



HAL
open science

Rôle de la Heat Shock Protein 27 au cours des glomérulonéphrites extracapillaires

Hamza Sakhi

► **To cite this version:**

Hamza Sakhi. Rôle de la Heat Shock Protein 27 au cours des glomérulonéphrites extracapillaires. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2022. Français. NNT : 2022PA120079 . tel-04510682

HAL Id: tel-04510682

<https://theses.hal.science/tel-04510682>

Submitted on 19 Mar 2024

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

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

Université de Paris-Est Créteil
École doctorale : Sciences de la vie et de la santé

Thèse de doctorat

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Paris-Est Créteil
Spécialité :

**Rôle de la Heat Shock Protein 27 au
cours des glomérulonéphrites
extracapillaires**

Présentée et soutenue par

Hamza SAKHI

Le 13 décembre 2022

Devant le jury composé de :

Madame la Professeure Carmen Garrido
Madame la Docteure Olivia Lenoir
Monsieur le Docteur Morgan Gallazzini
Monsieur le Professeur Laurent Mesnard
Madame la Docteure Lubka Roumenina
Monsieur le Professeur Vincent Audard
Monsieur le Docteur Khalil El Karoui

Présidente du Jury
Rapporteuse
Rapporteur
Examineur
Examinatrice
Directeur de Thèse
Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Je tenais avant tout à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de dédier leur temps à ce travail : madame la professeure Carmen Garrido, madame la docteure Olivia Lenoir, monsieur le docteur Morgan Gallazzini, madame la Docteure Lubka Roumenina et monsieur le Professeur Laurent Mesnard.

Un grand merci au professeur Dil Sahali qui m'a accueilli au sein de son équipe. Merci de sa confiance et de son soutien tout au long de ces années.

A Vincent, un grand merci pour ses conseils, son soutien et son efficacité. Un merci tout particulier pour m'avoir fait découvrir le domaine si intéressant des maladies rares.

A Khalil pour nos longues heures de discussions dans son bureau et ses mille et une idées et projets à la fois.

Je tenais aussi à remercier l'ensemble des collaborateurs et équipes qui ont participé à ce travail.

Je remercie l'ensemble de l'équipe 21 pour toutes ces années, leur aide et soutien.

Je remercie l'ensemble de l'équipe de néphrologie de Mondor avec qui j'ai partagé aussi une période étrange de notre vie à tous.

Enfin, je n'aurais jamais assez de mots pour remercier ceux qui m'ont accompagné ces dernières années.

A ces purs-sangs de la science, Carole et Morgan pour leurs conseils avisés.

A Julie, Margaux, Chloé, Antoine & Jojo qui ont égayé mes longues journées manip'. A Anissa pour son aide et avis d'experte.

A Elsa, Idris et Céline pour avoir supporté mes grognements pendant cette phase charnière thèse/clinicat.

A mes parents et mon frère pour tout ce chemin parcouru (Une trentaine d'années et 1.482,59 km).

A Alma, l'essentiel.

A Anne-Sophie. Non pas pour cela mais pour bien plus, bien au-delà.

Résumé

La glomérulonéphrite extracapillaire (GEC) est une maladie glomérulaire sévère associée à un risque majeur d'insuffisance rénale chronique terminale. Le traitement principal (immunosuppresseur) est associé à des effets secondaires importants, et aucun traitement ne cible à ce jour les mécanismes locaux impliqués dans la formation du croissant extracapillaire. Des études récentes ont identifié les cellules épithéliales pariétales (PEC) glomérulaires comme un composant majeur du croissant. De plus, par sa capacité à s'activer, se différencier, proliférer et migrer, la PEC joue un rôle à part entière dans les mécanismes de formation de cette lésion. La protéine de choc thermique 27 (HSP27/HSPB1) est une protéine ubiquitaire, dont l'expression est induite par divers types de stress. Elle est impliquée dans les fonctions de prolifération, de différenciation et de migration au cours de pathologies cancéreuses notamment. Son importance a mené au développement en oncologie d'un oligonucléotide antisens (OGX-427) dirigé contre le transcrite d'*HSPB1*. De plus, récemment, l'ivermectine, un antiparasitaire, a été identifié comme inhibiteur de la phosphorylation et la fonction d'HSP27. Dans ce travail, nous montrons la surexpression d'HSP27 au sein des croissants au cours des GEC chez l'homme et l'animal. Cette surexpression est identifiée principalement au sein de PEC activées. De plus, le taux sérique d'HSP27 est associé à l'activité des GEC chez l'homme. De façon intéressante, HSP27 n'apparaît pas seulement comme un biomarqueur d'activité mais également comme un acteur du développement des croissants : l'inhibition d'HSP27 par OGX 427 limite les lésions extracapillaires dans un modèle de GEC. En parallèle, nous identifions les mécanismes expliquant le rôle pathogène d'HSP27 au sein des PEC. En effet, l'inhibition d'HSP27 par OGX-427 *in vitro* diminue l'activation des PEC et leur migration. Par ailleurs, l'utilisation de l'ivermectine reproduit les résultats observés sous OGX-427 avec une baisse de l'activation et de la migration des PEC, et une diminution des lésions extracapillaires chez l'animal. Cependant, le traitement par OGX-427 majore les lésions de microangiopathies thrombotiques chez l'animal. De plus, HSP27 module *in vitro* la migration des cellules endothéliales médiée par la signalisation du VEGFR2. En conclusion, ce travail démontre l'importance pathogénique d'HSP27 au cours de la GEC. Il identifie ainsi une nouvelle voie physiopathologique associée à l'activation des PEC et au développement des croissants. Enfin, cette étude met en évidence l'importance d'HSP27 dans l'homéostasie endothéliale. Outre le rôle potentiel d'HSP27 comme biomarqueur d'activité des GEC, cette étude identifie de nouvelles cibles thérapeutiques des GEC chez l'homme.

Mots clefs : Heat Shock Protein (HSP) 27 ; Cellules épithéliales pariétales glomérulaires ; Glomérulonéphrite extracapillaire ; Croissant extracapillaire

Abstract

Crescentic glomerulonephritis (CG) is a severe glomerular disease associated with a major risk of end-stage renal disease. Treatment consists of immunosuppressive therapy leading to significant side effects. No treatment has yet targeted the local mechanisms involved in the formation of the crescent. Recent studies have identified glomerular parietal epithelial cells (PEC) as a major component of the crescent. Moreover, the ability of PEC to activate, dedifferentiate, proliferate, and migrate, suggests that they play a significant role in the mechanisms of lesion formation. Heat shock protein 27 (HSP27/HSPB1) is a ubiquitous protein, which is induced by various types of stress. It is involved in the cellular proliferation, dedifferentiation, and migration especially in cancerous cells. This importance has led to the development in oncology of an antisense oligonucleotide (OGX-427) directed against the HSPB1 transcript. Furthermore, recently, the antiparasitic drug Ivermectin has been identified as inhibiting HSP27 phosphorylation and function. In this work, we show that HSP27 is overexpressed within crescents during CG in humans and animals. This overexpression is identified mainly within activated PEC. Furthermore, serum HSP27 levels are associated with CG activity in humans. Interestingly, HSP27 appears not only as a biomarker of activity but also a player in the development of crescents: inhibition of HSP27 by OGX 427 limits extracapillary damage in a CG model. In parallel, we identified the mechanisms explaining the pathogenic role of HSP27 in PEC. Indeed, the inhibition of HSP27 by OGX-427 in vitro decreased the activation of PEC and their migration. Furthermore, the use of ivermectin resumes the results observed after OGX-427 exposure both in vivo and in vitro. However, treatment with OGX-427 increases thrombotic microangiopathy lesions in animals. In addition, HSP27 modulates in vitro endothelial cell migration mediated by VEGFR2 signaling.

In conclusion, this work demonstrates the pathogenic importance of HSP27 during CG. These results unveil a new pathophysiological pathway associated with PEC activation and crescent development. Furthermore, they highlight the importance of HSP27 in endothelial homeostasis. In addition to the potential role of HSP27 as a biomarker of CG activity, this study identifies new therapeutic targets of CG in humans.

Keywords: Heat Shock Protein (HSP) 27; Glomerular parietal epithelial cell; Crescentic glomerulonephritis

TABLE DES MATIERES

PRINCIPALES ABREVIATIONS.....	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS	9
LISTE DES TABLEAUX.....	9
INTRODUCTION	10
PARTIE I. LA CELLULE EPITHELIALE PARIETALE ET LES MALADIES RENALES GLOMERULAIRES	11
1 LE REIN NORMAL : GENERALITES.....	11
1.1 ANATOMIE ET GRANDES FONCTIONS DU REIN	11
1.2 STRUCTURES RENALES.....	12
1.2.1 Le glomérule.....	12
1.2.2 Le tubule rénal	14
1.2.3 Appareil juxtaglomérulaire.....	15
1.2.4 Interstitium.....	15
1.2.5 Vascularisation	15
2 PATHOLOGIE GLOMERULAIRE : LA GLOMERULONEPHRITE EXTRACAPILLAIRE ET LA HYALINOSE SEGMENTAIRE ET FOCALE	17
2.1 LESION EXTRACAPILLAIRE : CROISSANTS EXTRACAPILLAIRES ET LESIONS DE HYALINOSE SEGMENTAIRE ET FOCALE	17
2.1.1 Définitions	17
2.1.2 La glomérulonéphrite extracapillaire	19
2.1.3 La Hyalinose Segmentaire et Focale.....	26
3 LA CELLULE EPITHELIALE PARIETALE	35
3.1 CARACTERISTIQUES DES CELLULES EPITHELIALES PARIETALES.....	35
3.1.1 Genèse des PEC.....	35
3.1.2 Description histologique	35
3.1.3 Expression protéique.....	35
3.1.4 Sous-catégorie de cellules épithéliales pariétales.....	38
3.2 ROLE PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES EPITHELIALES PARIETALES	40
3.3 LA CELLULE EPITHELIALE PARIETALE EN PATHOLOGIE	41
3.3.1 Les modifications phénotypiques de la cellule épithéliale pariétale.....	42
3.3.2 Voies de signalisation impliquées en pathologie	47
PARTIE 2 HEAT SHOCK PROTEIN (HSP) 27	56
1 GENERALITES.....	56
1.1 GENERALITES SUR LES HSP	56
1.1.1 Activité chaperonne	57
1.1.2 Aspect structurel	58
1.1.3 Caractéristiques des petites HSPs	58
1.2 STRUCTURE D’HSP27 (HSPB1).....	59
1.3 REGULATION D’HSP27.....	60
1.4 HSP27 & HSP25 – MODELE MURIN.....	62
2 FONCTIONS D’HSP27	64
2.1 AU SEIN DES CELLULES CANCEREUSES	64
2.1.1 Rôle et voies cellulaires d’intérêt en oncologie.....	65
2.1.2 Stratégies thérapeutiques ciblant HSP27	68
2.2 FIBROSE TISSULAIRE.....	73
2.3 NEUROPATHIES PERIPHERIQUES HEREDITAIRES	74
3 HSP27 ET REIN	75

3.1	EXPRESSION D'HSP27 DANS LE REIN NORMAL	75
3.2	EXPRESSION D'HSP27 AU COURS DES PATHOLOGIES RENALES	76
3.2.1	Ischémie-reperfusion	76
3.2.2	Fibrose rénale.....	77
3.2.3	Glomérulopathies.....	78
	EXPOSÉ DES TRAVAUX	85
	DISCUSSION	129
1	SUREXPRESSON D'HSP27 DANS LES PATHOLOGIES IMPLIQUANT LES PEC ACTIVEES	130
2	HSP27 : UN ELEMENT COMMUN EN AVAL DE DIFFERENTES VOIES D'ACTIVATION DES PEC ?	131
3	ROLE D'HSP27 DANS L'HOMÉOSTASIE DE LA PEC.....	132
3.1	HSP27 ET ACTIVATION DE LA PEC.....	132
3.2	HSP27 ET MIGRATION.....	133
3.3	HSP27 ET AUTRES MECANISMES D'INTERET	136
4	IMPLICATION D'HSP27 DANS LA FORMATION DES LESIONS EXTRACAPILLAIRES <i>IN VIVO</i>	138
5	ROLE D'HSP27 DANS LES MECANISMES DE HYALINOSE SEGMENTAIRE ET FOCALE	140
6	ROLE D'HSP27 DANS LES MECANISMES DE MICROANGIOPATHIES THROMBOTIQUES.....	141
6.1	LE MODELE NTS EST UN MODELE DE MICROANGIOPATHIE THROMBOTIQUE	142
6.2	HSP27 ET MICROANGIOPATHIE THROMBOTIQUE.....	142
7	PERSPECTIVES CHEZ L'HOMME	144
7.1	HSP27 COMME BIOMARQUEUR D'ACTIVITE DES GEC.....	144
7.2	APPROCHE THERAPEUTIQUE	145
	REFERENCES.....	149
	TRAVAUX ANNEXES	171

Principales abréviations

ANCA	Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles
CD44	Cluster de différenciation 44
CD9	Cluster de différenciation 9
CdK	Cyclin-dépendant kinase
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2
GEC	Glomérulonéphrite extracapillaire
GEC	Glomérulonéphrite extracapillaire
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HSF	Hyalinose segmentaire et focale
HSP	Heat Shock Protein
HTA	Hypertension artérielle
IRC	Insuffisance rénale chronique
JAK	Janus kinase
KLF4	Kruppel-like factor 4
LGM	Lésions glomérulaire minimes
MAPK	Mitogen activated protein kinases
MBG	Membrane Basale Glomérulaire
MIF	Migration inhibitory factor
MK2	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2
MPO	Myeloperoxydase
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NFkappaB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NTN	Nephrotoxic serum Nephritis
NTS	Nephrotoxic serum
p38	p38 mitogen-activated protein kinases
PAX2	Paired cox protein 2
PAX8	Paired cox protein 8
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PEC	Cellule épithéliale pariétale
PGP 9.5	Protein gene product 9.5 / ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-1 (UCH-L1)
PR3	Proteinase 3
Snail	Zinc finger protein SNAI1
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF-beta	Transforming growth factor-beta
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A

VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2
WT-1	Wilms Tumor-1
ZO	Zonula occludens-1

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Anatomie du néphron

Figure 2. Anatomie du glomérule rénal

Figure 3. Microscopie optique de la glomérulonéphrite à croissants montrant les différents stades de la formation des croissants chez les mêmes patients (coloration argentique)

Figure 4. Représentation en PAS de glomérules atteints de HSF

Figure 5. Classification histologique des différentes formes d'HSF

Figure 6. Caractéristiques des sous-populations de cellules épithéliales pariétales chez l'homme et la souris

Figure 7. Caractéristiques structurelles essentielles de la voie dysrégulatrice, dégénérative et inflammatoire de la dégénérescence du néphron

Figure 8. Sous-population de PEC au cours de la hyalinose segmentaire et focale selon l'expression de ERK phosphorylé et leur rôle profibrotique ou régénératif

Figure 9. Représentation schématique d'HSP27, de ces principaux sites de phosphorylation ainsi que de l'équilibre dynamique de sa structure quaternaire

Figure 10. Propriétés structurelles de la HSP27 humaine

Figure 11. Mécanisme d'action de l'ivermectine au niveau du complexe d'HSP27

Figure 12. Hypothèse d'action d'HSP27 au sein de la cellule épithéliale pariétale au cours des glomérulonéphrites extracapillaires

Figure 13. Mécanisme d'action d'HSP27 au sein de la PEC selon les résultats observés au cours de notre étude

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Résumé des modèles expérimentaux de glomérulonéphrite à croissants

Tableau 2. Expression protéique différentielle entre les cellules épithéliales pariétales et les podocytes

Tableau 3. Nomenclature, distribution et principales fonctions des petites heat shock protein

INTRODUCTION

PARTIE I. LA CELLULE EPITHELIALE PARIETALE et LES MALADIES RENALES GLOMERULAIRES

1 Le rein normal : Généralités

1.1 Anatomie et grandes fonctions du rein

Les reins sont au nombre de deux, et sont composés d'une zone corticale où vont se concentrer les glomérules, chargés de la filtration glomérulaire et d'une zone médullaire externe et interne où se joueront les phénomènes de concentration des urines.

Ainsi le rein présente trois grandes fonctions : la filtration et l'élimination des produits issus du catabolisme notamment azoté ; la régulation de l'équilibre hydroélectrolytique ; et une fonction endocrinienne concernant l'érythropoïèse à travers la sécrétion d'érythropoïétine, la régulation de la pression artérielle par la sécrétion de rénine et la régulation du métabolisme calcique par la synthèse de calcitriol.

Le rein est structuré en unités fonctionnelles (le néphron) au nombre de 400 000 à 800 000. Chaque néphron est composé d'un glomérule et d'un tubule associé qui lui, est composé de cinq portions (le tubule proximal, l'anse de Henlé, le tubule distal, le tube connecteur) se terminant par le tube collecteur. (**Figure 1**)

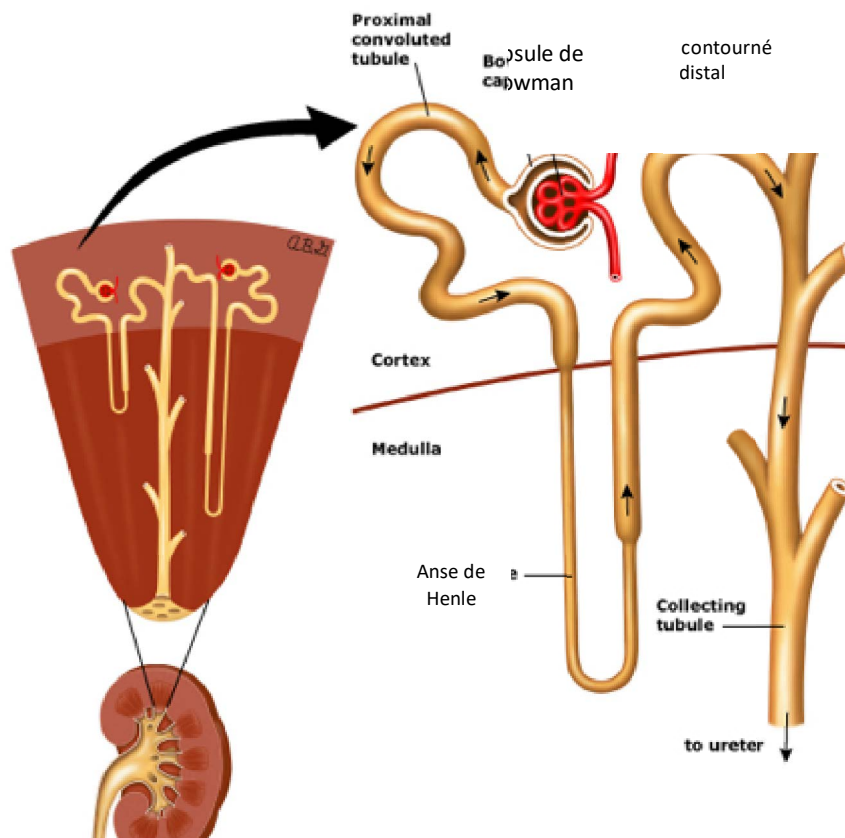


Figure 1. Anatomie du néphron (d'après uptodate)

1.2 Structures rénales

1.2.1 Le glomérule

Les glomérules sont situés au niveau du cortex rénal et sont chargés de l'ultrafiltration du plasma. Le débit sanguin rénal représente 20 à 25 % du débit cardiaque. Le pourcentage du débit plasmatique rénal filtré est quant à lui de l'ordre de 20% soit un débit de filtration glomérulaire estimé à 120ml/min. La filtration des protéines au-delà de 68 kDa (comme l'albumine) est négligeable. Cette filtration dépendra de la taille mais aussi de la charge électrique des protéines. Il s'en suivra donc la constitution d'urine primitive.

Cette filtration se fera à travers une barrière composée de trois couches : les cellules endothéliales du capillaire glomérulaire, la membrane basale glomérulaire (MBG) et des cellules épithéliales viscérales différenciées : les podocytes (**Figure 2**).

Le réseau capillaire forme un système porte artériel avec l'artériole afférente et l'artériole efférente qui reçoit le sang filtré. L'endothélium glomérulaire est fenestré avec des pores de 60 à 100 nm. Les capillaires sont organisés autour d'un axe : la tige mésangiale et forment une structure lobulaire. Au centre de cette structure se trouve donc le mésangium. Le glomérule est par ailleurs enveloppé d'une capsule (capsule de Bowman) constituée de cellules épithéliales pariétales (PEC) reposant sur une membrane basale. L'espace entre la capsule et la barrière de filtration glomérulaire est l'espace de Bowman (ou chambre urinaire), où se collecte l'urine primitive. Il est connecté au tubule proximal (**Figure 2**).

La membrane basale glomérulaire (MBG) a une épaisseur de 300 nm et est constituée de trois couches (lamina rara externa, densa et rara interna) Elle est impliquée dans la perméabilité de la paroi capillaire. Son principal constituant est le collagène IV constitué notamment des chaînes alpha3, alpha4, alpha5. Elle est par ailleurs composée de glycoprotéines non collagéniques (laminines) et de protéoglycanes.

Les podocytes (ou cellules épithéliales viscérales) sont des cellules possédant une structure en 3D avec un aspect de pieuvre. Ils sont constitués d'un corps cellulaire principal avec des ramifications en pieds, eux même se ramifiant en pédicelles et reposant sur le versant externe de la MBG. Les pédicelles vont être liées entre elles par des jonctions adhérentes particulières : le diaphragme de fente, qui est composé de plusieurs protéines déterminantes telles que la néphrine, protéine transmembranaire ou la podocine, impliquées dans le maintien de l'architecture du diaphragme et dans la signalisation podocytaire.

Les cellules mésangiales représentent un tiers des cellules du floculus. Elles ont des caractéristiques de cellules musculaires lisses en ultrastructure et de péricytes. Elles contiennent d'épais faisceaux contractiles. Elles s'enroulent ainsi autour des capillaires glomérulaires. Elles sont capables de réguler la pression glomérulaire et la surface d'ultrafiltration. Elles ont par ailleurs des capacités d'endocytose et de phagocytose importantes contribuant à l'élimination des débris cellulaires et de corps apoptotiques. La

matrice mésangiale est composée de collagène IV (alpha1 et alpha2), des laminines et de protéoglycanes. La molécule principale est la fibronectine.

La capsule de Bowman est constituée de cellules épithéliales pariétales (PEC) reposant sur une membrane basale et empêchant la sortie de l'urine primitive. La PEC fera l'objet d'une description plus approfondie ci-dessous.

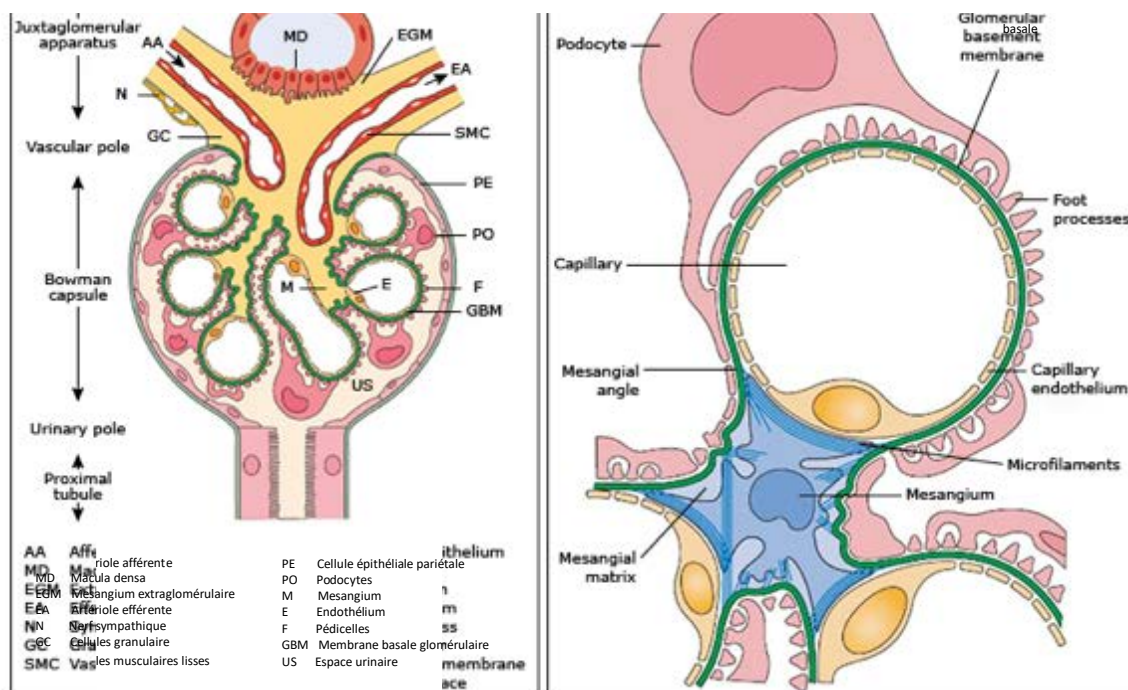


Figure 2. Anatomie du glomérule rénal (d'après uptodate)

1.2.2 Le tubule rénal

Le tubule rénal est une structure épithéliale composée de cinq portions.

Le tubule proximal fait suite à la chambre urinaire glomérulaire et représente la principale section en termes de réabsorption des constituants de l'urine primitive. Il réabsorbe la majeure partie du sodium et de l'eau ainsi que les protéines de faible poids moléculaire. C'est la portion la plus longue du néphron. Les cellules tubulaires proximales présentent une

morphologie cubique avec une bordure en brosse faite de microvillosités. Elles se lient aux cellules adjacentes par des jonctions étanches.

L'anse de Henlé, située dans la médullaire est composée de cellules aplaties et est chargée de la constitution du gradient de concentration osmotique cortico-papillaire impliqué dans la concentration des urines.

Le tubule distal qui fait suite à l'anse de Henlé. Il s'en suit les tubes connecteurs et collecteurs. Ils sont impliqués notamment dans la régulation fine du bilan sodé et potassique.

1.2.3 Appareil juxtaglomérulaire

Situé au pôle vasculaire du glomérule (à l'abouchement de l'artériole afférente), l'appareil juxtaglomérulaire est constitué de la terminaison de l'artériole afférente, la partie initiale de l'artériole efférente, le mésangium et la macula densa (portion du tube distal et de cellules de lacinis (cellules musculaires lisses particulières)). Il est impliqué dans la régulation de la volémie via la synthèse de rénine notamment.

1.2.4 Interstitium

Il est composé de cellules et de matrice extracellulaire. Ce tissu conjonctif peut représenter jusqu'à 40% de la surface dans la médullaire profonde et seulement 10% dans le cortex.

Les cellules interstitielles sont de l'ordre de trois types : les fibroblastes (majoritaires), les cellules dendritiques et les macrophages.

Le tissu interstitiel est composé de collagène fibrillaire, de glycosaminoglycanes, de laminines et de fibronectines.

1.2.5 Vascularisation

L'artère rénale issue de l'aorte se divise au niveau du hile en artères segmentaires, puis en artères interlobaires qui pénètrent dans le parenchyme rénal avant de donner lieu aux artères arquées puis aux artères interlobulaires qui se divisent en artérioles afférentes glomérulaires.

L'artériole efférente issue d'un glomérule va donner naissance à un réseau capillaire cortical vascularisant les tubes du même néphron. Les artérioles efférentes des glomérules profonds vont donner lieu au *vasa recta* qui vont vasculariser la papille et suivre les anses de Henlé. La circulation artérielle rénale est terminale et non anastomotique.

Au cours de ce travail, nous avons porté un intérêt particulier aux pathologies touchant le secteur extracapillaire et associées au comblement de l'espace de Bowman. Ces pathologies sont marquées par une atteinte de la cellule épithéliale pariétale et se manifestent sous deux grandes formes : la glomérulonéphrite extracapillaire et la hyalinose segmentaire et focale.

2 Pathologie glomérulaire : La glomérulonéphrite extracapillaire et la hyalinose segmentaire et focale

2.1 Lésion extracapillaire : croissants extracapillaires et lésions de hyalinose segmentaire et focale

2.1.1 Définitions

2.1.1.1 Croissants extracapillaires

Le croissant extracapillaire est une lésion histologique non spécifique pouvant faire suite à de nombreuses pathologies glomérulaires et est associé à un pronostic sévère avec le développement d'une insuffisance rénale rapidement progressive^{1,2}. Il se définit par l'accumulation d'au moins deux couches de cellules dans l'espace de Bowman³ (ou parfois par une hypercellularité impliquant plus de 10% de la circonférence de la capsule de Bowman)⁴. Ils sont parfois segmentaires (touchant une partie du glomérule) ou circonférentiels (englobant l'ensemble de l'espace de Bowman)³.

Nous pouvons distinguer histologiquement le croissant cellulaire (> 75% de cellules) du croissant fibreux (<25% de cellules), et du croissant fibro-cellulaire (entre 25-75% de cellules)^{1,4} (**Figure 3**). Les croissants sont responsables de la déconnection glomérulo-tubulaire aboutissant à la perte néphronique et à l'insuffisance rénale⁵.

Chez l'homme, lorsque la lésion extracapillaire est l'une des principales lésions histologiques, on parlera de glomérulonéphrite extracapillaire (GEC)².

La GEC peut être observée dans de nombreuses pathologies qui seront détaillées ci-après.

Sur le plan fonctionnel, cette atteinte histologique rénale va s'associer à une insuffisance rénale subaiguë ou dite rapidement progressive (dégradation de fonction rénale sur quelques semaines), une protéinurie d'origine glomérulaire et une hématurie. Il pourra s'y associer des symptômes en lien avec les causes à l'origine de la GEC (atteinte cutanée, articulaire, pulmonaire par exemple).

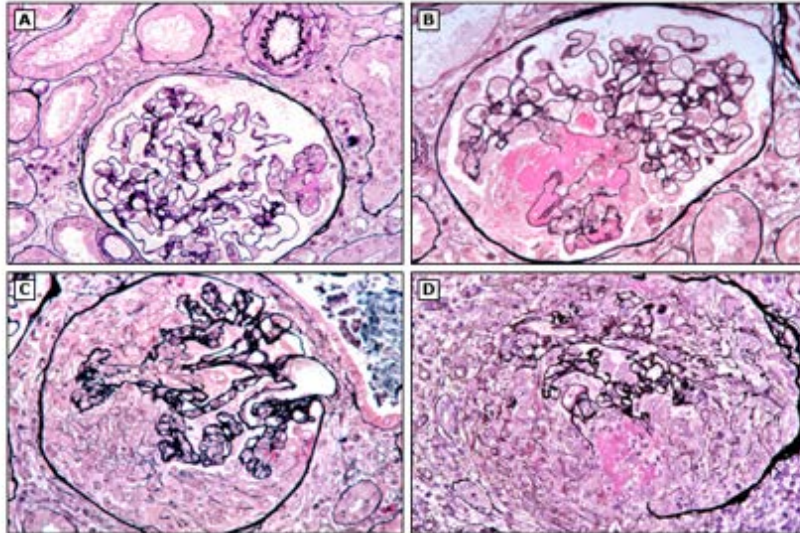


Figure 3. Microscopie optique de la glomérulonéphrite à croissants montrant les différents stades de la formation des croissants chez les mêmes patients (coloration argentique) (de Dr P Callard, uptodate)

- (A) Stade précoce montrant la nécrose de la paroi capillaire, antérieur au développement de la lésion extracapillaire.
- (B) Grande zone nécrotique avec début de formation d'un croissant avec prolifération des cellules épithéliales pariétales.
- (C) Croissant cellulaire circonférentiel.
- (D) Stade tardif montrant une large zone de rupture de la capsule de Bowman.

2.1.1.2 La hyalinose segmentaire et focale

La hyalinose segmentaire et focale (HSF) est également une lésion histologique peu spécifique pouvant être identifiée dans diverses pathologies glomérulaires. Elle se définit par la présence au niveau glomérulaire d'une sclérose (par une accumulation de matrice) avec une oblitération de la lumière capillaire, une altération des cellules épithéliales qui est partielle (segmentaire) et par une distribution variable des lésions au sein des glomérules (focales)⁶ (**Figure 4**).

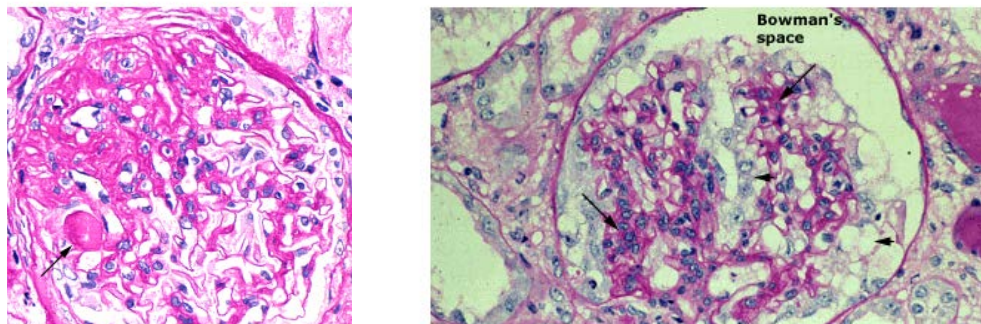


Figure 4. Représentation en PAS de glomérules atteints de HSF (Dr Helmut Rennke, uptodate)

A. Zone segmentaire de sclérose avec effondrement capillaire sur le flocculus ; le segment inférieur droit est relativement normal. On observe également un dépôt focal de matériau hyalin (flèche). B. Glomérulosclérose avec effondrement des capillaires avec quelques anses capillaires ouvertes dans les zones sclérosées (longues flèches). Vacuolisation et encombrement des cellules épithéliales glomérulaires (flèches courtes). Lésion typique d'HIVAN.

2.1.2 La glomérulonéphrite extracapillaire

2.1.2.1 La glomérulonéphrite extracapillaire chez l'homme

Comme nous l'avons vu, le terme croissant extracapillaire s'applique avant tout à une lésion histologique. D'un point de vue nosologique, on parle de glomérulonéphrite extracapillaire (GEC) lorsque les lésions de croissants sont les principales lésions retrouvées. Certains définissent un seuil de plus de 50% de glomérules avec croissants pour parler de GEC^{2,3}. Les GEC sont divisées en trois catégories en fonction de leur origine étiopathogénique⁷.

- La glomérulonéphrite extracapillaire de type 1

Elle se caractérise par des dépôts linéaires d'immunoglobulines sur la membrane basale glomérulaire (MBG).

Il s'agit d'une pathologie auto-immune marquée par l'apparition d'auto-anticorps circulants dirigés contre le domaine NC1 de la chaîne alpha3 du collagène de type 4, fortement exprimée

sur la MBG et les alvéoles pulmonaires^{8,9}. Cette pathologie est également appelée Syndrome de Goodpasture⁹.

Sa présentation se caractérise par un syndrome pneumo-rénal avec un tableau de glomérulonéphrite rapidement progressive (insuffisance rénale subaiguë et hématurie, protéinurie glomérulaire) d'une part et une hémorragie alvéolaire. Il s'agit cependant d'une maladie rare. Son incidence est estimée à un à deux cas par million d'habitants et par an¹⁰.

- La glomérulonéphrite extracapillaire de type 2

La glomérulonéphrite extracapillaire de type 2 se définit par la présence de dépôts immuns granuleux (complexes immuns) dans les glomérules. La localisation et le type de dépôts vont permettre de caractériser la pathologie.

Les étiologies sont ainsi variées : Néphropathie lupique, néphropathie à IgA, cryoglobulinémie, glomérulonéphrite post-infectieuse, glomérulonéphrite à dépôts de C3.

- La glomérulonéphrite extracapillaire de type 3

Il s'agit d'une GEC dite pauci-immune car ne présentant pas de dépôts immuns à l'analyse en immunofluorescence du tissu rénal. Elle est secondaire aux vascularites à ANCA (anticorps anti-cytoplasme de polynucléaire neutrophile).

Les vascularites à ANCA sont une pathologie touchant les petits vaisseaux¹¹. Dans la plupart des cas, ils existent des auto-anticorps activateurs, dirigés contre des protéines cytosoliques des polynucléaires neutrophiles : la protéinase 3 (ANCA anti-PR3) ou la myéloperoxydase (ANCA anti-MPO)¹².

2.1.2.2 Modèles animaux expérimentaux d'intérêt dans la glomérulonéphrite extracapillaire

2.1.2.2.1 Le modèle de sérum néphrotoxique (NTS)

Le modèle animal utilisé en général pour l'étude des GEC est le modèle « NTS », pour nephrotoxic serum ou « néphrite toxique » ou encore anti-MBG (membrane basale glomérulaire).

Le modèle a été développé par Redman Olivier chez le chien puis par Masugui chez le lapin en 1932^{13,14}.

Sérum

Le sérum utilisé est un sérum dit hétérologue issu en général de mouton préalablement immunisé contre des extraits de cortex rénal de souris ou de rats (partie riche en glomérules).

Procédure

La procédure consiste en une injection à la souris ou au rat du sérum hétérologue, en intra-péritonéale ou en intra-veineux.

Il existe différents types de modèles :

- Le modèle passif : absence d'immunisation préalable
- Le modèle passif accéléré : immunisation initiale de la souris ou du rat par l'adjuvant complet de Freund,
- Le modèle actif : immunisation directe par injection d'extraits glomérulaires et de l'adjuvant de Freund
-

Déroulé

Après l'injection de sérum hétérologue, on distinguera deux phases : l'une dite hétérologue puis la seconde dite autologue. La phase hétérologue est marquée par le dépôt des anticorps issus du sérum au sein du glomérule avec l'activation de l'immunité innée. La mise en place de la réponse adaptative correspond à la phase autologue, avec la formation d'immunoglobulines dirigées contre celles issues du sérum. S'en suit (J4) la formation des lésions glomérulaires avec notamment la prolifération extracapillaire.

2.1.2.2.2 Utilisation du modèle NTS

Ce modèle est actuellement l'un des modèles les plus utilisés pour l'étude des glomérulonéphrites extracapillaires, permettant notamment au cours d'expérimentations l'étude de voies de signalisations podocytaires¹⁵⁻¹⁷ ou encore avec les études plus récentes pour l'étude des voies impliquant la PEC¹⁸⁻²⁰.

Après injection du sérum, la protéinurie apparaît de manière précoce dès J2-J3 avec une insuffisance rénale majeure dès J5-J7. A J4 il n'y a en général pas de croissants constitués, les croissants se constituant vers J7-J10²¹⁻²³. Ougaard *et al.* ont suivi des souris C57/B6 jusqu'à 42

jours. Les lésions glomérulaires chroniques se forment à au-delà de la deuxième semaine pour progresser au cours du temps²².

La survie des souris dépend aussi du fond génétique avec une mortalité précoce chez les sv129 dans les trois premières semaines contrairement au C57/B6 qui survient au-delà de trois semaines²¹.

2.1.2.2.3 Limites du modèle NTS

Ce modèle se veut le reflet de la pathologie auto-immune anti-MBG (Maladie de Good-Pasture) mais il s'agit dans un premier temps d'une réponse allo-immune et multi-cible (extraits de cortex) alors que la maladie de GoodPasture est une pathologie auto-immune dirigée spécifiquement contre la chaîne alpha3 du collagène IV.

De plus, il existe dans le modèle NTS une immunisation contre plusieurs composants de la MBG tel que Aminopeptidase 1 et le collagène IV qui ne sont pas connues pour être pathogènes chez l'homme²⁴⁻²⁶.

Par ailleurs, il existe des effets « extra rénaux » avec une forte mortalité précoce liée à un possible effet vasoplégiant (hypotension artérielle induite par le sérum) notamment chez la souris 129/sv²⁷.

De plus, il faut souligner l'importance du fond génétique dans la sévérité des lésions. Ainsi, on va observer un degré de lésion différent qui est majeur chez les souris 129/sv et les C57/B (montrant une plus grande susceptibilité au sérum) à l'opposé de modèles AKR/J, ou encore DBA/2J²⁸.

Il est possible qu'il existe une réponse immunitaire adaptative T helper différente selon le fond génétique²⁹. Mais, fait intéressant, le degré de lésion ne serait pas simplement lié à la simple réponse immunitaire (même degré d'infiltrat) mais aussi aux cellules résidentes glomérulaires^{28,30}. Ainsi, Mesnard *et al.* ont bien précisé l'importance de l'expression du VEGFR2 endothélial, en fonction du fond génétique, qui pourrait être associé à une divergence des lésions entre fonds génétiques sv129 et C57B/6²¹.

2.1.2.2.4 Autres modèles de glomérulonéphrites extracapillaires

Le modèle NTS reste le modèle le plus utilisé à ce jour. Cependant il existe d'autres modèles mimant les GEC ou les vascularites à ANCA avec formation de croissants extracapillaires³¹ (**Tableau 1**).

Maladie humaine	Nom du modèle	Espèce	Mécanisme d'induction de la pathologie
GN à croissants ³²	Glomérulonéphrite expérimentale auto-immune	Rat	Réponse autoimmune dirigée sur la chaîne $\alpha 3$ du collagène de type IV ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$)
GN à croissants ^{13,14}	Néphrite nephrotoxique	Rat et souris	Anticorps anti-MBG hétérologue de mouton
GEC/ANCA ³³	Souris SCG/Kj	Souris	GN à croissants spontanée souris forming/Kinjoh (SCG/Kj)
GEC/ANCA ³⁴	MPO humain	Rat et souris	Immunisation contre la myeloperoxydase (MPO) humaine
GEC/ANCA ³⁵	Modèle Anti-MPO	Souris	Injection d'anticorps anti-MPO ou de splénocytes générés dans des souris MPO-/-
GEC/ANCA ³⁶	Modèle anti-MPO modifié	Souris	Injection de MPO ou d'anti-MPO dans des souris MPO-/- transplantée avec une moelle MPO+/+

ANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibody; MBG, membrane basale glomérulaire; GN, glomérulonéphrite; MPO, myeloperoxydase; PEC, parietal epithelial cell; GEC : glomérulonéphrite extracapillaire,

Tableau 1. Résumé des modèles expérimentaux de glomérulonéphrite à croissants (d'après Ohse et al.).³¹

2.1.2.3 Mécanismes initiaux à l'origine de la formation du croissant extracapillaire au cours de la GEC

Cinétique¹

La cinétique du modèle NTS correspond à une agression immune au niveau de la MBG résultant de la formation de gap/nécrose de la paroi des anses capillaires avec une fuite du plasma de la chambre urinaire, l'activation de la cellule épithéliale pariétale avec la formation du croissant extracapillaire (cellulaire initialement puis progressivement fibreux) menant à la

déconnexion tubulo-glomérulaire avec formation d'un tubule aglomérulaire³⁷. On peut à l'occasion observer une rupture de la capsule de Bowmann avec afflux de cellules inflammatoires au-delà de la chambre urinaire^{38,39}.

Cependant, il est possible que ces lésions de croissants puissent éventuellement régresser⁴⁰. La cinétique de formation dans un modèle murin NTS a été étudiée notamment en microscopie électronique et montre à J3 une atteinte des cellules endothéliales, à J6 une atteinte podocytaire avec modification morphologique (effacement des pédicelles) et à J10 des lésions de croissants touchant presque un glomérule sur deux⁴¹.

Ainsi, un des mécanismes initiaux du croissant extracapillaire serait la formation de « gap » au sein des capillaires résultant en une nécrose de la paroi des anses capillaires^{3,42} et de la MBG^{43,44}.

Cette agression peut se faire par un mécanisme de NETose (Neutrophils Extracellular Traps), processus immunitaire marqué par la libération de protéines et d'ADN par les polynucléaires neutrophiles⁷¹ et d'activation de la voie du complément^{72,73}.

Différents acteurs ont été identifiés comme impliqués au cours de la formation des croissants extracapillaires :

- Des cellules de l'immunité
- Des facteurs de coagulation
- Les cellules résidentes

Rôle de l'immunité

- Le complément⁴⁵

Le système du complément est un élément majeur de l'immunité innée, composé d'une soixantaine de protéines et dont le rôle comprend la destruction de pathogènes, la clairance de corps apoptotiques ou encore la promotion de l'inflammation^{46,47}.

Son rôle au cours des GEC pauci-immunes est prédominant à la phase initiale avec l'implication du C5a récepteur médiant l'activation des neutrophiles⁴⁸. Il est également possible que le complément joue un rôle direct sur la cellule épithéliale pariétale. En effet, dans un modèle d'HSF (sans agression endothéliale initiale) on pouvait observer des dépôts de C3a/C3R sur les PEC. *In vitro* le C3a contribue à la migration et à la surexpression de CXCR4 sur les PEC⁴⁹.

- Immunité T

Au cours des GEC, on peut observer une accumulation de lymphocytes au sein des croissants^{50,51}. L'immunité adaptative est caractérisée par les cellules T effectrices, les T helpers avec des sous-populations caractérisées selon leur profil cytokinique et enfin la réponse T régulatrice⁵².

Des premières études ont montré le rôle de la réponse T helper, notamment Th1⁵³. D'autres études ont porté sur la réponse Th2 et aussi Th17 avec des résultats pouvant être contradictoires. Ainsi, on observe dans le modèle invalidé pour IL-4 (pivot de la réponse Th2) une majoration des lésions de croissants extracapillaires dans le modèle NTS⁵⁴.

Concernant les T effecteurs CD8, leur implication semble principalement liée à la rupture de la capsule³⁸. La capsule de Bowman fait office de barrière et ce n'est qu'en cas de rupture qu'on observe un infiltrat lymphocytaire important.

- Les macrophages

Les macrophages peuvent également entrer dans la composition des croissants observés dans des modèles NTS. Masaki *et al.* ont montré une hétérogénéité de l'expression de divers antigènes macrophagiques au sein du croissant dans le modèle NTS⁵⁵. Au sein du croissant, on observait une expression majeure de CD68 contrairement au CD11b or F4/80 (autre marqueur macrophagique)⁵⁵. Par la suite, Bariéty *et al.* ont montré que les podocytes pouvaient exprimer l'épitope CD68 suggérant que les cellules CD68 au sein des croissants pouvaient être non pas des macrophages mais possiblement des podocytes⁵⁶. Enfin, Smeets *et al.* ont montré que les macrophages ne composaient qu'une faible proportion des cellules des croissants, tout du moins au stade précoce¹⁷.

