarisation. Nous avons démontré que cette technique était reproductible, simple à mettre en œuvre mais également suffisamment robuste et sensible pour caractériser des augmentations précoces de la fibrose interstitielle. Nous avons ensuite utilisé cette technique dans une étude translationnelle chez l'homme. Nous avons montré que l'expression de CB1R augmentait fortement au cours de la dysfonction chronique de l'allogreffe (DCA). Il existait 3 mois après la greffe une corrélation positive entre l'expression de CB1R et la fibrose interstitielle. CB1R pourrait donc être un marqueur prédictif du développement de la fibrose interstitielle et de la DCA. *In vitro*, dans un modèle de fibrose médiée par le tacrolimus, le blocage pharmacologique de CB1R réduisait la synthèse de collagène par les cellules épithéliales tubulaires.

Pour finir, dans un modèle expérimental murin de MRC après ischémie-reperfusion (I/R-CKD), nous avons montré que le blocage génétique global ou pharmacologique de CB1R prévenait la MRC. La préservation de la fonction rénale était plus marquée lorsque nous utilisions des inhibiteurs de deuxième ou de troisième génération par rapport au blocage génétique. Dans tous les cas, le blocage de CB1R réduisait significativement la fibrose interstitielle mais n'avait pas de conséquence sur la sévérité des lésions tubulaires. *In vitro*, l'inhibition pharmacologique de CB1R réduisait la synthèse de collagène par les myofibroblastes. De façon inattendue, l'induction d'une délétion de CB1R restreinte aux cellules tubulaires rénales aggravait aussi bien la fonction rénale que la fibrose interstitielle et les lésions tubulaires dans le modèle d'I/R-CKD. Ce résultat surprenant a été confirmé dans un modèle d'UUO. L'effet protecteur du blocage global de CB1R est donc probablement lié à un effet prépondérant sur les myofibroblastes. Il est possible que CB1R joue un rôle protecteur dans la réparation des cellules épithéliales au cours de la nécrose tubulaire aiguë. Des travaux supplémentaires sont nécessaires afin de caractériser plus finement le rôle de CB1R dans les myofibroblastes et dans les cellules tubulaires.

Ainsi, le blocage pharmacologique de CB1R pourrait constituer un nouvel outil dans la prise en charge thérapeutique de la MRC, indépendamment de son origine métabolique. Plusieurs essais cliniques de phases I et II sont en cours pour évaluer la tolérance et la sécurité d'emploi des nouvelles molécules.