Néanmoins, les macrophages pourraient contribuer à la sécrétion du facteur tissulaire⁵⁷, l'interleukine 1⁵⁸ ou encore le TNF alpha⁵⁹. Divers chemoattractants ont été identifiés comme impliqués dans les mécanismes d'infiltration macrophagique au sein des croissants. Nous pouvons citer les protéines macrophage inflammatory protein (MIP) -1alpha et monocyte chemoattractant protein (MCP) -1. L'ostéopontine exprimée notamment par les PEC⁶⁰ favoriserait également l'infiltrat macrophagique. De même pour les molécules d'adhésion comme le vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, l'intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, et le CD44 exprimées par les PEC^{61,62}.

Bien que l'ensemble des données ci-dessus suggèrent un rôle de la réponse immunitaire dans la formation des croissants, celle-ci n'est pas indispensable au développement des lésions⁶³. Ainsi, on peut observer, une activation des PEC et la formation des croissants y compris chez les souris immunodéficientes^{64,65} dans le modèle NTS⁵⁶. De plus, à titre d'exemple, des modèles d'ablation partielle et directe de PEC (par expression inductible de toxine diphtérique au sein des PEC) déclenche la formation de croissants sans réponse immune préalable⁶⁶.

Facteurs de coagulation

Le rôle des facteurs de coagulation est marqué par l'importance de la fibrine. Ainsi, dans les modèles murins, la défibrination (par injection d'ancrod, issu de venin de vipère) prévient la formation des croissants^{67,68}.

De même, le facteur tissulaire, qu'il soit issu des cellules résidentes ou des macrophages⁵⁷ est impliqué dans la formation des croissants avec l'augmentation des dépôts de fibrines⁶⁹. A l'inverse, le plasminogène joue un rôle dans la résolution des lésions de croissants^{70,71}.

2.1.3 La Hyalinose Segmentaire et Focale

2.1.3.1 La Hyalinose Segmentaire et Focale chez l'homme

La hyalinose segmentaire et focale (HSF) est également une lésion histologique peu spécifique pouvant être identifiée dans diverses pathologies glomérulaires. Elle se définit par la présence au niveau glomérulaire d'une sclérose (par une accumulation de matrice) avec une oblitération de la lumière capillaire, une altération des cellules épithéliales qui est partielle (segmentaire) et par une distribution variable des lésions au sein des glomérules (focales)⁶. Parmi les aspects histologiques, la HSF peut prendre un aspect dit de pseudo-croissant se différenciant histologiquement des « vrais » croissants extracapillaires par leur absence d'attachement à la capsule de Bowman. De plus, les cellules extracapillaires ont tendance à être arrondies et peu cohésives, avec une résorption des protéines intracellulaires (aspect de podocytose)^{56,72}.

La lésion de HSF peut être classée soit selon la cause soit selon son type histologique. Il existe ainsi : Les HSF primitives, secondaires, génétiques ou de cause inconnue, et différentes formes histologiques d'HSF.

Il existe une forme d'HSF dite primitive, dont l'hypothèse physiopathologique principale est celle du rôle d'un facteur circulant toxique pour le podocyte. Ce mécanisme physiopathologique se rapprocherait de celui de la néphropathie à lésions glomérulaires minimes (Microscopie optique normale, effacement des pédicelles en microscopie électronique)⁷³. Une seconde forme de HSF est dite adaptative ou de réduction néphronique, en rapport avec une diminution chronique de la masse néphronique et une hyperpression glomérulaire sur les néphrons restants, quel que soit l'origine de la pathologie initiale. Par ailleurs, il existe des formes de HSF en rapport avec des variants pathogènes de gènes impliqués dans l'homéostasie podocytaire ou de la membrane basale glomérulaire⁷⁴. Enfin, certaines formes d'HSF seraient secondaires à des infections notamment virales, ou encore par une toxicité directe de médicaments, volontiers sur terrain génétique prédisposant (variants de l'apolipoprotéine 1, APOL1).

Par ailleurs, les lésions d'HSF ont été ordonnées selon la classification de Columbia basée sur l'aspect morphologique en microscopie optique^{6,75} (forme collapsante, tip lesion, forme cellulaire, forme périhilaire, et forme NOS, not otherwise specified) (**Figure 5**).

Néanmoins, cette classification ne permet clairement pas de distinguer les formes primitives des formes secondaires ou génétiques, même si on peut observer des formes plus fréquemment associées à certaines causes⁶.

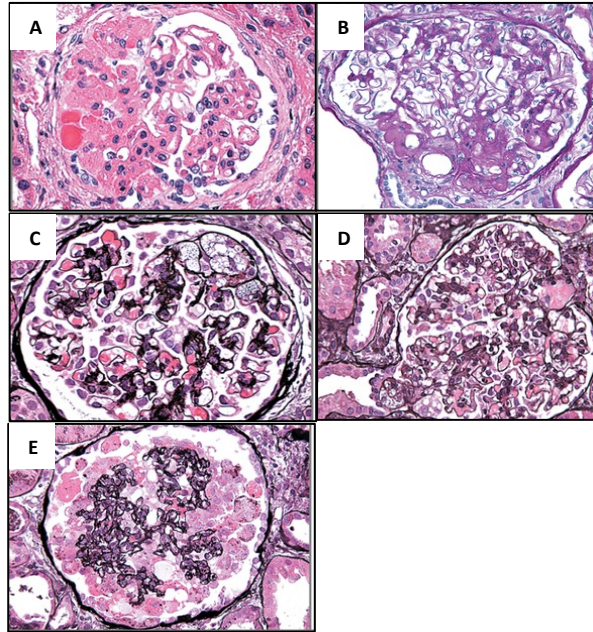


Figure 5. Classification histologique des différentes formes d'HSF On distingue les formes dites A. NOS (not otherwise specified/non spécifique), B. Périhilaire, C. cellulaire ; D. Tip lesion ; E.Collapsante. (d'après D'Agati et al.)⁶

2.1.3.2 Principaux modèles murins de hyalinose segmentaire et focale

Divers modèles ont été développés pour étudier les mécanismes lésionnels des HSF. Nous présenterons ici les plus utilisés. En effet, la HSF pouvant faire suite à de nombreuses causes, il a été nécessaire de développer différents modèles pour étayer les différents mécanismes de formation de ces lésions⁷⁶. Cependant l'atteinte podocytaire reste centrale⁷⁷ dans ces différents modèles. Il est important de souligner que le plus souvent ces modèles animaux miment les HSF secondaires chez l'homme et non la HSF dite primitive⁷⁸.

Modèle par néphrectomie des 5/6

Ce modèle a été réalisé chez le rat en provoquant un infarctus rénal par une ligature initiale des vaisseaux puis néphrectomie d'un rein et infarctus partiel du rein controlatéral (2/3 du rein)^{79,80}.

Ce modèle de HSF est lié au mécanisme de réduction néphronique et d'hyperfiltration glomérulaire compensatrice des glomérules restants^{81,82}. Il est associé à la formation de lésions de HSF dans près de 50% des glomérules à la 7^{ème} semaine. On observe l'apparition d'une insuffisance rénale dans les semaines suivant l'induction de l'infarctus et une mortalité totale à 3 mois⁸⁰.

Néanmoins, le fond génétique reste important. Ainsi la plupart des rats sont susceptibles à la formation de ces lésions tout comme les souris 129/sv ou Swiss-Webster alors que les C57BL/6 sont résistantes⁸³.

Puromycine aminonucléoside

La Puromycine aminonucléoside (PAN) est un antibiotique qui inhibe la synthèse protéique. Après une injection en intraveineux ou en intrapéritonéal^{84,85}, on note l'apparition d'une protéinurie massive dans les jours suivants avec en histologie un effacement des pédicelles podocytaires mimant la pathologie humaine (dite lésions glomérulaires minimes). Une deuxième phase marquée par une protéinurie plus modérée à partir de la 10^e semaine est associée au développement de lésions de HSF. A la 18^e semaine on observe environ 10 à 15% de glomérules atteints de lésions d'HSF^{86,87}.

Modèle Adriamycine

L'adriamycine est une anthracycline qui possède une toxicité podocytaire mais aussi endothéliale⁸⁸. En effet, elle altère la synthèse de protéoglycanes endothéliales, ce qui précéderait l'atteinte podocytaire⁸⁹.

La susceptibilité au développement des lésions d'HSF dans ce modèle dépend du fond génétique des souris. Ainsi, la souris BALB/c est connue comme sensible à l'adriamycine⁹⁰ alors que les souris C57BL/6 sont résistantes⁸⁸. Cette susceptibilité semble liée à un gène responsable de l'expression de l'arginine méthyltransférase, impliquée dans la sensibilité cellulaire aux chimiothérapies⁹¹. De même, la polarisation de la réponse immunitaire Th1 vs Th2 semble jouer un rôle dans cette susceptibilité⁹².

Les modalités de développement de ce modèle nécessitent une à plusieurs injections intra veineuses^{88,93,94}. Après 16 semaines on peut observer un phénotype d'HSF, avec protéinurie et insuffisance rénale progressive. La mortalité devient importante au-delà de 28 semaines⁹⁵.

Modèles transgéniques et génétiques de hyalinose segmentaire et focale

Le modèle NEP25 correspond à un modèle murin transgénique où le podocyte exprime sélectivement le CD25 (ou récepteur à l'IL-2) humain. L'injection d'une immunotoxine ciblant le CD25 provoque alors un tableau de déplétion podocytaire avec développement de lésions d'HSF en quelques semaines.^{96,97}.

Le modèle de toxine diphtérique est un modèle de rat transgénique exprimant le récepteur à la toxine diphtérique au sein des podocytes. L'injection de la toxine induit une déplétion podocytaire avec apparition d'une protéinurie et des lésions de HSF en fonction du degré de déplétion⁹⁸.

Le modèle transgénique Thy 1.1 est issu de l'insertion d'un gène hybride humain-souris Thy 1.1 dans les zygotes des souris croisées CBA × C57BL/10. Il est marqué par une expression ectopique de ce transgène au niveau rénal chez la souris (gène non exprimé habituellement) et notamment podocytaire. Cette expression induit une protéinurie à huit semaines de vie avec l'apparition de lésions d'HSF à six mois de vie⁹⁹. Un modèle inductible a été mis en place par la suite avec l'injection d'anticorps monoclonaux anti-Thy 1.1 dans ces souris transgéniques, induisant une protéinurie importante dès les premières heures post-injection avec des lésions de HSF dans les trois semaines¹⁰⁰.

Enfin, il existe des modèles génétiques touchant des protéines impliquées dans la fonction podocytaire. Les mutations identifiées dans ces protéines sont associées notamment à des HSF génétiques chez l'homme. On peut citer le modèle lié à la mutation de la podocine (protéine impliquée dans la fonction du diaphragme de fente)¹⁰¹ ou encore le modèle dit *WT1* (Wilms Tumor 1)^{102,103}.

En conclusion, il existe une grande diversité de modèles d'HSF avec comme élément central l'atteinte podocytaire. A l'image des lésions observées chez l'homme, ces modèles reflètent

des mécanismes d'HSF d'origine secondaire, que ce soit à une mutation génétique touchant les éléments du podocyte, la réduction néphronique ou encore une possible atteinte directe d'origine infectieuse ou toxique⁷⁴.

2.1.3.3 Mécanisme initial et composition cellulaire des lésions d'HSF

La HSF peut donc faire suite à de multiples causes. Au niveau histologique avant même la formation des lésions de HSF, on observe une atteinte podocytaire en microscopie électronique avec l'effacement des pédicelles reflet de l'agression podocytaire¹⁰⁴.

La déplétion podocytaire est associée à la formation des lésions de HSF^{98,105}. Cependant les podocytes sont des cellules épithéliales différenciées de manière terminale ne pouvant proliférer⁷⁷. Le développement et la composition des lésions fait donc suite à des mécanismes cellulaires supplémentaires impliquant les PEC.

- HSF Primitive

L'hypothèse soutenue actuellement est l'existence d'un facteur circulant immun responsable des HSF primitives. Même s'il reste à ce jour indéterminé, il existe des arguments soutenant cette hypothèse. La HSF primitive est une pathologie rénale qui récidive après la transplantation rénale de façon précoce et brutale¹⁰⁶ avec une bonne réponse au traitement par plasmaphérèse¹⁰⁷. L'injection de plasma de patients avec HSF primitives chez le rat induit une protéinurie¹⁰⁸. De plus la mise en contact *in vitro* de sérum de patients avec une HSF primitives, induit une plus grande perméabilité glomérulaire¹⁰⁷ et une modification phénotypique des podocytes¹⁰⁹.

Différents facteurs ont été discutés sans qu'aucun ne soit consensuel¹¹⁰. On peut citer à titre d'exemple le microARN miR-193a. Il inhibe le transcrite de la protéine de la tumeur de Wilms (WT1) dans les podocytes. Son expression dans les souris induit rapidement une HSF d'allure primitive^{110,111}. La protéine cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1), membre de la famille des interleukines 6 a été retrouvée dans le plasma de patients avec HSF primitives. L'exposition de glomérules de rat isolés à la protéine CLCF1 a été associée une augmentation de la perméabilité à l'albumine¹¹².

- HSF secondaire

Cette forme d'HSF correspond à une réponse adaptative du fait d'une augmentation de pression glomérulaire lors d'une réduction de la masse néphronique totale^{113,114}. Il s'ensuit une hypertrophie glomérulaire associée à une augmentation de la surface des capillaires et à un étirement podocytaire qui induit in fine un détachement podocytaire¹¹⁵⁻¹¹⁸.

Par ailleurs, il peut y avoir également une atteinte podocytaire directe par un mécanisme toxique ou encore infectieux⁷⁴. Parmi les HSF d'origine virale, on peut citer la réponse interféron de type 1 pouvant induire une dysfonction podocytaire à travers l'interaction interféron/ApoL1/Jak/Stat^{119,120}. De même, l'administration d'interféron a été aussi associée aux HSF¹²¹.

Concernant les causes toxiques, on peut citer certaines thérapies ciblées en oncologie qui ont une toxicité en lien avec des voies primordiales dans l'homéostasie podocytaire (inhibiteur de tyrosine kinase comme le dasatinib¹²², ou encore les inhibiteurs de mTOR comme le sirolimus^{123,124}).

- HSF génétique

Enfin, on citera les HSF génétiques associées à des mutations mettant en défaut des voies de signalisation vitale pour la fonction podocytaire avec typiquement des atteintes des protéines entrant dans le fonctionnement du diaphragme de fente (podocine, nephrine)¹²⁵.

2.1.3.4 Rôle des cellules résidentes dans la composition du croissant extracapillaire et des lésions de hyalinose segmentaire et focale

La composition du croissant extracapillaire et la lésion de HSF a été longuement discutée. Aujourd'hui, il est admis que la PEC en est le principal composant¹⁷ même si les autres types de cellules jouent un rôle déterminant dans sa formation.

La PEC, composant majeur du croissant extracapillaire

Plusieurs études ont suggéré que le croissant était majoritairement composé de PEC chez l'homme^{126,127}. En immunohistochimie, on a pu observer que les croissants exprimaient des

marqueurs des cellules dites progénitrices CD133/CD24¹²⁸⁻¹³¹ ou cytokératines chez l'homme¹³². Nitta *et al.* ont montré chez l'homme que le composant majeur du croissant était la PEC¹³³. Récemment, des expérimentations utilisant des techniques de marquage génétique (lineage tracing) ont pu montrer que les PEC étaient les composants majeurs des croissants extracapillaires dans des modèles expérimentaux d'HSF ou GEC et qu'elles étaient activées (CD44 +)¹⁷.

Implication du podocyte

De manière chronologique, les premières études ont attribué la composition majeure du croissant aux PEC^{126,127}. Des études par marquage immunohistochimique⁵⁶ puis par traçage génétique¹³⁴ ont réinterrogé le rôle du podocyte comme composant majeur du croissant et comme cellule pouvant se multiplier (exprimant notamment des marqueurs de prolifération comme PCNA ou Ki-67).

En effet, la difficulté d'identifier les podocytes comme composants des croissants était expliquée par la perte de ses marqueurs de différenciation. Thorner *et al.*, en utilisant un marquage podocytaire nestine qui se maintenait au cours de la formation des croissants, proposaient le podocyte comme composant principal de ces lésions chez l'homme et dans des modèles murins¹³⁵. Dans une étude par marquage génétique podocytaire, Moeller *et al.* ont ainsi montré que les podocytes composant le croissant (β -galactosidase (+)) n'exprimaient pas de marquage podocytaire spécifique (WT-1, synaptopodine, GLEPP-1, podocine)¹³⁴.

Ensuite, des études de traçage génétique par la même équipe^{17,115} ont montré que les PEC étaient bien l'un des composants majeurs du croissant extracapillaire (modèles NTS) mais aussi dans les lésions de HSF (modèle de HSF aigu, Thy 1.1 avec anticorps et modèle Thy-1.1 chronique). Dans ces modèles, les PEC composaient ces lésions d'HSF malgré l'allure histologique « non cellulaire ». Les PEC étaient en contact du floculus. Ainsi les auteurs suggéraient que la perte des marqueurs podocytaires pouvait refléter le remplacement des podocytes par les PEC plus qu'une dédifférenciation des podocytes¹¹⁵. Récemment Kuppe *et al.* ont montré dans divers modèles d'HSF (Thy 1.1 ou encore néphrectomie des 5/6^{ème}), qu'il s'agit notamment des sous-populations de PEC dites intermédiaires, qui devenaient activées et contribuaient à la formation des lésions d'HSF¹³⁶.

Cependant le rôle du podocyte reste prépondérant dans la formation des lésions, que ce soit comme cellules exposées à l'agression initiale⁴¹ ou via de multiples voies de signalisation.

Ainsi, plusieurs voies de signalisation étudiées au sein du podocyte *in vitro* et dans des modèles murins de croissants extracapillaires ont montré leur implication dans la formation du croissant extracapillaire^{15,16,137,138}.

Bollé *et al.* ont montré une expression de novo de l'HB-EGF dans les podocytes (et les PEC) au cours des GEC humaines ou chez la souris dans le modèle NTS. Chez les souris déficientes en HB-EGF, ou après la délétion podocytaire de l'EGFR, les lésions glomérulaires dans le modèle NTS sont réduites, soulignant l'importance de cette voie dans le podocyte¹⁶. De plus, dans le modèle NTS la déplétion de STAT 3 au niveau du podocyte réduit les lésions de croissants extracapillaires¹³⁸. Ding et al ont quant à eux montré que la surexpression de CXCR4 podocytaire, récepteur surexprimé au cours de l'activation de HIF, induisait des lésions extracapillaires¹³⁷. Par ailleurs, on peut citer l'importance de la voie du Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) dont la déplétion podocytaire majore les lésions glomérulaires au cours du modèle NTS¹³⁹. Enfin, des micro-ARN dont miR-92a podocytaire ont été impliqués spécifiquement dans la régulation du podocyte au cours des GEC. Sa délétion podocytaire améliorerait les lésions de croissants au cours du modèle NTS.¹⁵

Ainsi, l'ensemble de ces études utilisant des délétions spécifiques podocytaires, souligne le rôle clé de cette cellule au cours de la formation des croissants extracapillaires, même si elles ne correspondent pas au composant principal du croissant extracapillaire.

Que ce soit au sein des mécanismes lésionnels de HSF ou de croissants extracapillaires, la PEC semble participer à une voie finale commune réactionnelle à l'agression initiale généralement podocytaire ou endothéliale. Nous allons voir dans la section suivante plus en détails les mécanismes impliqués dans ces modifications phénotypiques et les principales voies de signalisation étudiées à ce jour pour expliquer le rôle des PEC dans le développement des lésions.

3 La cellule épithéliale pariétale

3.1 Caractéristiques des cellules épithéliales pariétales

3.1.1 Genèse des PEC

La cellule épithéliale pariétale (PEC) a une origine similaire à celle des cellules podocytaires. Elles partagent ainsi les mêmes origines que les podocytes jusqu'au stade S de la glomérulogénèse et expriment les mêmes marqueurs¹⁴⁰. Ce n'est qu'au stade de la « capillary loop » que les PEC se distinguent des podocytes, chacun exprimant un ensemble de protéines spécifiques¹⁴¹.

3.1.2 Description histologique

La cellule épithéliale pariétale (PEC) tapisse la capsule de Bowman sur son versant interne d'une monocouche. Il s'agit de cellules épithéliales relativement plates d'une épaisseur de 0,1 à 0,3 μm pouvant présenter un à plusieurs cils primaires¹⁴².

Les PEC font la jonction au pôle vasculaire du glomérule avec les podocytes et au pôle urinaire avec les cellules tubulaires proximales.

3.1.3 Expression protéique

Au-delà de l'aspect morphologique, la PEC se différencie des podocytes par l'expression de certaines protéines.³¹ (**Tableau 2**).

Protéines de jonctions

Les PEC expriment différentes protéines de jonctions et de cadhérines. On note ainsi l'expression de claudin-1, 2 et 3¹⁴³; des protéines Zonula occludens-1 (ZO-1) et des occludins³¹ ainsi que des cadhérines^{144,145}.

Facteurs de transcription

On note l'expression de deux facteurs de transcription spécifique aux PEC apparentés à la famille des « paired box gene » et exprimés notamment durant le développement foetal que sont PAX2¹⁴⁶ et PAX 8¹⁴⁷. PAX2 contribue notamment au développement morphologique de la PEC sous forme squameuse¹⁴⁸.

On retrouve par ailleurs l'expression d'HNF1b au sein de ces cellules¹⁴⁴.

Cytosquelette – Protéines de filaments intermédiaires

On peut observer au niveau des PEC principalement une expression chez l'homme des cytokératines 8 et 18 (aussi retrouvée chez la souris), avec dans une moindre mesure, une expression des cytokératines 7 et 19¹⁴⁹. A l'inverse, il n'y a pas d'expression des desmines et de la vimentine, exprimées par les podocytes¹⁵⁰.

Catégories	Protéines	PEC	Podocyte	pPod
Facteur de transcription (PEC)	PAX2	+++	-	+
	PAX8	+++	-	+
	HNF1b	+	-	NA
Jonctions serrées	Claudin-1	+	-	+
	Claudin-2	+	-	NA
	Claudin-3	+	+	NA
	Occludine	+	-	NA
	ZO-1	+	+	NA
Jonctions (autres)	K-cadherine	+	-	NA
	KSP-cadherine	+	-	NA
Enzyme	PGP9.5	+	-	NA
	CD10	+	+ (humain)	NA
Antioxydant	Ceruloplasmine	+	-	NA
Filament intermédiaire	Cytokeratine	+	-	-
	Cytokeratine 8	+	-	NA
	Desmine	-	+	NA
	Vimentine	-	+	NA
Glycoprotéines	Podocalyxine	-	+	+
Factor de transcription (podocyte)	WT-1	-	+	+
Diaphragme de fente	Nephrine	-	+	+
	Podocine	-	+	+
Protéines liées à l'actine	α -ACTN4	-	+	+
	Synaptopodine	-	+	+
Tyrosine phosphatase	GLEPP-1	-	+	+
Cycle cellulaire	CKIp57	-	+	±
Facteur de croissants	VEGF	-	+	+

ACTN-4, actinin; GLEPP, glomerular epithelial protein; h, human; HNF1b, hepatocyte nuclear factor; KSP, kidney specific; m, mouse; mAb, monoclonal antibody; NA, non applicable; PAX, paired box gene 2; PEC, parietal epithelial cell; PGP9.5, protein gene product 9.5; Ppod, parietal podocyte; rt, rat; VEGF, vascular endothelial growth factor; WT-1, Wilm's tumor suppressor protein 1; ZO-1, zonula occludens-1.

Tableau 2. Expression protéique différentielle entre les cellules épithéliales pariétales et les podocytes (d'après Ohse et al.)³¹

3.1.4 Sous-catégorie de cellules épithéliales pariétales

On distingue trois différentes sous-population de PEC en fonction de leur localisation sur la capsule de Bowman, leur caractéristiques morphologiques et des expressions protéiques différentes¹³ (**Figure 6**) :

- Les PEC plates situées à partir du pôle vasculaire du glomérule
- Les PEC cuboïdes se situent au niveau du pôle urinaire
- Les PEC intermédiaires font la jonction des PEC plates et cuboïdes

A ces PEC plates, on peut ajouter au niveau du pôle vasculaire un contingent de cellules péripolaires caractérisées par leur large taille et leur aspect granulaire à la microscopie électronique¹⁴, appelées parfois podocytes pariétaux. Elles expriment à la fois des marqueurs podocytaires (nestine, dipeptidyl peptidase 4 et aminopeptidase A) et de PEC (Claudin-1)¹⁵. Ces PEC plates, qui expriment notamment des marqueurs de cellules souches (CD24/CD133) sont parfois considérées comme des cellules multipotentes avec un possible rôle de régénération au niveau du néphron¹⁶. Ainsi l'injection de ce subset de PEC CD24/CD133 a été associée à une amélioration des lésions rénales dans différents modèles murins^{128,151}.

Cette différence de sous-population ne s'arrête pas à la description morphologique des PEC, mais semble aussi avoir son importance dans les mécanismes lésionnels impliqués dans les glomérulonéphrites extracapillaires ou les lésions de hyalinose segmentaire et focale. De plus ces sous-populations se caractérisent par une expression protéique différentielle entre les différents sous-types de PEC.

Ces différents sous-types de PEC pourraient jouer un rôle spécifique en pathologie. Ainsi, Kuppe *et al*, par une méthode combinant marquage génétique et immunofluorescence au sein d'un modèle murin de hyalinose segmentaire et focale, ont montré d'une part une activation différentielle des sous-populations des PEC avec une expression majeure de CD44 (marqueur d'activation des PEC) dans les PEC cuboïdes et d'autre part une tendance plus importante des PEC intermédiaires à proliférer¹³⁶.

Ainsi, les lésions extracapillaires définies par la prolifération cellulaire au sein de l'espace de Bowman sont majoritairement composées des PEC cuboïdes et intermédiaires.

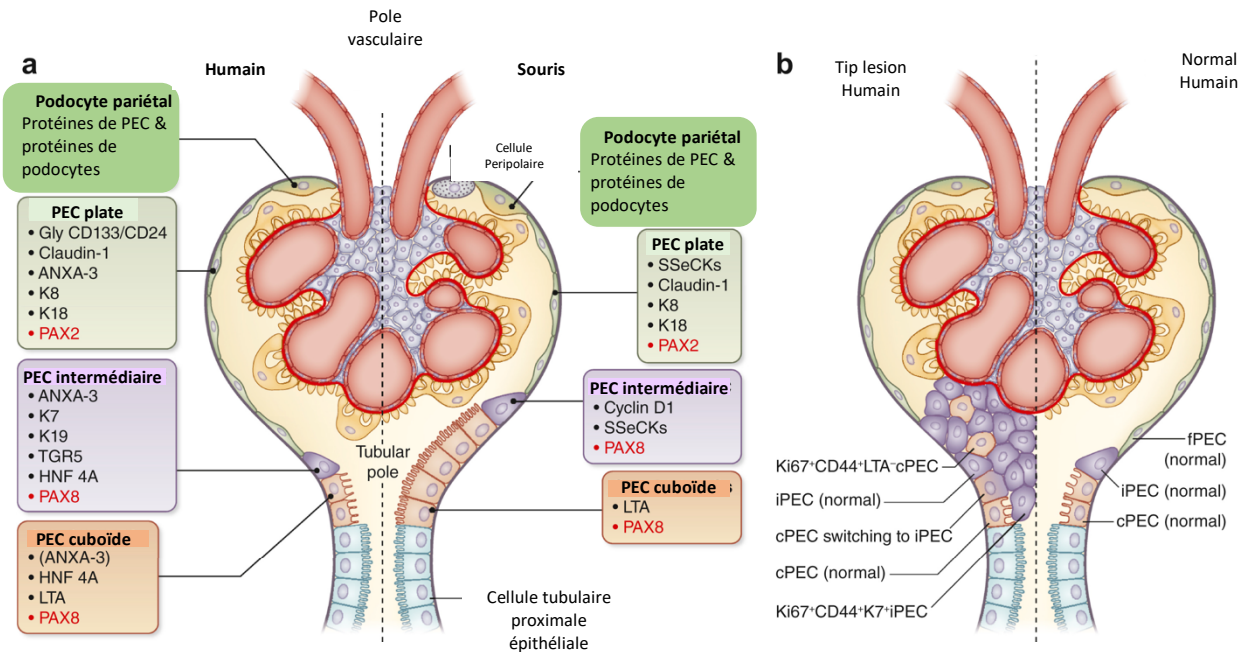


Figure 6. Caractéristiques des sous-populations de cellules épithéliales pariétales chez l'homme et la souris (d'après D'Agati et al. et Kuppe et al)^{136,152}.

(a) Sous-populations de cellules épithéliales pariétales (PEC) dans le glomérule normal. Schéma montrant les différentes sous-populations de cellules épithéliales pariétales le long de la capsule de Bowman (bleu) chez l'homme (côté gauche) et la souris (côté droit), selon leur aspect histologique et les marqueurs. Pôle vasculaire : podocytes pariétaux chez l'homme et la souris et les cellules péripolaires chez la souris ; PEC plates (fPEC ; vert) ; PEC intermédiaires iPEC ; violet ; PEC cuboïdes cPEC au pôle tubulaire. Les marqueurs en rouge ont été utilisés pour caractériser les sous-populations chez les souris rapporteuses transgéniques et ne représentent pas nécessairement l'expression des protéines endogènes. **(b) Schéma montrant la lésion 'TIP' au cours de la HSF dans le glomérule humain.** Les fPEC, iPEC et cPEC normaux sont représentés à droite ANXA-3, annexine A3 ; Gly CD133/CD24, CD133/CD24 glycosylée ; HNF 4A, hepatocyte nuclear factor 4 alpha ; K7, kératine 7 ; K8, kératine 8 ; K18, kératine 18 ; K19, kératine 19 ; LTA, lotus tetragonolobus agglutininin ; PAX2, paired box gene 2 ; PAX8, paired box gene 8 ; SSeCKs, src-suppressed C-kinase ; TGR5, G protein-coupled bile acid receptor 1.

3.2 Rôle physiologique des cellules épithéliales pariétales

Rôle de barrière de perméabilité

Le rôle de barrière des PEC a été montré dès 1971, les PEC exprimant différentes jonctions (serrées, desmosomes, intermédiaires)¹⁵³. Elles limitent le passage de l'urine primitive au niveau periglomérulaire et interstitiel¹⁴⁷. A l'inverse, cette barrière peut également avoir un rôle limitant l'infiltrat inflammatoire dans le glomérule³⁸.

PEC et albumine

Les PEC ont une capacité d'endocytose de l'albumine jusqu'à une certaine limite à travers la mégaline avec un risque d'apoptose en cas d'exposition à l'albumine trop importante¹⁵⁴. Dans une autre étude, l'exposition des PEC de rat à l'albumine induit par ailleurs CD44 via la mégaline¹⁵⁵. Cette activation pourrait d'ailleurs participer à la toxicité de la protéinurie au cours de la maladie rénale chronique.

Mecanosenseur et contractilité

Les PEC ont un cil primaire¹⁴² qui pourrait avoir rôle de mecanosenseur à l'image des cellules tubulaires rénales exposées aux flux du filtrat glomérulaire¹⁵⁶. Cependant, à ce jour, le rôle des PEC dans les pathologies impliquant des variants de protéines du cil (ciliopathies) n'est pas connu. De même les PEC présentent une capacité de contractilité pouvant éventuellement réguler la pression dans l'espace de Bowman¹⁵⁷.

Rôle de cellules progénitrices

L'un des rôles majeurs des PEC (mais qui reste grandement débattu) est la possibilité de régénérer les cellules podocytaires : certaines PEC pourraient avoir ce rôle de progéniteur en se différenciant en podocytes¹⁵⁸.

Ainsi, une partie des PEC ont été définies comme « podocytes pariétaux » pouvant exprimer des marqueurs podocytaires^{159,160}. Mais au-delà de l'expression de marqueurs podocytaires de certaines PEC, Sagrinati *et al* ont montré que les PEC pouvaient exprimer des marqueurs de cellules souches embryonnaires¹⁵¹ : CD24/CD133 avec un possible rôle régénératif¹²⁸.

D'autres études par la suite ont suggéré que les PEC pouvaient jouer le rôle de progéniteur pour les podocytes en physiologie comme dans les modèles murins juvéniles montrant que des PEC marqués génétiquement (lineage tracing) pouvaient migrer et exprimer des marqueurs podocytaires¹⁶¹. Cependant, ces résultats n'ont pu être reproduits dans des modèles murins âgés ou encore après avoir provoqué une néphrectomie des 5/6 (modèle d'hypertrophie glomérulaire/HSF)¹⁶².

Le rôle de la PEC comme progéniteur dans des contextes pathologiques sera abordé plus en détail dans la section sur le rôle de la PEC en pathologie.

3.3 La cellule épithéliale pariétale en pathologie

Ces dernières années, les PEC ont été impliquées dans les mécanismes pathogènes de nombreuses pathologies rénales. Notamment, elles apparaissent directement impliquées dans la formation des lésions de hyalinose segmentaire et focale (HSF) et des croissants extracapillaires, lésions associées à la progression de diverses pathologies rénales. Les lésions de croissant correspondent à l'accumulation de plus trois couches cellulaires au sein de la chambre urinaire, lésions survenant dans un contexte d'agression glomérulaire aiguë, notamment lors des vascularites rénales. La lésion d'HSF associe également une accumulation cellulaire dans la chambre urinaire (souvent moins marquée), avec hyalinose podocytaire et podocytose. Ces lésions d'HSF se rencontrent essentiellement dans les contextes de dysfonction podocytaire.

Les mécanismes physiopathologiques impliquant les PEC dans les lésions d'HSF et la formation de croissant extracapillaire semblent similaires. Ainsi, on parle même de développement de pseudo-croissant dans les HSF. Ces lésions associent prolifération cellulaire, dédifférenciation, et migration cellulaire¹⁶³ avec *in fine* la perte du glomérule et du néphron, menant à l'insuffisance rénale⁵. Ainsi Kriz *et al.* définissent trois types de pertes de glomérules : dérégulation, dégénération et inflammatoire. Les deux premières sont liées aux lésions de HSF et la dernière au mécanisme inflammatoire de formation du croissant extracapillaire⁵ (**Figure 7**).

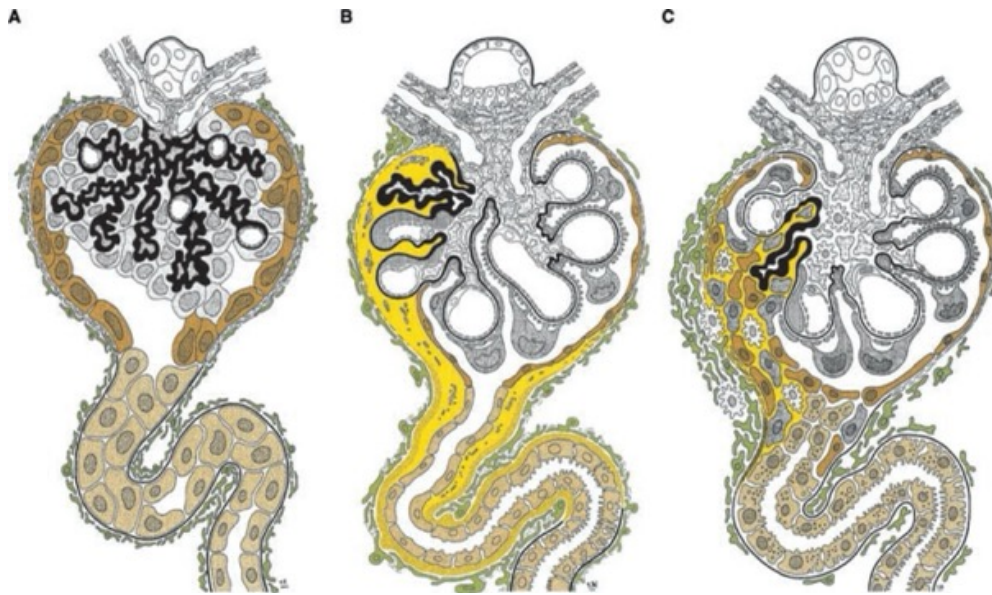


Figure 7. Caractéristiques structurelles essentielles de la voie dysrégulatrice (A), dégénérative (B) et inflammatoire (C) de la dégénérescence du néphron. (d'après Kriz et al.)¹⁶⁴

La membrane basale glomérulaire (MBG) est représentée en noir, les cellules mésangiales au centre, les podocytes sont sur la membrane basale glomérulaire. Les cellules pariétales sont représentées en brun foncé, les cellules du tubule proximal en brun pâle et les fibroblastes en vert. L'extension anormal de l'infiltrat est indiquée en jaune.

3.3.1 Les modifications phénotypiques de la cellule épithéliale pariétale

3.3.1.1 Activation des PEC et rôle de CD44

En réponse à différentes agressions au cours des GEC ou des HSF, les PEC sont dites « activées »¹⁶³. On observe alors une modification du phénotype avec des cellules plus larges et qui vont pouvoir proliférer et migrer.

Cette activation est caractérisée notamment par l'expression de CD44, marqueur « spécifique » des PEC activées comparées aux autres cellules glomérulaires résidentes^{17,115,165}.

CD44 est une glycoprotéine transmembranaire de surface exprimée par nombre de cellules^{166,167}, dont il existe de multiple isoformes. Il s'agit d'un récepteur de nombreux ligands comme l'acide hyaluronique, l'ostéopontine et les métalloprotéases (MMP-9)¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Ses

fonctions physiologiques sont multiples : CD44 est impliquée dans les mécanismes d'hématopoïèse, et de prolifération et de migration des cellules lymphocytaires¹⁷¹. Au niveau physiopathologique, CD44 est associée à une capacité d'invasion et de migration accrue de cellules cancéreuses épithéliales comme observé dans le cancer du sein¹⁷² ou le cancer de la prostate¹⁷³. De plus, chez l'homme son expression en immunohistochimie dans les carcinomes colorectaux est associée à un stade plus avancé du cancer¹⁷⁴. L'inactivation de CD44 *in vitro* dans des cellules de cancer hépatique diminue ainsi la capacité des tumeurs à migrer et à se différencier¹⁷⁵.

Au niveau rénal, CD44 n'est pas exprimée en condition physiologique. Il a été montré une surexpression au niveau tubulaire dans des modèles d'ischémie reperfusion chez le rat¹⁷⁶. Au sein du glomérule, il a été montré que seules les PEC activées composant les lésions de croissants extracapillaires ou d'HSF exprimaient CD44^{115,163}.

3.3.1.2 Prolifération

Au niveau glomérulaire, les PEC tout comme les cellules mésangiales et endothéliales, ont une capacité de renouvellement de l'ordre de 1% par jour chez le rat, contrairement aux podocytes qui ne présentent aucune capacité de renouvellement¹⁷⁷. Chez l'homme, l'évaluation de marquages par Ki-67 et PCNA sur biopsies de reins normaux a permis d'observer de manière similaire un index de prolifération présent mais faible dans les PEC, comparé à d'autres lignes cellulaires rénales (tubulaires ou endothéliales)¹⁷⁸.

En pathologie, que ce soit au sein de lésions d'HSF ou de croissants extracapillaires, on observe également une surexpression des marqueurs de prolifération cellulaire au sein des PEC chez l'homme^{146 179}.

L'expression d'inhibiteur de cycline kinase a été étudiée dans différents modèles, notamment p21, inhibiteur de cycline kinase inhibant l'entrée en cycle cellulaire et la prolifération. Au cours des HSF chez l'homme, les PEC en prolifération (Ki67 +) sont p21 négatif suggérant l'entrée en cycle cellulaire de ces cellules. Une observation similaire a été notée au sein des croissants extracapillaires dans un modèle de GEC, avec des PEC perdant l'expression de p21 alors que l'expression est maintenue dans le podocyte¹³³. Kim et al ont montré que les souris invalidées pour p21 sur le plan systémique développaient des lésions extracapillaires plus

sévères que les souris sauvages dans un modèle murin de GEC¹⁸⁰. De même, dans un modèle murin d'HSF, les souris invalidées pour p21 présentaient des lésions d'HSF plus importantes associées à une prolifération majorée des PEC¹⁸¹.

Enfin, on citera une autre possible voie de prolifération qu'est l'activation de PGP 9.5, une ubiquitine surexprimée dans les PEC en immunohistochimie au sein des croissants au cours du modèle rat NTS et chez l'homme^{182,183}.

Ainsi, la prolifération cellulaire des PEC semble être un mécanisme important du développement des lésions d'HSF et de croissants extracapillaires.

3.3.1.3 Migration et sécrétion de matrice

Au cours du développement des lésions d'HSF ou de croissants extracapillaires, la PEC activée adopte un phénotype évocateur de transition épithéliaux-mésenchymateuse (TEM). La TEM se définit par la capacité des cellules épithéliales à modifier leur phénotype en phénotype mésenchymateux acquérant de nouvelles fonctions liées notamment à la capacité de migration. S'y associe une baisse d'expression de marqueurs épithéliaux et une surexpression de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine ou alpha-SMA¹⁸⁴.

De façon intéressante, que ce soit chez l'homme, sur des biopsies de GEC ou dans des modèles animaux de GEC ou d'HSF, on observe une dédifférenciation des PEC avec perte de marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine, perte de l'expression des jonctions serrées et une surexpression de marqueurs mésenchymateux (expression de novo d'alpha-SMA, perte de polarité, de microvilli) associée à une surexpression de TGF-beta¹⁸⁵⁻¹⁸⁸.

Un autre facteur de transcription, Snail (ou Zinc finger protein SNAI1) impliqué dans les mécanismes de dédifférenciation cellulaire et de TEM²⁰⁶, est aussi surexprimé au cours de l'activation et la dédifférenciation des PEC observées *in vitro*^{207,208}.

Au-delà de leur dédifférenciation, les PEC activées vont présenter une capacité de migration^{31,163}. Plusieurs études ont montré l'implication de la migration de la PEC en « remplacement » des podocytes comme possible progéniteurs¹⁵ ou encore en contribuant aux lésions de HSF ou de croissants extracapillaires.

En effet, l'invalidation de diverses voies majeures impliquées dans l'activation de la PEC (Cf section 2.3.3) a été associée à une diminution de la migration des PEC *in vitro* et une diminution des lésions de croissants ou de HSF *in vivo*^{19,23}.

Les PEC contribuent également à la synthèse des protéines composant la matrice^{19,23,115}.

En effet, alors que les GEC présentent des PEC avec un phénotype migratoire et prolifératif, au cours des HSF, le phénotype est plus en faveur d'une production de matrice extracellulaire¹¹⁵.

3.3.1.4 Rôle de progéniteur des PEC

Nous avons vu que les PEC étaient impliquées dans le développement des croissants extracapillaires et des lésions d'HSF, tant dans des modèles murins que chez l'homme. Néanmoins, certaines études tendent à suggérer que les PEC peuvent également jouer un rôle bénéfique en réponse à une agression initiale podocytaire.

En effet, Il existe différentes réponses à la déplétion podocytaire : un mécanisme de régénération peut s'observer dans des agressions aiguës. Cependant, ce mécanisme n'est pas observé dans les modèles d'aging ou de réduction néphronique (réponse dégénérative et hyperplasique)¹⁸⁹.

Ce rôle progéniteur a été étayé par de récentes études. Ohse *et al.* ont montré que des cellules pouvaient à la fois exprimer des marqueurs de PEC et de podocytes tels que la coexpression de PAX-8/synaptopodines, ou encore de WT-1/Claudin-1 dans des modèles murin d'HSF (modèle adriamycine) et de croissants extracapillaires (modèle NTS)¹⁹⁰. De plus, Eng *et al.* ont montré dans un modèle murin d'HSF (anticorps anti-podocytes) que les PEC pouvaient présenter une dualité avec un rôle profibrosant responsable des lésions d'HSF, notamment à la phase initiale, puis un rôle régénératif puisqu'exprimant des marqueurs podocytaires à distance de l'agression podocytaire¹⁹¹. Dans cette étude, une analyse du pourcentage de déplétion podocytaire permettait d'observer un nadir de perte podocytaire à J14 de l'induction de l'HSF, avant une amélioration du nombre de ces cellules. D'un point de vue

fonctionnel, on notait une protéinurie majeure dès J7, avant une amélioration progressive les jours suivants, suggérant une « réparation podocytaire ».

Par ailleurs, au cours de cette étude, on pouvait distinguer deux sous-types de PEC, l'un exprimant des marqueurs podocytaires allant dans le sens de l'hypothèse régénérative et un autre sous-type distinct exprimant CD44 avec un rôle profibrosant. De plus, la phosphorylation de ERK (protéine de la famille des MAPkinases impliquées dans la prolifération et la croissance cellulaire¹⁹²) n'était observée que dans les PEC CD44 (+). L'implication de ERK dans la modulation de CD44 a été étayée par Roeder *et al*, en montrant que l'expression de CD44 était associée à la synthèse de matrice extracellulaire (diminution du marquage collagène IV chez les souris invalidées pour CD44). In vitro, l'inhibition de ERK était associée à une diminution de l'expression de CD44¹⁹ (**Figure 8**).

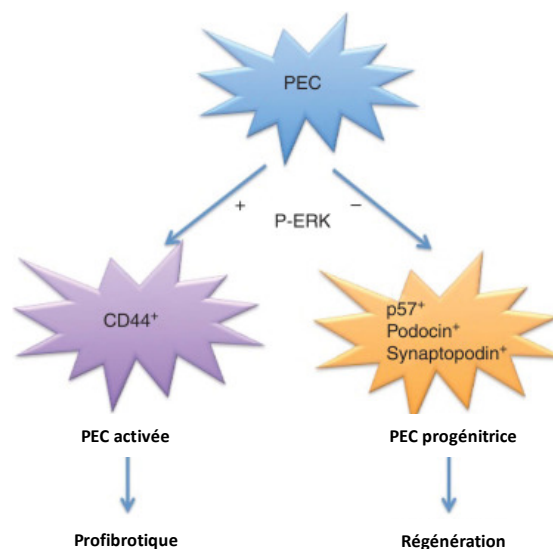


Figure 8. Sous-population de PEC au cours de la hyalinose segmentaire et focale selon l'expression de pERK et leur rôle profibrotique ou régénératif. (d'après Eng et al.)¹⁹¹

On distingue deux sous-ensembles de PEC. Soit des PEC profibrotique : PEC activées (CD44+) co-expriment phospho-ERK, soit régénératrice : n'expriment pas phospho-ERK et sont des progéniteurs podocytaires (expriment p57, podocine et synaptopodine).

Ces mécanismes de régénération sont aussi observés dans le modèle adriamycine, où ils semblent dépendre de la voie CXCL12, qui exercerait un rôle inhibiteur sur Notch et empêcherait l'activation des PEC et donc la régénération podocytaire¹⁹³.

Cette dualité entre implication des PEC dans des mécanismes profibrosants d'HSF et/ou de régénération a été de nouveau observée dans un modèle murin de HSF par Kaverina *et al.* Il a été observé chez des souris adultes étudiées par traçage génétique pour les PEC et les podocytes, que les PEC migraient dans les lésions de HSF. Cependant, une partie des PEC se transdifférençait en podocytes (coexpression de marqueurs de PEC et podocytes) et formaient des structures proches des pédicelles podocytaires¹⁹⁴. Cependant il n'est pas encore évident que les PEC puissent remplir la fonction du podocyte malgré un phénotype similaire. D'un point de vue fonctionnel, l'albuminurie va dans un premier temps se majorer, atteignant un pic à J3 avant de régresser progressivement suggérant un mécanisme de réparation.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent une dualité entre la PEC « régénératrice » exprimant des marqueurs podocytaires et la PEC « fibrosante » pERK/ CD44 (+).

3.3.2 Voies de signalisation impliquées en pathologie

Le rôle délétère de la PEC activée au cours de la formation de la HSF ou du croissant extracapillaire a été établi à travers diverses études en montrant :

(i) que les lésions d'HSF ou de croissants étaient composées de PEC activées que ce soit chez l'homme ou dans les modèles animaux (Cf ci-dessus)¹⁶³.

(ii) que différentes voies de signalisation au sein des PEC pouvaient être modulées et limiter les lésions *in vivo*. En effet, de multiples voies de signalisation régulent l'activation des PEC.

Voie de signalisation impliquant CD44

CD44 est une glycoprotéine de surface jouant des rôles multiples dans une grande variété de cellules, notamment dans la migration ou l'interaction avec la matrice ou encore la chémoattraction¹⁹⁵. CD44 est un marqueur de PEC activées mais n'est pas détecté dans les PEC en condition physiologique que ce soit chez l'homme¹⁹⁶ ou encore chez la souris¹⁷. Eymael *et*

al, ont montré que dans des modèles murins d'HSF et de GEC, l'invalidation systémique de CD44 permettait une diminution de la prolifération cellulaire et de la taille des lésions glomérulaires. *In vivo*, on observait moins d'expression de Ki67 par les cellules occupant l'espace de Bowman chez les souris invalidées pour CD44. *In vitro*, les cellules glomérulaires ont été isolées des souris invalidées pour CD44 et sauvages. On observait une croissance moins importante des cellules glomérulaires issues des souris invalidées pour CD44. CD44 semble donc jouer un rôle dans la prolifération et la migration des PEC²⁰.

Des résultats similaires ont été observés par Roeder *et al* dans un modèle d'HSF, avec notamment l'observation d'une diminution de l'accumulation de matrice extracellulaire au cours de l'invalidation systémique de CD44. Dans ce travail, la surexpression de CD44 dans les PEC était associée à une migration accrue et à la surexpression de collagène IV. De plus, les auteurs observaient une surexpression de p-ERK dans les PEC que ce soit chez les patients ou les souris avec HSF. La surexpression de p-ERK était associée à une surexpression de CD44 et à la migration des PEC, faisant de la voie ERK un possible régulateur de l'activation des PEC²⁰⁹. Les mécanismes en amont de l'activation de ERK n'étaient cependant pas identifiés.

Au-delà des données fondamentales, des résultats chez l'homme tendent à confirmer ce rôle pathogène de l'expression de CD44.

Premièrement, le marquage des PEC et notamment CD44 permet de sensibiliser le diagnostic de lésions d'HSF. Bien qu'il existe des mécanismes communs sous-tendant un possible continuum entre syndrome de lésions glomérulaires minimales (LGM) et HSF primitives, ces dernières ont un pronostic plus réservé⁷³. De plus, du fait de l'atteinte focale de la HSF, un diagnostic initial de LGM peut être porté à tort sur l'échantillon biopsié. Smeets *et al* ont montré que parmi 57 LGM initiales, l'utilisation de marqueurs de PEC et notamment CD44 permettait de redresser le diagnostic d'HSF dans 25% de cas considérés comme LGM, avec l'identification de lésions d'HSF¹⁹⁷.

Par ailleurs, ce marquage apporte aussi un rôle pronostic. Roca *et al* ont montré qu'au cours des LGM, parmi celles exprimant CD44 (LGM-CD44 (+)), 60% étaient résistantes au traitement de première intention (corticostéroïdes) contre seulement 20% des LGM CD44 (-). De plus, au cours du suivi, 80% de ces LGM-CD44 (+) présentaient des lésions de HSF contre 16% des LGM-CD44 (-) à la rebiopsie¹⁹⁸. Enfin, sur des biopsies de HSF humaines pédiatriques, l'expression de CD44 était associée à une moins bonne survie rénale¹⁹⁹ mais on ne notait pas de différence

en termes de protéinurie (que ce soit initialement ou à la fin du suivi). Ainsi, le marqueur CD44 semble associé chez l'homme au cours des LGM ou HSF a une moins bonne réponse thérapeutique et un plus mauvais pronostic.

Voie impliquant STAT 3

Estrada *et al.* ont mis en exergue le possible rôle du facteur de transcription stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) dans la formation des lésions de HSF et de croissants extracapillaires. L'activation de STAT3 dans les PEC serait dépendante de la sécrétion d'IL-6 par les podocytes, dans un mécanisme de cross talk podocyte-PEC²⁰⁰. Dans ce modèle, la délétion podocytaire de KLF-4, (Krüppel-like factors, protéine de la famille des facteurs de transcription en doigt de zinc impliquée dans les mécanismes de tumorigénèse ou encore d'activation immunitaire²⁰¹) était associée à une activation de STAT3 3 (phospho-Stat 3). Dans le modèle NTS, les souris invalidées pour KLF-4 montraient des lésions extracapillaires plus importantes avec activation et prolifération des PEC concomitamment à une activation de STAT3 podocytaire et des PEC. De même la délétion podocytaire de KLF-4 dans les souris FVB/N (plus enclines à développer des lésions glomérulaires²⁰²) induisait des lésions de prolifération extracapillaire, composées de PEC. Enfin, dans ce même modèle, l'utilisation d'un inhibiteur de Stat 3, S3I-201, qui fixe le domaine SH2, est associée à une amélioration des lésions chez les souris invalidées (au niveau des podocytes) pour KLF-4²⁰³. Cet effet protecteur pourrait s'expliquer par un bénéfice au niveau podocytaire comme démontré par Dai *et al*¹³⁸. *In vitro* les podocytes invalidés pour KLF4 entraînent en cycle cellulaire et subissaient une apoptose par catastrophe mitotique. L'utilisation de l'inhibiteur de STAT3 améliorait la survie cellulaire²⁰⁰. En effet, même si le podocyte peut entrer en phase M du cycle cellulaire, il est dans l'impossibilité de réussir la cytokinèse du fait de sa différenciation terminale et de la conformation de son cytosquelette d'actines^{204,205}. Estrada *et al.* ont par ailleurs démontré qu'il s'en suivait un relargage d'IL-6 activant STAT3 dans les PEC et provoquant leur prolifération²⁰⁰.

Voie impliquant HB-EGF/EGFR

Le récepteur à l'EGF (epidermal growth factor) est un récepteur exprimé au niveau membranaire par les cellules épithéliales. Il fait partie de la famille des récepteurs de la famille ERbB et possède sept différents ligands (Epithelial growth factor (EGF), Transforming

growth factor- α (TGF- α), Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), betacellulin (BTC), amphiregulin (AR), epiregulin (EPI), et epigen (EPGN)). En aval de l'activation de l'EGFR, différentes voies de signalisation sont activées, telles que celle des MAPKs ou encore la voie de signalisation phosphatidylinositol polyphosphate (PIP)²⁰⁶.

L'activation de l'EGFR a été impliquée dans la prolifération des cellules tubulaires et la progression de la fibrose rénale^{202,207,208}. Au niveau glomérulaire, l'EGFR est exprimé par les podocytes et les PEC à l'état basal. Au cours des GEC ou des HSF, il a été noté une surexpression de l'HB-EGF dans les podocytes et les PEC^{16,209}. Bollé *et al*, ont montré que l'activation de l'EGFR dans un modèle murin NTS était associée aux lésions extracapillaires. En effet, l'inhibition de la voie par un inhibiteur pharmacologique ou dans des modèles invalidés pour HB-EGF permettait une diminution des lésions¹⁶. De façon intéressante, la phosphorylation de ERK 1/2, située en aval de l'activation de l'EGFR²¹⁰ est associée à l'activation des PEC en favorisant l'expression de CD44¹⁹. De même Lazareth *et al* ont montré le rôle de cette voie sur les PEC et la modification de leur phénotype. Ainsi, l'exposition *in vitro* de PEC à l'HB-EGF était associée à un phénotype migratoire²³.

Voie impliquant PDGF/PDGFR

Le PDGF récepteur a plusieurs ligands (PDGF-A ; -B ; -C ; -D) et deux récepteurs (PDGFR- α et - β), impliqués dans les mécanismes de cicatrisation, fibrose ou dans le contexte tumoral²¹¹. Les PEC vont exprimer le PDGFR- β en situation physiologique comme les cellules mésangiales, alors que les podocytes quant à eux expriment le PDGF-A^{211,212}. L'implication de cette voie a surtout été démontrée dans les mécanismes de prolifération mésangiale au cours des glomérulonéphrites membrano-prolifératives^{211,213}. Au sein des croissants extracapillaires, on note une surexpression du PDGFR β et du PDGF-B chez l'homme²¹⁴. Cette surexpression du récepteur et du ligand au sein des croissants est également observée chez l'animal dans le modèle NTS chez le rat^{187,215}. Ce modèle a permis de montrer en immunohistochimie que la surexpression PDGF-B and PDGFR- β était observée au sein des cellules considérées comme des PEC (cellules de la capsule et croissants)¹⁸⁷. Des études récentes ont confirmé que la PEC exprimait bien le PDGFR- β dans la PEC^{23,216}.

L'utilisation d'un inhibiteur du PDGFR (imatinib) dans un modèle NTS chez le rat est associée à une réduction des lésions^{217,218} suggérant un rôle délétère de cette voie dans les mécanismes

de développement des GEC. Récemment Lazareth *et al*, ont démontré l'implication spécifique de cette voie des PEC. L'activation de la voie PDGFR favorise notamment l'activation, la migration des PEC ainsi que la formation des lésions extracapillaires²³. Cet effet serait dépendant de l'expression de la protéine CD9 en aval du PDGFR.

Voie impliquant CD 9

CD9 est une tetraspanine qui est exprimée au cours des HSF ou des GEC chez l'homme et au cours des modèles murins NTS et de modèles de HSF par réduction néphronique. Son expression est notamment observée au niveau de la PEC. L'invalidation spécifique de CD9 au sein de la PEC inhibe la prolifération et la migration de la PEC, ainsi que la transition épithélio-mésenchymateuse²³. Un des mécanismes proposés passerait par la régulation de l'intégrine ITGB1 (dont l'expression est diminuée dans les PEC invalidées pour CD9). Celle-ci modulerait l'adhésion, la motilité et la prolifération dont l'adhésion est nécessaire pour favoriser la réponse aux facteurs de croissance²¹⁹. Enfin CD9 pourrait médier les réponses aux activations de l'EGFR et le PDGFR²³.

CD9 jouerait aussi un rôle dans la régulation du CD44 observée notamment *in vitro* avec la diminution du transcrit CD44 dans les PEC invalidées pour CD 9²³.

Voie mTOR

La voie mTOR semble jouer un rôle important dans la formation des lésions de croissant extracapillaire ou de HSF, à travers l'activation des PEC. On observe une surexpression de pS6 dans les PEC au sein des croissants que ce soit dans les modèles murins de GEC ou d'HSF²²⁰. Dans un modèle murin de déplétion podocytaire, l'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine favorise une augmentation du nombre de PEC dans les croissants, une activation de ces cellules (surexpression CD44) et la surexpression de marqueurs de TEM (PDGFR- β , α -smooth muscle actin (SMA), Notch-3)²¹⁶. Ainsi, l'inhibition de la voie mTOR semble jouer un rôle délétère dans le développement des lésions dans ce modèle. Néanmoins, cet effet pourrait s'expliquer éventuellement par le timing de l'utilisation de ces inhibiteurs. En effet, comme montré par Kurayma *et al*, il existe une aggravation des lésions lors de l'utilisation des inhibiteurs de mTOR à un stade précoce, mais une réduction des lésions de croissants lors de l'utilisation de ces inhibiteurs à un stade tardif dans un modèle de croissants²²¹.

Voie impliquant le Macrophage migration inhibitory factor

MIF (Macrophage migration inhibitory factor) est une cytokine impliquée dans diverses pathologies inflammatoires, telles que le sepsis, l'athérosclérose ou les polyarthrites inflammatoires²²²⁻²²⁴. Il interagit notamment avec les récepteurs CXCR4 ou CD74^{223,225} et joue un rôle dans le recrutement des leucocytes²²³. Dans le rein humain normal, MIF est exprimé de manière constitutive dans les cellules épithéliales tubulaires, les cellules endothéliales, les cellules mésangiales et les podocytes²²⁶. MIF est surexprimée au cours des GEC chez l'homme, tout comme son récepteur CD74. Chez la souris, au cours du modèle NTS, on observe une expression de novo de CD74 dans les PEC (et dans les cellules mésangiales) tout comme MIF avec une expression précoce dès J3. On notait en plus une coexpression de CD44 et CD74 au sein des PEC au cours du modèle NTS. *In vitro* les PEC exposées à MIF recombinant montraient une prolifération accrue médiée par CD74. Au cours du modèle NTS, les animaux invalidés pour MIF tout comme pour son récepteur CD74 ont montré une réduction des lésions glomérulaires, y compris après greffe de moelle de souris sauvage, suggérant un rôle prépondérant de MIF épithélial dans le développement des lésions (indépendant de MIF exprimé dans les cellules immunitaires circulantes)²²⁷. Il faut noter que CD44 est aussi un corécepteur de CD74²²⁸ et son rôle délétère observé au cours des HSF et GEC^{19,20} pourrait impliquer une potentialisation du signal MIF/CD74-CD44.

Récepteur aux glucocorticoïdes

Alors que les corticoïdes sont un traitement de base des GEC via leur rôle immunomodulateur, Kuppe *et al* se sont intéressés à l'effet direct de ces traitements au sein des PEC. En effet, les PEC expriment le récepteur aux glucocorticoïdes. En invalidant spécifiquement ce récepteur dans les PEC, les auteurs ont montré que les lésions extracapillaires étaient dépendantes de la stimulation de ce récepteur (diminution de l'activation des PEC et diminution des lésions extracapillaires dans le modèle NTS chez les animaux invalidés). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur aux glucocorticoïdes, la Mifépristone était associée à des résultats similaires. Ce résultat étonnant pourrait s'expliquer par une action sélective de l'inhibition de ce récepteur. En effet, que ce soit l'invalidation spécifique du récepteur aux glucocorticoïdes ou l'utilisation de la Mifépristone, cela ne semblait pas majorer la réponse inflammatoire au cours du modèle NTS¹⁸.

La voie Notch

La voie Notch est impliquée dans le développement rénal et joue un rôle actif dans les mécanismes de migration et de prolifération²²⁹. Son implication est large que ce soit dans la carcinogénèse ou les maladies auto-immunes²³⁰.

Une surexpression de Notch dans les podocytes est observée dans les HSF chez l'homme (et la néphropathie diabétique), dans des modèles murins de diabète (*Lepr^{db/db}*) et d'HSF (modèle d'HSF induite par la Puromycine). Par ailleurs, l'inhibition de Notch a un rôle protecteur avec une diminution de la protéinurie dans ce modèle de rat d'HSF²³¹. De même la surexpression podocytaire (inductible) de Notch sous le promoteur de NPHS2 induit chez la souris une protéinurie, une expansion mésangiale et des lésions d'HSF. *In vitro*, les auteurs ont montré que l'activation de Notch était associée à l'apoptose podocytaire²³¹.

Cette surexpression de Notch a aussi été observée dans les PEC chez les patients présentant des lésions d'HSF²³². De plus, la surexpression de Notch *in vitro* sur des PEC en culture a été associée à l'expression de marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse tels que la vimentine ou encore SNAIL 1. A l'inverse, l'inhibition pharmacologique de Notch permettait d'inverser ce phénotype et d'inhiber la migration²³³.

Ainsi inhiber Notch pourrait permettre de limiter les lésions d'HSF. Cependant, à une phase plus tardive, cette inhibition pourrait jouer un rôle délétère en empêchant la régénération podocytaire^{193,232}.

Snail est un facteur de transcription impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse, notamment en aval de la voie du TGF-beta et de Notch²³⁴. Snail a été impliqué dans les mécanismes de fibrogénèse, en contribuant à la transition épithélio-mésenchymateuse notamment au cours des mécanismes de fibrose rénale au sein des cellules tubulaires²³⁵. Sa surexpression a aussi été observée dans les PEC *in vitro* exposées aux TGF-beta²³⁶. De plus, Lazareth *et al.* ont montré que les PEC en culture exprimaient Snail. L'inhibition de CD9 était alors associée à une diminution de l'expression de Snail²³.

Ainsi, Snail est surexprimée au cours de la dédifférenciation des PEC. Cependant son rôle actif au cours de cette dédifférenciation reste à explorer au sein de ces cellules.

Cross-talk podocyte/cellule épithéliale pariétale

Que ce soit dans la GEC ou la HSF, l'agression podocytaire semble être un des éléments à l'origine de l'activation des PEC et la formation des lésions.

Ainsi, plusieurs études ont montré l'implication de voies de signalisation podocytaires dans la formation de lésions extracapillaires (croissants ou HSF)^{16,138}.

Effet paracrine de l'HB-EGF/PDGF

Comme nous l'avons décrit ci-dessus, l'HB-EGF et le PDGF-BB sont deux facteurs de croissance impliqués dans les mécanismes d'activation des PEC et de prolifération extracapillaire^{16,23}.

L'HB-EGF est surexprimé dans les podocytes (et dans les PEC). Quant à son récepteur il est exprimé par les PEC (et les podocytes). L'inactivation systémique de l'HB-EGF était associée à une diminution des lésions dans le modèle NTS¹⁶. De plus, l'exposition des PEC à de l'HB-EGF induit leur migration, via notamment l'activation de CD9²³.

De plus, Lazareth *et al* ont montré le rôle prépondérant de la voie PDGF-BB/PDGFR-beta au sein de la PEC promouvant *in vitro* la migration et la prolifération, et *in vivo* la formation de lésions extracapillaires dans des modèles NTS et d'HSF²³. Par ailleurs, il a été observé dans différents modèles d'agression rénale une surexpression du PDGF-BB au sein du podocyte²¹¹ (modèle de rat de néphropathie diabétique²³⁷ ou encore modèle murin de glomérulonéphrite extramembraneuse²³⁸).

On peut donc évoquer l'hypothèse d'un effet paracrine de l'HB-EGF et du PDGF-BB podocytaire sur la PEC entraînant son activation puis la formation de lésions extracapillaires.

Rôle de KLF4/STAT3

KLF-4 est un facteur de transcription impliqué dans différents process biologiques qui jouerait un rôle négatif dans la prolifération cellulaire²³⁹. STAT 3 médie la signalisation impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire et l'inflammation notamment²⁴⁰. Son rôle a été étudié dans le podocyte où sa délétion dans des modèles de GEC a été associée à une diminution des lésions rénales. La délétion de STAT3 était associée à une diminution d'IL-6 podocytaire¹³⁸. L'inactivation de KLF4 au niveau podocytaire était associée à une surexpression de p-STAT3 *in vivo et in vitro*, cette surexpression de p-STAT3 podocytaire induisant une réentrée des podocytes dans le cycle cellulaire, menant à la catastrophe

mitotique. S'en suit alors un relargage d'IL-6 qui à son tour active la voie STAT3 dans les PEC provoquant leur prolifération et favorisant la formation de croissants²⁴¹.

Ainsi, l'ensemble de ces voies souligne l'importance du cross-talk des cellules résidentes glomérulaires et le rôle déterminant des médiateurs locaux dans la physiopathologie des GEC et des lésions d'HSF.

En résumé, la PEC joue un rôle primordial dans la formation du croissant extracapillaire et des lésions de HSF. Cette cellule est non seulement un des composants majeurs de ces lésions mais son rôle pathogénique dans les modèles *in vivo* de GEC et d'HSF a été démontré via l'inhibition de diverses voies de signalisation spécifiquement au sein de la PEC.

Ce rôle pathogénique implique des modifications phénotypiques que sont l'activation avec expression de CD44, la dédifférenciation, la migration et la prolifération cellulaire. Plusieurs voies de signalisation cellulaires ont été identifiées au cours de ces modifications phénotypiques (comme détaillées ci-dessus). Nous soulignerons ici pour la suite du travail, l'importance de l'EGFR qui, via son activation via par l'HB-EGF va promouvoir la migration des PEC^{16,23}. Au vu des données de la littérature, on peut estimer que cette action est potentiellement médiée par l'activation d'ERK et de CD44¹⁹. En effet, CD44 jouerait un rôle dans la migration, dans la synthèse de matrice extracellulaire ainsi que dans la prolifération cellulaire.

PARTIE 2 Heat Shock Protein (HSP) 27

1 Généralités

1.1 Généralités sur les HSPs

Le concept d'Heat shock Protein (HSP) a été défini par Ritossa en 1996²⁴². Initialement décrites chez la drosophile²⁴³ où leur expression faisait suite à un choc thermique, les HSP présentent un caractère universel et sont aujourd'hui impliquées dans une grande variété de réponses. Ces protéines sont caractérisées par une surexpression lors de différentes situations très variées allant du choc thermique décrit initialement, au stress oxydatif ou encore lors de mécanismes d'apoptoses chimio induites^{244,245}.

La nomenclature des Heat Shock Protein a été proposée par Kampinga *et al* en caractérisant diverses « familles d'HSP » : HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 et les petites HSP²⁴⁶.

Les HSP sont ainsi divisées en six catégories selon leurs poids moléculaires. Parmi celles-ci on trouve les HSP de faible poids moléculaire²⁴⁴ classées de HSPB1 à B10 avec un poids moléculaire entre 10-45 kDa (**Tableau 3**). Elles se caractérisent par une séquence conservée d'acides aminés (80-100) dénommée alpha-cristallin²⁴⁷. Leurs fonctions sont marquées par une activité chaperonne, empêchant l'agrégation des protéines mais elle sont aussi impliquées dans le cycle cellulaire²⁴⁴, la signalisation de l'apoptose, la différenciation, ou diverses voies de signalisation cellulaires²⁴⁵.

NOM	PM	DISTRIBUTION TISSULAIRE	IND. STRESS	FONCTION
Hsp27 (HspB1)	22.8	Ubiquitaire, haut niveau dans le cœur et les muscles striés et lisses	+	Chaperonne, stabilisation du cytosquelette, anti-apoptotique, anti-oxydant
HspB2 (MKBP)	20.2	Cœur, muscle strié et lisse	-	Chaperonne et anti-apoptotique, intégrité des myofibrilles
HspB3	17.0	Cœur, cerveau, muscle lisse et strié	-	Chaperonne, intégrité des myofibrilles
α A-crystalline (HspB4)	19.9	Cristallin, musculature striée, foie, rate, tissu adipeux	-	Chaperonne, stabilité génomique
α B-crystalline (HspB5)	20.2	Ubiquitaire, cristallin, au niveau dans le cœur et le muscle	+	Chaperonne, stabilisation du cytosquelette, cycle cellulaire, cardioprotection
Hsp20 (HspB6)	16.8	Ubiquitaire, muscle	-	Relaxation cellule musculaire lisse, cardioprotection, chaperonne, anti-apoptotique
HspB7	18.6	Cœur et muscle strié, tissu adipeux	-	Chaperonne, intégrité des myofibrilles
Hsp22 (HspB8, α -crystallin C)	21.6	Ubiquitaire	+	Chaperonne, induction autophagie
HspB9	17.5	Testicule	- (selon type cellulaire)	Rôle cancer testicule
HspB10	28.3	Testicule	-	Structure cytosquelette

Tableau 3. Nomenclature, distribution et principales fonctions des petites heat shock protein PM : Poids moléculaire (d'après Bakthisaran et al)²⁴⁴

1.1.1 Activité chaperonne

L'une des principales fonctions des HSPs correspond à leur habilité à corriger le mauvais repliement des protéines en situation de stress comme démontré pour HSP27 et le repliement de l' α -glucosidase²⁴⁸ ainsi que pour d'autres petites HSP²⁴⁹. Le mécanisme se fait via une interaction directe avec la protéine concernée²⁵⁰. Cette activité chaperonne concernant la grande majorité des HSP est par ailleurs modulée par la température et augmente avec celle-ci.

1.1.2 Aspect structurel

Leur structure se caractérise par un domaine ACD (α -crystallin domain) conservé, impliqué dans l'interaction entre les sous-unités²⁵¹ et permettant de former les dimères, ces sous unités contribuant à la formation d'oligomères²⁵¹⁻²⁵³. Le domaine NTD (N-terminal domain) hydrophobe serait impliqué dans l'oligomérisation des petites HSPs (sHSPs)²⁵⁴. Le domaine CTD (C-terminal domain) serait quant à lui impliqué dans la solubilité des HSP et des complexes protéiques qu'ils forment²⁵⁵.

Régulation

La phosphorylation semble un des principaux mécanismes de régulation des sHSPs en modulant notamment l'équilibre entre les différentes tailles d'oligomères tout du moins pour certaines sHSP (27 et 22)²⁵⁶⁻²⁵⁸.

1.1.3 Caractéristiques des petites HSPs

HspB4/ α A-cristallin

Exprimée au niveau du cristallin, elle partage avec HspB5 la présence d'un domaine alpha-cristallin dans la partie C-terminal. Cette protéine est associée à des pathologies du cristallin à type de cataracte²⁵⁹. Elle est régulée notamment par des mécanismes de phosphorylation²⁶⁰. Elle semble impliquée dans des mécanismes de carcinogénèse bien que son rôle soit moins étudié que HSP27 ou HSPB5^{261,262}.

HspB5/ α B-cristalline

Cette protéine d'expression ubiquitaire est notamment oculaire. Elle interagit avec HSPB4 pour former des hétéro-oligomères et est régulée par des mécanismes de phosphorylation à l'instar d'HSP27²⁶³. Elle interagit avec le cytosquelette d'actine via des mécanismes de phosphorylation²⁶⁴. Elle est exprimée en réponse au stress oxydatif et est impliquée dans les voies d'inhibition d'apoptose²⁶⁵.

Son rôle est de plus en plus étudié dans les pathologies oncologiques avec un rôle pro tumoral²⁶⁵. Elle interagit notamment avec des facteurs proangiogéniques comme le VEGFA.

Ainsi dans un modèle d'OIR (rétinopathie induite par l'oxygène, mécanisme d'hypoxie puis normoxie entraînant une néovascularisation rétinienne) invalidé pour α B-cristalline, on observe une diminution de l'expression de VEGFA et une phosphorylation d' α B-cristalline²⁶⁶. Cette HSP interagit directement avec le VEGFA et empêche sa polyubiquitination et sa dégradation²⁶⁷. Elle favoriserait ainsi sa bonne conformation avec son rôle chaperonne²⁶⁸.

Autres petites HSP

Hsp22 est impliquée dans la synthèse protéique en modulant la phosphorylation de eIF2-alpha^{269,270} ainsi que dans l'autophagie²⁷¹. Comme HSP27, son implication a été démontrée dans les neuropathies héréditaires distales des neurones moteurs de type 2A et maladies de Charcot-Marie-Tooth type 2L²⁷².

Hsp20 protégerait les cellules du muscle cardiaque en condition de stress oxydatif lors d'une ischémie en promouvant la survie des cardiomyocytes à travers la stabilisation d'AKT²⁷³ sa régulation implique notamment des mécanismes de phosphorylation en régulant sa forme oligomérique²⁷⁴.

HspB2 et B3 sont des protéines musculaires impliquées dans la différenciation des myoblastes²⁷⁵. HspB9 et B10 ne sont présentes que dans les testicules²⁷⁶.

1.2 Structure d'HSP27 (HSPB1)

HSP27 (HSPB1) est une protéine ATP-indépendante dont le gène *HSPB1* est situé sur le chromosome 7. Il existe trois sites d'épissages alternatifs²⁷⁷.

La protéine est composée de 205 acides aminés formant trois domaines :

- 1- Le domaine conservé alpha cristallin entre les HSP, qui serait responsable des principales fonctions de la protéine^{253,278}, mais qui est aussi associé à la formation initiale de dimère d'HSP27²⁷⁹.
- 2- Le domaine WDPF (W (tryptophane), D (acide aspartique), P (proline), et F (phenylalanine) en position N-terminale, impliqué dans la formation des oligomères^{257,279}.
- 3- Le domaine C-terminal impliqué dans la stabilisation des oligomères.

HSPB1 ou encore HSP27 humaine présente trois sites de sérine phosphorylables (ser15, ser78, et ser82) situés dans sa partie N-terminale. L'homologue d'HspB1 murine, HSP25, ne possède que deux sites sérine phosphorylés (ser15 et ser86). Il existe un quatrième site, la thréonine 143 (Thr143)²⁸⁰.

Structure quaternaire

HSP27 est caractérisée par une structure quaternaire dynamique entre la formation de dimères d'HSP27 jusqu'à la formation d'oligomère de 800kDa²⁵⁷. Aujourd'hui, il est démontré que la structure quaternaire d'HSP27 varie en fonction de son environnement avec un équilibre dynamique entre dimères et oligomères²⁵⁷ (**Figure 9**).

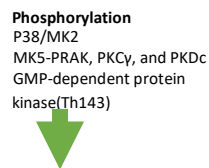


Figure 9. Représentation schématique d'HSP27, de ces principaux sites de phosphorylation ainsi que de l'équilibre dynamique de sa structure quaternaire.

1.3 Régulation d'HSP27

Il existe une régulation transcriptionnelle par le facteur de transcription HSF-1 qui se fixe alors sur le domaine HSE (Heat Shock element) présent sur le promoteur d'HSP27 ^{281,282}.

Mais une des régulations principales d'HSP27 se fait au niveau post traductionnelle avec la phosphorylation de cette protéine et la régulation dynamique de sa forme oligomérique^{258,283,284}.

Plusieurs kinases ont été identifiées comme impliquées dans la phosphorylation d'HSP27 (**Figure 10**). Différentes kinases ont été identifiées *in vivo* ou *in vitro* comme les protéines kinase-2,-3,-5 activées par MAPK (MK2, MK3, MK5), la protéine kinase (PK) A, B, C, et D. Le type de kinase impliqué dépendra évidemment du type cellulaire et des voies de signalisation induites²⁸⁰. Une voie majeure de régulation d'HSP27 est la voie des MAPK avec p38/MK2, phosphorylant les sites S78/82 ainsi que la S15 mais qui semble jouer un rôle mineur. Le site thréonine 143 est phosphorylé par des kinases dépendantes de la GMP cyclique²⁸⁰.

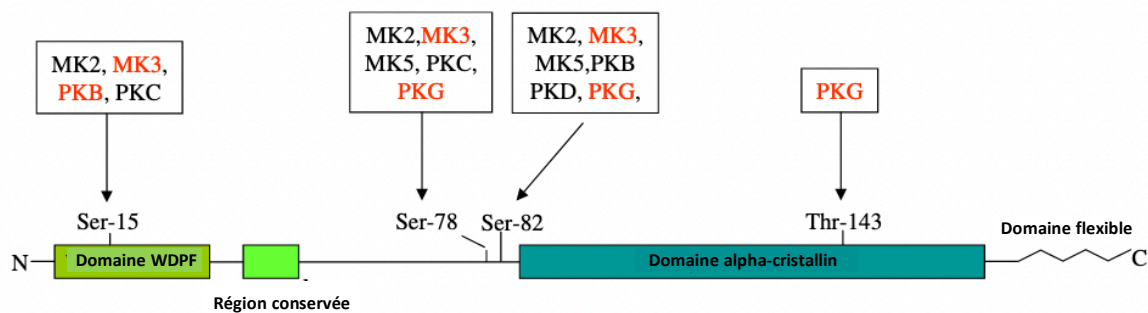


Figure 10. Propriétés structurales de la Hsp27 humaine. (d'après Kostenko et al)²⁸⁰

Schéma de la Hsp27 : domaine WDPF, région N-terminale conservée et le domaine α -cristallin et domaine flexible dans la partie C-terminale de la protéine. Les sites de phosphorylation dont Ser-15, Ser-78, et Ser-82. Les protéines kinases qui phosphorylent Hsp27 sur ces sites *in vivo* sont indiquées en noir, tandis que les protéines kinases identifiées *in vitro* sont représentées en rouge.

La phosphorylation module l'équilibre entre les différentes structures dimériques-oligomériques d'HSP27²⁵⁷. Ainsi des modifications des sites de phosphorylation par des résidus acide aspartique^{258,283} permettant d'obtenir des phosphomimétiques d'HSP27 résultent en la formation majoritairement de dimères avec une majoration de l'activité chaperonne²⁸⁵. A l'inverse, l'inhibition de la phosphorylation d'HSP27 empêche la formation de dimères (persistance des oligomères) et diminue l'activité d'HSP27²⁸⁶. Ainsi les mutants d'HSP27 modifiés pour être non phosphorylables (Serine en alanine) présentaient de larges oligomères et un défaut de petits oligomères^{287,288}.

Il existe aussi un mécanisme de régulation par des phosphatases. L'étude en time course a montré une phosphorylation transitoire d'HSP27 dans des cellules hippocampiques Hib5 soumises à choc thermique, suggérant une phosphorylation réversible^{289,290}. La protéine phosphatase 2A (PP2A) a été identifiée comme impliquée dans la déphosphorylation d'HSP27. Ainsi, *in vitro*, Cainrs *et al.* ont montré que l'exposition de phospho-HSP27 à PP2A était associée à sa déphosphorylation. L'utilisation d'un inhibiteur de PP2A (acide okadaïque, calyculine A) dans les cellules MRC-5 (fibroblastes) empêchait alors la déphosphorylation d'HSP27²⁹¹.

De plus, il existe d'autres modifications post traductionnelles d'HSP27 qui ne semblent pas se limiter à des mécanismes de phosphorylation.

Les mécanismes de SUMOylation semblent jouer aussi un rôle. Cela a été observé en oncologie et favoriserait le rôle pro-tumoral. Ainsi La surexpression de SUMO2/3 est associée à la surexpression d'HSP27 et à la prolifération de cellules de carcinome hépatocellulaire *in vitro*²⁹².

Le stress induit par le méthylglyoxal (MGO) jouerait également un rôle important sur la fonction d'HSP27. Dans les cancers, on note l'effet Warburg d'adaptation des cellules tumorales²⁹³, caractérisé par l'augmentation des produits de glycolyse comme le MGO qui interagit (« glycate ») avec les protéines²⁹⁴. Il existe donc une forme glyquée d'HSP27 (MGO-HSP27) qui est beaucoup plus stable et active, favorisant la survie tumorale²⁹⁵. De façon intéressante, l'utilisation de scavenger des produits MGO comme la carnosine inhiberait ce mécanisme et augmenterait la sensibilité tumorale aux thérapeutiques²⁹⁶.

1.4 HSP27 et HSP25 – Modèle murin

Il faut noter qu'il existe une grande homologie entre la protéine HSP25 murine et HSP27 humaine dont les sites de phosphorylation sont en sérines 15 et 86. Ainsi, les résultats observés dans les modèles murins permettent de soutenir leur application chez l'homme. Par ailleurs, le développement de thérapie ciblant HSP27 permet en général une utilisation de la même molécule chez l'homme comme la souris, à l'instar de l'oligonucléotide antisens ciblant

l'ARNm d'*HSPB1* développé pour l'homme²⁹⁷⁻²⁹⁹ et utilisé pour des études dans les modèles murins^{286,300,301}.

Modèles murins d'inactivation d'*HSPB1*

Les souris invalidées pour *HSPB1* de manière constitutive sont viables et fertiles et ne présentent pas d'anomalie à l'état physiologique si ce n'est une atteinte musculaire observée à l'échelle moléculaire et ultra structurelle³⁰² ainsi qu'un défaut de cicatrisation cutanée³⁰³.

Modèle de Kammoun *et al.*³⁰²

Il s'agit d'un modèle murin de fond génétique C57BL/6 avec inactivation systémique.

Les souris invalidées pour *HSPB1* étaient viables, fertiles et naissaient après 21 jours de gestation.

On ne notait pas d'anomalie morphologique apparente ou de phénotype majeur jusqu'au 18 mois. On notait une différence sur le poids avec un poids moins important chez les souris invalidées pour *HSPB1* comparé aux souris contrôles. Sur le plan biologique, on notait une baisse des métabolites lipidiques chez les souris invalidées. Enfin, on notait une altération au niveau du muscle squelettique avec des anomalies au niveau des myofibrilles (destruction et gap plus important entre les myofibrilles).

Modèle de Crowe *et al.*³⁰³

Il s'agit d'un modèle murin de fond génétique C57BL/6 avec inactivation systémique.

Crowe *et al.* ont observé que les souris invalidées pour *HSPB1* avaient un défaut de cicatrisation cutanée comparées aux souris contrôles (Expérience de « Wound Healing » cutanée). L'analyse histologique de la peau des souris invalidées pour *HSPB1* montrait moins de re-épithélialisation et de dépôts de collagène mais un infiltrat inflammatoire plus important (neutrophiles, macrophages).

Modèles *HSPB1* transgéniques

Il existe des modèles transgéniques surexprimant *HSPB1* de manière systémique³⁰⁴.

Il s'agit d'une souris exprimant un transgène chimérique d'*HSPB1* humain sous contrôle du promoteur CMV et tagué HA (Hémagglutinine). Le fond génétique est C57/B6.

Ce modèle de surexpression d'HSP27 a été étudié notamment dans un modèle d'ischémie cérébrale. La surexpression d'HSP27 était alors associée à un effet neuroprotecteur post ischémie cérébrale avec un mécanisme d'inhibition de l'apoptose (baisse du nombre de cellules du cortex cérébral positives pour la caspase 3 chez les souris transgéniques *HSPB1* comparées aux souris sauvages).

Il existe également un modèle transgénique surexprimant HSP27 humain dans les cellules endothéliales, utilisé pour étudier le rôle d'HSP27 dans l'endothélium au cours de l'ischémie cérébrale. Ce modèle ne montre pas d'anomalie particulière à l'état basal. La surexpression d'HSP27 dans ce modèle au sein de l'endothélium a été associée à une diminution des lésions cérébrales et une meilleure récupération fonctionnelle³⁰⁵.

2 Fonctions d'HSP27

HSP27 est une protéine ATP-indépendante impliquée initialement dans le métabolisme des protéines dénaturées à la suite d'un stress. Identifiée initialement comme protéine induite à la suite d'un choc thermique, il a été montré qu'elle réagissait à une grande diversité de stress comme le stress oxydatif ou encore le stress du réticulum.^{248,306,307} Son rôle a par ailleurs été étudié dans la régulation du cytosquelette et l'apoptose^{308,309}. Mais progressivement son action a été étendue à une grande variété de voies de signalisation qui seront détaillées ci-dessous.

2.1 Au sein des cellules cancéreuses

HSP27 a été étudiée dans différentes pathologies cancéreuses où son rôle de biomarqueur ou de cible thérapeutique a été décrit.

Il a été observé une surexpression d'HSP27 dans différentes variétés de tumeurs chez l'homme comme les tumeurs urothéliales^{310,311}, le cancer du sein³¹², le carcinome hépatocellulaire²⁹², le glioblastome³¹³, ou encore le cancer pulmonaire non à petites cellules³¹⁴.

La surexpression d'HSP27 dans les cellules tumorales ou au niveau sérique a été associée dans certaines tumeurs à un marqueur de mauvais pronostic (tumeurs moins différenciées, et un risque métastatique plus important)³¹⁴. De plus, il semble que l'expression d'HSP27 soit associée à la résistance des tumeurs aux chimiothérapies via divers mécanismes d'inhibition de l'apoptose³¹⁵.

2.1.1 Rôle et voies cellulaires d'intérêt en oncologie

2.1.1.1 Inhibition de l'apoptose et résistance à la chimiothérapie

HSP27 a une activité anti-apoptotique majeure induisant une résistance à la chimiothérapie faisant de cette protéine une cible thérapeutique particulièrement intéressante en oncologie. HSP27 est associée aux mécanismes d'inhibition de l'apoptose à différents niveaux de la cascade apoptotique cellulaire avec un effet protecteur contre les chimiothérapies^{316,317}. Ainsi, HSP27 est impliquée à la fois dans la voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. On observe notamment une action d'HSP27 via une inhibition de la caspase 9³¹⁸, ou encore du death domain associated protein (DAXX)³¹⁹, mais aussi de la protéine kinase C delta (PKC δ)³²⁰.

2.1.1.2 Transition épithélio-mésenchymateuse et migration cellulaire

HSP27 est impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) en oncologie et semble promouvoir la dédifférenciation cellulaire. Ainsi son inhibition atténue la TEM induite par l'IL-6 et médiée par STAT 3 dans un modèle *in vitro* de cancer de la prostate³²¹. La voie EGF/EGFR pourrait également être modulée par HSP27 dans ce contexte. En effet, dans un modèle *in vitro* similaire, Cordonnier *et al* suggèrent que la surexpression d'HSP27 après activation de l'EGFR médie l'activation aussi bien des voies AKT, GSK3 et beta-caténine avec une perte des marqueurs de différenciation comme l'E-cadhérine et l'acquisition d'un phénotype migratoire^{322,323}. De plus, diverses études ont confirmé le rôle d'HSP27 dans la TEM³²⁴, en régulant notamment la voie du TGF-beta à travers la régulation de SNAIL.^{301,325-327} Enfin, dans un modèle de carcinome cystique adénoïde salivaire (SACC), Chen *et al* ont montré que HSP27 module la TEM en inhibant l'expression d'E-cadhérine, et en uprégulant des

marqueurs de cellules souches CD133 et CD44³²⁶. De fait dans ce modèle, HSP27 contribuerait à la migration de ces cellules. *In vitro*, au sein d'une culture de cellules SACC, la surexpression d'HSP27 (par transfection d'HSP27 humain au sein de lentivirus) induit la TEM (surexpression de Snail, vimentine, inhibition d'E-cadhérine) et majore la migration. L'inhibition d'HSP27 par sh-ARN était associée à une transition mésenchymato-épithéliale avec baisse de la migration. *In vivo*, les souris inhibées pour HSP27 présentaient des lésions tumorales moins volumineuses que les souris sauvages et les souris surexprimant HSP27³²⁶. Ainsi, dans ces différents modèles *in vivo* et *in vitro*, HSP27 favoriserait la TEM.

2.1.1.3 Cycle cellulaire et prolifération

HSP27 modulerait la prolifération cellulaire dépendante de p53 et p21. Celles-ci sont des protéines majeures impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire notamment à la suite de dommage à l'ADN. Elles permettent d'une part la survie et la réparation de l'ADN, ou peuvent mener à l'apoptose. HSP27 est impliquée dans la phosphorylation de p21³²⁸. Ainsi, HSP27 promeut la survie cellulaire en étant impliquée dans la phosphorylation et la translocation de p21 au niveau du cytoplasme³²⁸ ou encore module p53 via sa forme phosphorylée^{329,330}.

Dans des cellules MCF-7 (adénocarcinome/cancer du sein) exposées aux UV-C, l'inhibition d'HSP27 majorait la sensibilité à l'apoptose induite par cette exposition. Sous siRNA anti-HSP27, on observait une surexpression de p53. On observe de plus dans ces cellules exposées aux UV après inhibition d'HSP27 une diminution de l'expression de p21 sous sa forme phosphorylée ainsi qu'une persistance de p21 au niveau nucléaire (au lieu d'être cytosolique). L'expression nucléaire de p21 étant associée à une inhibition de la prolifération, ces résultats soulignent le rôle pro-prolifératif d'HSP27 dans ce contexte cellulaire³²⁸. Dans une seconde étude, la surexpression d'HSP27 dans cellules MCF10 exposées cette fois à la doxorubicine inhibe p21. Ainsi, p21 inhibe le cycle cellulaire provoquant un arrêt en G1/S pouvant mener la cellule vers l'apoptose³³⁰. HSP27 à travers sa forme phosphorylée favorise la phosphorylation de p21 et sa translocation cytosolique promouvant la prolifération cellulaire.

Au niveau phénotypique, il a été montré qu'HSP27 pouvait favoriser la prolifération dans les modèles de cellules tumorales (Carcinome hépatique)²⁹² ou encore dans des modèles de cancer de la prostate³³¹. Des cellules de cancer de la prostate transfectées pour HSP27

proliféraient de manière plus importante *in vitro*³³¹. A l'inverse son inhibition réduisait cette prolifération. L'inhibition d'HSP27 était associée concomitamment à l'inhibition de la phosphorylation d'AKT et de PEA-15. La phosphorylation de cette dernière est associée à la translocation d'ERK dans le noyau, ce qui favorise alors la prolifération de ces cellules³³¹, démontrant donc une autre voie pro-proliférative régulée par HSP27.

Ainsi, dans de multiples modèles de tumeurs *in vitro*, HSP27 joue un rôle pro-prolifératif en régulant les protéines p53 et p21, et diverses voies de signalisation.

2.1.1.4 Réponse aux stress

HSP27 est impliquée dans différentes réponses au stress. Au-delà de la réponse au stress thermique, HSP27 est responsable de la diminution des espèces réactives de l'oxygène (ROS) à travers la régulation du taux de glutathion et de fer intracellulaire. HSP27 est associée à une diminution du niveau de fer intracellulaire. De plus, sa surexpression est significativement associée à l'augmentation de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), de la glutathion réductase et de la glutathion transférase^{283,332}.

Durant la croissance tumorale, on observe de manière générale une prolifération non contrôlée, et une multiplication des altérations génétiques avec une forte synthèse protéique. Cette synthèse se fait notamment au travers du réticulum endoplasmique (RE), où les protéines vont acquérir diverses modifications post-traductionnelles ainsi que leur conformation finale. Toute situation altérant la fonction du RE, sera associée à un défaut de replis des protéines et induira un stress du RE. Face à ce stress, il résulte une réponse dite UPR (Unfolding protein response) visant à rétablir dans un premier temps l'homéostasie protéique mais pouvant aussi mener à des mécanismes d'apoptose en cas de stress du RE prolongé^{333,334}. La forte demande métabolique au cours des pathologies tumorales, génère un stress du RE avec une activation permanente de la réponse UPR pouvant contribuer à la survie des cellules cancéreuses³³⁴. De façon intéressante, HSP27 est impliquée dans la réponse UPR observée dans un modèle *in vitro* de cancer de prostate. L'inhibition d'HSP27 est associée à une majoration des marqueurs de stress du RE pro-apoptotique^{286,335}. Ainsi, HSP27 contribuerait à la survie cellulaire à travers la modulation du stress du RE, son inhibition induisant une

dérégulation de l'UPR et favorisant l'apoptose³³⁶. Les mécanismes exacts de modulation de l'UPR par HSP27 restent à déterminer.

2.1.2 Stratégies thérapeutiques ciblant HSP27

2.1.2.1 OGX-427 (Apatorsen)

De ce fait, diverses approches thérapeutiques ont été étudiées afin de moduler l'expression d'HSP27. Parmi ces approches, notons le développement d'un oligonucléotide antisens, l'OGX-427, ciblant l'ARNm d'*HSPB1* humain, avec la mise en place d'essai de phase II^{298,299,337-339} à ce jour avec une bonne tolérance de ce traitement et notamment pas d'effet off-target rénal rapporté.

Nous résumons ici les principales données des études de Phase II :

- Evan *et al.* : Apatorsen + prednisone (A/P) vs prednisone (P) chez les patients avec cancer de prostate métastatique. Pas de différence sur la survie. Baisse du PSA plus importante sous A/P comparé aux groupes P. Pas d'effet secondaire plus important sous Apatorsen³³⁸.
- Spigel *et al.* : Carboplatin et Pemetrexed +/- Apatorsen chez les patients avec cancer du poumon non à petites cellules de stade 4. Pas de différence sur la survie. Pas d'effet secondaire plus important sous Apatorsen²⁹⁹.
- Rosenberg *et al.* : carcinome urothélial métastatique récidivant : Docetaxel / Apatorsen versus Docetaxel. Amélioration de la survie principalement chez les patients dont le taux d'HSP27 diminuait de plus de 20,5% par rapport à la base. Plus grande incidence de sepsis dans le groupe sous Apatorsen²⁹⁸.
- Andrew *et al.* : Gemcitabine + Nabipaclitaxel +/- Apatorsen dans le cancer du pancréas. Pas d'effet sur la survie mais possiblement en lien avec le taux élevé d'HSP27. Pas d'effet secondaire plus important sous Apatorsen³³⁹.

Il faut noter que si l'OGX-427 a été développé pour l'homme, il a été testé sur divers modèles murins et présente une efficacité semblable sur l'ARNm d'*HSPB1* murin^{300,301,340}.

Ainsi, l'OGX-427 a été administré à des souris au cours de modèle de fibrose pulmonaire et contribuait à la diminution des lésions. Dans un modèle murin de fibrose pulmonaire par injection intrapleurale de TGF-beta on notait une surexpression d'HSP27. Ce même modèle, HSP27 a été inhibé au niveau pulmonaire par injection intra-pleural d'OGX-427 de manière quotidienne. On observait chez les souris sous OGX-427 une forte inhibition de l'expression d'HSP27 en western blot. De plus, l'utilisation de l'OGX-427 était associée à des lésions de fibrose pulmonaire moins importantes que chez les souris sous TGF-beta seule³⁰¹. (Cf Section 2.2).

Dans une seconde étude, l'OGX-427 a été utilisé au cours de modèles murins de myélofibrose primitive (TPO^{high} et JAK2V617F). L'utilisation de l'OGX-427 dans ces modèles était associée à une baisse de l'expression d'HSP27 de plus de 50% (western blot de splénocytes). On observait dans ces modèles une amélioration des paramètres de myélofibrose sous OGX-427 (réduction de la splénomégalie, diminution de l'expansion des mégakaryocytes, et une diminution de la fibrose médullaire). *In vitro*, Sevin *et al* ont montré au sein de cellules exprimant la mutation JAK2V617F, qu'HSP27 était impliquée dans les mécanismes de prolifération de la voie JAK2/STAT5 en inhibant la déphosphorylation de STAT5 et favorisant la formation du complexe JAK2/STAT5. Ainsi HSP27 favorise les lésions de myélofibrose en promouvant l'activation de la voie JAK2/STAT5³⁰⁰.

Enfin, rappelons ici son utilisation dans une série d'études impliquant des modèles murins de cancer. Il a été montré que dans un modèle de xénogreffe de cancer du pancréas, l'OGX-427 seule diminuait le volume tumoral et augmentait l'effet apoptotique de la Gemcitabine³⁴⁰. De même, dans un modèle de xénogreffe de cancer du poumon il existait une augmentation de la sensibilité à l'erlotinib sous OGX-427³³⁷.

Ainsi, l'OGX-427 a été éprouvé dans une grande variété de modèles murins et de pathologies. Aucune de ces études ne rapporte d'effets off-targets.

2.1.2.2 Peptide aptamer

L'utilisation d'aptamers est une nouvelle approche pour inhiber les protéines. Il s'agit d'oligonucléotides simple branche (ARN ou ADN) qui vont interagir de manière spécifique avec une protéine, inhibant ainsi son interaction avec d'autres protéines et donc sa fonction³⁴¹. Le

PA11 inhibe l'oligomérisation d'HSP27 en interagissant directement avec HSP27. Il a un effet anti tumoral dans des modèles tumoraux de xélogreffe de cellules carcinomateuses (Cellules SQ20B)^{342,343}.

Dans cette approche thérapeutique, ont été étudiées également diverses autres molécules ciblant HSP27 avec néanmoins une action moins spécifique³¹⁷.

2.1.2.3 Quercétine

Il s'agit d'un flavonoïde inhibant l'expression d'HSP27 modulé par HSF1. La quercétine se lie à HSF-1³⁴⁴ et diminue son expression³⁴⁵. Elle joue un rôle de sensibilisation à la chimiothérapie. De plus, il a été montré récemment que la quercétine inhibait l'expression de CK2 (Casein Kinase 2) dans un modèle *in vitro* de leucémie chronique³⁴⁶. Or dans une autre étude, il a été montré que CK2 contribuait à l'expression d'HSP27 dans les myoblastes *in vitro* en affectant son ubiquitination. Ainsi la diminution de l'expression d'HSP27 par la quercétine pourrait notamment se faire à travers son action sur CK2³¹⁷.

2.1.2.4 Brivudine

La brivudine a été principalement étudiée comme sensibilisant des traitements par chimiothérapie dans des modèles oncologiques où elle a montré une diminution de la croissance cellulaire tumorale. Il s'agit d'un nucléoside se fixant au niveau des Phe 29 et 33 d'HSP27. Il a été montré qu'elle interagissait directement avec HSP27 et favorisait l'activation de la voie de l'apoptose *in vitro* dans un modèle de cellules lymphomatoses³⁴⁷.

De plus dans un modèle rat de sarcome, l'utilisation de la brivudine en association à un sel de platine diminuait la masse tumorale³⁴⁷.

Elle a aussi été testée en phase II de cancer du pancréas avec une amélioration de la médiane de survie contre Gemcitabine seule mais avec majoration des effets secondaires selon la dose utilisée. Ainsi cette étude suggère que l'effet antitumoral observé chez l'homme et le rat est médié par l'inhibition d'HSP27³⁴⁷.

2.1.2.5 Ivermectine

L'ivermectine (IVM) est une molécule antiparasitaire appartenant à la famille des lactines macrocycliques³⁴⁸. Elle est largement utilisée en pratique quotidienne dans le traitement des parasitoses avec très peu d'effets secondaires. Son action sur HSP27 a été déterminé par Nappi *et al*²⁸⁶. Les auteurs ont procédé à un screening de molécules pré existantes (Prestwick Chemical Library) pouvant inhiber HSP27. Ils ont identifié l'ensemble des molécules par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer : méthode reposant sur le transfert d'énergie en fonction de la distance entre la molécule donneuse et la molécule « acceptrice ») pour identifier ceux qui présentaient une interaction avec HSP27. Il a été montré ainsi que l'IVM pouvait interagir avec HSP27 et inhiber son action *in vitro*.

L'IVM se lie directement à HSP27 et inhibe son interaction avec les protéines cibles de son activité chaperonne. La molécule se fixe au niveau de la poche de phosphorylation des dimères d'HSP27, et empêche la phosphorylation au niveau des S78 et 82. Finalement, l'IVM empêche la formation des petits oligomères d'HSP27 et favorise la stabilisation des formes larges d'oligomère d'HSP27, entravant donc l'action d'HSP27²⁸⁶. **(Figure 11)**

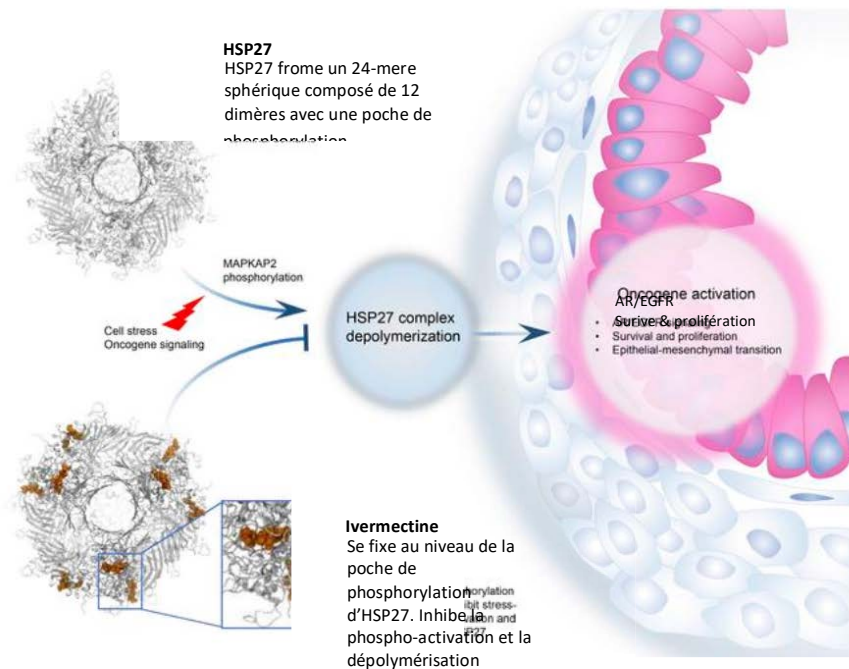


FIGURE 11. Mécanisme d'action de l'ivermectine au niveau du complexe d'HSP27 (d'après Nappi et al)²⁸⁶.

Dans cette étude l'IVM comme inhibiteur d'HSP27 a été étudié dans plusieurs modèles *in vivo* de xéno greffe tumorale. Dans un premier modèle de xéno greffe d'adénocarcinome pulmonaire (HCC-827), comparativement aux souris contrôles, l'IVM seule était associée à une diminution du volume tumoral. Cet effet était majoré en association avec l'erlotinib, un inhibiteur de tyrosine kinase bloquant l'activité kinase de l'EGFR.

Dans un second modèle de cancer de la prostate (LNCap), l'utilisation de l'IVM seule comparativement aux souris contrôles diminuait le volume tumoral. En effet, l'IVM inhibait les voies de signalisation associées aux récepteurs de l'androgène (AR). Tout comme l'OGX-427 (inhibant HSP27), l'IVM diminuait l'expression d'AR.

Enfin, dans un troisième modèle de xéno greffe de cancer prostate (PC3-DR), comparée aux souris contrôles et sous chimiothérapie par Taxol, l'IVMs seule ou en association aux taxols ralentissait la progression tumorale. On observait de plus en immunohistochimie, une diminution de la prolifération tumorale (Ki67) et une augmentation de l'apoptose (TUNEL)²⁸⁶.

En résumé, au cours de ces différents modèles murins, l'IVM améliore le pronostic carcinologique seul ou en association à une chimiothérapie ou une thérapie ciblée. De plus, son action mime les résultats observés sous OGX-427. Enfin, *in vitro* il a été montré que l'IVM interagissait avec HSP27, empêchant la formation de dimères et donc son activation. Ainsi, l'utilisation de l'IVM offre une approche thérapeutique intéressante dans les mécanismes de régulation impliquant HSP27 chez l'homme. Un essai de phase II testant l'IVM dans le cancer du sein est en cours (NCT05318469).

2.2 Fibrose tissulaire

HSP27 est surexprimée dans différents modèles de fibrose d'organe, notamment la fibrose pulmonaire à la Bléomycine. Dans ces modèles, HSP27 pourrait colocaliser avec les marqueurs de dédifférenciation cellulaire (tel qu'alpha SMA)³⁴⁹.

L'inhibition d'HSP27 dans un modèle de rat de fibrose pulmonaire réduit les lésions pulmonaires^{301,349}. Les données *in vitro* ont montré que HSP27 stabilisait Snail favorisant la TEM médiée par le TGF-beta³⁰¹. De façon intéressante, Snail, situé en aval du TGF-beta a été impliqué dans les voies de dédifférenciation et de fibrose notamment rénale³⁵⁰. Dans un modèle murin alternatif d'inflammation pulmonaire radio-induit, le rôle d'HSP27 ne se limite pas aux mécanismes de dédifférenciation mais HSP27 favoriserait aussi des voies proinflammatoires³⁵¹.

Par ailleurs, HSP27 module l'activation de NfκappaB, voie de signalisation contribuant aux lésions de fibrose pulmonaire³⁵². Dans une étude de fibrose pulmonaire radio induit, on observait une augmentation de l'expression d'HSP27. L'inhibition d'HSP27 par shARN était associée à une diminution de la TEM *in vitro* (culture de cellules pulmonaire irradiées) et une diminution de la fibrose *in vivo*. *In vitro*, on observait une surexpression de plusieurs voies en aval de NfκappaB (IL-6, twist) après irradiation. On observait de plus après irradiation *in vitro* une augmentation de l'interaction d'HSP27 avec IκBα, un inhibiteur de NfκappaB. Enfin, l'inhibition d'HSP27 induisait une diminution de la translocation de p65 (composant de NfκappaB) au niveau nucléaire. Enfin, les souris irradiées transgéniques surexprimant HSP27 montraient une diminution de IκBα et une diminution d'alpha-SMA pulmonaire

(marqueur de TEM), comparativement aux souris contrôles irradiées. Ainsi, la fibrose pulmonaire radio-induite semble aussi s'articuler à travers la voie HSP27-NfκB³⁵².

2.3 Neuropathies périphériques héréditaires

L'un des domaines où le rôle d'HSP27 a été le plus étudié est celui des neuropathies périphériques héréditaires. Ces pathologies se manifestent chez l'homme par une perte sensitive progressive, des troubles de la marche, et un déficit moteur avec atrophie musculaire. La maladie de Charcot-Marie-Tooth regroupe un spectre de neuropathies héréditaires qui peuvent être démyélinisantes ou axonales. Les mutations décrites touchent pour beaucoup la myéline, les jonctions gaps des protéines ou encore des structures composant les axones comme la kinésine³⁵³. Une série de mutations touchant *HSPB1* a été identifiée comme responsable de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2F (CMT 2F), neuropathie axonale caractérisée par un défaut de transport axonal du fait d'une dérégulation des neurofilaments³⁵⁴ ou encore de la cinétique des microtubules³⁵⁵. Il s'agit dans la majorité des cas de mutations ponctuelles faux sens, de transmission autosomique dominante³⁵⁶.

Le profil d'atteinte des maladies de CMT 2F, lié aux variants *HSPB1* concerne des personnes âgées de 50-60 ans³⁵⁷. Plus de 30 mutations ont été identifiées touchant l'ensemble de la structure d'*HSPB1*. De manière globale les mutants semblent plus sensibles à l'agrégation en condition de choc thermique. En cas de mutation du domaine NTD, on observe une augmentation des structures oligomériques ne pouvant se dissocier. Les mutations du domaine ACD induisent des protéines plus enclines à se dissocier à l'inverse. Ainsi, les mutations du domaine NTD sont résistantes à la phosphorylation contrairement aux mutations ACD mais toutes sont associées à un phénotype comparable³⁵⁸.

Au niveau physiopathologique, le rôle d'HSP27 muté peut s'expliquer par une capacité à stabiliser les microtubules^{355,359}. Les protéines résultant des variants interagissent avec les ceux-ci, et les surstabilisent.. Il s'en suit une surexpression de l'histone deacetylase 6 (HDAC6) induisant une dépolymérisation des microtubules.

Le rôle d'*HSPB1* muté a ainsi été démontré au travers de modèle murin transgénique. Ydewalle et al ont développé une souris transgénique *HSPB1* exprimé au niveau neuronal avec

les formes sauvages et mutées (S135F, P182L). Les souris mutées ont un phénotype similaire à la neuropathie héréditaire avec trouble de la marche et des signes électromyographiques et histologiques de neuropathie. Les formes mutées étaient associées à une diminution du pourcentage de l'alpha tubuline acétylée impliquée dans le transport notamment mitochondrial³⁵⁹.

Parmi d'autres mécanismes possibles pour expliquer le phénotype associé aux variants d'*HSPB1*, on retrouve une implication du transport antérograde de mitochondrie³⁶⁰, ou une dérégulation des réseaux de neurofilaments³⁵⁴. Enfin, d'autres mutations d'*HSPB1* augmenteraient la phosphorylation des neurofilaments par Cdk-5, affectant ainsi la liaison des neurofilaments à la kinésine, réduisant leur transport antérograde et la bonne organisation du cytosquelette³⁶¹.

3 HSP27 et REIN

3.1 Expression d'HSP27 dans le rein normal

O'Neil *et al* ont étudié l'expression en immunohistochimie d'HSP27 sur des pièces de néphrectomie chez l'homme. Ainsi dans le rein humain normal, on observe une expression principalement endothéliale et dans les cellules musculaires lisses. De plus, on observe une expression au niveau des tubes contournés distaux et collecteurs³⁶².

Au niveau glomérulaire, HSP27 n'est pas détectée (ou très faiblement) au niveau des cellules épithéliales glomérulaires (podocytes ou cellules épithéliales pariétales). De même, chez l'animal, HSP27 est peu ou pas exprimée au niveau glomérulaire comme observé chez les souris contrôles au cours d'étude impliquant HSP27 que l'on détaillera ci-dessous^{362,363}. In *vitro*, on retrouve souvent une expression à l'état basal dans les podocytes (murins)^{363,364}.

3.2 Expression d'HSP27 au cours des pathologies rénales

Il existe peu d'études sur le rôle d'HSP27 au cours des pathologies rénales. La plupart des études ont porté sur son implication dans les lésions d'ischémie-reperfusion, impliquant essentiellement le secteur tubulointerstitiel.

Différents modèles de modulation d'HSP27 ont été décrits chez l'animal. Comme nous l'avons rapporté ci-dessus, il existe un modèle d'invalidation systémique^{302,303} mais aussi des modèles murins transgéniques de surexpression d'HSP27^{304,365}. Il n'est pas rapporté d'atteinte rénale spontanée dans ces différents modèles murins d'HSP27 (invalidations constitutionnelles ou les modèles de surexpression)³⁶⁶ (Cf Section 1.4).

3.2.1 Ischémie-reperfusion

Les premières études d'HSP27 dans la maladie rénale se sont centrées sur son implication dans les mécanismes de résistance et de régénération au cours des lésions de nécrose tubulaire aigue secondaire à un processus d'ischémie-reperfusion. Les études montrent globalement un rôle équivoque d'HSP27, dépendant ainsi du type cellulaire impliqué.

In vitro, la surexpression d'HSP27 dans les cellules tubulaires induit une résistance à l'apoptose après exposition aux peroxydes d'oxygène³⁶⁶.

Minjae Kim *et al.* ont montré que la surexpression locale au niveau du rein d'HSP27 limitait les lésions d'ischémie-reperfusion. Ainsi, dans un premier modèle de souris C57BL/6 avec injection intrarénale de lentivirus – A1AR (A1 adenosine receptor) dans des souris invalidées pour A1AR (mimant une expression rénale unique d'A1AR), on montrait une diminution des lésions de nécrose tubulaire après IR, une diminution de l'expression de gènes proinflammatoires (ICAM1, TNF-alpha, MCP1) et une diminution de l'infiltrat de neutrophiles. On observait une surexpression d'HSP27³⁶⁷. De même, dans une seconde étude, après injection intrarénale de lentivirus d'HSP27 (induisant une surexpression tubulaire de la protéine), les auteurs notaient une diminution des lésions d'ischémie-reperfusion (meilleure fonction rénale, diminution des lésions de nécrose tubulaire aigue, et de l'expression de gènes proinflammatoires et d'infiltrat de neutrophiles)³⁶⁸. Ces effets protecteurs seraient en rapport

avec une stabilisation du cytosquelette d'actine et une diminution de l'apoptose (méthode TUNEL) observées *in vivo*^{367,368}.

Cependant, d'autres études utilisant des modèles similaires n'ont pas retrouvé de tels résultats. En effet, Chen et al. ont montré que la surexpression systémique d'HSP27 (donc y compris dans les cellules inflammatoires) vient contrebalancer le rôle protecteur d'HSP27 au niveau tubulaire par une majoration de la réponse inflammatoire après ischémie reperfusion³⁶⁶. Dans cette étude, Chen *et al*, ont utilisé un modèle de souris transgéniques surexprimant HSP27 de manière systémique. Après induction de lésions d'ischémie-reperfusion, on observait chez les souris surexprimant HSP27, une aggravation des lésions avec une moins bonne fonction rénale, une surexpression des gènes proinflammatoires et un infiltrat de neutrophiles plus précoces. L'injection de splénocytes surexprimant HSP27 dans des souris sauvages majorait les lésions rénales et à l'inverse la déplétion en lymphocytes améliorait les lésions rénales comparativement aux souris sauvages. *In vitro*, les cellules tubulaires proximales issues des souris surexprimant HSP27 montraient une plus grande résistance à la nécrose (mesure du relargage de LDH) comparées aux cellules issues des souris sauvages³⁶⁶.

Ainsi, au cours de l'ischémie-reperfusion, HSP27 joue un rôle protecteur au sein des cellules tubulaires mais pourrait être délétère par son rôle au sein des cellules de l'inflammation.

3.2.2 Fibrose rénale

Comme vu précédemment, il a été montré qu'HSP27 était impliquée dans les mécanismes de TEM dans les cellules cancéreuses ainsi que dans la fibrose pulmonaire notamment à travers les voies du TGF- β 1 et Snail (Cf. Section 2.2).

De même, au cours des modèles murins d'obstruction urétérale unilatérale, on observe une surexpression d'HSP27 au niveau tubulaire que ce soit sa forme totale ou phosphorylée, concomitamment à une expression des protéines médiatrices de la fibrose comme le TGF- β 1^{369,370}. Cette surexpression est aussi observée chez l'homme (néphropathie secondaire aux uropathies malformatives³⁷⁰). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé un modèle de surexpression d'HSP27 dans les cellules tubulaires proximales via un transgène (KAP2-HSP27). Pour étudier l'implication de la HSP dans les mécanismes de fibroses rénales au cours de

module d'uropathie obstructive. Dans ce modèle, la surexpression tubulaire d'HSP27 était associée à une diminution de la fibrose à 14 jours après obstruction urétérale unilatérale, tout comme à une stabilisation de l'E-cadherin³⁷⁰. Alors que dans d'autres modèles de fibrose, HSP27 semble jouer un rôle délétère en promouvant la TEM, dans le modèle d'UUO on observe un phénotype inverse où HSP27 est protecteur. Une explication possible à ce paradoxe serait l'implication potentielle d'HSP27 au maintien des jonctions cellulaires, comme observé au cours de modèle d'ischémie cérébrale. Dans ces modèles murins d'accident ischémique cérébral, la surexpression d'HSP27 endothéliale était associée à un maintien de la barrière hématoencéphalique³⁰⁵. Au sein des cellules tubulaires, HSP27 pourrait jouer un rôle similaire mais au sein de cellules épithéliales

Dans une autre étude, la surexpression d'HSP27 *in vitro* au sein de cellules NRK52E (cellules tubulaires proximales de rat) inhibait Snail tout en augmentant l'expression de marqueurs de différenciation épithéliale (E-cadhérine et b-caténine membranaires)³⁶⁹. L'hypothèse évoquée par les auteurs est que la surexpression d'HSP27 pourrait alors maintenir la différenciation cellulaire dans les tubules proximaux en stabilisant le cytosquelette, l'E-cadhérine et la b-catenine et donc inhiber la fibrogénèse. Cependant il est important de rappeler que ces résultats vont à l'encontre de ce qui est observé quant au rôle d'HSP27 au cours de mécanisme d'EMT et de fibrose que ce soit en oncologie ou dans d'autres pathologies fibrosantes (poumon).

3.2.3 Glomérulopathies

A l'instar d'autres organes, HSP27 semble surexprimée au cours d'une grande variété de stimuli dans les glomérules. Ainsi son expression a été observée que ce soit *in vitro* sur des cultures de podocytes ou *in vivo* dans divers modèles murins ou de rat d'agression glomérulaire.

La néphropathie diabétique

Sanchez *et al* suggèrent une surexpression au niveau podocytaire au cours des néphropathies diabétiques chez l'homme. De même, dans un modèle de néphropathie diabétique (injection de streptozotocine), on observait une surexpression d'HSP27 au niveau glomérulaire. Celle-ci

semblait concerner les podocytes (études de Co marquage avec marqueurs podocytaires en immunohistochimie). Cette surexpression était aussi observée *in vitro* sur des podocytes humains exposés à de fortes concentrations de glucose. On observait à 24H une surexpression du transcrite et de la protéine totale³⁶³. De plus, dans une autre étude, l'exposition au glucose au bout de dix minutes était associée à la phosphorylation d'HSP27 via p38³⁷¹ ; L'inhibition d'HSP27 *in vitro* par des techniques de siRNA sur podocytes dans ces conditions était associée à une majoration de l'apoptose³⁶³. Les auteurs suggéraient donc un rôle protecteur d'HSP27 contre l'apoptose podocytaire dans le contexte de diabète.

La hyalinose segmentaire et focale

L'expression d'HSP27 au cours des HSF a aussi été observée dans l'étude de Sanchez-Nino *et al*, sur biopsies humaines utilisées dans l'étude comme contrôle de néphropathie protéinurique³⁶³. L'expression d'HSP27 a aussi été observée au sein de lésions de hyalinose segmentaire et focale au cours d'un modèle de réduction néphronique et hypertension chronique. Cette surexpression était également détectée *in vitro* sur des podocytes humains exposés à de l'angiotensine II³⁶³.

De même, dans un modèle d'HSF induit par l'exposition aux fortes doses d'albumine bovine, on observe également une augmentation du transcrite *HSPB1* dans le lysat glomérulaire *in vivo* et des podocytes en culture exposés à l'albumine³⁶⁴. Enfin dans un troisième modèle chez le rat de HSF par exposition à la puromycine (utilisé comme toxine podocytaire), on observait une augmentation du transcrite d'HSP27 dans le cortex rénal (enrichi en glomérules). On observait également une augmentation de la forme totale dans le glomérule ainsi que de la forme phosphorylée d'HSP27 (en immunohistochimie)³⁷². Dans une seconde étude, Smoyer *et al* ont montré que l'inhibition d'HSP27 par un antisense dans des podocytes exposés à la puromycine *in vitro* majorait l'apoptose, mais aussi la désorganisation du cytosquelette d'actine³⁷³.

HYPOTHESE DE TRAVAIL

HSP27 est une protéine ubiquitaire exprimée en réponse à une grande variété de stress. Elle est impliquée dans des mécanismes de prolifération, dédifférenciation et de migration cellulaire.

Des mécanismes similaires jouant potentiellement un rôle délétère dans les PEC au cours de leur activation, nous avons fait l'hypothèse qu'HSP27 pouvait favoriser le développement des lésions dans les néphropathies associées à une activation des PEC (GEC et HSF).

En effet, plusieurs voies identifiées au sein de la PEC et contribuant à son activation, sa migration et sa prolifération au cours des GEC et des HSF semblent impliquer HSP27 dans d'autres modèles cellulaires (essentiellement en oncologie).

Une des voies qui nous a semblé primordial d'étudier est la voies impliquant l'EGFR, CD44 et la migration de la PEC. De façon interpellante, des travaux récents dans une population cellulaire différente ont montré que HSP27 était impliquée dans la stabilisation de l'EGFR et dans son activation. De plus, de multiples études ont montré le rôle prépondérant d'HSP27 dans la migration cellulaire.

Ainsi, notre hypothèse de travail serait qu'au sein des PEC, HSP27 favoriserait l'activation de l'EGFR et l'expression de CD44, promouvant la migration cellulaire et le développement des lésions extracapillaires (**Figure 12**).

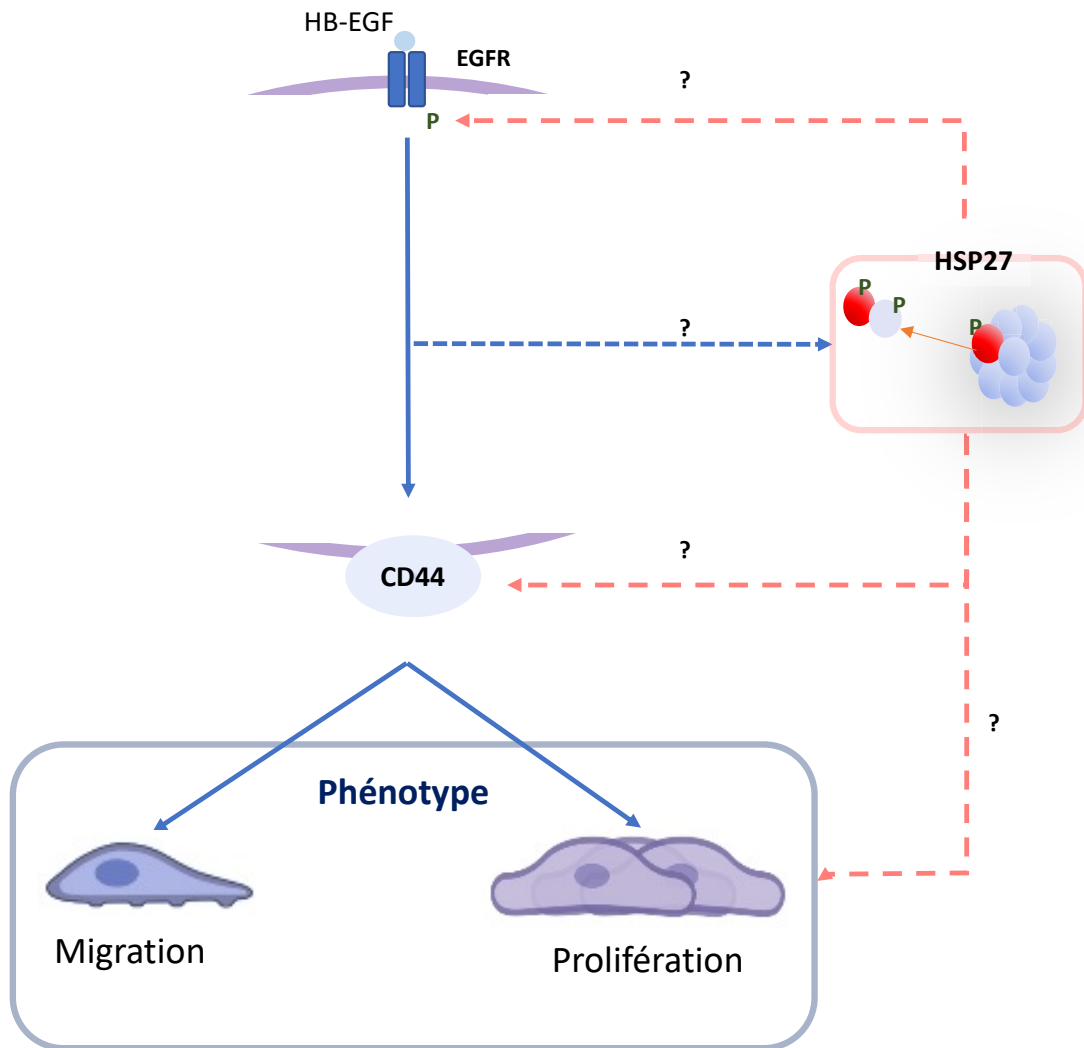


Figure 12. Hypothèse d'action d'HSP27 au sein de la cellule épithéliale pariétale au cours des glomérulonéphrites extracapillaires.

L'activation de l'EGFR par l'HB-EGF induit l'expression de CD44 et favorise la migration et la prolifération des PEC (**Flèche bleue pleine**). L'activation de l'EGFR dans les PEC pourrait stimuler l'expression d'HSP27 et/ou la phosphorylation d'HSP27. HSP27 favoriserait la migration et la prolifération des PEC à travers notamment la stabilisation de l'EGFR activée et en promouvant l'expression de CD44 (**Flèche rouge en pointillée**).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif de l'étude est d'identifier le rôle d'HSP27 dans la physiopathologie des glomérulopathies impliquant l'activation des PEC en :

- 1) Caractérisant le rôle d'HSP27 au cours de ces glomérulopathies *in vivo*.
- 2) Identifiant les conséquences moléculaires et fonctionnelles de l'induction d'HSP27 dans les PEC.

Avant-Propos

Notre approche a consisté à développer deux aspects. En premier lieu étayer le rôle physiopathologique d'HSP27 in vivo et in vitro. En parallèle, nous avons souhaité développer une approche thérapeutique avec une possibilité de repositionnement de différents traitements ciblant HSP27 et bien tolérés chez l'homme (OGX-427 et Ivermectine).

Afin de valider l'hypothèse que HSP27 joue un rôle délétère au cours des GEC via son expression au sein de la PEC, nous avons articulé ce travail sous trois grands axes.

Ainsi, en premier lieu, en ayant recours au service d'anatomopathologie et d'immunologie, nous nous sommes assurés de l'expression d'HSP27 au cours des GEC et notamment au sein des PEC activées composant le croissant chez l'homme.

En parallèle, nous avons étayé le rôle d'HSP27 dans un modèle murin mimant la GEC, le modèle NTS. Ce modèle est le plus fréquemment utilisé dans les études et est relativement aisé à développer. Ce modèle court (10 jours après injection du sérum néphrotoxique dans notre étude) et efficace pour induire des lésions extracapillaires, permet de limiter l'expérimentation animale à quelques semaines seulement. Afin de moduler HSP27, deux outils étaient à notre disposition, l'OGX-427 et l'ivermectine. L'OGX-427 est un oligonucléotide antisense (ASO) inhibant HSP27 développé chez l'homme dans les pathologies cancéreuses et dont l'efficacité chez la souris a été démontrée. Il s'agit d'une ASO, dont la propriété est d'inhiber la traduction de l'ARNm cible. En se fixant de manière spécifique à cet ARNm, il entraîne sa dégradation par une endonucléase (RNase H). Par ailleurs, HSP27 est une protéine dont la régulation dépend de sa phosphorylation pour former des dimères actifs. Il a été récemment montré que l'ivermectine, antiparasitaire largement utilisé chez l'homme, inhibait la formation de structure dimère d'HSP27 et donc son activation. Nous avons donc au sein du même modèle NTS, utilisé l'ivermectine pour moduler l'activation d'HSP27 et en étudier les conséquences fonctionnelles.

L'approche in vivo avait pour objectif d'éclaircir le rôle au niveau physiopathologique d'HSP27 au cours de la GEC. Bien-sûr, l'effet des inhibiteurs utilisés reste systémique et cette approche n'offre pas l'avantage d'une invalidation cellule-spécifique.

Afin de préciser l'action au sein même de la PEC, nous avons eu recours à des expérimentations *in vitro* utilisant des cellules primaires issues du laboratoire du Dr Marcus Moeller. Après s'être assuré de la validité de ce modèle *in vitro* dans nos conditions de culture (expression de marqueurs spécifiques des PEC), nous avons inhibé HSP27 par une méthode d'interférence RNA transitoire en utilisant l'ASO à notre disposition. Nous nous sommes d'abord assurés de l'efficacité de cette inhibition. Nous avons ensuite étudié les conséquences fonctionnelles de cette inhibition en analysant la migration des PEC. Enfin, nous avons cherché à préciser les voies modulées par cette inhibition en étudiant en premier lieu l'expression de CD44, marqueur d'activation des PEC. En parallèle, nous avons répété cette approche en utilisant l'ivermectine.

Dans l'ensemble, notre étude montre que l'inhibition d'HSP27 diminue l'expression de CD44 et la migration des PEC *in vitro* et est associée *in vivo* à une diminution des lésions de croissants extracapillaires.

Ainsi, HSP27 semble bien jouer un rôle pathogénique au cours des GEC. Néanmoins des expérimentations supplémentaires restent nécessaires pour préciser :

- *In vivo* le rôle d'HSP27 au sein de la PEC par des méthodes d'inactivation cellule-spécifique.
- *In vitro* les mécanismes impliquant cette protéine dans les PEC.

EXPOSÉ DES TRAVAUX

HSP27 promotes parietal epithelial cells activation and crescent formation during crescentic glomerulonephritis.

Hamza SAKHI¹, Carole Henique¹, Shao-Yu Zhang¹, Anissa Moktefi¹, Margaux von Wynsbreghe¹, Chloe Ben Ali¹, André Pawlak¹, Kim-Anh Nguyen², Pablo Bartolucci², Thibault Belmondo³, Sophie Hue³, Violaine Tran Quang⁴, Oriane Wagner-Ballon⁴, Dil Sahali^{1,5}, Vincent Audard^{1,5}, Khalil El-Karoui^{1,5}

1. Univ Paris Est Créteil, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), Equipe 21, Créteil, France
2. Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Inserm U955 Equipe 2, GRex Université Paris-Est Créteil, Créteil, France ;
3. Institut Mondor de Recherche Biomédicale INSERM U955, équipe immunorégulation et biothérapie (I-BIOT), Université Paris-Est Créteil (UPEC), Créteil, France ;
4. Département d'Hématologie et d'Immunologie Biologiques, APHP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, F-94010, Créteil, France
5. Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Service de Néphrologie et Transplantation, Centre de Référence Maladie Rare « Syndrome Néphrotique Idiopathique », Fédération Hospitalo-Universitaire « Innovative therapy for immune disorders », Créteil, France.

Count: 203 + 4500

Abstract

Crescentic glomerulonephritis (CG) is an aggressive glomerular disease associated with severe kidney outcome. While the main treatment consisting in immunosuppressive therapy is associated with major side-effects in frail patients, to date no drugs targeting the mechanisms directly involved in epithelial crescent formation are available. Indeed, recent studies identified parietal epithelial cells (PEC) as a major component of crescent formation.

In this study, we showed that Heat shock protein 27 (HSP27/HSPB1), a stress-inducible protein involved in cancer cell proliferation and migration, is overexpressed in activated PEC of crescentic lesions both in nephrotoxic nephritis mouse model and humans. Moreover, circulating HSP27 is associated with disease activity in humans with biopsy-proven CG. HSP27 inhibition through OGX-427, an antisense oligonucleotide targeting *HSPB1* mRNA, and Ivermectin (which inhibits HSP27 dimerization) reduce crescent formation in experimental CG model and PEC activation and migration *in vitro*. However, in NTN murine model, HSP27 inhibition with OGX-427 but not with Ivermectin was associated with a worsening of endothelial injury.

Overall, these results identify HSP27 as a new pathogenic protein during crescent formation and a biomarker of disease activity in human CG. Optimal therapeutic option inhibiting HSP27 with the aim to reduce molecular processes leading to proliferative glomerulonephritis remains to be determined.

Introduction

Crescentic glomerulonephritis (CG) and focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS) are two renal diseases associated with a potential risk of severe kidney failure. End-stage renal disease (ESRD) occurred in approximately 30% of patients with CG after 5 years of follow-up¹ and FSGS count for about 3-4% of all causes of ESRD². Immunosuppressive therapy remains the cornerstone of CG therapeutic management but is associated with a subsequent risk of major side effects in frail patients.

Recently, several experimental studies identified common molecular pathways leading to crescent formation and FSGS lesion. These studies demonstrated that parietal epithelial cell (PEC) appeared as a key player in the pathophysiological processes involved in both diseases³⁻⁶. PEC are quiescent cells lining on the Bowman capsule. However, after PEC activation, they have been identified as the major component of crescent and FSGS-related lesions⁴. During CG occurrence, podocytes injury⁷ and secretion of local factors^{5,8} lead to PEC activation, characterized by de novo CD44 expression followed by an epithelia-mesenchymal transition (EMT) like phenotype with the acquisition of the ability to dedifferentiate⁵, migrate^{5,6,9} and proliferate^{5,6,9,10}. However, it remains to be determined the underlying molecular mechanisms associated with PEC activation with the aim to develop promising therapy targeting specifically this cell behavior.

Heat shock Protein (HSP) are considered as chaperones molecules which were initially described in *Drosophila*¹¹. These proteins are characterized by an overexpression during a large range of stress situations from the initially described heat shock to oxidative, metabolic or hypoxic stress^{12,13}. Small HSP, one of the six families of HSP¹⁴, are characterized by a conserved sequence of amino acids (80-100) named alpha crystalline¹⁵. HSP27, also known as HSPB1 a member of the small HSP family, is involved in a broad spectrum of human diseases including solid cancer and malignant hematological disorders¹⁶⁻¹⁸. Overexpression of HSP27 has been associated with tumor progression, as a marker of poor prognosis¹⁹ and with resistance to chemotherapies²⁰. HSP27 is involved in EMT and seems to promote cell dedifferentiation in cancer cells²¹⁻²⁴. Interestingly, HSP27 inhibition attenuates EGFR-mediated EMT in an in vitro model of prostate cancer²¹. Cordonnier et al previously demonstrated that overexpression of HSP27 through EGFR mediates EMT phenotype including loss of differentiation markers and acquisition of a migratory phenotype. Recently,

Nappi et al, showed that, once phosphorylated, HSP27 may directly interact with EGFR, modulating its signalization through SHPTP1, a phosphatase involved in EGFR regulation. In this study, HSP27 inhibition impairs cell migration *in vitro* and tumoral outgrowth in a xenograft mouse model¹⁸.

HSP27 transcription is regulated through the major transcription factor Heat Shock Factor (HSF)-1^{25,26}. HSP27 regulation involves a dynamic balance between its different oligomeric structures. HSP27 may be assembled in large oligomers, and the phosphorylation in three serine residues (Ser15, Ser78, Ser82) by different kinases (e.g., MAPKAP2, p38 MAPK)²⁷ leads to its dislocation into several activated dimers^{18,27}.

Due to all these potential biological effects, several inhibitors of HSP27 have been developed. Recently, OGX-427, an anti-sense oligonucleotide has been developed and tested in phase 2 trial of epithelial cancer²⁸⁻³⁰. Moreover, Nappi et al identified ivermectin, a well-known antiparasitic drug³¹ as a potential relevant inhibitor of HSP27 dimer formation¹⁸ suggesting a possible repositioning in cancer treatment of this already FDA approved drug (NCT05318469)

To date, there are only few data regarding the potential role of HSP27 in pathogenesis of glomerular diseases. Sanchez et al show that HSP27 could be overexpressed in FSGS lesions³² but its role on PEC biology remains to be determined

Considering HSP27 role on epithelial cell dedifferentiation and migration, we sought to investigate HSP27 role in CG glomerulonephritis associated with PEC activation.

Results

HSP27 is overexpressed in glomeruli of human crescentic glomerulonephritis within activated parietal epithelial cells

To evaluate glomerular HSP27 expression in human renal tissue specimens, we performed immunohistochemistry experiments performed in normal samples and from patients with biopsy-proven glomerular diseases. In normal kidney, we observed only a weak glomerular HSP27 expression (**Supplementary Figure 1**). We then evaluated glomerular expression of HSP27 in human CG. Compared to controls including renal tissues from patients with non-proliferative glomerulonephritis (non-CG group) such as IgA nephropathy or Membranous nephropathy (**Supplementary Table 1**), glomerular HSP27 expression was higher in CG group (23.3% (± 16.2) versus 79.4 (± 18.5) for non-CG and CG, respectively; $p < 0.0001$ (**Figure 1a & b**)). Moreover, HSP27 was expressed mainly on its phosphorylated form (S82) in CG (**Supplementary Figure 2**). Upregulation of HSP27 was also observed in other glomerular diseases associated with PEC activation such as primary or secondary FSGS (**Supplementary Figure 1**).

Strikingly, we observed that glomerular HSP27 was overexpressed in PEC even in normal glomeruli of CG patients without crescentic lesions, compared to control patients. (48.5 % (± 42) versus 23.3 (± 23.3); $p < 0.05$) (**Figure 1c & d**). In these crescentic lesions, HSP27 was coexpressed with CD44, (**Figure 1e**) and with Ki-67 (**Figure 1f**).

We then investigated HSP27 expression in nephrotoxic serum nephritis (NTN) an experimental of murine CG (**Figure 2a**). We found a strong induction of *HSPB1* mRNA in cortical lysate of NTN-mice compared to control mice ($p < 0.05$) (**Figure 2b**). HSP27 protein expression was also strongly induced and mainly observed in glomerular crescentic lesion (**Figure 2c, d**). HSP27 expression was mainly observed in crescentic lesions in murine model whereas in human we observed more frequent PEC, HSP27 positive in normal glomeruli. As observed in human CG, coexpression experiments showed in NTN-mice that HSP27 was mainly expressed in CD44+ activated PEC (**Figure 2e**).

These results suggested that HSP27 induction in activated PEC is a common finding both in experimental model and in humans with CG.

Serum level of HSP27 is increased during crescentic glomerulonephritis

To assess whether HSP27 could be a non-invasive biomarker of disease activity, we determined HSP27 levels in sera from patients with active CG disease (CG (active): n = 32) and during remission phase (CG (remission), n =19), as well in healthy volunteers (HV, n = 22). **(Figure 3a, Supplementary Table 2)**. Serum HSP27 levels were higher in CG group with active disease compared to Healthy Volunteers (HV) and CG group patients in remission. Values were 8415 (\pm 5108), 5760 (\pm 3251) and 3085 (\pm 1965) pg/ml for respectively active CG, CG in remission and for HV, respectively, $p < 0.001$ **(Figure 3a)**.

These levels were not correlated to eGFR at diagnosis ($r = 0.05$, $p = 0.78$) **(Figure 3b)**. ROC curve of serum HSP27 level for discrimination between CG (active) compared to HV was with area under curve (AUC) (\pm s.e.m) = 0.85 (\pm 0.05). ROC curve of serum HSP27 level for discrimination between CG (active) from CG (remission) was with AUC (\pm s.e.m) = 0.65 (\pm 0.07) **(Figure 3c & d)**. We then compared patients with high and low serum HSP27 levels based on the best HSP27 level value allowing to discriminate CG (active) from HV according to ROC curve study (HSP27 level = 8000pg/ml). High serum HSP27 level was associated with more frequent acute kidney injury according to KDIGO staging at presentation compared to patients with low HSP27 level (64% versus 29%, $p = 0.052$), although mean eGFR at diagnosis was not statistically different between the 2 groups (HSP27 high: 21 ml/min/m² vs HSP27 low: 14 ml/min/1.73m², $p = ns$) **(Figure 3e and Supplementary table 2)**. Interestingly, the high HSP27 level group displayed also less chronic lesion on kidney biopsy based on Mayo clinic chronicity score of 4 (4) vs 7(3), $p < 0.05$ **(Figure 3f, Supplementary table 2)**. These finding suggest that serum HSP27 levels may be a promising biomarker of CG activity.

HSP27 expression is associated with PEC activation and phenotypic changes *in vitro*

We then analyzed the potential role of HSP27 *in vitro* in activated PEC. We showed that mouse PEC cell lines expressed CD44 and HSP27 on western blot analysis **(Figure 4a)**, suggesting a close relationship between HSP27 expression and PEC activation. We then studied the impact of HSP27 inhibition on PEC activation by using OGX-427, an anti-sense oligonucleotide directed against human *HSPB1* transcript. We found that OGX-427 transfection leads to a significant downregulation of HSP27 protein expression compared to scramble ($p < 0.05$)

(**Figure 4a & b**). This reduction was associated to a significant decrease of CD44 expression (**Figure 4a & c**), suggesting that HSP27 has a potential role in PEC activation-

We performed a migration assay following activation by HB-EGF exposure. After HB-EGF exposure, we observed an increase of CD44 (**Figure 4d & e**) and HSP27 (**Figure 4f & g**) expression associated with an increase of PEC migration (**Figure 4h & i**). Interestingly, inhibition of HSP27 by OGX-427 in PEC exposed to HB-EGF (**supplementary Figure 3a & b**) significantly reduced HB-EGF induced migration compared to PEC exclusively exposed to HB-EGF (scratch area reduction in percentage: mean difference(\pm SD) 10.71(\pm 0.92), $p < 0.05$) at 24h). (**Figure 4h & i and Supplementary Figure 3c**). All these results support a mechanistic role of HSP27 in PEC activation and migration.

HSP27 inhibition reduces glomerular crescent in the Nephrotoxic nephritis NTN- mouse model

To investigate the potential role of HSP27 during CG formation, we used OGX-427 to inhibit HSP27 expression in the nephrotoxic nephritis (NTN) model (**Figure 5a**). HSP27 protein expression was induced in glomerular crescentic lesion HSPB1 mRNA expression after NTN induction in this experiment (**Figure 5b & c**) as seen previously. While relative HSPB1 mRNA expression increased by 45-fold in NTN mice compared to control ($p < 0.01$), OGX-427 treatment led to a 40% reduction of HSPB1 mRNA expression compared to NTN induced mice ($p = 0.08$) (**Figure 5b**).

Until day 10, in normal mice, OGX-427 injection was well tolerated with no significant mortality, weight loss, histological renal lesion or abnormal functional parameters. (**Figure 5d,e,f & g**). Histological analysis of glomerular lesions showed a significant reduction of crescent formation (40%) in OGX-427-exposed NTN mice ($p < 0.01$). Percentage of crescents were respectively in NTN and NTN + OGX-427 mice of 48.7% (\pm 29.9) and 29.9% (\pm 7.6) (**Figure 5d & e**). However, these pathological changes were not associated to improvement of kidney function or reduction of proteinuria level (**Figure 5f & g**). Overall, these data suggest, in NTN experimental model, that OGX-427 is associated with significant reduction on glomerular crescent development but without evident improvement of renal function parameters.

HSP27 inhibition by OGX-427 exacerbates endothelial injury in NTN model

We next sought to investigate the main reason leading to improvement of glomerular changes without renal function improvement after OGX-427 administration. In our model, we found that OGX-427 was associated with worsening of glomerular TMA lesions (64.1% glomeruli with TMA lesions (± 24) in NTN + OGX-427 mice vs 35.9% (± 15) in NTN mice, $p < 0.01$). Strikingly, OGX-427 treatment was not associated with TMA lesions in control mice (**Figure 6a & b**). Positive fibrin staining confirmed the composition of microvascular lesions induced by OGX-427 (**Figure 6c**). Since endothelial injury occurs during the early phase following NTS injection, we measured proteinuria at day 5. We observed an early increase in proteinuria level in NTN+OGX-427 mice, 4093 (± 2092) g.mol⁻¹ compared to 2092 (± 2092) g.mol⁻¹ in NTN mice ($p < 0.02$) (**Figure 6d**). However, no difference was observed in platelet, hematocrit, or reticulocytes count after OGX-427 administration. (**Figure 6e, f and g**)

HSP27 is expressed in endothelial cell *In vivo* and *in vitro*

To investigate the association between OGX-427 administration and the occurrence of TMA lesions, we firstly analyzed HSP27 expression in endothelial cells. Compared to control mice, HSP27 was induced in endothelial cell in NTS model, as identified by coexpression staining of HSP27 with CD31, (**Figure 6h**). We next studied HSP27 expression in primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). We found a constitutive protein expression of HSP27 in these cells (**Supplementary Figure 4a**). Moreover, as VEGFA/VEGFR2 is major signaling pathway involved in TMA lesions in NTN mice we then evaluated whether HSP27 expression could be modulated by this signaling pathway. We found that VEGFA exposure was associated with HSP27 phosphorylation (**Supplementary Figure 4a & b**). We confirm that OGX-427 administration was associated a significant reduction of HSP27 expression in HUVEC. We then evaluated the functional consequences of this inhibition, by studying HUVEC migration. Interestingly, inhibition of HSP27 (**Supplementary Figure 4c**) was associated with a decrease in migratory phenotype of HUVEC exposed to VEGFA (scratch area reduction in percentage: mean difference (\pm SD) = 9.54 (± 0.89), $p < 0.05$). (**Supplementary Figure 4d & e**). Those data

suggest that, *in vitro*, HSP27 is regulated by VEGFA and may participate to endothelial cell homeostasis

Ivermectin induces a reduction of crescent formation in NTN model

Given the impact of HSP27 inhibition in crescent formation in the NTN model but due to worsening of TMA lesions after OGX-427 administration then evaluated the effect Ivermectin in this model (**Figure 7a**). Notably, as expected, ivermectin treatment induced no difference in *HSPB1* mRNA expression (**Figure 7b**). We next evaluated Ivermectin impact on HSP27 phosphorylation by immunohistochemistry. We observed that ivermectin exposure led to a trend toward but no significant reduction of proportion of glomeruli positive for HSP27 phosphorylation in NTN mice. (29.8% (± 16.3) vs 47% (± 15.2), $p = 0.2$). (**Figure 7c and d**). Histological analysis of glomerular lesion demonstrated a non-significant reduction of 40% in crescent formation after ivermectin treatment (glomerular crescent in 51 (± 21.6) % glomeruli versus 27.8 (± 8) % in NTN mice and in NTN mice receiving ivermectine, respectively ($p = 0.2$) (**Figure 7e & f**). In this experimental model, microvascular lesions were not modified by ivermectin exposure. However, no difference in functional parameters (renal function and albuminuria) was observed (**Figure 7g & h**). To assess whether ivermectin could inhibit HSP27 function in PEC, we quantify HSP27 dimerization after ivermectin exposure. Ivermectin was associated with a 30% reduction of HSP27 dimers compared to control ($p=0.2$) (**Supplementary Figure 5a and b**) but a modest reduction of phosphor-HSP27 expression (**Supplementary Figure 5c**).

Interestingly, IVM exposure in PEC was associated with a decrease in CD44 expression ($p<0.05$) (**Supplementary Figure 5d and e**). Moreover, PEC exposed to ivermectin showed a reduction in HB-EGF -induced migration (scratch area reduction expressed in percentage: mean difference 25.4% (± 4.6), $p<0.05$) (**Supplementary Figure 5f and g**). In conclusion, these results suggest that ivermectin may have a beneficial role in glomerular lesions *in vivo* and directly inhibits PEC activation and migration.

Discussion

HSP27 is overexpressed in crescent and in PEC activation

In this study, we showed that HSP27 may be overexpressed in PEC from renal tissues of patients with CG and in a murine model of CG. This induction was absent from other non-proliferative glomerulonephritis (IgAN and MN). Moreover, this expression was also noticed in FSGS, another glomerular disease sharing similar pathophysiological mechanisms with CG^{4,33}. Indeed, PEC are the major component of crescents and FSGS lesions^{3,4,33}. Their activation, characterized by the expression of CD44 is associated with the formation of glomerular injury in the urinary space via their ability to migrate & proliferate^{6,9}.

Serum HSP27 increases during crescentic glomerulonephritis

In addition, in patients, serum circulating HSP27 levels were associated with CG activity independently of eGFR. Circulating HSP27 was previously suggested as being a biomarker in non-small cell lung cancer and was associated in a worse outcome (dedifferentiate cancer, metastatic, survival)¹⁹ Currently, one of the major problems in patients with CG is the evaluation of underlying local activity given the absence of specific biomarkers.. Until now, classical renal functional parameters, positive antibodies (such as ANCA or anti GBM) in the serum³⁴ or those reflecting a specific kidney lesion such as NGAL³⁴ are the most frequently used to guide specific therapy. Our data emphasizes on the fact that HSP27, may not be a specific biomarker, but could reflect an active phase of the disease at diagnosis and even may help for identifying relapses. Nevertheless, these preliminaries results have several limitations due to the limited sample size of our cohort and the absence of sequential analysis

HSP27 involvement in PEC activation & migration

HSP27 may have different roles in modulating PEC activation and migration. We observed that OGX 427 lead to an inhibition of CD44 expression suggesting that HSP27 is involved in PEC

activation. To date, there is no data in the literature regarding the direct involvement of HSP27 in the CD44 pathway. Immunoprecipitation experiments should be performed to evaluate if HSP27 may directly interact with CD44 or regulate its expression at transcriptional level. However, HSP27 modulation of CD44 expression may be also related to an indirect action on upstream factors modulating CD44. Interestingly, HSP27 interact and stabilize p-EGFR, promoting its activation in cancer cells¹⁸. Thus, HSP27 could have a similar role in PEC. Given the known role of EGFR pathway in PEC activation and migration⁵, HSP27 role in PEC activation may involve EGFR signaling. Consistently with this hypothesis, we observed a less important migration induced by HB-EGF/EGFR activation under OGX-427.

HSP27 involvement in crescent reduction

Our *in vitro* data showing the role of HSP27 promoting PEC activation and migration are in line with the impact of HSP27 inhibition *in vivo*. In the experimental NTN model, characterized by proliferative glomerulonephritis with severe crescent formation, inhibition of HSP27 by OGX-427 resulted in a decrease in extracapillary lesions. However even if PEC are the main cell type localized in glomerular crescent, other cellular populations such as inflammatory cells are also involved in crescent formation^{35,36}. Hence, a potential inhibiting role of OGX 427 in inflammatory cells cannot be excluded¹⁷. Although our *in vivo* and *in vitro* data support a pathogenic role of HSP27 through PEC activation during crescent formation. CG mouse models with HSP27 cell-specific invalidation will be necessary to assess HSP27 role in each cell type involved in crescent formation

Moreover, as CG and FSGS share similar pathophysiological pathways involving PEC activation in lesion formation^{3-6,9,10}, we can speculate that HSP27 expression in PEC may be involved in FSGS lesions formation. However, whether or not HSP27 inhibition could lead to a similar

benefit (with no worsening of endothelial impairment) in FSGS experimental models remains to be determined.

HSP27 involvement in endothelial lesions

In the NTN model, despite the benefit of HSP27 inhibition on crescentic lesions, we did not observe any functional benefit. This result may be explained by the increase in capillary microthrombi lesions after OGX-427 treatment which may counterbalances the effect of the reduction of extracapillary lesions. Currently, the NTN model is a composite model with global glomerular injury that can associate extracapillary proliferation, endocapillary proliferation and thrombotic microangiopathy lesions³⁷⁻³⁹

As described in other studies focusing on HSP27 expression in endothelial cells, we found a strong expression of HSP27 in endothelial cells *in vivo*^{40,41}. We demonstrated *in vitro* that HSP27 inhibition reduces HUVEC migration after VEGF exposition, suggesting a major role of HSP27 in VEGF signaling pathway. VEGFR signaling is associated with HSP27 overexpression and phosphorylation in endothelial cell types⁴¹. Nevertheless, the accurate mechanism by which HSP27 is involved in endothelial cells protection in the NTN model remains to be clarified. Interestingly, IVM, a direct inhibitor of HSP27 dimerization, did not induce endothelial injury, suggesting that HSP27 dimerization may not be involved in endothelial homeostasis. Shi et al showed that HSP27 maintains endothelial permeability after brain ischemic injury through apoptosis inhibition and actin polymerization inhibition^{42,43}. Interestingly, in the NTN model, Mesnard et al have shown the importance of VEGFR2 signaling in TMA development³⁸. Hence, it is tempting to speculate that HSP27 may protect from TMA lesions through VEGFR signaling and apoptosis /cytoskeleton modulation in the NTN model.

Therapeutic approach

Our results demonstrated that targeting HSP27 with OGX-427, an antisense oligonucleotide, has the potential to significantly reduce crescent formation and PEC activation. To date, no treatment targeting the mechanisms of activation, migration or proliferation of PEC has been developed for human CG. Interestingly, OGX-427 phase II trials showed a good experimental drug tolerance in different cancers studies²⁸⁻³⁰ suggesting that this drug may be proposed as potential additional therapeutic approach in human CG. Unfortunately, endothelial injury observed in our experimental model after OGX-427 administration should be elucidated before considering its use in patients with CG. In addition, our results show that Ivermectin, an antiparasitic drug of the macrolide family³¹ has functional consequences on PEC activation through possible HSP27 inhibition. Indeed, Nappi et al have shown that ivermectin prevents HSP27 phosphorylation and HSP27 dimer formation thus inhibiting the functional activity of HSP27 in cancer cells. Our results suggest that IVM may have a similar HSP27 inhibiting role in activated PEC both *in vitro* and *in vivo* and could represent a new promising therapeutic strategy. However, no functional benefit was observed *in vivo* in CG mouse model. Thereby, Ivermectin should be firstly investigated in FSGS experimental model which is considered as a more progressive model of PEC activation.

Limitations

Finally, our study has several limitations. First, we only used a pharmacological approach using ivermectin and OGX-427 to inhibit HSP27 expression or function. Although OGX-427 is an ASO directed specifically against HSP27 transcript, this inhibition was not complete and not specific to PEC. Hence, to validate the role of HSP27 in PEC activation and crescent formation, similar

experiments could be proposed in PEC-specific *HSPB1* invalidated mice^{5,10,44}. Moreover, evaluating HSP27 function in FSGS models⁴⁵⁻⁴⁷ should allow us to reproduce our results in other less aggressive models of PEC activation . Similarly, *HSPB1* shRNA or CRISPR cas9 invalidation studies in cultured PEC should help us for validating HSP27 role in PEC activation and migration. Lastly, while HSP27 levels correlate with CG activity and could be disease activity biomarker, larger patient cohorts are necessary to confirm our preliminaries results.

Conclusion

In conclusion, our study shows for the first time that HSP27 is a newly identified player of extra-capillary lesion formation, by promoting PEC activation and migration. Moreover, HSP27 appears as a crucial molecule in endothelial cell homeostasis. Altogether, these results suggest that targeting HSP27 expression may represent a new therapeutic and diagnostic strategy in glomerular diseases associated with PEC activation.

Concise methods

Human samples

All patient data were obtained from electronic records of Nephrology department, Mondor Hospital, Assistance Publique- Hôpitaux de Paris, Créteil, France.

Human tissues. Formalin-fixed, paraffin-embedded renal tissue specimens were obtained from the department of pathology, Mondor Hospital, Assistance Publique- Hôpitaux de Paris, Créteil, France, after informed consent and approval from the local Ethics Committee (IRB.) . HSP27 dosage was done through ELISA kit according to manufacturer instructions on residual serum samples (Invitrogen).

Animals

129/sv Mice were purchased from Jackson laboratory. All mice had *ad libitum* access to drinking water and standard murine chow. Experiments were conducted according to the French veterinary guidelines and those formulated by the European Community for experimental animal use (L358-86/609EEC) and were approved by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and local University Research Ethics Committee (Comité d’Ethique en matière d’Expérimentation Animale, UPEC).

Nephrotoxic nephritis was induced in male mice (10 weeks of age) by retroorbital injection of 15 µl of sheep anti-glomerular basement membrane (GBM) nephrotoxic serum (NTS) as previously described^{48,49}. Serum injections were repeated twice: on day 2 (6 µl/g of body weight) and on day 3 (7 µl/g of body weight). Mice were sacrificed at day 10.

Vehicle or OGX-427, a second-generation antisense oligonucleotide (OncoGenex Pharmaceuticals). was given intraperitoneally (15mg/kg) every day from day -2 to day 10 after NTS injection.

Ivermectin (8898Sigma-Aldrich) was solubilized in DMSO.

Mice were randomly given 10 mg/kg of IVM or DMSO, administered orally every other day from day -2 to day 10 after NTS induction.

Blood urea nitrogen (BUN) concentrations were measured by a standard colorimetric method (Olympus AU400) at the Biochemistry Laboratory of Institut Claude Bernard (IFR2, Faculté de Médecine Paris Diderot). Urinary albumin excretion was measured using a specific ELISA assay for the quantitative determination of albumin in mouse urine (CellTrend GmbH).

Kidneys were fixed in 4% formol or in Alcohol-Formol- Acetic acid. Paraffin-embedded sections (4 µm thick) were stained by Periodic Acid Schiff to evaluate kidney morphology and determine the proportion of crescentic glomeruli by a blind examination of at least 50 glomeruli per section. mRNA and proteins were extracted from kidney cortex after manual excision of medulla.

Immunohistochemistry & immunofluorescence

Immunohistochemistry and immunofluorescence are performed as previously described. Briefly Nonspecific sites are blocked by a solution containing 0.1% TBST, 10% SVF and 3% BSA for 20 minutes at room temperature. Slides are exposed to 1/200 anti-HSP27 (Abcam) antibody following secondary antibody.

For CD44 staining, antigen retrieval is performed in citrate buffer. Primary Antibodies included anti-HSP27 (rabbit, Abcam, 1/200; anti-CD44(mouse, R&D, A/50); anti-CD44 (Rat, BDpharmingen, 1/100). Anti-CD31 (Rat, Dianova, 1/100) and Anti-Fibrin (Rabbit, Dapko, 1/50).

RNA extraction analysis

. HSPB1 mRNA was extracted and detected in mouse kidneys by real-time RT-PCR using Lightcycler 480 (Roche) as previously described. Primers (Eurogentec) were as follows: HSPB1 Forward: AGG-AAG-GCG-TGG-TGG-AGA-T; Rerverse:GAC-CGA-GAG-ATG-TAG-CCA-TGT-TC. GAPDH were used as the normalization controls in kidneys.

PEC Culture

The glomerular parietal epithelial cells, a gift from Dr Markus Moeller (University Hospital RWTH Aachen, Aachen, Germany) (39). The cells were cultured in EGM-MV medium (Lonza Basel, Switzerland) + 20% SVF combined with growth factors (hEGF 0.1%, Hydrocortisone 0.1%, GA-1000 0.1%, BBE 0.4%, ascorbic acid 0.1%) (39). In addition, 1% Pencillin-Streptomycin is added.

For HSP27 studied, PEC were plated in 6-well plates at 2.10^6 with OGX-427 or scramble and RNAiMax lipofectamine (Invitrogen) using reverse transfection protocol. Cells were then cultured for 48h and then harvested.

For ivermectin studies, PEC were plated in 6-well plates at 2.10^6 . Cells were then cultured for 48h and then starved overnight with ivermectin (2.5 or 5nM) or vehicle (DMSO). Induction was realized with HB-EGF (30ng/ml) or vehicle in starved medium with IVM or DMSO. Cells were then harvested at 24h.

HUVEC culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), were isolated from umbilical cords as previously described⁵⁰. HUVEC were cultured in Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell) and used between passage 3 and 7.

HUVEC were plated in 12-well plates at 10^6 cells with OGX-427 or scramble and RNAiMax lipofectamine (Invitrogen) using Reverse transfection protocol. Cells were then cultured for 48h, starved 4H and then migration was induced with VEGF-A (Invitrogen, 50ng/ml) or vehicle after scratch made in dishes. Wound monitoring was made at h16. Relative density was measured using ImageJ Software.

Western blot analysis

Proteins from cells were extracted by RIPA lysis buffer (25mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% Na+ desoxycholate and 0.1% SDS) with protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets, Roche) and phosphatase inhibitors (Phosphostop,Roche). Western blotting was performed as previously described. Primary antibodies included: HSP27 (Abcam, 1/1000), p-HSP27 (S82, Abcam 1/1000), CD44 (Abcam, 1/500), Tubulin (Abcam, 1/5000), GAPDH (Cell Signaling, 1/3000), Rabbit (HRP, Cell Signaling, 1/3000), Rat (HRP, Cell Signaling, 1/3000)

Migration (wound healing) assay

PEC were plated in 12-well plates at 10^6 cells with OGX-427 or scramble and RNAiMax lipofectamine (Invitrogen) using Reverse transfection protocol. Cells were then cultured for 48h, starved overnight and then migration was induced with HB-EGF (10ng/ml) or vehicle after scratch manually made in dishes. Wound monitoring was made at 24h. Relative density was measured using ImageJ Software.

For IVM studies, PEC were plated in 12-well plates at 10^6 . Cells were then cultured for 48h. They were starved overnight in presence of IVM (2.5 or 5nM^o or DMSO and then migration was induced by HB-EGF (10nM) or vehicle) after manual scratch. Wound monitoring was made at 24h. Relative density was measured using ImageJ Software

Migration (wound healing) assay using Incucyte

PEC cells were plated in 96-well ImageLock plates (Essen Bioscience) at 34×10^3 cells per well. After 24 hours the wound was made in each well using Woundmaker (Essen Bioscience), and the cells were treated with OGX-24 (100nM) and induced by HB-EGF (10ng/ml) or vehicle. Wound closure was monitored for 24 hours with an IncuCyte evaluation every hour. Relative wound density was determined using IncuCyte software.

Supplementary materials

Supplementary Table 1. Clinical data of patients from non-crescentic <glomerulonephritis (control) and crescentic glomerulonephritis (CG)

Supplementary Table 2. Baseline data of patients with active crescentic glomerulonephritis at diagnosis between those with high level of HSP27s (>8000pg/ml) (n=14) and low level (<8000pg/ml) (n=18).

Supplementary figure 1. Expression of HSP27 in normal kidney and focal and segmental glomerulosclerosis

Supplementary figure 2. Expression of p-HSP27 in crescentic glomerulonephritis.

Supplementary Figure 3 Supplementary Figure 5. HSP27 contribute to PEC activation and to migration *in vitro*

Supplementary Figure 4. HSP27 contribute to endothelial cell homeostasis *in vitro*

Supplementary Figure 5. Ivermectin inhibits PEC activation and migration *in vitro*.

REFERENCES

1. Boudhabhay, I. *et al.* Reappraisal of Renal Arteritis in ANCA-associated Vasculitis: Clinical Characteristics, Pathology, and Outcome. *JASN* **32**, 2362–2374 (2021).
2. Couchoud, C. *et al.* The renal epidemiology and information network (REIN): a new registry for end-stage renal disease in France. *Nephrol Dial Transplant* **21**, 411–418 (2006).
3. Shankland, S. J., Smeets, B., Pippin, J. W. & Moeller, M. J. The emergence of the glomerular parietal epithelial cell. *Nat Rev Nephrol* **10**, 158–173 (2014).
4. Smeets, B. *et al.* Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 2604–2615 (2009).
5. Lazareth, H. *et al.* The tetraspanin CD9 controls migration and proliferation of parietal epithelial cells and glomerular disease progression. *Nat Commun* **10**, 3303 (2019).
6. Eymael, J. *et al.* CD44 is required for the pathogenesis of experimental crescentic glomerulonephritis and collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **93**, 626–642 (2018).
7. Estrada, C. C. *et al.* Krüppel-like factor 4 is a negative regulator of STAT3-induced glomerular epithelial cell proliferation. *JCI Insight* **3**, (2018).
8. Bollée, G. *et al.* Epidermal growth factor receptor promotes glomerular injury and renal failure in rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Nat. Med.* **17**, 1242–1250 (2011).
9. Roeder, S. S. *et al.* Activated ERK1/2 increases CD44 in glomerular parietal epithelial cells leading to matrix expansion. *Kidney Int.* **91**, 896–913 (2017).
10. Kuppe, C. *et al.* Investigations of Glucocorticoid Action in GN. *J Am Soc Nephrol* **28**, 1408–1420 (2017).
11. Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* **18**, 571–573 (1962).
12. Bakthisaran, R., Tangirala, R. & Rao, C. M. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochim Biophys Acta* **1854**, 291–319 (2015).
13. Van Montfort, R., Slingsby, C. & Vierling, E. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem* **59**, 105–156 (2001).
14. Kampinga, H. H. *et al.* Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* **14**, 105–111 (2009).
15. Kappé, G. *et al.* The human genome encodes 10 α -crystallin-related small heat shock proteins: HspB1–10. *Cell Stress Chaperones* **8**, 53–61 (2003).
16. Heinrich, J. C. *et al.* New HSP27 inhibitors efficiently suppress drug resistance development in cancer cells. *Oncotarget* **7**, 68156–68169 (2016).
17. Sevin, M. *et al.* HSP27 is a partner of JAK2-STAT5 and a potential therapeutic target in myelofibrosis. *Nat Commun* **9**, 1431 (2018).
18. Nappi, L. *et al.* Ivermectin inhibits HSP27 and potentiates efficacy of oncogene targeting in tumor models. *J Clin Invest* **130**, 699–714 (2020).
19. Sheng, B. *et al.* Increased HSP27 correlates with malignant biological behavior of non-small cell lung cancer and predicts patient's survival. *Sci Rep* **7**, 13807 (2017).
20. Lampros, M., Vlachos, N., Voulgaris, S. & Alexiou, G. A. The Role of Hsp27 in Chemotherapy Resistance. *Biomedicines* **10**, 897 (2022).
21. Cordonnier, T. *et al.* Hsp27 regulates EGF/ β -catenin mediated epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer. *Int. J. Cancer* **136**, E496-507 (2015).
22. Shiota, M. *et al.* Hsp27 regulates epithelial mesenchymal transition, metastasis, and circulating tumor cells in prostate cancer. *Cancer Res.* **73**, 3109–3119 (2013).
23. Z, F., W, L. & L, L. HSP27 promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of the β -catenin/MMP3 pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Translational cancer research* **8**, (2019).
24. Park, A.-M. *et al.* Heat Shock Protein 27 Plays a Pivotal Role in Myofibroblast Differentiation and in the Development of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *PLoS ONE* **11**, e0148998 (2016).

25. Dierick, I. *et al.* Genetic variant in the HSPB1 promoter region impairs the HSP27 stress response. *Hum Mutat* **28**, 830 (2007).
26. Jiang, Q. *et al.* Defective heat shock factor 1 inhibits the growth of fibrosarcoma derived from simian virus 40/T antigen-transformed MEF cells. *Mol Med Rep* **12**, 6517–6526 (2015).
27. Arrigo, A.-P. Mammalian HspB1 (Hsp27) is a molecular sensor linked to the physiology and environment of the cell. *Cell Stress Chaperones* **22**, 517–529 (2017).
28. Yu, E. Y. *et al.* A randomized phase 2 study of a HSP27 targeting antisense, apatosen with prednisone versus prednisone alone, in patients with metastatic castration resistant prostate cancer. *Invest New Drugs* **36**, 278–287 (2018).
29. Spigel, D. R. *et al.* A Randomized, Double-Blinded, Phase II Trial of Carboplatin and Pemetrexed with or without Apatosen (OGX-427) in Patients with Previously Untreated Stage IV Non-Squamous-Non-Small-Cell Lung Cancer: The SPRUCE Trial. *Oncologist* **24**, e1409–e1416 (2019).
30. Rosenberg, J. E. *et al.* Apatosen plus docetaxel versus docetaxel alone in platinum-resistant metastatic urothelial carcinoma (Borealis-2). *Br J Cancer* **118**, 1434–1441 (2018).
31. Campbell, W. C., Fisher, M. H., Stapley, E. O., Albers-Schönberg, G. & Jacob, T. A. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* **221**, 823–828 (1983).
32. Sanchez-Niño, M. D. *et al.* HSP27/HSPB1 as an adaptive podocyte antiapoptotic protein activated by high glucose and angiotensin II. *Lab. Invest.* **92**, 32–45 (2012).
33. Smeets, B. *et al.* Parietal Epithelial Cells Participate in the Formation of Sclerotic Lesions in Focal Segmental Glomerulosclerosis. *JASN* **22**, 1262–1274 (2011).
34. Morris, A. D., Rowbottom, A. W., Martin, F. L., Woywodt, A. & Dhaygude, A. P. Biomarkers in ANCA-Associated Vasculitis: Potential Pitfalls and Future Prospects. *Kidney360* **2**, 586–597 (2021).
35. Bariéty, J. *et al.* Podocyte involvement in human immune crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* **68**, 1109–1119 (2005).
36. Lan, H. Y., Nikolic-Paterson, D. J., Mu, W. & Atkins, R. C. Local macrophage proliferation in the pathogenesis of glomerular crescent formation in rat anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol* **110**, 233–240 (1997).
37. Xie, C., Sharma, R., Wang, H., Zhou, X. J. & Mohan, C. Strain distribution pattern of susceptibility to immune-mediated nephritis. *J Immunol* **172**, 5047–5055 (2004).
38. Mesnard, L. *et al.* Genetic background-dependent thrombotic microangiopathy is related to vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling during anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *Am J Pathol* **184**, 2438–2449 (2014).
39. Vernon, K. A. *et al.* Partial Complement Factor H Deficiency Associates with C3 Glomerulopathy and Thrombotic Microangiopathy. *JASN* **27**, 1334–1342 (2016).
40. Shi, Y. *et al.* Rapid endothelial cytoskeletal reorganization enables early blood-brain barrier disruption and long-term ischaemic reperfusion brain injury. *Nat Commun* **7**, 10523 (2016).
41. Sawada, J., Li, F. & Komatsu, M. R-Ras Inhibits VEGF-Induced p38MAPK Activation and HSP27 Phosphorylation in Endothelial Cells. *J Vasc Res* **52**, 347–359 (2015).
42. Badin, R. A. *et al.* Protective effect of post-ischaemic viral delivery of heat shock proteins in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**, 254–263 (2009).
43. Stetler, R. A. *et al.* Hsp27 protects against ischemic brain injury via attenuation of a novel stress-response cascade upstream of mitochondrial cell death signaling. *J Neurosci* **28**, 13038–13055 (2008).
44. Bouchard, M., Souabni, A. & Busslinger, M. Tissue-specific expression of cre recombinase from the Pax8 locus. *Genesis* **38**, 105–109 (2004).
45. Lee, V. W. & Harris, D. C. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology* **16**, 30–38 (2011).
46. Ratelade, J. *et al.* A murine model of Denys-Drash syndrome reveals novel transcriptional targets of WT1 in podocytes. *Hum Mol Genet* **19**, 1–15 (2010).
47. Smeets, B. *et al.* Podocyte changes upon induction of albuminuria in Thy-1.1 transgenic mice. *Nephrol Dial Transplant* **18**, 2524–2533 (2003).
48. Huang, J. *et al.* Lutheran/basal cell adhesion molecule accelerates progression of crescentic

glomerulonephritis in mice. *Kidney Int* **85**, 1123–1136 (2014).

49. Henique, C. *et al.* Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Drives Podocyte-Specific Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Essential for Resistance to Crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 172–188 (2016).

50. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. & Minick, C. R. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. IDENTIFICATION BY MORPHOLOGIC AND IMMUNOLOGIC CRITERIA. *J Clin Invest* **52**, 2745–2756 (1973).

FIGURES

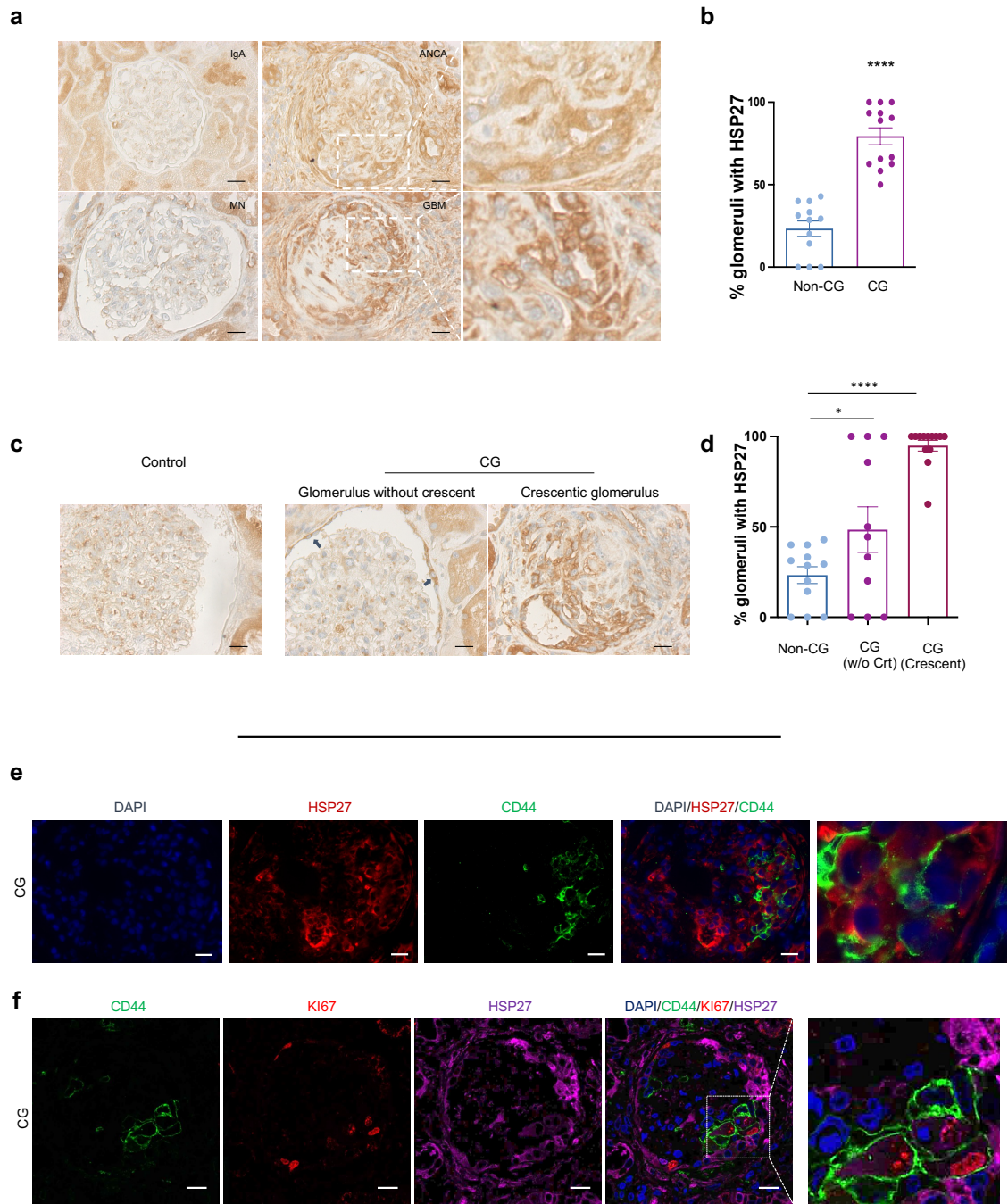


Figure 1. HSP27 is overexpressed in glomeruli during human crescentic glomerulonephritis (CG) by parietal epithelial cells (PEC).

Figure 1. HSP27 is overexpressed in glomeruli during human crescentic glomerulonephritis (CG) by parietal epithelial cells (PEC). **a** Immunohistochemistry of HSP27 expression in glomeruli in human: Representative panel of non-crescentic glomerulonephritis (Non-CG) : IgA nephropathy (IgA) and Membranous nephropathy (MN) and crescentic glomerulonephritis (CG): ANCA vasculitis (ANCA) and GoodPasture syndrome (GBM). Scale bar 40 μ m. **b.** Quantification of number of glomeruli expressing HSP27 in bowman space : in Non-CG (n=12) and CG (n=13); expressed in percentage. 23.3% (\pm 16.2) versus 79.4% (\pm 18.5) for respectively non crescentic glomerulonephritis and CG. Values are means \pm s.e.m; t-test: ****p<0.0001.

c. Immunohistochemistry of HSP27 expression in glomeruli in human: Representative images of non-crescentic glomerulonephritis (Non-CG) and in CG : Glomeruli without crescent (CG w/o Crt) and CG : Glomerulus with crescent (CG, crescent). Note the expression of HSP27 on the parietal epithelial cells in a non crescentic glomerulus in the CG group (Arrow). **d.** Quantification of HSP27 expression in bowman space in the glomeruli of in Non-CG (n=12) and in the glomeruli without crescent (CG, w/o Crt ; n=13) or with crescent (CG, Crescent ; n=13) in the CG group; expressed in percentage. 23.3 %(\pm 16.2) , 48.5 %(\pm 42), 94.9 % (10.7) for respectively non crescentic glomerulonephritis, CG with glomeruli without crescent and CG in a glomerulus with crescent. Values are means \pm s.e.m; One way ANOVA test followed by a Dunnett's multiple comparisons test: *p<0.05 ****p<0.0001. **e.** Representatives images of immunofluorescence staining of co-expression of HPS27 (red) and CD44 (green) and **f.** triple co-expression of HPS27 (violet), CD44 (green) and Ki76 (red) in human CG. Nuclear staining with Dapi. Scale bar : 40 μ m

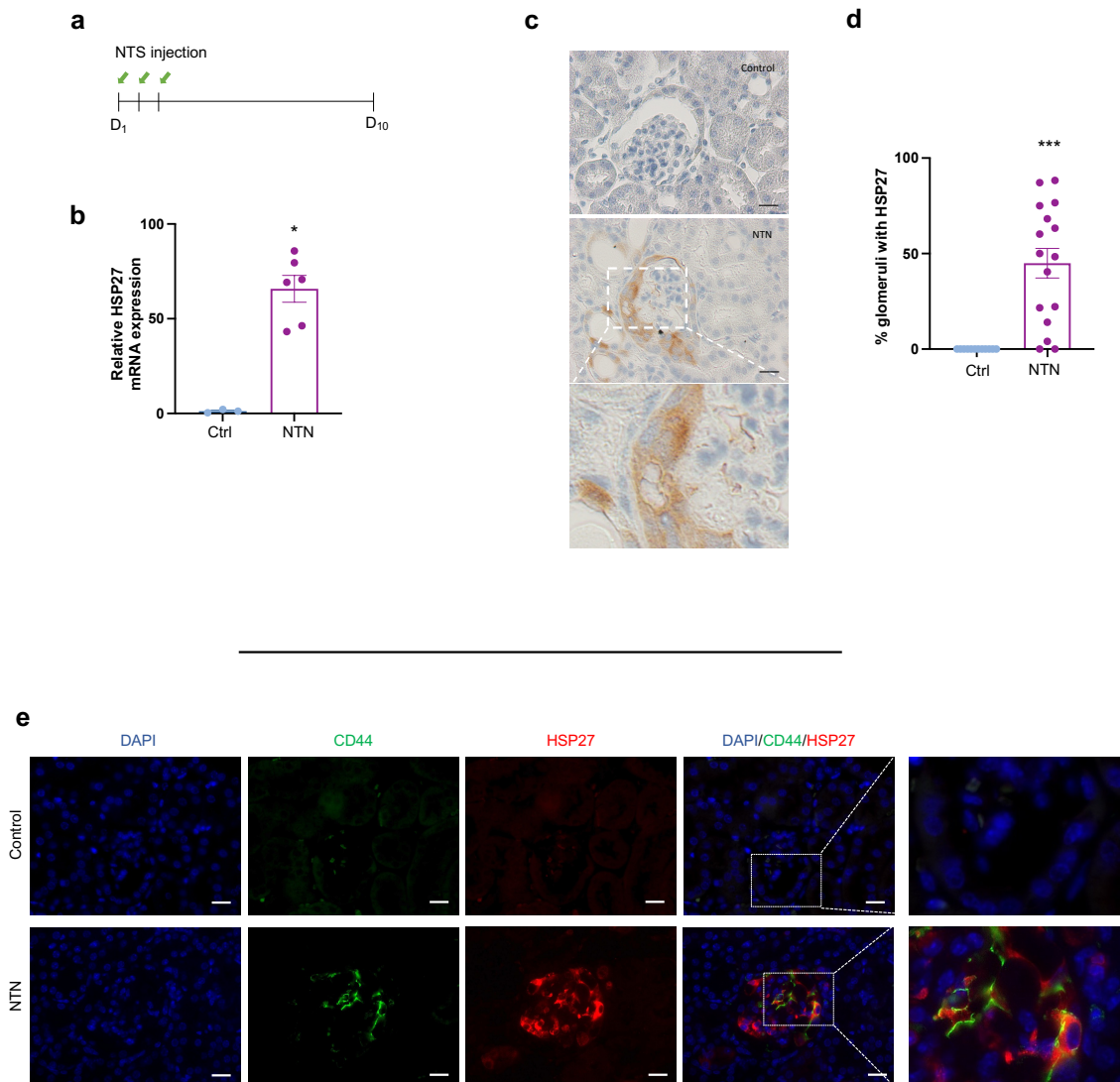


Figure 2. HSP27 is overexpressed in glomeruli during mouse model of crescentic glomerulonephritis by parietal epithelial cells (PEC) **a.** Procedure design of nephrotoxic serum nephritis induction with 3 injections at day 1,2 and 3. **b.** RT-qPCR of HSP27 mRNA relative abundance in cortical lysat from control mice (n=3) and NTN induced mice (n=6) at day 10. Values are means \pm s.e.m. Mann-Withney: * $p < 0.05$ versus control **c.** Representatives images of HSP27 expression in glomeruli by immunohistochemistry in control and NTN induced mice at day 10; scale bar 40 μ m. **d.** Quantification of number of glomeruli expressing HSP27 in bowman space in control (n=12) and in crescentic glomeruli of NTN induced mice (n=16); analyse of at least 50 glomeruli per mice and expressed in percentage. Values are means \pm s.e.m; Mann-Withney test: *** $p < 0.001$ versus control. **e.** Représentative images of immunofluorescence staining with co-expression of HSP27 (red) and PEC specific marker : CD44 (green) expression in glomeruli of control mice and in crescentic glomeruli of NTN induced mice at day 10 . Nuclear staining with Dapi. Scale bar : 40 μ m.

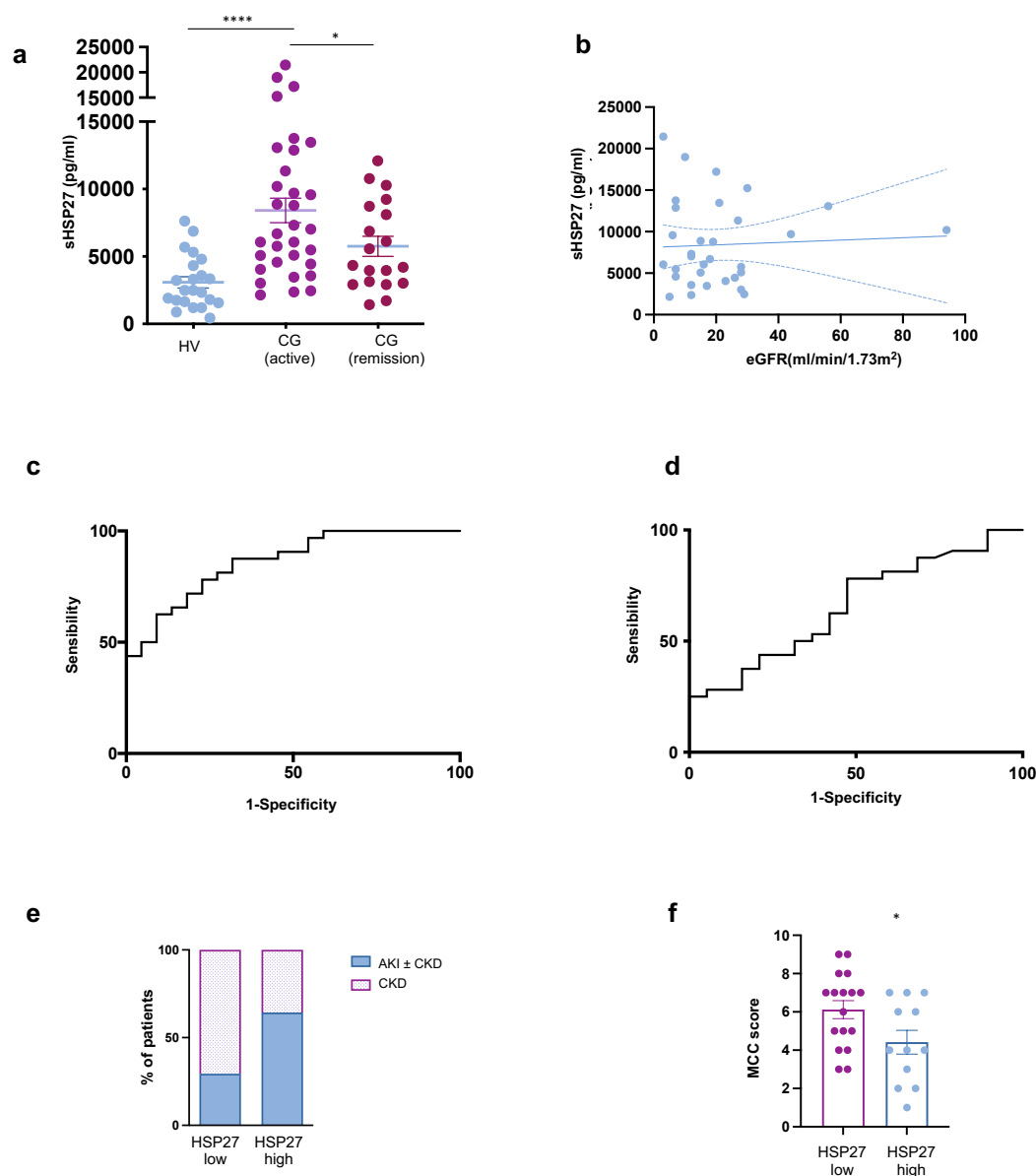


Figure 3. Circulating HSP27 is a biomarker of crescentic glomerulonephritis activity. **a.** Serum HSP27 concentration (pg/ml) in Healthy volunteers (HV) : 3085pg/ml [\pm 1965] (n=22) ;in CG group with active disease patients (CG active) : 8415pg/ml [\pm 5108] (n= 32) and remission patients (CG remission) : 5760pg/ml [\pm 3251] (n = 19). Values in mean \pm s.e.m. One way ANOVA test followed by a Dunnett's multiple comparisons test: ****p<0.0001 CG (active) versus HV ; *p<0.05 CG (active) versus CG (remission) . **b.** Analysis of correlation of baseline serum HSP27 (pg/ml) and baseline estimated kidney function (eGFR, ml/min/1.73m²). ROC curve of HSP27s **c.** for discrimination between crescentic glomerulonephritis (active) and HV. AUC (\pm s.e.m) = 0.85 (\pm 0.05) and **d.** for discrimination between crescentic glomerulonephritis (active) and crescentic glomerulonephritis in remission . AUC(\pm s.e.m) = 0.65 (\pm 0.07) **e.** Proportion of patients with acute kidney injury (AKI) according to KDIGO definition, at diagnosis for patients with active CG with low HSP27s (<8000pg/ml) or high HSP27s (>8000pg/ml). Chi-square test. p = 0.052. **f.** Mayo Clinic chronicity score in patients with with active CG with low or high HSP27s. Values in mean \pm s.e.m. t-test. * p<0.05 HSP27 high group versus HSP27 low group

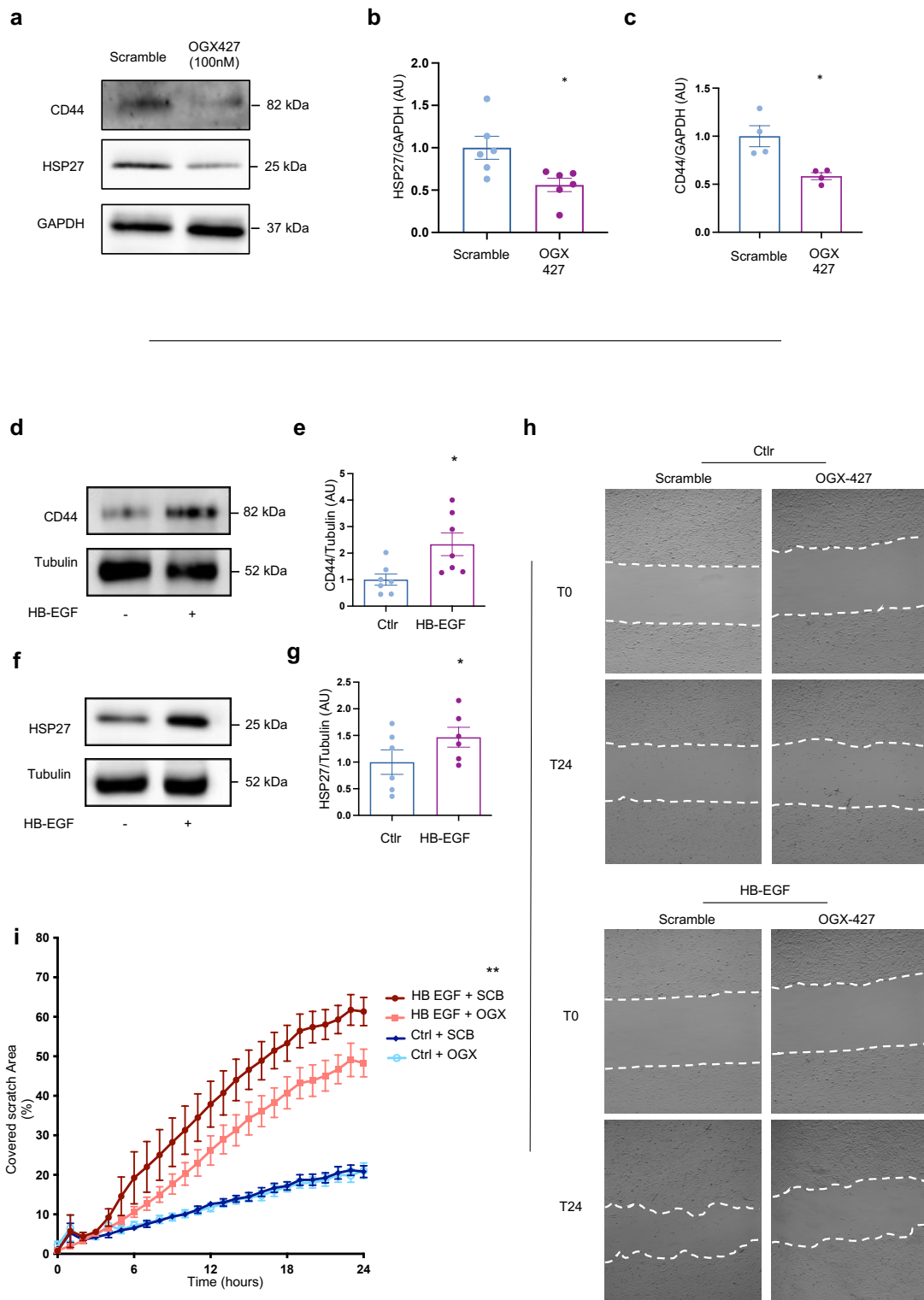


Figure 4. HSP27 contribute to PEC activation and to migration *in vitro*.

Figure 4. HSP27 contribute to PEC activation and to migration *in vitro*. **a.** Representative western blotting of CD44 and HSP27 expression in PEC transfected with scramble or OGX-427 (100nM). Quantification of **b.** HSP27 expression (n=6) and **c.** CD44 expression (n=4) in PEC after scramble or OGX-427 exposure. Value are mean (\pm s.e.m) and normalized on GAPDH . **d.** Representative western blotting of CD44 expression in PEC after HB-EGF exposure (50ng/ml). **e.** Quantification of CD44 expression in PEC after HB-EGF exposure. Value are mean (\pm s.e.m)and normalized on tubulin ; n = 7. **f** Representative western blotting of HSP27 expression in PEC after HB-EGF exposure (50ng/ml). **g.** Quantification of HSP27 expression in PEC after HB-EGF exposure. Value are mean (\pm s.e.m)and normalized on tubulin ; n = 6. Mann-Withney analysis, *p-value <0.05 **h.** Representative phase contrast images of wound healing assay of PEC exposed with scramble or OGX-427, without (Ctrl) and with HB-EGF exposure (HB-EGF, 10ng/ml) at time zero and time 24h. **i.** Evolution of scratch area from time zero to 24 hours in 4 groups : control with scramble (Ctrl + SCB) or OGX-427 (Ctrl + OGX) and HB-EGF exposure with scramble (HB EGF + SCB) or OGX-427 (HB EGF + OGX). Values are mean (\pm s.e.m) n = 4 per conditions. 2-way ANOVA test **p<0.01 HB EGF + OGX versus HB EGF + SCB.

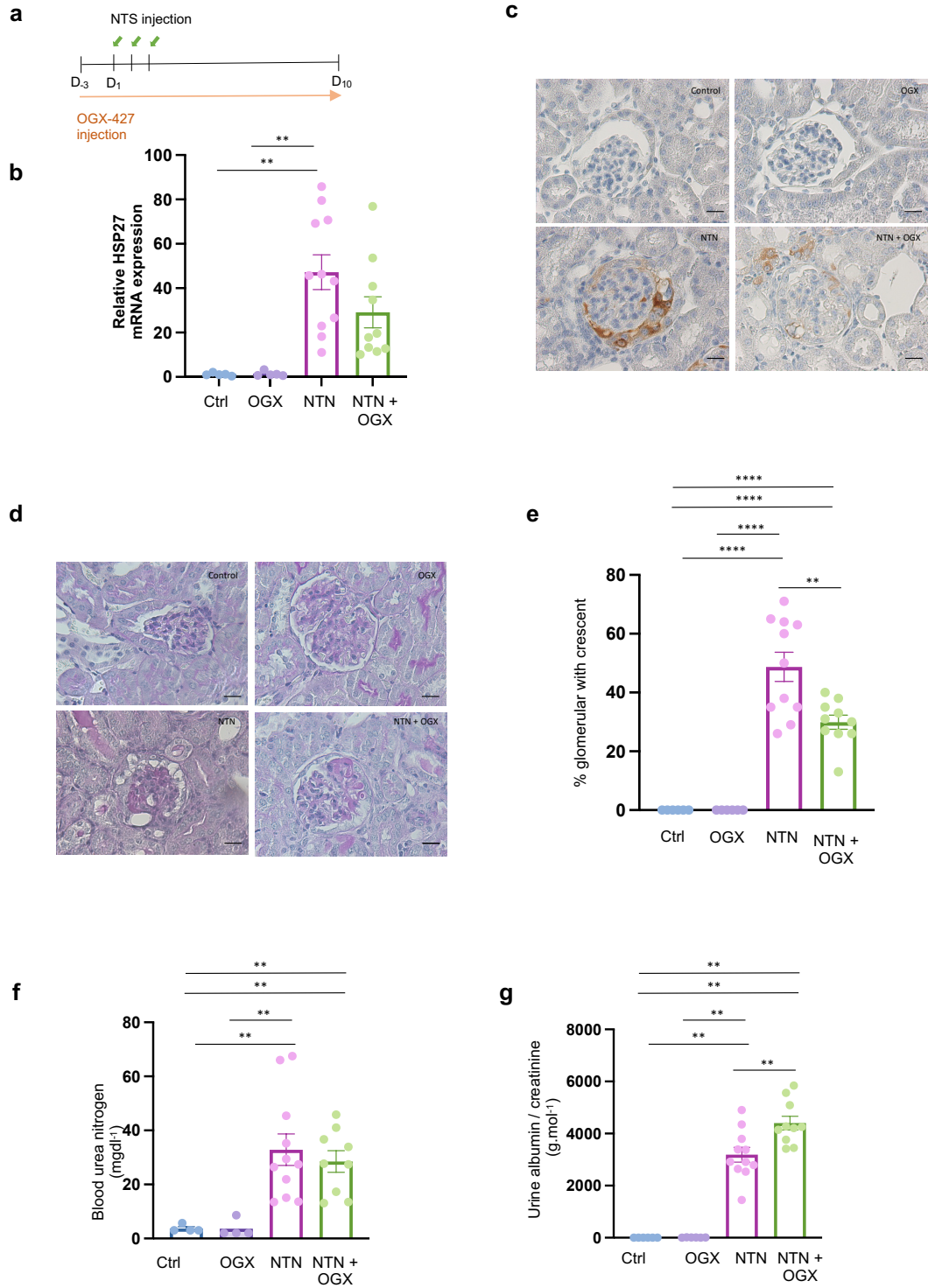


Figure 5. Silencing HSP27 RNA in NTN mice model attenuates crescentic lesions.

Figure 5. Silencing HSP27 RNA in NTN mice model attenuates crescentic lesions. **a.** Procedure design of HSP27 inhibition by OGX-427 in nephrotoxic serum nephritis. **b.** HSP27 mRNA expression by RT-qPCR in renal cortex lysat, relative to GAPDH from control mice (Ctrl, n =6), normal mice treated by OGX-427 (OGX, n=6), NTN-induced mice (n=11) and NTN-induced mice treated by OGX-427 (N/O, n =10) at day 10. Values are means \pm s.e.m. One-way ANOVA test followed by a Tukey's multiple comparison test. **c.** Representatives images of HSP27 expression in glomeruli by immunohistochemistry in normal mice (control), normal mice treated by OGX-427 (OGX), NTN induced mice (NTN) and NTN induced mice treated by OGX-427 (NTN + OGX) at day 10; scale bar 40 μ m. **d** Representatives PAS stained images with normal glomerulus from control and OGX-427 treated mice, with crescentic lesions in NTN induced mice and less crescent formation in NTN induced mice with OGX-427 treatment at day 10. **e.** Proportion of crescent lesions expressed in percentage in those groups. Values are means \pm s.e.m. One-way ANOVA test followed by a Tukey's multiple comparison test. **f.** blood urea nitrogen and **g.** albuminuria in the different groups previously describe at day 10. Values are means \pm s.e.m. One-way ANOVA test followed by a Tukey's multiple comparison test.

* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

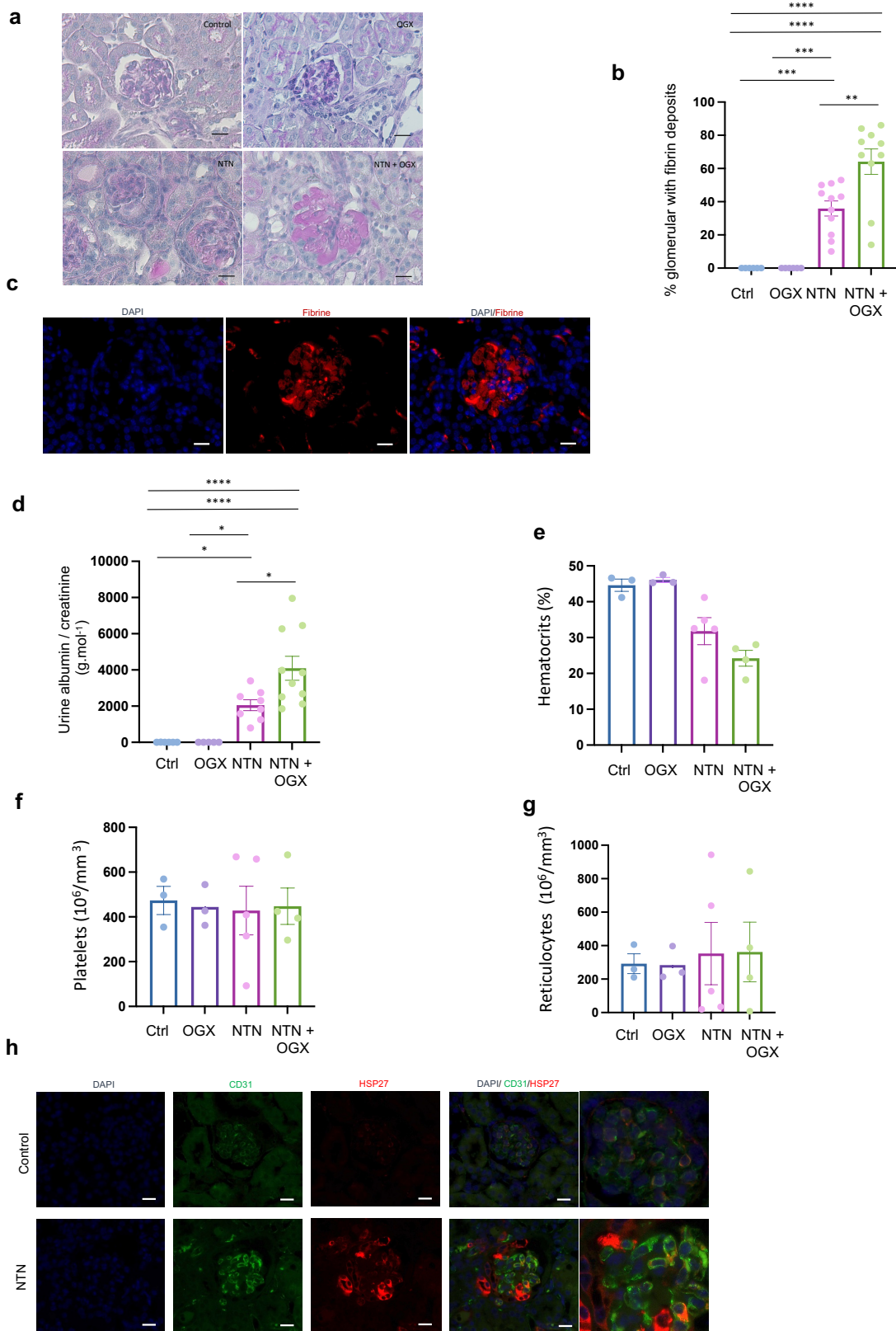


Figure 6. Silencing HSP25 RNA increase glomerular thrombotic microangiopathy injuries in NTN mouse model.

Figure 6. Silencing HSP27 RNA increase glomerular thrombotic microangiopathy injuries in NTN mouse model **a.** Representatives Periodic Acid Schiff stained images with normal glomerulus from control and OGX-427 treated mice, pathological glomeruli crescent in NTN-induced mice and with intracapillary thrombi in NTN induced mice with OGX-427 treatment at day 10. Scale bar = 20µm. **b.** Proportion of glomeruli with intracapillary fibrin depositions. count in control mice (Ctrl, n =6), normal mice treated by OGX-427 (OGX, n=6), NTN-induced mice (n=11) and NTN-induced mice treated by OGX-427 (NTN + OGX, n =10) at day 10. Values are means ± s.e.m and expressed in percentages of affected glomeruli. One-way ANOVA test followed by a Tukey's multiple comparison test. **c.** Representative image of intracapillary fibrin deposit by immunofluorescence in NTN with OGX-427 treated mice at day 10. Scale bar = 20µm. **d.** Albuminuria at day 5 in count in control mice (Ctrl, n =6), normal mice treated by OGX-427 (OGX, n=6), NTN-induced mice (n=8) and NTN-induced mice treated by OGX-427 (NTN + OGX, n =9) Values are means ± s.e.m.. One-way ANOVA test followed by a Tukey's multiple comparison test. Measure of **e.** haematocrits. **f.** Platelet count and **g.** reticulocytes count in control mice (Ctrl, n =3), normal mice treated by OGX-427 (OGX, n=3), NTN-induced mice (n=5) and NTN-induced mice treated by OGX-427 (N/O, n =4) at day 10. Values are means ± s.e.m. Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test. **h.** Representative images of glomerular expression of CD31(Endothelial cell marker) and HSP27 evaluated by immunofluorescence in control and NTN mice at day 10. Scale bar 20µm.
 * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

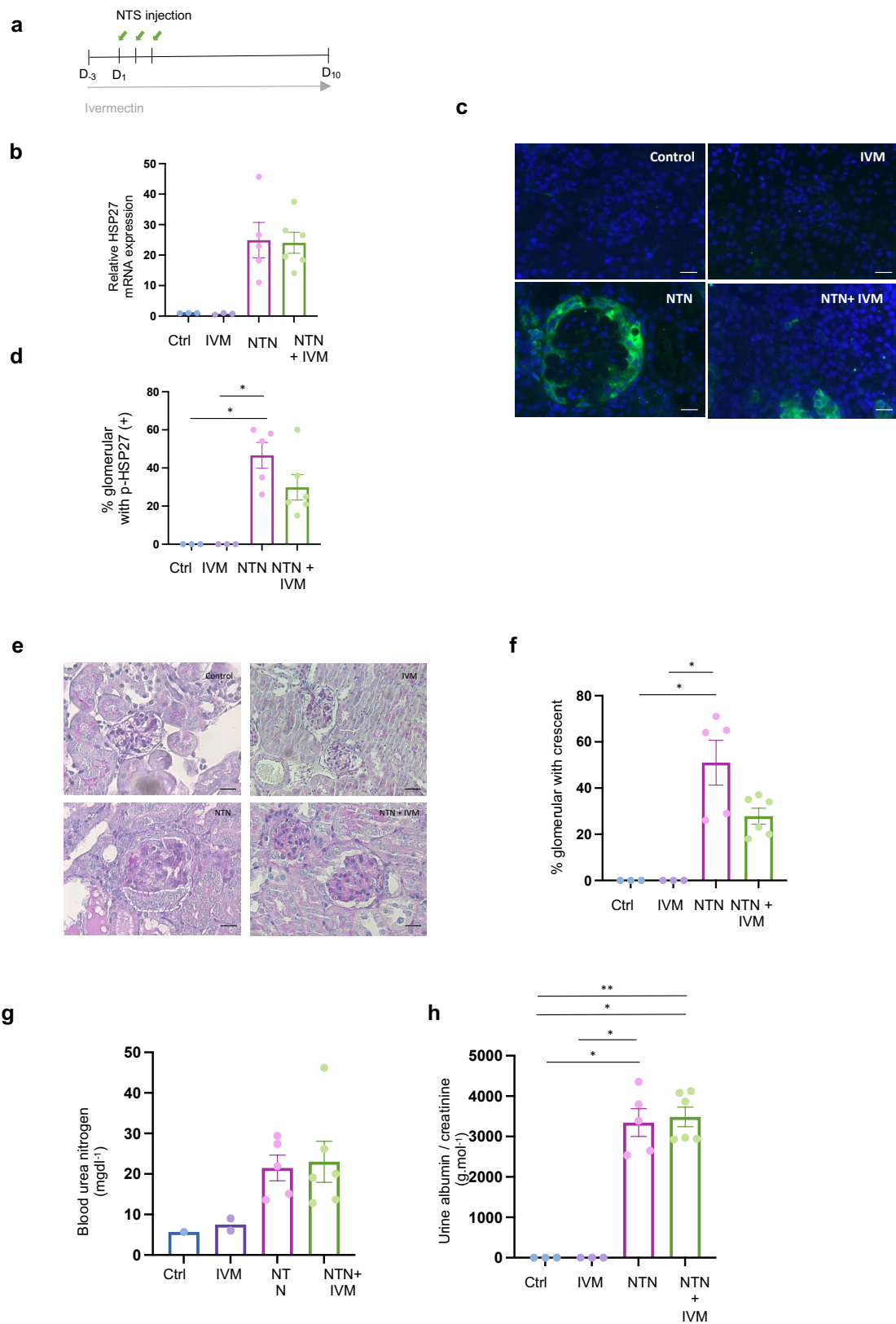


Figure 7 . Using Ivermectin attenuates crescentic lesions in a mouse model of crescentic glomerulonephritis.

Figure 7 . Using Ivermectin attenuates crescentic lesions in a mouse model of crescentic glomerulonephritis **a.** Procedure design of ivermectin in nephrotoxic serum nephritis. **b.** HSP27 mRNA expression by RT-qPCR in renal cortex lysat, relative to GAPDH from control mice (Ctrl, n =3), normal mice treated by ivermectin (IVM, n=3), NTN-induced mice (n=5) and NTN-induced mice treated by ivermectin (NTN + IVM, n =6) at day 10. Values are means \pm s.e.m. Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test. **c.** Representatives images of p-HSP27 expression in glomeruli by immunofluorescence in normal mice (control), normal mice treated by Ivermectin (IVM), NTN induced mice and NTN induced mice treated by Ivermectin (NTN + IVM) at day 10; scale bar 40 μ m. **d.** Proportion of glomeruli expressing p-HSP27 expressed in percentage and **e.** Representatives PAS stained images with normal glomerulus from control and ivermectin treated mice, with crescentic lesions in NTN induced mice and less crescent formation in NTN induced mice with ivermectin treatment. **f.** Proportion of crescent lesions. Values are means \pm s.e.m. . Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test. **g.** blood urea nitrogen and **h.** albuminuria in the different groups previously describe. Values are means \pm s.e.m. Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test.

* p<0.05, ** p<0.01

SUPPLEMENTARY MATERIALS

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table of content

Supplementary Table 1. Clinical data of patients from non-crescentic <glomerulonephritis (control) and crescentic glomerulonephritis (CG)

Supplementary Table 2. Baseline data of patients with active CG at diagnosis between those with high level of HSP27s (>8000pg/ml) (n=14) and low level (<8000pg/ml) (n=18).

Supplementary Figure 1. Expression of HSP27 in normal kidney and focal and segmental glomerulosclerosis.

Supplementary Figure 2. Expression of p-HSP27 in crescentic glomerulonephritis.

Supplementary Figure 3. HSP27 contribute to PEC activation and to migration *in vitro*.

Supplementary Figure 4. HSP27 contribute to endothelial cell homeostasis *in vitro*.

Supplementary Figure 5. Ivermectin inhibits PEC activation and migration *in vitro*.

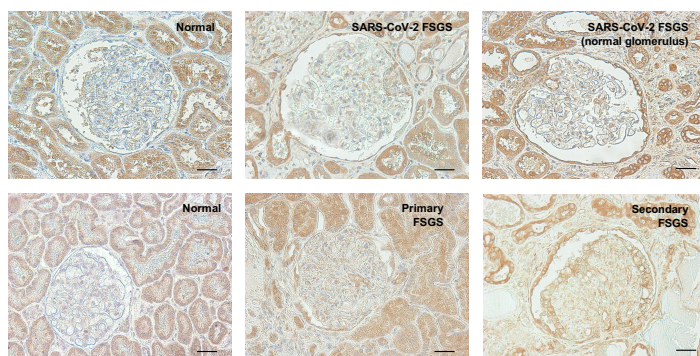
Supplementary Table 1. Clinical data of patients with histological analyse from non crescentic glomerulonephritis (control) and crescentic glomerulonephritis (CG)

Group	Diagnosis	Age	Gender	Proteinuria (g/g of creatinuria)	Creatinine ($\mu\text{mol/l}$)
Control	IgA nephropathy	37	M	2,73	102
Control	IgA nephropathy	66	M	1	218
Control	IgA nephropathy	60	F	0,2	45
Control	IgA nephropathy	40	M	1,2	68
Control	IgA nephropathy	24	M	1,3	78
Control	IgA nephropathy	63	M	210	90
Control	IgA nephropathy	37	M	208	186
Control	Lupus MN	27	M	3,1	76
Control	Primitive MN	45	F	1	44
Control	Secondary MN	67	M	6,5	56
Control	Secondary MN	62	M	1	142
Control	Primitive MN	60	M	2,97	140
CG	Anti-GBM antibody disease	63	H	10	635
CG	AAV- microscopic polyangiitis	73	H	2,42	397
CG	AAV- microscopic polyangiitis	79	F	1,2	230
CG	C3-crescentic glomerulonephritis	65	F	3,15	450
CG	AAV- granulomatosis with polyangiitis	41	H	0,4	100
CG	AAV- microscopic polyangiitis	44	F	5	900
CG	AAV- microscopic polyangiitis	69	H	1,8	207
CG	AAV- microscopic polyangiitis	83	H	1,74	1000
CG	AAV- microscopic polyangiitis	45	F	4	291
CG	Anti-GBM antibody disease	53	H	2,81	1817
CG	AAV- microscopic polyangiitis	74	H	1,3	214
CG	AAV- microscopic polyangiitis	67	H	2,35	1083
CG	AAV- microscopic polyangiitis	56	H	0,9	211

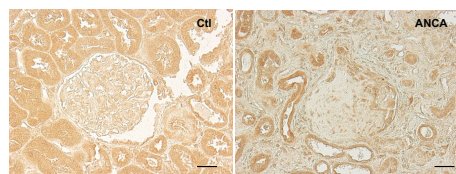
Supplementary Table 2. Baseline data of patients with active CG at diagnosis (n=32) between those with high level of HSP27s (>8000pg/ml) (n=14) and low level (<8000pg/ml) (n=18).

	All (n=32)	HSP27s high (n=14)	HSP27s low (n=18)
Epidemiologic data			
Age, median (IQR)	64 (17.3)	58 (15.1)	67 (18.4)
Male, n (%)	18 (56.25)	8 (57)	10 (55.6)
Diagnosis			
Anti-GBM antibody disease, n (%)	4 (12.5)	1 (7.1)	3 (16.7)
AAV - microscopic polyangiitis, n (%)	20 (62.5)	9 (64.3)	11 (61.1)
AAV - granulomatosis with polyangiitis, n (%)	8 (25)	4 (28.6)	4 (22.2)
Date of diagnosis			
Before 2017	20 (62.5)	9 (64.3)	11 (61.1)
After 2017	12 (37.5)	5 (35.7)	7 (38.9)
First episode, n(%)	25 (78.1)	11 (78.6)	14 (77.7)
Baseline characteristics			
Proteinuria	2 (2.27)	1 (2.5)	2 (1.63)
eGFR(ml/min/1.73m ²), median (IQR)	17 (18)	21 (35)	14 (11.25)
AKI, n (%)	14 (43.75)	9 (64.3) [#]	5 (29.4) [#]
Hemodialysis, n (%)	8 (25)	3 (21.4)	5 (27.8)
BVAS score, median (IQR)	18 (5.25)	16(7)	18 (4)
HSP27s, median (IQR)	6860 (7176)	12985 (5032.75)	4830 (2491.25)
Histological score			
Berden classification, n	29	12	17
Focal, n (%)	3 (10.3)	2 (16.7)	1 (5.9)
Crescent, n (%)	5 (17.2)	3 (25)	2 (11.8)
Mixed, n (%)	14 (48.3)	5 (41.6)	9 (52.9)
Sclerotic, n (%)	7 (24.1)	2 (16.7)	5 (29.4)
ARRV, median (IQR)	6 (3)	6 (7)	9 (4.5)
MCC score, median (IQR)	8 (6.5)	4 (4) [*]	7 (3) [*]
Treatment			
Corticosteroid, n (%)	31 (96.9)	14 (100)	17 (94.4)
Immunosuppressive therapy			
Cyclophosphamide, n (%)	18 (56.25)	7 (50)	11 (61.1)
Rituximab, n (%)	11 (34.4)	6 (42.8)	5 (27.8)
Plasma exchange, n (%)	7 (21.9)	6 (42.9) [*]	1 (5.6) [*]

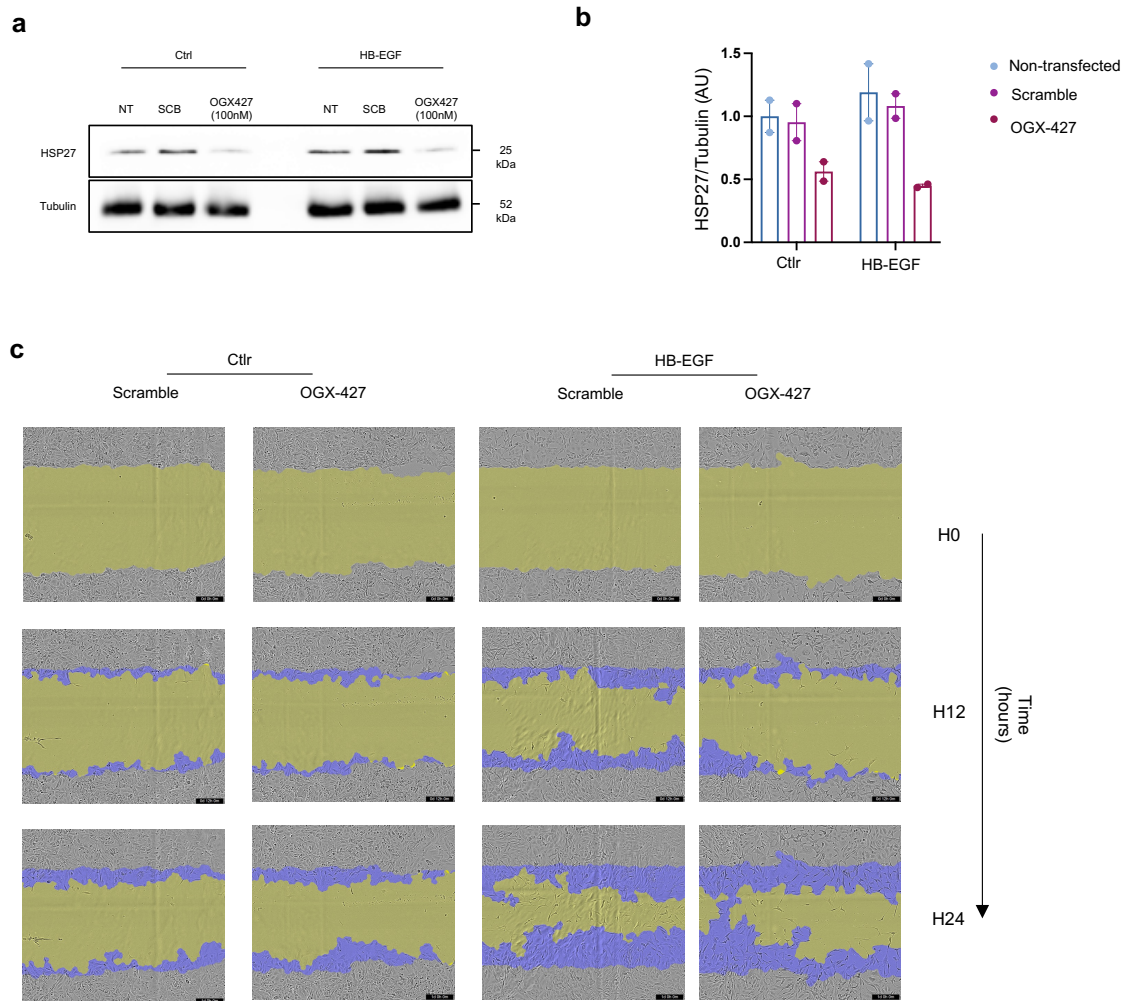
GBM : Glomerular Basement Membrane, AAV : ANCA-Associated vasculitis, eGFR : estimated glomerular filtration rate, BVAS : Birmingham vasculitis activity score, MCC : Mayo Clinic chronicity score
Chi-square test and t-test for respectively qualitative and quantitative values. # p=0.052 ; * p<0.05.



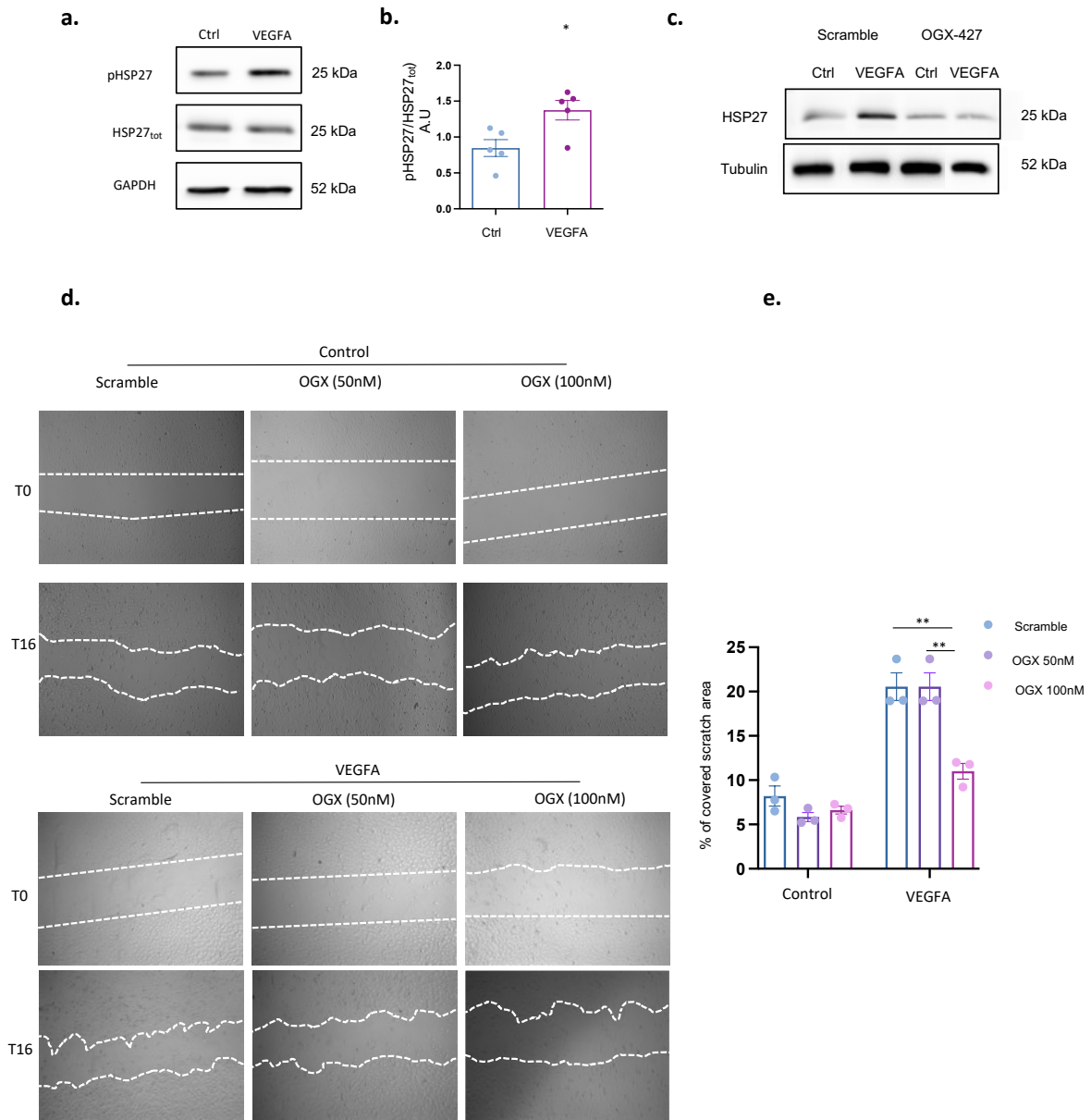
Supplementary Figure 1. Expression of HSP27 in normal kidney and in focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS). Immunohistochemistry of HSP27 expression in glomeruli in human: Representative panel of glomeruli from normal kidney and from primary FSGS , COVID-19 associated with FSGS (in a lesion and normal glomerulus) and in secondary FSGS. Scale bar 40 μ m.



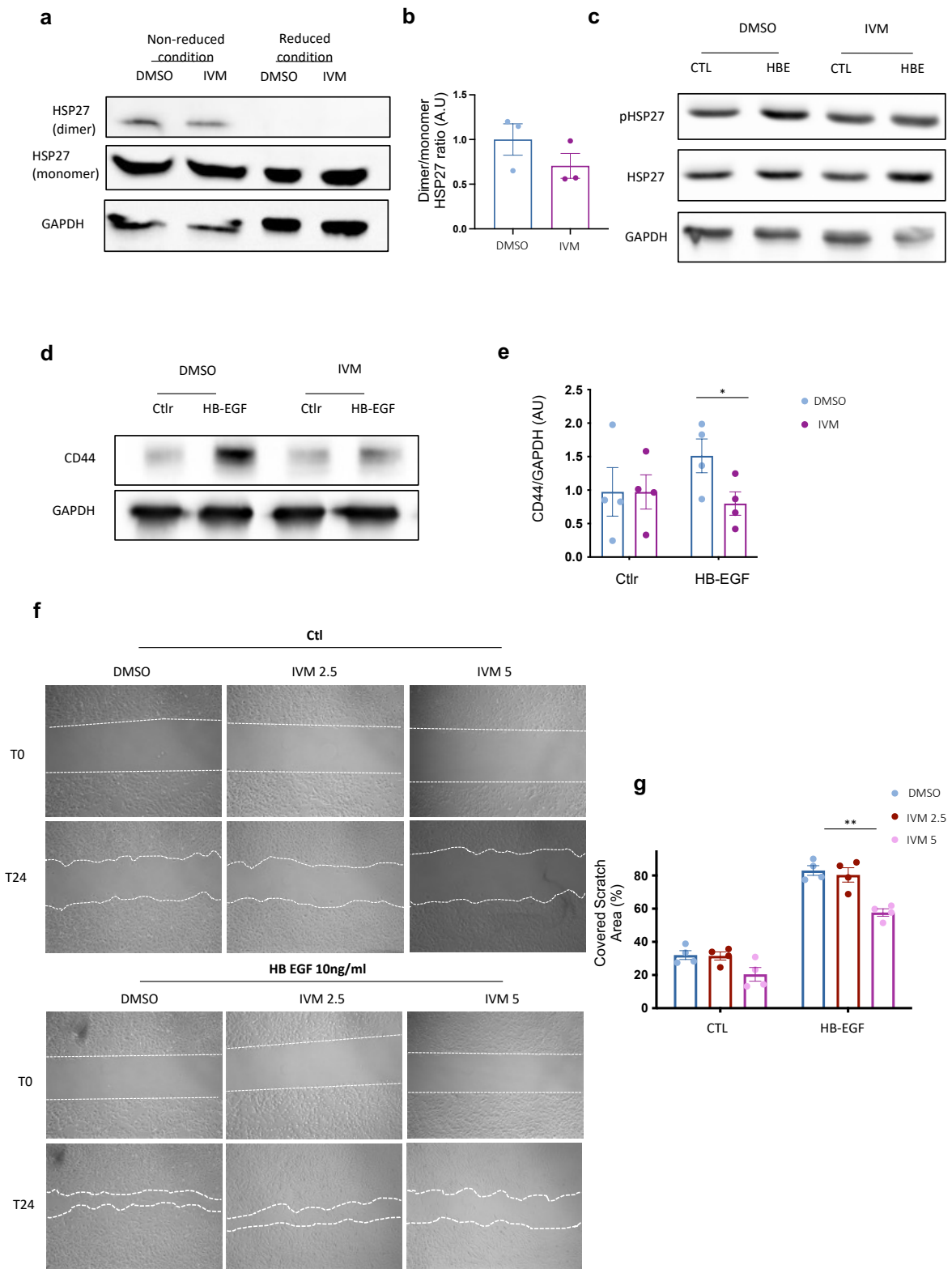
Supplementary Figure 2. Expression of phospho-HSP27 in crescentic glomerulonephritis. Immunohistochemistry of phosphorylated HSP27 (S82) expression in glomeruli in human: Representative panel of glomeruli from normal kidney and crescentic glomerulonephritis Scale bar 40 μ m.



Supplementary Figure 3. HSP27 contribute to PEC activation and to migration *in vitro* **a.** Representative western blotting of HSP27 expression in PEC non transfected (NT), with scramble or OGX-427 (100nM) in control PEC (Ctrl) and after HB-EGF exposure **b.** Quantification of HSP27 expression in PEC with scramble or OGX-427 (100nM) in control PEC (Ctrl. Value are mean (\pm s.e.m) and normalized on GAPDH **c.** Representative images of wound healing assay every 6h using Incucyte migration assay of PEC exposed with scramble or OGX-427 without (Ctrl) and with HB-EGF exposure (HB-EGF) at time zero to time 24h



Supplementary Figure 4. HSP27 contribute to endothelial cell homeostasis *in vitro*. **a.** Representative western blotting of pHSP27 expression (upper panel), HSP27 (middle panel) and GAPDH (lower panel) after VEGFA exposure (50ng/ml) at 15 minutes. **b.** Quantification of pHSP27 normalized on HSP27 after VEGFA exposure in HUVEC ; Value are mean (± s.e.m); n = 5. Mann-Whitney test. * p<0.05 versus control. **c.** Representative western blotting of HSP27 expression in HUVEC with scramble or OGX-427 (100nM) and with or without VEGFA exposure. **d.** Representative phase contrast images of wound healing assay of HUVEC exposed with scramble or OGX-427 with or without VEGFA exposure at time zero and time 16h. **e.** Quantification of covered scratch area at time 16h (expressed in percentage of initial scratch area) of HUVEC exposed with scramble, OGX-427 50nM and OGX-427 100nM with or without VEGFA exposure. Values are mean (± s.e.m) n = 3 per conditions. Two-way ANOVA test with Sidak multiple comparison test. ** p<0.01 OGX-427 100nM versus Scramble and versus OGX 50nM



Supplementary Figure 5. Ivermectin inhibits PEC activation and migration *in vitro*.

Supplementary Figure 5. Ivermectin inhibits PEC activation and migration *in vitro*. **a.** Representative western blotting of HSP27 dimers expression and total HSP27 (monomers after reduced condition) **b.** Quantification of HSP27 dimers expression on total HSP27 (monomers after reduced condition) ; n=3 **c.** Representative western blotting of phospho-HSP27 (S85) and HSP27 expression in PEC culture with and without HB-EGF on DMSO or ivermectin **d.** Representative western blotting of CD44 expression in PEC after HB-EGF exposure (30ng/ml). **e.** Quantification of CD44 expression in PEC after HB-EGF exposure with or without ivermectin. Value are mean (\pm s.e.m) and normalized on tubulin ; n = 7. **f.** Representative phase contrast images of wound healing assay of PEC exposed with DMSO or Ivermectin (2.5mM or 5mM) without (Ctrl) and with HB-EGF exposure (HB-EGF) at time zero and time 24h. **g.** Quantification of covered scratch area at time 24h between six groups : control with DMSO or Ivermectin (2,5mM or 5mM) , and HB-EGF exposure with DMSO or Ivermectin (2,5mM or 5mM). Values are mean (\pm s.e.m) n = 4 per condition. Two-way ANOVA test with Sidak multiple comparison test. ** p<0.01 IVM 5nM versus DMSO

DISCUSSION

1 Surexpression d'HSP27 dans les pathologies impliquant les PEC activées

Au cours de ces travaux, nous avons montré chez l'homme une surexpression d'HSP27 au sein des croissants extracapillaires et notamment au sein des PEC activées (comarquage CD44+ / HSP27 +). De plus, alors que dans les glomérulopathies sans atteinte extracapillaire, un faible pourcentage de glomérules exprimait HSP27 au niveau de la capsule de Bowman (27%), chez les patients atteints de GEC, près d'un glomérule optiquement normal sur deux exprimait HSP27. Cela suggère une expression d'HSP27 à un stade antérieur à la migration et à la prolifération des PEC. L'expression d'HSP27 pourrait donc précéder le développement des lésions chez l'homme. Par ailleurs, nous avons observé de manière similaire une surexpression d'HSP27 au sein des lésions de hyalinose segmentaire et focale chez l'homme, qui partagent des mécanismes physiopathologiques communs avec les GEC.

HSP27 est une protéine ubiquitaire, mais son expression rénale chez le sujet sain semble minimale au niveau glomérulaire³⁶². Dans le modèle murin NTS, nous avons montré une expression minimale au sein du cortex rénal (analyse de l'ARNm) chez les contrôles. Cependant, après induction dans le modèle NTS, une nette induction de l'ARNm d'HSPB1 était observée, avec une expression majoritairement glomérulaire en immunohistochimie au sein des croissants et très peu au niveau tubulaire. Ainsi, même si dans d'autres études, on observe une expression tubulaire d'HSP27 au cours de multiples modèles pathologiques avec agression tubulaire³⁶⁷⁻³⁷⁰, au cours de nos expérimentations, nous observons une expression essentiellement glomérulaire.

Enfin, à l'instar de nombreuses études montrant la convergence des mécanismes lésionnels au cours des HSF et de GEC, nous avons observé au cours de données préliminaires, l'expression d'HSP27 dans les lésions d'HSF dans le modèle doxorubicine (données non montrées).

2 HSP27 : un élément commun en aval de différentes voies d'activation des PEC ?

HSP27 est une protéine de réponse aux stress et aux agressions multiples^{319,331,332,335,336}. Son induction peut se faire par l'augmentation du transcrite et de sa forme totale^{301,340} ou encore par la régulation de sa structure quaternaire et de sa phosphorylation^{257,286}.

Dans notre modèle *in vitro* les PEC sont spontanément activées (milieu de culture standard/enrichi, avec expression spontanée de CD44, cellules en prolifération) et expriment constitutivement HSP27. De plus, l'exposition de ces cellules (en milieu pauvre en sérum) à de l'HB-EGF permet aussi d'induire l'expression d'HSP27 à 24h. De même, l'activation de l'EGFR est associée à une augmentation de l'expression d'HSP27 dans des modèles *in vitro* de cancer épithéliaux (prostate, poumon)^{286,323}.

L'HB-EGF a été utilisé comme inducteur d'activation des PEC compte tenu de l'impact de ce facteur de croissance dans le modèle de NTS¹⁶. Néanmoins, d'autres inducteurs potentiels d'HSP27 au sein des PEC pourraient également être étudiés.

La voie PDGF-BB/PDGFR-beta est impliquée dans les mécanismes de prolifération et de migration des PEC²³. La migration et la prolifération des PEC sous PDGF-BB serait médiée notamment par le CD9. De même, l'utilisation de l'Imatinib, un inhibiteur du PDGFR, dans le modèle NTS a été associée à une diminution des lésions extracapillaires^{217,218}. De façon intéressante, au sein des ostéoblastes, il a été démontré que le PDGF-BB stimule la phosphorylation d'HSP27³⁷⁴. D'autres études montrent que l'activation du PDGFR induit la phosphorylation de p38, une kinase majeure pour la phosphorylation de HSP27³⁷⁵. A l'inverse l'inhibition du PDGFR (dans un modèle murin d'hémorragie cérébrale) était associée à une diminution de la phosphorylation de p38 tout comme de MK2, toutes deux impliquées dans la phosphorylation d'HSP27^{257,280}. Ainsi, une induction d'HSP27 et de sa phosphorylation pourrait survenir en aval de la voie PDGF-BB/PDGR-beta au sein de la PEC.

Une récente étude a montré que la diminution de l'expression de KLF-4 dans le podocyte induisait une sécrétion d'IL-6. Les PEC exposées à ce surnageant surexprimaient CD44 suggérant une possible activation de ces cellules par l'IL-6²⁰⁰. Or l'IL-6 pourrait induire dans

des modèles cellulaires de cancer une augmentation de l'expression d'HSP27 (transcrit et protéique)³²¹.

Ainsi, que ce soit sous sa forme totale ou sa forme phosphorylée, l'induction d'HSP27 semble pouvoir s'intégrer à ce jour dans les différentes voies de signalisation impliquées dans l'activation des PEC (IL6 STAT3, PDGFR/PDGFR)^{23,200}, et pourrait donc représenter un élément central de l'activation des PEC.

Comme nous l'avons vu, la PEC est une cellule dont l'activation au cours des GEC va se manifester par des mécanismes de prolifération, de différenciation ou encore de migration cellulaire^{19,20,23,163}. De façon interpellante, HSP27 est également impliquée à différents niveaux au cours de ces processus.

3 Rôle d'HSP27 dans l'homéostasie de la PEC

3.1 HSP27 et activation de la PEC

Modulation de CD44

In vitro, la PEC est spontanément activée avec expression constitutive de CD44 dans notre modèle. De même, dans une culture de PEC humaines, Eymael *et al.* ont montré que les PEC présentaient également un phénotype activé (CD44 +)²⁰. De façon similaire, la mise en culture de PEC issues de croissants par Kuppe *et al.* montraient une expression spontanée de CD44¹⁸. Ainsi, la culture de PEC, correspond donc à un modèle de cellules activées et proliférant pouvant s'apparenter à un « modèle *in vitro* de croissants ».

Dans notre étude, on observe *in vitro* une inhibition de l'expression de CD44 en western blot sous OGX-427 suggérant qu'HSP27 est impliquée dans l'activation de ces cellules. Il n'existe pas à ce jour de données dans la littérature quant à l'implication directe d'HSP27 sur la voie de CD44. Des expérimentations d'immunoprécipitation permettraient d'évaluer si HSP27 interagit directement avec cette protéine pour la stabiliser ou si son action sur l'expression de CD44 est médiée indirectement. Dans ce but, l'utilisation d'une méthode d'inactivation par shRNA offrant une inhibition pérenne d'HSP27 permettrait d'étudier l'effet sur CD44 de l'inhibition d'HSP27, après activation des PEC par la voie de l'EGFR.

Modulation de la voie de l'EGFR

De façon intéressante, Nappi *et al.* ont montré *in vitro* et dans des modèles tumoraux que HSP27 stabilisait p-EGFR à travers l'inhibition d'une des phosphatases SHPTP1^{286,376}. Il serait donc intéressant de confirmer ces données dans la PEC lors de son activation.

Cependant, outre la stabilisation de sa forme phosphorylée par l'inhibition de SHPTP1, il pourrait exister d'autres mécanismes, à travers lesquels HSP27 potentialiserait l'action de l'EGFR. Un effet sur le trafficking de l'EGFR pourrait ainsi être suggéré. Ce mécanisme est essentiel à l'activation de l'EGFR. Yamine *et al.* ont montré que la lipocaline 2, petite molécule de transport de fer, pourrait interagir directement avec l'EGFR et moduler son trafficking³⁷⁷. Compte tenu de l'activité chaperon d'HSP27, un rôle similaire pourrait être évoqué. Ainsi, avec des premières expérimentations avec inhibition de HSP27 par sh-RNA, nous pourrions étudier une possible expression différentielle de l'EGFR au niveau de la membrane cellulaire. De plus, l'étude de l'accumulation de l'EGFR au sein des lysosomes pourraient nous orienter vers un phénomène de modulation du recyclage ou de la dégradation de l'EGFR par HSP27³⁷⁷. Cependant le trafficking de l'EGFR est dépendant de ses ligands : il existe un recyclage plus important pour le TGF alpha que l'EGF³⁷⁷. Dans leur étude, Roepstorff *et al.*, ont montré que l'HB-EGF était un des ligands les plus affins avec l'EGFR menant rapidement à son internalisation et sa dégradation comparée au TGF-alpha et l'EGF. Ainsi, le complexe HB-EGF/EGFR semble moins sujet au mécanisme de recyclage³⁷⁸.

3.2 HSP27 et migration

La migration cellulaire est un phénomène majeur dans les processus pathologiques de la PEC^{18,19,23}. Nous avons montré qu'HSP27 promouvait la migration des PEC *in vitro*. En effet, l'inhibition d'HSP27 par l'OGX-427 ou de sa fonction par IVM diminuait significativement la migration des PEC. Cet effet sur la migration a également été démontré dans d'autres modèles cellulaires, tels que les cellules de cancer de prostate, exprimant constitutivement l'EGFR ou encore les fibroblastes^{286,301}.

L'action d'HSP27 sur la migration pourrait impliquer sa régulation du cytosquelette d'actines et son rôle au niveau des molécules d'adhésion. Dans une étude sur une culture de fibroblastes, Hirano *et al.* montraient que les fibroblastes surexprimant HSP27 avait une plus grande élévation et étaient bipolarisés. On observait de plus une baisse de l'adhérence

cellulaire. Par ailleurs, le rôle d'HSP27 dans la régulation et la dynamique du cytosquelette d'actine est largement étayé. *In vitro*, la surexpression d'HSP27 augmente la quantité de F-actine au niveau du cortex cellulaire, ce qui entraîne la migration cellulaire et l'accumulation de fibres de stress³⁷⁹⁻³⁸². A l'inverse, l'inhibition d'HSP27 entraîne une désorganisation du cytosquelette d'actine^{381,383}. Enfin, le rôle d'HSP27 dans l'adhérence cellulaire pourrait impliquer également la régulation de la beta1 intégrine. L'expression d'HSP27 est associée à l'expression de la beta1 intégrine, favorisant la migration de cellules MDPC-23 (cellules de la papille dentaire), l'inhibition de cette intégrine entraînant une diminution de la migration induite par HSP27³⁸⁴. Ainsi, afin d'étudier le rôle d'HSP27 sur la migration cellulaire, un effet sur le cytosquelette d'actine ou l'expression d'intégrine beta 1 pourra être recherché dans les PEC activées après inhibition d'HSP27 à l'image des résultats observés par Lazareth *et al.* quant à la diminution de l'expression de l'intégrine beta 1 dans les PEC invalidées pour CD9²³.

Ainsi les rôles d'HSP27 sur les voies étudiées au sein de la PEC et sur la migration sont synthétisés dans la **Figure 13**.

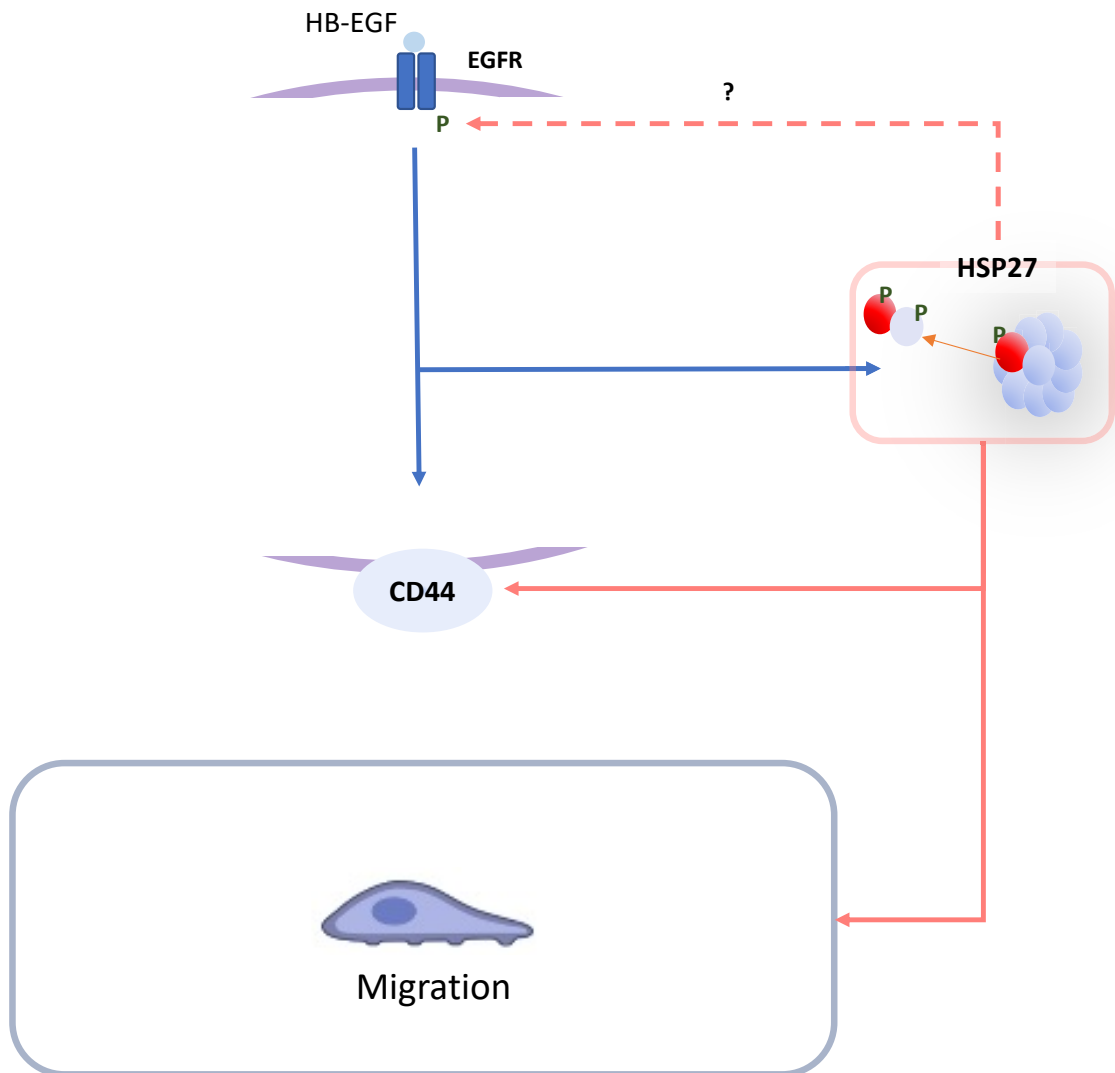


Figure 13. Mécanisme d'action d'HSP27 au sein de la PEC selon les résultats observés au cours de notre étude

L'activation de l'EGFR par l'HB-EGF augmente l'expression d'HSP27 et de CD44 (**Flèche bleue**). HSP27 stimule l'expression de CD44 au sein des PEC. HSP27 stimule la migration des PEC induite par l'HB-EGF (**Flèche rouge pleine**). Cet effet pourrait être lié à sa capacité de stabilisation de l'EGFR activée (**Flèche rouge pointillée**)

3.3 HSP27 et autres mécanismes d'intérêt

Outre l'activation des PEC et leur migration, il existe d'autres modifications phénotypiques ou de voies de signalisation des PEC dans lesquels HSP27 pourrait jouer un rôle expliquant son effet sur la diminution des croissants *in vivo*.

Dédifférenciation cellulaire

Les mécanismes de dédifférenciation cellulaire sont largement observés au cours de l'activation des PEC. Ainsi, au cours des GEC ou des HSF, on observe que les PEC activées expriment des marqueurs de dédifférenciation cellulaire en surexprimant notamment la vimentine ou encore Snail²³.

De façon intéressante, ce phénotype se rapproche de mécanismes de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM correspond au processus au cours duquel les cellules épithéliales vont avoir un changement de phénotype, vers des caractéristiques de cellules mésenchymateuses avec perte de marqueurs épithéliaux, et surexpression de marqueurs mésenchymateux, perte de polarité, et acquisition d'un phénotype migratoire¹⁸⁴. Dans différents modèles *in vitro* de cellules tumorales, l'expression d'HSP27 était associée à la TEM (diminution expression d'E-Cadhérine, surexpression de vimentine)^{326,385}.

Parmi les voies impliquées dans des mécanismes de TEM, celle du TGF beta³⁸⁶, est aussi impliquée au cours des mécanismes de formation des croissants extracapillaires. Le blocage du TGF-beta ou de son récepteur diminue les lésions de croissants dans le modèle NTS^{387,388}, soulignant l'importance de cette voie notamment au sein des PEC qui expriment aussi le TGF-beta¹⁸⁵. D'ailleurs, l'exposition *in vitro* de PEC au TGF beta est associée à l'acquisition de marqueurs de dédifférenciation (inhibition de E-cadhérine, surexpression de vimentine, et Snail) et à un phénotype migratoire²³³. Dans l'étude de Wettstein et al, HSP27 est surexprimé au cours de la fibrose pulmonaire, chez l'homme et dans les cellules mésothéliales *in vitro*. L'inhibition d'HSP27 inhibe la TEM induite par le TGF-beta dans ces cellules (diminution de marqueurs de TEM et inhibition de la migration). De plus, *in vivo* l'utilisation de l'OGX-427 inhibe la fibrose et la migration cellulaire. Le mécanisme d'action d'HSP27 semble impliquer SNAIL en empêchant sa dégradation par le protéasome³⁰¹. Ainsi, l'acquisition de marqueurs de TEM dans les PEC *in vivo* pourrait être dépendante d'HSP27. Le rôle de cette voie de

signalisation dans les PEC lors de l'activation de l'EGFR reste cependant à démontrer, en analysant notamment l'expression de SNAIL dans des PEC invalidées pour HSP27.

Une autre voie impliquée dans les mécanismes de TEM est la voie Notch. Celle-ci est impliquée dans les mécanismes de migration et de dédifférenciation de la PEC après exposition au TGF-beta (surexpression α -smooth muscle (SMA), vimentine et Snail)²³³. De façon intéressante, l'inhibition d'HSP27 par shRNA dans des cultures de cellules de cancer du côlon est associée à une diminution de l'expression de Notch³⁸⁹. La voie de signalisation impliquant Notch par HSP27 au sein des PEC pourrait donc également participer aux mécanismes de TEM des PEC. Par ailleurs, dans une étude de Shiota *et al.*, il a été observé qu'HSP27 modulait la TEM dans cultures cellulaires de cancer de prostate. La transfection d'HSP27 était associée à une augmentation de marqueurs de la TEM et à l'inverse son inhibition à une diminution de ces marqueurs. HSP27 était nécessaire pour la TEM induite par l'IL6. L'inhibition d'HSP27 était de plus associée à une diminution de la phosphorylation de STAT3 induite par l'exposition à l'IL-6, ainsi qu'à une diminution de sa translocation nucléaire. Enfin, l'inhibition d'HSP27 dans le modèle *in vivo* était associée à une diminution des métastases³²¹.

Ainsi, on pourrait évoquer qu'au sein des PEC, la surexpression d'HSP27 médie la phosphorylation de STAT3 promouvant sa translocation nucléaire et un phénotype de TEM.

Ainsi, HSP27 semble jouer un rôle majeur sur diverses voies impliquées dans les phénotypes TEM like. Dans un premier temps, il serait donc intéressant d'étudier dans des PEC invalidées pour HSP27 par shRNA, l'expression de ces marqueurs de dédifférenciation après activation *in vitro*. Une fois validée *in vitro*, la pertinence de ces résultats serait étudiée *in vivo* dans les modèles de GEC et de HSF avec et sans inhibition d'HSP27. Une étude en immunohistochimie des marqueurs de TEM avec comarquage PEC permettrait d'évaluer l'impact de l'inhibition d'HSP27 sur ces marqueurs.

Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire des PEC joue un rôle majeur dans la formation des lésions extracapillaires^{18,19,23,146}. Kim *et al* ont montré que les souris invalidées pour p21 dans un modèle murin de GEC présentaient une majoration des lésions extracapillaires¹⁸⁰. De même,

dans un modèle murin d'HSF, les souris invalidées pour p21 présentaient de plus importantes lésions d'HSF avec une majoration de la prolifération des PEC (Ki67 +)¹⁸¹. D'autre part, HSP27 joue potentiellement un rôle dans la prolifération cellulaire en modulant l'entrée en cycle. HSP27 pourrait inactiver p53 qui régule p21³³⁰. Ainsi il serait intéressant dans un premier temps d'observer dans des PEC invalidées pour HSP27 si la prolifération cellulaire est impactée, par des techniques de marquage au BRDU. Le rôle potentiel de la voie p21 pourrait alors être étudié à travers sa modulation. Nous pourrions étudier *in vitro* le cycle cellulaire en analysant les différents stades présents dans les PEC invalidées pour HSP27 comparées aux PEC contrôles, puis de manière plus large étudier l'expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire en ARNm dont p21, à l'instar de l'étude de Ah Mee Park au sein des cellules cancéreuses³⁹⁰.

4 Implication d'HSP27 dans la formation des lésions extracapillaires *in vivo*

Du fait (i) de l'expression majoritairement au niveau des cellules du croissant observée dans le modèle NTS, et les biopsies humaines et (ii) des données *in vitro* impliquant HSP27 dans l'activation et la migration des PEC, on peut supposer que l'implication pathogène d'HSP27 dans le croissant est médiée par son rôle dans la PEC *in vivo*.

Cependant, HSP27 étant ubiquitaire, son rôle dans les autres populations cellulaires impliquées dans les croissants ne peut être écarté.

Au niveau podocytaire l'implication d'HSP27 dans la stabilisation du cytosquelette ou encore dans son rôle antiapoptotique³⁶³ pourrait avoir un effet protecteur dans le modèle d'agression de la membrane basale glomérulaire qu'est le modèle NTS. Mais à l'inverse, à l'image de l'activation de stat 3 podocytaire^{138,200} la surexpression podocytaire d'HSP27 pourrait avoir un effet délétère en stimulant l'entrée en cycle cellulaire des podocytes. Par exemple, la délétion de KLF4 podocytaire entraîne l'activation de stat3 dans cette cellule, une réentrée du podocyte dans le cycle cellulaire le menant à la catastrophe mitotique et entraînant son apoptose. En effet, même si le podocyte peut entrer en phase M du cycle cellulaire, il est dans l'incapacité de réaliser la cytokinèse du fait de sa différenciation terminale et de la

conformation de son cytosquelette d'actines^{204,205}. Ainsi, l'entrée en cycle cellulaire du podocyte peut *in fine* entraîner son apoptose, et la libération de médiateurs stimulant à leur tour la PEC^{138,200}. Au cours du modèle doxorubine, il semble exister une réentrée du podocyte dans le cycle cellulaire³⁹¹. De plus, lorsque ce modèle est appliqué à des souris invalidées pour p21, on observait une majoration des lésions de HSF avec diminution du nombre de podocytes et majoration de l'apoptose³⁹². De façon intéressante, HSP27 pourrait réguler la localisation subcellulaire et l'abondance de p21 dans des cellules cancéreuses³¹⁵. Ainsi on peut supposer que l'activation potentielle d'HSP27 dans le podocyte pourrait également être délétère, en inhibant p21 et promouvant l'entrée en cycle du podocyte et *in fine*, entraîner son apoptose^{330,393,394}.

Ainsi, HSP27 pourrait donc avoir un effet délétère au cours des GEC ou des HSF à la fois au niveau des PEC comme suggéré par nos données, mais aussi au niveau podocytaire.

Par ailleurs, HSP27 est exprimée dans les cellules hématopoïétiques et notamment les monocytes^{300,395}. Ainsi, on ne peut écarter l'hypothèse que l'inhibition d'HSP27 intramonocytaire puisse jouer un rôle dans la modulation des lésions extracapillaires. Même si les études récentes suggèrent que les croissants sont principalement composés de cellules résidentes, les monocytes/ macrophages pourraient contribuer à la formation des croissants à travers la sécrétion de différents facteurs (facteur tissulaire⁵⁷, l'interleukine-1^{396,397}, TNF-alpha⁵⁹).

Ainsi, compte tenu de l'expression ubiquitaire d'HSP27, nous aurons nécessité de recourir à des modèles murins avec invalidation cellule-spécifique d'HSP27 pour comprendre son rôle *in vivo* dans les différents types cellulaires impliqués. Il existe un modèle de souris floxées pour *HSPB1* développé par Crowe³⁰³. Les modèles utilisant une CRE spécifique des PEC ont été développés et étudiés dans le modèle NTS (PAX-8/CRE)^{18,23,398}. Par ailleurs, il existe des systèmes CRE spécifiques de l'endothélium^{305,399} et des podocytes⁴⁰⁰. Afin d'étudier le rôle d'HSP27 hématopoïétique, nous pourrions également avoir recours à l'étude de souris chimérique Wt/ allogreffée de moelle d'une souris invalidée pour HSP27. Compte tenu de la lourdeur du développement de souris transgéniques, et de nos premiers résultats suggérant un rôle majeur d'HSP27 dans les PEC, nous développerons en premier lieu le modèle NTS chez des animaux avec invalidation spécifique d'HSP27 dans les PEC.

5 Rôle d'HSP27 dans les mécanismes de hyalinose segmentaire et focale

Comme nous l'avons vu précédemment, les glomérulonéphrites extracapillaires et les hyalinoses segmentaires et focales partagent des mécanismes similaires au cours de l'activation des PEC. Il sera donc pertinent de valider les résultats observés dans le modèle NTS dans d'autres modèles de HSF cette fois.

Le modèle doxorubicine est un modèle éprouvé pour l'étude des HSF par toxicité podocytaire^{91,401}. La doxorubicine est une anthracycline avec toxicité podocytaire directe dans le fond génétique balb/c (susceptibilité en lien avec le locus DOXNPH sur le chromosome 16)^{91,401}. Nous avons expérimenté ce modèle au laboratoire, mais lors d'expérimentation préliminaire, nous avons observé une mortalité précoce plus importante sous OGX-427 (42 % de mortalité dans le groupe doxorubicine + OGX-427 versus 15% dans le groupe doxorubicine). Nous n'avons pu identifier formellement la cause de cette surmortalité. De façon notable, HSP27 est associée aux mécanismes de résistance à ce traitement dans différents modèles de cancer et l'inhibition d'HSP27 potentialise l'action pro-apoptotique de la doxorubicine sur les cellules tumorales³¹⁵. Les mécanismes évoqués sont notamment une formation de ROS par les cellules exposées à la doxorubicine, avec dommage à l'ADN qui stimule l'activation de p53. HSP27 limiterait la mortalité cellulaire en interagissant directement avec p53^{315,330}.

De plus, chez l'homme et la souris, la doxorubicine est associée une toxicité cardiaque importante⁴⁰². De façon intéressante, on observe une surexpression d'HSP27 dans une culture de cellules cardiaques exposée à la doxorubicine^{403,404}.

Ainsi, l'inhibition d'HSP27 chez la souris dans le modèle de doxorubicine pourrait être associée à une toxicité cardiaque accrue, responsable de la surmortalité observée. Cependant, en l'absence d'analyse histologique cardiaque détaillée (animaux décédés brutalement), cette hypothèse ne peut être confirmée dans l'immédiat. Des expérimentations de time course et dose-course sous inhibiteur d'HSP27 avec analyse cardiaque détaillée pourraient être envisagées pour analyser au mieux les causes de mortalité.

Enfin, cette surmortalité pourrait s'expliquer également par une toxicité endothéliale de la doxorubicine. En effet, dans des modèles murins utilisant la doxorubicine, il a été observé une augmentation de la perméabilité capillaire⁴⁰⁵. Les mécanismes liés à cette toxicité semblent

divers, impliquant un défaut de régénération des progéniteurs endothéliaux, l'inhibition du flux autophagique ou une activation anormale de la voie TGF-beta^{406,407}. L'autophagie est un processus essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et de réponse au stress, qui contribue au recyclage des protéines, notamment présentant un défaut de confirmation^{408,409}. Cette voie semble ainsi impliquée dans la réponse au stress induit par la doxorubicine : chez des animaux invalidés pour Atg7 spécifiquement dans l'endothélium, l'exposition à cette chimiothérapie semble associée à une majoration des lésions cardiaques.

Il faut noter que dans notre travail, l'analyse histologique par simple microscopie optique en PAS du rein et du cœur (sur un échantillon limité) n'a pas montré de lésions évidentes du tissu cardiaque et notamment pas de lésion endothéliale. Mais compte tenu des données de la littérature, il semble probable que l'inhibition d'HSP27 puisse majorer la toxicité cardiovasculaire de la doxorubicine. C'est pourquoi, pour la suite du projet étudiant le rôle d'HSP27 au sein des PEC au cours des HSF, il conviendrait d'utiliser d'autres modèles d'HSF non associés à une toxicité endothéliale ou myocardique. Parmi les modèles développés, le modèle Thy 1.1 est classiquement utilisé dans l'étude de l'activation des PEC^{20,115}. Il s'agit d'un modèle murin transgénique marqué par une expression ectopique du transgène Thy 1.1 au niveau podocytaire (gène non exprimé habituellement), cette expression induisant des lésions progressives d'HSF. Un modèle accéléré existe avec l'injection d'anticorps monoclonaux anti-Thy 1.1^{99,100}. Enfin, un second modèle génétique déjà développé dans le laboratoire⁴¹⁰ en rapport avec une mutation du gène *WT1* (Wilms tumor 1) pourrait également être envisagé^{102,103}.

6 Rôle d'HSP27 dans les mécanismes de microangiopathies thrombotiques

Au cours du modèle NTS, malgré le bénéfice sur les lésions extracapillaires, nous n'avons pas observé de bénéfice fonctionnel. Il faut souligner que la majoration des lésions de microthrombis capillaires peut contrebalancer l'effet de la réduction des croissants extracapillaires sur le bénéfice fonctionnel.

6.1 Le modèle NTS est un modèle de microangiopathie thrombotique

Le modèle NTS est un modèle composite avec une agression glomérulaire globale pouvant associer prolifération extracapillaire, prolifération endocapillaire et encore des lésions de microangiopathies thrombotiques (MAT)^{21,28}. Le pattern prédominant va dépendre du fond génétique avec une susceptibilité plus accrue pour les lésions de MAT chez les souris 129/sv comparées au C57BL/6²¹. Les lésions de MAT correspondent à des microthromboses capillaires et artériolaires. Elles peuvent être rencontrées dans de nombreux contextes physiopathologiques chez l'homme (dérégulation du complément, infections, traitements inhibant la voie du VEGF, toxiques endothéliaux, etc...).

Au cours du modèle NTS, on observe une agression endothéliale initiale dès J4²¹. Celle-ci se caractérise par des thrombis capillaires précoces. Secondairement, les mécanismes de lésions extracapillaires se mettent en place avec développement des croissants cellulaires vers J10-J14 et de fibrose glomérulaire vers J21.

6.2 HSP27 et microangiopathie thrombotique

Nous avons observé une majoration des lésions de MAT après inhibition de l'expression d'HSP27 par OGX-427 dans le modèle NTS.

HSP27 est constitutivement exprimée dans les cellules endothéliales et a été impliquée dans différentes voies de signalisation de cette cellule.

Le VEGF (VEGFA) est un facteur de croissance impliqué en physiologie dans les phénomènes d'angiogenèse, de prolifération, de migration des cellules endothéliales, et de perméabilité capillaire. Le VEGF peut interagir avec différents récepteurs (le VEGFR1, le VEGFR 2) mais le VEGFR2 semble jouer le principal rôle au niveau angiogénique et est aussi le plus étudié^{411,412}. Le VEGFA est exprimé par les podocytes et les tubules rénaux. Les VEGFR 1 et 2 sont exprimés au niveau de l'endothélium glomérulaire et du capillaire péri-tubulaire^{241,413,414}.

L'invalidation inductible du VEGFR2 au niveau systémique (l'invalidation constitutionnelle étant léthale⁴¹⁵) dans les modèles murins est associée à des lésions endothéliales diffuses⁴¹⁶ et le modèle de délétion spécifique de VEGF-A podocytaire induit le développement de lésions de MAT⁴¹⁷. Ces résultats ont permis d'expliquer au mieux le développement de lésions de MAT induites par différents types d'inhibiteurs du VEGF-A ou de sa voie de signalisation chez

l'homme⁴¹⁷. Ainsi, le podocyte synthétise du VEGF-A et maintient l'homéostasie de l'endothélium glomérulaire.

HSP27 est impliquée dans les mécanismes d'angiogenèse tumorale via un rôle direct en aval du VEGFR2. HSP27 semble être phosphorylée au décours de l'activation du VEGFR via l'activation de p38⁴¹⁸. HSP27 pourrait alors moduler la migration des cellules endothéliales stimulée par l'interaction VEGF-a/ VEGFR2⁴¹⁸. HSP27 pourrait également avoir une action sur la sécrétion de VEGF par les cellules endothéliales par une action extracellulaire autocrine via le TLR 3⁴¹⁹. De plus, un rôle intracellulaire direct d'HSP27 semble aussi impliqué dans la sécrétion de VEGF. Ainsi, Straume *et al.* ont montré que l'inhibition d'HSP27 par siRNA mène à une diminution de la sécrétion de VEGFA et C⁴²⁰. Cet effet pourrait être médié par l'inhibition de la voie NF-κB, ou de pSTAT3⁴²¹⁻⁴²⁴.

Compte tenu des données impliquant HSP27 dans l'homéostasie endothéliale en aval du VEGFR, les lésions de MAT constatées lors de l'inhibition d'HSP27 par OGX-427 rappellent celles en rapport avec une perte de la signalisation VEGF chez l'homme.

Afin de valider cette hypothèse, des études d'inactivation d'HSP27 par shRNA sur cellules endothéliales pourront être proposées, dans le but d'évaluer l'apoptose et la migration endothéliale. De plus, une inactivation spécifique endothéliale pourra être développée *in vivo*, afin d'étudier l'impact d'HSP27 endothélial sur différents modèles d'agression endothéliale (hémolyse aigue, déficits de régulation du complément).

Enfin, on peut imaginer que les mécanismes de MAT aux anti VEGF chez l'homme puissent être favorisés par une diminution de l'expression ou de l'activation d'HSP27.

En effet, les mécanismes expliquant la susceptibilité de certains patients aux anti-VEGF restent mal compris. On peut s'interroger quant à la possible existence de variants génétiques d'*HSPB1* associés à un surrisque d'effet secondaire à type de MAT.

Une approche intéressante mais restant encore théorique et difficile à mettre en place, serait de comparer au sein d'une cohorte de patients traités par inhibiteurs du VEGF, ceux ayant présenté une complication à type de MAT à ceux sans toxicité endothéliale. Ainsi, plusieurs polymorphismes nucléotidiques ont été identifiés sur le promoteur d'*HSPB1* (rs2868370, rs2868371, rs7459185, rs2009836 et rs2070804). Parmi les mécanismes évoqués et du fait de

leur localisation sur le promoteur, il est possible que ces variants influent sur l'expression d'HSP27. Ainsi, Dierick *et al.* ont identifié une mutation sur le promoteur touchant la région de fixation de HSF1. On observait une baisse de l'activité du promoteur dans l'allèle mutant.c.-217C allèle²⁸¹. Par ailleurs, Guo *et al.* ont identifié un polymorphisme sur le promoteur -1271G>C associé à une diminution d'HSP27 au niveau tissulaire (tumoral ou sain)⁴²⁵. Ainsi, certains polymorphismes génétiques d'*HSPB1* pourraient théoriquement s'associer à un surrisque de manifestations endothéliales.

7 Perspectives chez l'homme

7.1 HSP27 comme biomarqueur d'activité des GEC

Actuellement l'une des problématiques majeures en pathologie rénale glomérulaire est l'évaluation de l'activité de la maladie, compte tenu de l'absence à ce jour de biomarqueurs spécifiques.

On peut distinguer différents marqueurs diagnostics ou encore pronostic (prédiction de l'insuffisance rénale chronique terminale/mise en dialyse). Ils peuvent être sériques, urinaire ou encore histologiques. Au cours de la vascularite à ANCA, l'une des principales causes de GEC, différents biomarqueurs ont été identifiés⁴²⁶.

En premier lieu, de multiples facteurs pronostics d'insuffisance rénale chronique terminale ont été identifiés. Ils incluent la sévérité de l'insuffisance rénale initiale, l'absence de réponse au traitement initiale, la récurrence de la pathologie, l'âge du patient. Cependant, la sévérité rénale initiale est certes de mauvais pronostic mais n'est pas synonyme d'absence de réponse. Ainsi plus de 50% des patients initialement dialysés peuvent sortir de dialyse et récupérer une fonction rénale⁴²⁷.

Afin d'améliorer la stratification pronostique des patients, différents scores essentiellement histologiques ont été développés en se basant sur le pourcentage d'atteinte glomérulaire, l'existence de lésions chroniques (fibrose interstitielle, glomérules scléreux) et de lésions actives (croissants cellulaires, signes de vascularite) mais aussi la fonction rénale initiale⁴²⁸⁻⁴³⁰. Ces scores permettent alors de stratifier les patients en plusieurs groupes. Cependant, il reste

essentiel de les affiner afin de pouvoir identifier parmi les patients à haut risque ceux pouvant bénéficier d'un traitement immunosuppresseur comparé à ceux dont le bénéfice est quasi nul.

De plus, la mesure de l'activité de la pathologie à un moment donné reste complexe. Une mesure de l'activité des vascularites peut être effectuée via le score BVAS (qui évaluent différentes atteintes d'organes)⁴³¹. Cependant, ce score s'applique mal aux patients recrutés en néphrologie, car les marqueurs utilisés dans le BVAS ne sont pas spécifiques de l'activité (mais peuvent représenter une atteinte rénale séquellaire).

Ainsi, différents biomarqueurs d'activité ont été identifiés⁴²⁶. Certains sont spécifiques de la maladie causale comme la positivité des ANCA au niveau sérique⁴²⁶, d'autres sont en lien avec une atteinte lésionnelle comme le dosage de NGAL (protéine associée à la dégranulation des neutrophiles⁴³²).

HSP27 sérique est certes un biomarqueur peu spécifique mais semble être en lien avec l'activité de la maladie rénale. Ainsi, au niveau histologique on observe son expression dans les glomérules normaux de patients atteints de vascularite avant même la formation des croissants. Au niveau sérique, un taux élevé d'HSP27 semble associé à une GEC active (Tableau d'insuffisance rénale aiguë, lésions de fibrose rénale moindre).

Ces résultats suggèrent ainsi qu'HSP27 sérique puisse refléter une phase active de la maladie lors du diagnostic. Son élévation pourrait justifier dès lors, un traitement immédiat. Néanmoins, ces résultats présentent plusieurs limites, incluant le faible nombre de patients étudiés et le caractère rétrospectif de l'étude. Ils nécessitent de tester la valeur prédictive du taux d'HSP27 dans une plus grande cohorte et de valider ces résultats sur une cohorte indépendante. L'association d'HSP27 avec d'autres biomarqueurs pourrait également améliorer sa valeur prédictive.

7.2 Approche thérapeutique

Comme nous l'avons vu, il n'existe à ce jour aucun traitement visant spécifiquement les mécanismes d'activation, de migration ou de prolifération des PEC. Plusieurs cibles d'intérêt ont été identifiées telles que CD44, CD9, KLF4/Stat3^{19,20,23,241} mais celles-ci n'ont pas encore abouti à des applications thérapeutiques chez l'homme⁴³³.

Apatorsen

Le rôle de l'OGX-427 (Apatorsen) au cours des GEC semble limité du fait de l'agression endothéliale initiale, exposant les patients à un effet paradoxal avec une majoration de lésions endothéliales.

On peut cependant poser l'hypothèse dans son utilisation au cours des lésions de HSF.

L'utilisation de l'Apatorsen (OGX-427) à la phase initiale des HSF primitives permettrait d'inhiber l'activation des PEC et la formation des lésions en attendant la réponse faisant suite aux traitements immunosuppresseurs.

A ce jour, des essais de phase II semblent montrer ainsi une bonne tolérance de l'Apatorsen au cours de différents cancers : prostate³³⁸ ; carcinome urothélial²⁹⁸ ; pulmonaire²⁹⁹ ou encore dans le cancer du pancréas sous Gemzar³³⁹ sans effet secondaire majeur rapporté notamment endothélial.

Les patients atteints de glomérulopathie notamment au cours des GEC sont pour beaucoup âgés, comorbides et exposés à des traitements immunosuppresseurs conséquents. Ainsi, l'identification de nouvelle cible thérapeutique avec un profil de tolérance éprouvé comme l'inhibition HSP27 semble être une approche intéressante.

L'ivermectine

Dans cette perspective thérapeutique, une autre molécule d'intérêt a été identifiée comme inhibiteur de la phosphorylation d'HSP27 avec les mêmes conséquences thérapeutiques fonctionnelles : l'ivermectine.

Nous avons montré, que l'ivermectine inhibe la migration des PEC, et diminue leur activation avec une baisse de l'expression de CD44. Par ailleurs, nous observons sur des données préliminaires une inhibition de la phosphorylation de STAT3 3 après exposition des PEC activées à l'ivermectine. Enfin, rappelons l'effet observé de diminution des croissants extracapillaires *in vivo* après exposition à l'ivermectine dans le modèle NTS.

Ainsi, l'utilisation de l'ivermectine semble induire des réponses similaires à l'inhibition d'HSP27, suggérant un possible bénéfice de cette molécule au cours des mécanismes de migration des PEC.

Cependant, il est nécessaire de poursuivre les investigations *in vivo* en validant le rôle potentiel de l'ivermectine dans un autre modèle murin de HSF (Modèle doxorubicine, WT-1). En effet, l'absence de bénéfice fonctionnel observé dans le modèle NTS de l'ivermectine peut suggérer une inhibition insuffisante dans ce modèle d'agression glomérulaire aiguë. L'effet thérapeutique de l'ivermectine pourrait être potentialisé dans un modèle plus progressif de développement des lésions glomérulaires, comme les modèles de HSF évoqués plus haut.

Ainsi, l'ivermectine semble jouer un rôle thérapeutique potentiel quant à la migration et l'activation des PEC. Néanmoins, nous n'avons pas réussi à observer de manière franche l'inhibition *in vitro* de la phosphorylation d'HSP27 dans les PEC comme observées par Nappi et al. Pour expliquer ce résultat, nous pouvons souligner en premier lieu que nous utilisons des cellules murines exprimant l'homologue murin HSP25 avec des sites de phosphorylation proches mais légèrement différents (S85) de la forme humaine utilisée. Il serait donc intéressant de reproduire ces expérimentations dans des PEC humaines comme celles récemment développées⁴³⁴. De plus, nous avons montré que l'ivermectine semblait associée à une baisse des formes dimériques à l'image des résultats obtenu par Nappi et al²⁸⁶. Ce résultat devra être validé par l'étude de la fonction chaperonne d'HSP27 *in vitro* en présence d'ivermectine, afin de caractériser la perte fonctionnelle d'HSP27 sous traitement. Il s'agit d'étudier la précipitation d'insuline (marquée au FITC) en présence d'HSP27 et en présence de dose croissante d'ivermectine. Ainsi, afin d'éclaircir le rôle de l'ivermectine sur HSP27 au sein des PEC, nous pourrions également réaliser une étude de l'oligomérisation à travers un gradient de glycerol avec ou sans ivermectine. Nous serons alors à même de confirmer ou non l'interaction directe de l'ivermectine avec HSP27 dans les PEC²⁸⁶.

Enfin, compte tenu des multiples voies de signalisation potentiellement modulées par l'IVM et impliquées dans la formation des croissants extracapillaires (mTOR²¹⁶, stat 3²⁰⁰ ou voie de l'EGFR²³) nous ne pouvons affirmer aujourd'hui que les effets observés soient médiés exclusivement par HSP27. Dans cette approche mécanistique, nous envisagerons donc l'évaluation de l'effet de l'ivermectine sur des PEC activées invalidées pour HSP27 pour étudier un effet de l'IVM potentiellement indépendant d'HSP27.

Conclusion

En conclusion, ce travail démontre l'importance pathogénique d'HSP27 au cours de la GEC tant chez l'homme que chez l'animal. Il identifie ainsi une nouvelle voie physiopathologique associée à l'activation des PEC et au développement des croissants extracapillaires. De plus, cette étude met en évidence l'importance d'HSP27 dans l'homéostasie endothéliale, et suggère le rôle protecteur de cette protéine dans le développement de lésions de microangiopathie thrombotique. Outre le rôle potentiel d'HSP27 comme biomarqueur d'activité des GEC, cette étude identifie de nouvelles cibles thérapeutiques chez l'homme. En effet, l'inhibition d'HSP27 au cours de pathologies impliquant l'activation des PEC permet d'envisager des perspectives thérapeutiques essentielles, compte tenu de la pauvreté des thérapeutiques existantes chez l'homme dans ces pathologies.

REFERENCES

1. Anguiano, L., Kain, R. & Anders, H.-J. The glomerular crescent: triggers, evolution, resolution, and implications for therapy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **29**, 302–309 (2020).
2. Jennette, J. C. Rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* **63**, 1164–1177 (2003).
3. Atlas de Pathologie rénale - Sous la direction de Laure-Hélène NOËL - 9782257000231 Lavoisier msp, Néphrologie. https://www.unitheque.com/Livre/lavoisier_msp/Atlas_de_Pathologie_renale-23550.html.
4. Bajema, I. M. *et al.* Revision of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification for lupus nephritis: clarification of definitions, and modified National Institutes of Health activity and chronicity indices. *Kidney International* **93**, 789–796 (2018).
5. Kriz, W. & LeHir, M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases- insights from animal models. *Kidney Int.* **67**, 404–419 (2005).
6. D'Agati, V. D., Kaskel, F. J. & Falk, R. J. Focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* **365**, 2398–2411 (2011).
7. Couser, W. G. Rapidly progressive glomerulonephritis: classification, pathogenetic mechanisms, and therapy. *Am J Kidney Dis* **11**, 449–464 (1988).
8. Kalluri, R. *et al.* Identification of the alpha 3 chain of type IV collagen as the common autoantigen in antibasement membrane disease and Goodpasture syndrome. *JASN* **6**, 1178–1185 (1995).
9. McAdoo, S. P. & Pusey, C. D. Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **12**, 1162–1172 (2017).
10. Canney, M. *et al.* Spatial and Temporal Clustering of Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **11**, 1392–1399 (2016).
11. Jennette, J. C. Overview of the 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference nomenclature of vasculitides. *Clin Exp Nephrol* **17**, 603–606 (2013).
12. Jennette, J. C. & Nachman, P. H. ANCA Glomerulonephritis and Vasculitis. *Clin J Am Soc Nephrol* **12**, 1680–1691 (2017).
13. Nahas, A. M. E. Masugi Nephritis: A Model for All Seasons. *Experimental and Genetic Rat Models of Chronic Renal Failure* 49–67 (1993) doi:10.1159/000421092.
14. Masugi, M. & Sato, Y. Über die allergische Gewebsreaktion der Niere. *Virchows Arch. path Anat.* **293**, 615–664 (1934).
15. Henique, C. *et al.* Genetic and pharmacological inhibition of microRNA-92a maintains podocyte cell cycle quiescence and limits crescentic glomerulonephritis. *Nat Commun* **8**, 1829 (2017).
16. Bollée, G. *et al.* Epidermal growth factor receptor promotes glomerular injury and renal failure in rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Nat. Med.* **17**, 1242–1250 (2011).
17. Smeets, B. *et al.* Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 2604–2615 (2009).
18. Kuppe, C. *et al.* Investigations of Glucocorticoid Action in GN. *J Am Soc Nephrol* **28**, 1408–1420 (2017).
19. Roeder, S. S. *et al.* Activated ERK1/2 increases CD44 in glomerular parietal epithelial cells leading to matrix expansion. *Kidney Int.* **91**, 896–913 (2017).
20. Eymael, J. *et al.* CD44 is required for the pathogenesis of experimental crescentic glomerulonephritis and collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **93**, 626–642 (2018).
21. Mesnard, L. *et al.* Genetic background-dependent thrombotic microangiopathy is related to vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling during anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *Am J Pathol* **184**, 2438–2449 (2014).

22. Ougaard, M. K. E. *et al.* Murine Nephrotoxic Nephritis as a Model of Chronic Kidney Disease. *Int J Nephrol* **2018**, 8424502 (2018).
23. Lazareth, H. *et al.* The tetraspanin CD9 controls migration and proliferation of parietal epithelial cells and glomerular disease progression. *Nat Commun* **10**, 3303 (2019).
24. Yaar, M. *et al.* The Goodpasture-like syndrome in mice induced by intravenous injections of anti-type IV collagen and anti-laminin antibody. *Am J Pathol* **107**, 79–91 (1982).
25. Chugh, S. *et al.* Aminopeptidase A: A nephritogenic target antigen of nephrotoxic serum. *Kidney International* **59**, 601–613 (2001).
26. O'Meara, Y. M. *et al.* Nephrotoxic antiserum identifies a beta 1-integrin on rat glomerular epithelial cells. *Am J Physiol* **262**, F1083-1091 (1992).
27. Lippman, R. W. & Jacobs, E. E. Nephrotoxic globulin nephritis. III. Prompt death after administration of nephrotoxic globulin to the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* **81**, 586–590 (1952).
28. Xie, C., Sharma, R., Wang, H., Zhou, X. J. & Mohan, C. Strain distribution pattern of susceptibility to immune-mediated nephritis. *J Immunol* **172**, 5047–5055 (2004).
29. Huang, X. R., Tipping, P. G., Shuo, L. & Holdsworth, S. R. Th1 responsiveness to nephritogenic antigens determines susceptibility to crescentic glomerulonephritis in mice. *Kidney Int* **51**, 94–103 (1997).
30. Luque, Y. *et al.* Glomerular common gamma chain confers B- and T-cell-independent protection against glomerulonephritis. *Kidney Int* **91**, 1146–1158 (2017).
31. Ohse, T. *et al.* The enigmatic parietal epithelial cell is finally getting noticed: a review. *Kidney Int* **76**, 1225–1238 (2009).
32. Pusey, C. D. Anti-glomerular basement membrane disease. *Kidney International* **64**, 1535–1550 (2003).
33. Neumann, I. *et al.* SCG/Kinjoh mice: A model of ANCA-associated crescentic glomerulonephritis with immune deposits. *Kidney International* **64**, 140–148 (2003).
34. Little, M. A. *et al.* Antineutrophil cytoplasm antibodies directed against myeloperoxidase augment leukocyte-microvascular interactions in vivo. *Blood* **106**, 2050–2058 (2005).
35. Xiao, H. *et al.* Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest* **110**, 955–963 (2002).
36. Schreiber, A., Xiao, H., Falk, R. J. & Jennette, J. C. Bone marrow-derived cells are sufficient and necessary targets to mediate glomerulonephritis and vasculitis induced by anti-myeloperoxidase antibodies. *J Am Soc Nephrol* **17**, 3355–3364 (2006).
37. Kriz, W. *et al.* Pathways to recovery and loss of nephrons in anti-Thy-1 nephritis. *J Am Soc Nephrol* **14**, 1904–1926 (2003).
38. Chen, A. *et al.* Bowman's capsule provides a protective niche for podocytes from cytotoxic CD8⁺ T cells. *J Clin Invest* **128**, 3413–3424 (2018).
39. Atkins, R. C., Nikolic-Paterson, D. J., Song, Q. & Lan, H. Y. Modulators of crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* **7**, 2271–2278 (1996).
40. McAdoo, S. P. *et al.* Spleen tyrosine kinase inhibition attenuates autoantibody production and reverses experimental autoimmune GN. *J Am Soc Nephrol* **25**, 2291–2302 (2014).
41. Le Hir, M. *et al.* Podocyte bridges between the tuft and Bowman's capsule: an early event in experimental crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 2060–2071 (2001).
42. Fujita, E. *et al.* Glomerular capillary and endothelial cell injury is associated with the formation of necrotizing and crescentic lesions in crescentic glomerulonephritis. *J Nippon Med Sch* **82**, 27–35 (2015).
43. Bonsib, S. M. Glomerular basement membrane discontinuities. Scanning electron

- microscopic study of acellular glomeruli. *Am J Pathol* **119**, 357–360 (1985).
44. Ryu, M. *et al.* Plasma leakage through glomerular basement membrane ruptures triggers the proliferation of parietal epithelial cells and crescent formation in non-inflammatory glomerular injury. *J Pathol* **228**, 482–494 (2012).
 45. Zipfel, P. F., Wiech, T., Gröne, H.-J. & Skerka, C. Complement catalyzing glomerular diseases. *Cell Tissue Res* **385**, 355–370 (2021).
 46. Holers, V. M. Complement and its receptors: new insights into human disease. *Annu Rev Immunol* **32**, 433–459 (2014).
 47. Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L. T. Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Frontiers in Immunology* **6**, (2015).
 48. Schreiber, A. *et al.* C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* **20**, 289–298 (2009).
 49. Morigi, M. *et al.* A previously unrecognized role of C3a in proteinuric progressive nephropathy. *Sci Rep* **6**, 28445 (2016).
 50. Li, H. L., Hancock, W. W., Dowling, J. P. & Atkins, R. C. Activated (IL-2R+) intraglomerular mononuclear cells in crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* **39**, 793–798 (1991).
 51. Cunningham, M. A., Huang, X. R., Dowling, J. P., Tipping, P. G. & Holdsworth, S. R. Prominence of cell-mediated immunity effectors in ‘pauci-immune’ glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* **10**, 499–506 (1999).
 52. Flajnik, M. F. A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **18**, 438–453 (2018).
 53. Kitching, A. R. *et al.* IL-12p40 and IL-18 in Crescentic Glomerulonephritis: IL-12p40 is the Key Th1-Defining Cytokine Chain, Whereas IL-18 Promotes Local Inflammation and Leukocyte Recruitment. *JASN* **16**, 2023–2033 (2005).
 54. Kitching, A. R., Tipping, P. G., Mutch, D. A., Huang, X. R. & Holdsworth, S. R. Interleukin-4 deficiency enhances Th1 responses and crescentic glomerulonephritis in mice. *Kidney Int* **53**, 112–118 (1998).
 55. Masaki, T., Chow, F., Nikolic-Paterson, D. J., Atkins, R. C. & Tesch, G. H. Heterogeneity of antigen expression explains controversy over glomerular macrophage accumulation in mouse glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation* **18**, 178–181 (2003).
 56. Bariéty, J. *et al.* Podocyte involvement in human immune crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* **68**, 1109–1119 (2005).
 57. Tipping, P. G. *et al.* Glomerular tissue factor expression in crescentic glomerulonephritis. Correlations between antigen, activity, and mRNA. *Am J Pathol* **147**, 1736–1748 (1995).
 58. Lan, H. Y. *et al.* The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat. *J Exp Med* **185**, 1455–1465 (1997).
 59. Khan, S. B. *et al.* Antibody blockade of TNF- α reduces inflammation and scarring in experimental crescentic glomerulonephritis. *Kidney International* **67**, 1812–1820 (2005).
 60. Lan, H. Y. *et al.* De novo glomerular osteopontin expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* **53**, 136–145 (1998).
 61. Nishikawa, K. *et al.* Antibodies to intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 prevent crescent formation in rat autoimmune glomerulonephritis. *J Exp Med* **177**, 667–677 (1993).
 62. Adler, S. & Brady, H. R. Cell adhesion molecules and the glomerulopathies. *Am J Med* **107**, 371–386 (1999).
 63. Wong, M. N., Tharoux, P.-L., Grahammer, F. & Puelles, V. G. Parietal epithelial cell

- dysfunction in crescentic glomerulonephritis. *Cell Tissue Res* **385**, 345–354 (2021).
64. Kusuyama, Y., Nishihara, T. & Saito, K. Nephrotoxic nephritis in nude mice. *Clin Exp Immunol* **46**, 20–26 (1981).
 65. Sato, T., Oite, T., Nagase, M. & Shimizu, F. Nephrotoxic serum nephritis in nude rats: the roles of host immune reactions. *Clin Exp Immunol* **84**, 139–144 (1991).
 66. Sicking, E.-M. *et al.* Subtotal Ablation of Parietal Epithelial Cells Induces Crescent Formation. *J Am Soc Nephrol* **23**, 629–640 (2012).
 67. Naish, P., Penn, G. B., Evans, D. J. & Peters, D. K. The effect of defibrination on nephrotoxic serum nephritis in rabbits. *Clin Sci* **42**, 643–646 (1972).
 68. Thomson, N. M., Moran, J., Simpson, I. J. & Peters, D. K. Defibrination with ancrod in nephrotoxic nephritis in rabbits. *Kidney Int* **10**, 343–347 (1976).
 69. Erlich, J. H. *et al.* Renal expression of tissue factor pathway inhibitor and evidence for a role in crescentic glomerulonephritis in rabbits. *J Clin Invest* **98**, 325–335 (1996).
 70. Kitching, A. R. *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 is a significant determinant of renal injury in experimental crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* **14**, 1487–1495 (2003).
 71. Rondeau, E. *et al.* Plasminogen activator inhibitor 1 in renal fibrin deposits of human nephropathies. *Clin Nephrol* **33**, 55–60 (1990).
 72. D’Agati, V. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol* **23**, 117–134 (2003).
 73. Maas, R. J., Deegens, J. K., Smeets, B., Moeller, M. J. & Wetzels, J. F. Minimal change disease and idiopathic FSGS: manifestations of the same disease. *Nat Rev Nephrol* **12**, 768–776 (2016).
 74. Rosenberg, A. Z. & Kopp, J. B. Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* **12**, 502–517 (2017).
 75. D’Agati, V. D., Fogo, A. B., Bruijn, J. A. & Jennette, J. C. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis* **43**, 368–382 (2004).
 76. Yang, J. W. *et al.* Recent advances of animal model of focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Exp Nephrol* **22**, 752–763 (2018).
 77. Jefferson, J. A. & Shankland, S. J. The Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Advances in Chronic Kidney Disease* **21**, 408–416 (2014).
 78. de Mik, S. M., Hoogduijn, M. J., de Bruin, R. W. & Dor, F. J. Pathophysiology and treatment of focal segmental glomerulosclerosis: the role of animal models. *BMC Nephrology* **14**, 74 (2013).
 79. Lee, M. L., Purkerson, M. L., Agate, F. J. & Dempsey, E. W. Ultrastructural changes in renal Glomeruli of rats during experimentally induced hypertension and uremia. *Am. J. Anat.* **135**, 191–203 (1972).
 80. Purkerson, M. L., Hoffsten, P. E. & Klahr, S. Pathogenesis of the glomerulopathy associated with renal infarction in rats. *Kidney International* **9**, 407–417 (1976).
 81. Deen, W. M., Maddox, D. A., Robertson, C. R. & Brenner, B. M. Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. VII. Response to reduced renal mass. *Am J Physiol* **227**, 556–562 (1974).
 82. Hostetter, T. H., Olson, J. L., Rennke, H. G., Venkatachalam, M. A. & Brenner, B. M. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* **241**, F85–93 (1981).
 83. Ma, L.-J. & Fogo, A. B. Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. *Kidney Int* **64**, 350–355 (2003).
 84. Grond, J., Weening, J. J., van Goor, H. & Elema, J. D. Application of puromycin aminonucleoside and adriamycin to induce chronic renal failure in the rat. *Contrib Nephrol*

60, 83–93 (1988).

85. Rossmann, P., Bukovský, A., Matoušovic, K., Holub, M. & Král, J. Puromycin aminonucleoside nephropathy: Ultrastructure, glomerular polyanion, and cell surface markers. *The Journal of Pathology* **148**, 337–348 (1986).
86. Diamond, J. R. & Karnovsky, M. J. Focal and Segmental Glomerulosclerosis Following a Single Intravenous Dose of Puromycin Aminonucleoside. **122**, 7 (1986).
87. Furness, P. N. & Harris, K. An evaluation of experimental models of glomerulonephritis. *Int J Exp Pathol* **75**, 9–22 (1994).
88. Jeansson, M., Björck, K., Tenstad, O. & Haraldsson, B. Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J Am Soc Nephrol* **20**, 114–122 (2009).
89. Sun, Y. B. Y. *et al.* Glomerular Endothelial Cell Injury and Damage Precedes That of Podocytes in Adriamycin-Induced Nephropathy. *PLOS ONE* **8**, e55027 (2013).
90. Wang, Y., Wang, Y. P., Tay, Y. C. & Harris, D. C. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int* **58**, 1797–1804 (2000).
91. Zheng, Z. *et al.* A Mendelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2502–2507 (2005).
92. Lee, V. W. & Harris, D. C. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology* **16**, 30–38 (2011).
93. Hayashi, K. *et al.* Regression of glomerulosclerosis in response to transient treatment with angiotensin II blockers is attenuated by blockade of matrix metalloproteinase-2. *Kidney Int* **78**, 69–78 (2010).
94. Heikkilä, E. *et al.* beta-Catenin mediates adriamycin-induced albuminuria and podocyte injury in adult mouse kidneys. *Nephrol Dial Transplant* **25**, 2437–2446 (2010).
95. Akiyama, K. *et al.* Actin-related protein 3 (Arp3) is mutated in proteinuric BUF/Mna rats. *Mamm Genome* **19**, 41–50 (2008).
96. Matsusaka, T. *et al.* Genetic Engineering of Glomerular Sclerosis in the Mouse via Control of Onset and Severity of Podocyte-Specific Injury. *JASN* **16**, 1013–1023 (2005).
97. Miyazaki, Y. *et al.* Mice are unable to endogenously regenerate podocytes during the repair of immunotoxin-induced glomerular injury. *Nephrol Dial Transplant* **29**, 1005–1012 (2014).
98. Wharram, B. L. *et al.* Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J Am Soc Nephrol* **16**, 2941–2952 (2005).
99. Kollias, G. *et al.* Ectopic expression of Thy-1 in the kidneys of transgenic mice induces functional and proliferative abnormalities. *Cell* **51**, 21–31 (1987).
100. Smeets, B. *et al.* Podocyte changes upon induction of albuminuria in Thy-1.1 transgenic mice. *Nephrol Dial Transplant* **18**, 2524–2533 (2003).
101. Roselli, S. *et al.* Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Mol Cell Biol* **24**, 550–560 (2004).
102. G, H. *et al.* A novel missense mutation of Wilms' Tumor 1 causes autosomal dominant FSGS. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **26**, (2015).
103. Ratelade, J. *et al.* A murine model of Denys-Drash syndrome reveals novel transcriptional targets of WT1 in podocytes. *Hum Mol Genet* **19**, 1–15 (2010).
104. Hommos, M. S. *et al.* The Incidence of Primary vs Secondary Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Clinicopathologic Study. *Mayo Clin Proc* **92**, 1772–1781 (2017).
105. Kim, Y. H. *et al.* Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int* **60**, 957–968 (2001).
106. Chang, J.-W. *et al.* Podocyte foot process effacement in postreperfusion allograft biopsies correlates with early recurrence of proteinuria in focal segmental glomerulosclerosis.

Transplantation **93**, 1238–1244 (2012).

107. Savin, V. J. *et al.* Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* **334**, 878–883 (1996).
108. Zimmerman, S. W. Increased urinary protein excretion in the rat produced by serum from a patient with recurrent focal glomerular sclerosis after renal transplantation. *Clin Nephrol* **22**, 32–38 (1984).
109. Kachurina, N. *et al.* Novel unbiased assay for circulating podocyte-toxic factors associated with recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **310**, F1148–1156 (2016).
110. Königshausen, E. & Sellin, L. Circulating Permeability Factors in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Review of Proposed Candidates. *Biomed Res Int* **2016**, 3765608 (2016).
111. Gebeshuber, C. A. *et al.* Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1. *Nat Med* **19**, 481–487 (2013).
112. Sharma, M. *et al.* Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors attenuate the effect of cardiotrophin-like cytokine factor 1 and human focal segmental glomerulosclerosis serum on glomerular filtration barrier. *Transl Res* **166**, 384–398 (2015).
113. D’Agati, V. D. Podocyte Growing Pains in Adaptive FSGS. *J Am Soc Nephrol* **28**, 2825–2827 (2017).
114. Rennke, H. G. & Klein, P. S. Pathogenesis and significance of nonprimary focal and segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* **13**, 443–456 (1989).
115. Smeets, B. *et al.* Parietal Epithelial Cells Participate in the Formation of Sclerotic Lesions in Focal Segmental Glomerulosclerosis. *JASN* **22**, 1262–1274 (2011).
116. Wiggins, J. E. *et al.* Podocyte hypertrophy, ‘adaptation,’ and ‘decompensation’ associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. *J Am Soc Nephrol* **16**, 2953–2966 (2005).
117. Cho, M. E., Hurley, J. K. & Kopp, J. B. Sirolimus therapy of focal segmental glomerulosclerosis is associated with nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis* **49**, 310–317 (2007).
118. Kriz, W. & Lemley, K. V. A Potential Role for Mechanical Forces in the Detachment of Podocytes and the Progression of CKD. *JASN* **26**, 258–269 (2015).
119. Nichols, B. *et al.* Innate immunity pathways regulate the nephropathy gene Apolipoprotein L1. *Kidney Int* **87**, 332–342 (2015).
120. Nystrom, S. E. *et al.* JAK inhibitor blocks COVID-19 cytokine-induced JAK/STAT/APOL1 signaling in glomerular cells and podocytopathy in human kidney organoids. *JCI Insight* **7**, (2022).
121. Coroneos, E., Petrussevska, G., Varghese, F. & Truong, L. D. Focal segmental glomerulosclerosis with acute renal failure associated with α -interferon therapy. *American Journal of Kidney Diseases* **28**, 888–892 (1996).
122. Calizo, R. C. *et al.* Disruption of podocyte cytoskeletal biomechanics by dasatinib leads to nephrotoxicity. *Nat Commun* **10**, 2061 (2019).
123. Puelles, V. G. *et al.* mTOR-mediated podocyte hypertrophy regulates glomerular integrity in mice and humans. *JCI Insight* **4**, e99271.
124. Morelon, E. & Kreis, H. Sirolimus therapy without calcineurin inhibitors: Necker Hospital 8-year experience. *Transplant Proc* **35**, 52S–57S (2003).
125. Woroniecki, R. P. & Kopp, J. B. Genetics of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* **22**, 638–644 (2007).
126. Morita, T., Suzuki, Y. & Churg, J. Structure and development of the glomerular crescent. *Am J Pathol* **72**, 349–368 (1973).

127. Churg, J. & Grishman, E. Ultrastructure of glomerular disease: a review. *Kidney Int* **7**, 254–261 (1975).
128. Ronconi, E. *et al.* Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol* **20**, 322–332 (2009).
129. Ivanova, L., Hiatt, M. J., Yoder, M. C., Tarantal, A. F. & Matsell, D. G. Ontogeny of CD24 in the human kidney. *Kidney Int* **77**, 1123–1131 (2010).
130. Angelotti, M. L., Lazzeri, E., Lasagni, L. & Romagnani, P. Only anti-CD133 antibodies recognizing the CD133/1 or the CD133/2 epitopes can identify human renal progenitors. *Kidney Int* **78**, 620–621; author reply 621 (2010).
131. Lasagni, L. & Romagnani, P. Glomerular epithelial stem cells: the good, the bad, and the ugly. *J Am Soc Nephrol* **21**, 1612–1619 (2010).
132. Magil, A. B. Histogenesis of glomerular crescents. Immunohistochemical demonstration of cytokeratin in crescent cells. *Am J Pathol* **120**, 222–229 (1985).
133. Nitta, K. *et al.* Glomerular expression of cell-cycle-regulatory proteins in human crescentic glomerulonephritis. *Virchows Arch* **435**, 422–427 (1999).
134. Moeller, M. J. *et al.* Podocytes populate cellular crescents in a murine model of inflammatory glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 61–67 (2004).
135. Thorner, P. S., Ho, M., Eremina, V., Sado, Y. & Quaggin, S. Podocytes contribute to the formation of glomerular crescents. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 495–502 (2008).
136. Kuppe, C. *et al.* Novel parietal epithelial cell subpopulations contribute to focal segmental glomerulosclerosis and glomerular tip lesions. *Kidney Int* **96**, 80–93 (2019).
137. Ding, M. *et al.* Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nat. Med.* **12**, 1081–1087 (2006).
138. Dai, Y. *et al.* Podocyte-specific deletion of signal transducer and activator of transcription 3 attenuates nephrotoxic serum-induced glomerulonephritis. *Kidney Int.* **84**, 950–961 (2013).
139. Henique, C. *et al.* Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Drives Podocyte-Specific Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Essential for Resistance to Crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 172–188 (2016).
140. Little, M. H. & McMahon, A. P. Mammalian kidney development: principles, progress, and projections. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a008300 (2012).
141. Saxén, L. & Sariola, H. Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol* **1**, 385–392 (1987).
142. Arakawa, M. & Tokunaga, J. A scanning electron microscope study of the human Bowman's epithelium. *Contrib Nephrol* **6**, 73–78 (1977).
143. Differential Expression Patterns of Claudins, Tight Junction Membrane Proteins, in Mouse Nephron Segments | American Society of Nephrology. <https://jasn.asnjournals.org/content/13/4/875>.
144. Following the Expression of a Kidney-Specific Gene from Early Development to Adulthood - Abstract - Nephron Experimental Nephrology 2003, Vol. 94, No. 1 - Karger Publishers. <https://www.karger.com/Article/Abstract/70812>.
145. Cho, E. A. *et al.* Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development. *Development* **125**, 803–812 (1998).
146. Dijkman, H. B. P. M. *et al.* Proliferating cells in HIV and pamidronate-associated collapsing focal segmental glomerulosclerosis are parietal epithelial cells. *Kidney Int* **70**, 338–344 (2006).
147. Ohse, T. *et al.* A new function for parietal epithelial cells: A second glomerular barrier. *ResearchGate* **297**, F1566-74 (2009).
148. Kaku, Y. *et al.* PAX2 is dispensable for in vitro nephron formation from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* **7**, 4554 (2017).

149. Djudjaj, S. *et al.* Keratins are novel markers of renal epithelial cell injury. *Kidney International* **89**, 792–808 (2016).
150. Stamenkovic, I., Skalli, O. & Gabbiani, G. Distribution of intermediate filament proteins in normal and diseased human glomeruli. *Am J Pathol* **125**, 465–475 (1986).
151. Sagrinati, C. *et al.* Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol* **17**, 2443–2456 (2006).
152. D'Agati, V. D. & Shankland, S. J. Recognizing diversity in parietal epithelial cells. *Kidney Int* **96**, 16–19 (2019).
153. Wa, W. & J, B. The permeability of the parietal layer of Bowman's capsule. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **25**, (1971).
154. Chang, A. M. *et al.* Albumin-induced apoptosis of glomerular parietal epithelial cells is modulated by extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 1330–1343 (2012).
155. Zhao, X. *et al.* Albumin induces CD44 expression in glomerular parietal epithelial cells by activating ERK signaling pathway. *J Cell Physiol* **234**, 7224–7235 (2019).
156. Yoder, B. K. Role of primary cilia in the pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **18**, 1381–1388 (2007).
157. Webber, W. A. & Wong, W. T. The function of the basal filaments in the parietal layer of Bowman's capsule. *Can J Physiol Pharmacol* **51**, 53–60 (1973).
158. Moeller, M. J. & Tharaux, P.-L. Cellular regeneration of podocytes from parietal cells: the debate is still open. *Kidney Int* **96**, 542–544 (2019).
159. Bariety, J., Mandet, C., Hill, G. S. & Bruneval, P. Parietal podocytes in normal human glomeruli. *J Am Soc Nephrol* **17**, 2770–2780 (2006).
160. Gibson, I. W. *et al.* The parietal podocyte: a study of the vascular pole of the human glomerulus. *Kidney Int* **41**, 211–214 (1992).
161. Appel, D. *et al.* Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 333–343 (2009).
162. Berger, K. *et al.* The Regenerative Potential of Parietal Epithelial Cells in Adult Mice. *JASN* **25**, 693–705 (2014).
163. Shankland, S. J., Smeets, B., Pippin, J. W. & Moeller, M. J. The emergence of the glomerular parietal epithelial cell. *Nat Rev Nephrol* **10**, 158–173 (2014).
164. Kriz, W. & LeHir, M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases—insights from animal models. *Kidney Int.* **67**, 404–419 (2005).
165. Fatima, H. *et al.* Parietal Epithelial Cell Activation Marker in Early Recurrence of FSGS in the Transplant. *CJASN* (2012) doi:10.2215/CJN.10571011.
166. Sneath, R. J. & Mangham, D. C. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol* **51**, 191–200 (1998).
167. Senbanjo, L. T. & Chellaiah, M. A. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol* **5**, 18 (2017).
168. Desai, B., Rogers, M. J. & Chellaiah, M. A. Mechanisms of osteopontin and CD44 as metastatic principles in prostate cancer cells. *Mol Cancer* **6**, 18 (2007).
169. Desai, B., Ma, T., Zhu, J. & Chellaiah, M. A. Characterization of the expression of variant and standard CD44 in prostate cancer cells: identification of the possible molecular mechanism of CD44/MMP9 complex formation on the cell surface. *J Cell Biochem* **108**, 272–284 (2009).
170. Goodison, S., Urquidi, V. & Tarin, D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* **52**, 189–196 (1999).
171. Schmits, R. *et al.* CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood* **90**, 2217–2233 (1997).

172. Yang, C. *et al.* Inducible formation of leader cells driven by CD44 switching gives rise to collective invasion and metastases in luminal breast carcinomas. *Oncogene* **38**, 7113–7132 (2019).
173. Li, W. *et al.* CD44 regulates prostate cancer proliferation, invasion and migration via PDK1 and PFKFB4. *Oncotarget* **8**, 65143–65151 (2017).
174. Ibrahim, H. M. *et al.* Prognostic Value of Cyclin D1 and CD44 Expression in Gastric Adenocarcinoma. *J Gastrointest Cancer* **50**, 370–379 (2019).
175. Gao, Y. *et al.* Knockdown of CD44 inhibits the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo by reversing epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget* **6**, 7828–7837 (2015).
176. Lewington, A. J., Padanilam, B. J., Martin, D. R. & Hammerman, M. R. Expression of CD44 in kidney after acute ischemic injury in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**, R247-254 (2000).
177. Pabst, R. & Sterzel, R. B. Cell renewal of glomerular cell types in normal rats. An autoradiographic analysis. *Kidney Int* **24**, 626–631 (1983).
178. Nadasdy, T., Laszik, Z., Blick, K. E., Johnson, L. D. & Silva, F. G. Proliferative activity of intrinsic cell populations in the normal human kidney. *JASN* **4**, 2032–2039 (1994).
179. Yang, Y., Gubler, M.-C. & Beauvils, H. Dysregulation of Podocyte Phenotype in Idiopathic Collapsing Glomerulopathy and HIV-Associated Nephropathy. *NEF* **91**, 416–423 (2002).
180. Kim, Y.-G. *et al.* The cyclin kinase inhibitor p21CIP1/WAF1 limits glomerular epithelial cell proliferation in experimental glomerulonephritis. *Kidney International* **55**, 2349–2361 (1999).
181. Suzuki, T. *et al.* Genetic podocyte lineage reveals progressive podocytopenia with parietal cell hyperplasia in a murine model of cellular/collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *Am. J. Pathol.* **174**, 1675–1682 (2009).
182. Takeda, Y., Shirato, I., Hayashi, K., He, J. S. & Tomino, Y. [Immunohistochemical analysis of protein gene product 9.5, a new marker for parietal epithelial cells of Bowman's capsules, in anti-glomerular basement membrane(GBM) antibody induced glomerulonephritis of WKY rats]. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* **43**, 20–27 (2001).
183. Shirato, I., Asanuma, K., Takeda, Y., Hayashi, K. & Tomino, Y. Protein gene product 9.5 is selectively localized in parietal epithelial cells of Bowman's capsule in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* **11**, 2381–2386 (2000).
184. Yang, J. *et al.* Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 341–352 (2020).
185. Ng, Y. Y. *et al.* Glomerular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in the evolution of glomerular crescent formation. *Nephrol Dial Transplant* **14**, 2860–2872 (1999).
186. Shimizu, M. *et al.* Role of integrin-linked kinase in epithelial-mesenchymal transition in crescent formation of experimental glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* **21**, 2380–2390 (2006).
187. Fujigaki, Y. *et al.* Mechanisms and kinetics of Bowman's epithelial-myofibroblast transdifferentiation in the formation of glomerular crescents. *Nephron* **92**, 203–212 (2002).
188. Bariety, J. *et al.* Glomerular epithelial-mesenchymal transdifferentiation in pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* **18**, 1777–1784 (2003).
189. Wanner, N. *et al.* Unraveling the Role of Podocyte Turnover in Glomerular Aging and Injury. *JASN* **25**, 707–716 (2014).
190. Ohse, T. *et al.* De novo expression of podocyte proteins in parietal epithelial cells during experimental glomerular disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **298**, F702-711 (2010).
191. Eng, D. G. *et al.* Glomerular parietal epithelial cells contribute to adult podocyte regeneration in experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **88**, 999–1012

(2015).

192. Lavoie, H., Gagnon, J. & Therrien, M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 607–632 (2020).
193. Romoli, S. *et al.* CXCL12 blockade preferentially regenerates lost podocytes in cortical nephrons by targeting an intrinsic podocyte-progenitor feedback mechanism. *Kidney Int.* **94**, 1111–1126 (2018).
194. Kaverina, N. V. *et al.* Dual lineage tracing shows that glomerular parietal epithelial cells can transdifferentiate toward the adult podocyte fate. *Kidney International* **96**, 597–611 (2019).
195. Cichy, J. & Puré, E. The liberation of CD44. *J Cell Biol* **161**, 839–843 (2003).
196. Fatima, H. *et al.* Parietal Epithelial Cell Activation Marker in Early Recurrence of FSGS in the Transplant. *CJASN* (2012) doi:10.2215/CJN.10571011.
197. Smeets, B. *et al.* Detection of Activated Parietal Epithelial Cells on the Glomerular Tuft Distinguishes Early Focal Segmental Glomerulosclerosis from Minimal Change Disease. *Am J Pathol* **184**, 3239–3248 (2014).
198. Roca, N. *et al.* CD44-negative parietal–epithelial cell staining in minimal change disease: association with clinical features, response to corticosteroids and kidney outcome. *Clinical Kidney Journal* **15**, 545–552 (2022).
199. Froes, B. P. *et al.* Is CD44 in glomerular parietal epithelial cells a pathological marker of renal function deterioration in primary focal segmental glomerulosclerosis? *Pediatr Nephrol* **32**, 2165–2169 (2017).
200. Estrada, C. C. *et al.* Krüppel-like factor 4 is a negative regulator of STAT3-induced glomerular epithelial cell proliferation. *JCI Insight* **3**, (2018).
201. Bialkowska, A. B., Yang, V. W. & Mallipattu, S. K. Krüppel-like factors in mammalian stem cells and development. *Development* **144**, 737–754 (2017).
202. Laouari, D. *et al.* TGF- α mediates genetic susceptibility to chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **22**, 327–335 (2011).
203. Pace, J. A. *et al.* Podocyte-specific KLF4 is required to maintain parietal epithelial cell quiescence in the kidney. *Sci Adv* **7**, eabg6600 (2021).
204. Nagata, M. Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int.* **89**, 1221–1230 (2016).
205. Lasagni, L., Lazzeri, E., Shankland, S. J., Anders, H.-J. & Romagnani, P. Podocyte Mitosis – A Catastrophe. *Curr Mol Med* **13**, 13–23 (2013).
206. Harskamp, L. R., Gansevoort, R. T., van Goor, H. & Meijer, E. The epidermal growth factor receptor pathway in chronic kidney diseases. *Nat Rev Nephrol* **12**, 496–506 (2016).
207. Terzi, F. *et al.* Targeted expression of a dominant-negative EGF-R in the kidney reduces tubulo-interstitial lesions after renal injury. *J Clin Invest* **106**, 225–234 (2000).
208. Viau, A. *et al.* Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **120**, 4065–4076 (2010).
209. Paizis, K. *et al.* Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is expressed in the adhesive lesions of experimental focal glomerular sclerosis. *Kidney Int* **55**, 2310–2321 (1999).
210. Gan, Y. *et al.* Differential roles of ERK and Akt pathways in regulation of EGFR-mediated signaling and motility in prostate cancer cells. *Oncogene* **29**, 4947–4958 (2010).
211. Floege, J., Eitner, F. & Alpers, C. E. A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *J Am Soc Nephrol* **19**, 12–23 (2008).
212. Alpers, C. E., Seifert, R. A., Hudkins, K. L., Johnson, R. J. & Bowen-Pope, D. F. PDGF-receptor localizes to mesangial, parietal epithelial, and interstitial cells in human and primate kidneys. *Kidney Int* **43**, 286–294 (1993).
213. Hudkins, K. L. *et al.* Exogenous PDGF-D is a potent mesangial cell mitogen and causes a severe mesangial proliferative glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* **15**, 286–298

(2004).

214. Matsuda, M. *et al.* Gene Expression of PDGF and PDGF Receptor in Various Forms of Glomerulonephritis. *AJN* **17**, 25–31 (1997).
215. Fujigaki, Y. *et al.* Cytokines and cell cycle regulation in the fibrous progression of crescent formation in antiglomerular basement membrane nephritis of WKY rats. *Virchows Arch* **439**, 35–45 (2001).
216. McNicholas, B. A. *et al.* Reducing mTOR augments parietal epithelial cell density in a model of acute podocyte depletion and in aged kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* **311**, F626–639 (2016).
217. Iyoda, M., Shibata, T., Kawaguchi, M., Yamaoka, T. & Akizawa, T. Preventive and therapeutic effects of imatinib in Wistar-Kyoto rats with anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Kidney Int.* **75**, 1060–1070 (2009).
218. Iyoda, M. *et al.* Long- and short-term treatment with imatinib attenuates the development of chronic kidney disease in experimental anti-glomerular basement membrane nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **28**, 576–584 (2013).
219. Cybulsky, A. V., Bonventre, J. V., Quigg, R. J., Wolfe, L. S. & Salant, D. J. Extracellular matrix regulates proliferation and phospholipid turnover in glomerular epithelial cells. *Am J Physiol* **259**, F326–337 (1990).
220. Hamatani, H. *et al.* Expression of a novel stress-inducible protein, sestrin 2, in rat glomerular parietal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **307**, F708–F717 (2014).
221. Kurayama, R. *et al.* Role of amino acid transporter LAT2 in the activation of mTORC1 pathway and the pathogenesis of crescentic glomerulonephritis. *Lab Invest* **91**, 992–1006 (2011).
222. Bendrat, K. *et al.* Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry* **36**, 15356–15362 (1997).
223. Bernhagen, J. *et al.* MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* **13**, 587–596 (2007).
224. Morand, E. F., Bucala, R. & Leech, M. Macrophage migration inhibitory factor: an emerging therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 291–299 (2003).
225. Leng, L. *et al.* MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* **197**, 1467–1476 (2003).
226. Sanchez-Niño, M. D. *et al.* MIF, CD74 and other partners in kidney disease: tales of a promiscuous couple. *Cytokine Growth Factor Rev* **24**, 23–40 (2013).
227. Djudjaj, S. *et al.* Macrophage Migration Inhibitory Factor Mediates Proliferative GN via CD74. *J Am Soc Nephrol* **27**, 1650–1664 (2016).
228. Shi, X. *et al.* CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* **25**, 595–606 (2006).
229. Sharma, S., Sirin, Y. & Susztak, K. The story of Notch and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **20**, 56–61 (2011).
230. Talora, C. *et al.* Notch signaling and diseases: an evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes. *Biochim Biophys Acta* **1782**, 489–497 (2008).
231. Niranjana, T. *et al.* The Notch pathway in podocytes plays a role in the development of glomerular disease. *Nat Med* **14**, 290–298 (2008).
232. Lasagni, L. *et al.* Notch activation differentially regulates renal progenitors proliferation and differentiation toward the podocyte lineage in glomerular disorders. *Stem Cells* **28**, 1674–1685 (2010).
233. Ueno, T. *et al.* Aberrant Notch1-dependent effects on glomerular parietal epithelial cells promotes collapsing focal segmental glomerulosclerosis with progressive podocyte loss. *Kidney Int.* **83**, 1065–1075 (2013).
234. Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X. & Zhou, B. P. The Role of Snail in EMT and

- Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets* **13**, 963–972 (2013).
235. Grande, M. T. *et al.* Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med* **21**, 989–997 (2015).
236. Swetha, G., Chandra, V., Phadnis, S. & Bhonde, R. Glomerular parietal epithelial cells of adult murine kidney undergo EMT to generate cells with traits of renal progenitors. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 396–413 (2011).
237. Nakagawa, H. *et al.* Immunohistochemical characterization of glomerular PDGF B-chain and PDGF beta-receptor expression in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* **48**, 87–98 (2000).
238. Floege, J. *et al.* Visceral glomerular epithelial cells can proliferate in vivo and synthesize platelet-derived growth factor B-chain. *Am J Pathol* **142**, 637–650 (1993).
239. Shields, J. M., Christy, R. J. & Yang, V. W. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* **271**, 20009–20017 (1996).
240. Yu, H., Pardoll, D. & Jove, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* **9**, 798–809 (2009).
241. Estrada, C. C., Maldonado, A. & Mallipattu, S. K. Therapeutic Inhibition of VEGF Signaling and Associated Nephrotoxicities. *J Am Soc Nephrol* **30**, 187–200 (2019).
242. Ritossa, F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* **1**, 97–98 (1996).
243. Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* **18**, 571–573 (1962).
244. Bakthisaran, R., Tangirala, R. & Rao, C. M. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochim Biophys Acta* **1854**, 291–319 (2015).
245. Van Montfort, R., Slingsby, C. & Vierling, E. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem* **59**, 105–156 (2001).
246. Kampinga, H. H. *et al.* Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* **14**, 105–111 (2009).
247. Kappé, G. *et al.* The human genome encodes 10 α -crystallin-related small heat shock proteins: HspB1–10. *Cell Stress Chaperones* **8**, 53–61 (2003).
248. Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K. & Buchner, J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* **268**, 1517–1520 (1993).
249. Bukach, O. V., Seit-Nebi, A. S., Marston, S. B. & Gusev, N. B. Some properties of human small heat shock protein Hsp20 (HspB6). *Eur J Biochem* **271**, 291–302 (2004).
250. Mchaourab, H. S., Dodson, E. K. & Koteiche, H. A. Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins. Two-mode binding of the excited states of T4 lysozyme mutants by alphaA-crystallin. *J Biol Chem* **277**, 40557–40566 (2002).
251. Baranova, E. V. *et al.* Three-dimensional structure of α -crystallin domain dimers of human small heat shock proteins HSPB1 and HSPB6. *J Mol Biol* **411**, 110–122 (2011).
252. Bagnéris, C. *et al.* Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20. *J Mol Biol* **392**, 1242–1252 (2009).
253. Hochberg, G. K. A. *et al.* The structured core domain of α B-crystallin can prevent amyloid fibrillation and associated toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E1562–1570 (2014).
254. Pasta, S. Y., Raman, B., Ramakrishna, T. & Rao, C. M. Role of the conserved SRLFDQFFG region of alpha-crystallin, a small heat shock protein. Effect on oligomeric size, subunit exchange, and chaperone-like activity. *J Biol Chem* **278**, 51159–51166 (2003).
255. Smulders RHPH, null *et al.* Immobilization of the C-terminal extension of bovine

- alphaA-crystallin reduces chaperone-like activity. *J Biol Chem* **271**, 29060–29066 (1996).
256. Shemetov, A. A., Seit-Nebi, A. S., Bukach, O. V. & Gusev, N. B. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits chaperone-like activity of human HSP22 in vitro. *Biochemistry (Mosc)* **73**, 200–208 (2008).
257. Arrigo, A.-P. Mammalian HspB1 (Hsp27) is a molecular sensor linked to the physiology and environment of the cell. *Cell Stress Chaperones* **22**, 517–529 (2017).
258. Rogalla, T. *et al.* Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem* **274**, 18947–18956 (1999).
259. Andley, U. P. AlphaA-crystallin R49Cneo mutation influences the architecture of lens fiber cell membranes and causes posterior and nuclear cataracts in mice. *BMC Ophthalmol* **9**, 4 (2009).
260. Kantorow, M. & Piatigorsky, J. Phosphorylations of alpha A- and alpha B-crystallin. *Int J Biol Macromol* **22**, 307–314 (1998).
261. Chen, P. *et al.* Alpha-Crystallins and Tumorigenesis. *Current Molecular Medicine* **12**, 1164–1173 (2012).
262. Deng, M. *et al.* The small heat shock protein α A-crystallin is expressed in pancreas and acts as a negative regulator of carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1802**, 621–631 (2010).
263. Arrigo, A.-P. *et al.* Hsp27 (HspB1) and α B-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Letters* **581**, 3665–3674 (2007).
264. Singh, B. N., Rao, K. S., Ramakrishna, T., Rangaraj, N. & Rao, C. M. Association of alphaB-crystallin, a small heat shock protein, with actin: role in modulating actin filament dynamics in vivo. *J Mol Biol* **366**, 756–767 (2007).
265. Arrigo, A.-P. & Gibert, B. HspB1, HspB5 and HspB4 in Human Cancers: Potent Oncogenic Role of Some of Their Client Proteins. *Cancers* **6**, 333–365 (2014).
266. Ito, H., Okamoto, K., Nakayama, H., Isobe, T. & Kato, K. Phosphorylation of α B-Crystallin in Response to Various Types of Stress *. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 29934–29941 (1997).
267. Kase, S. *et al.* alphaB-crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF. *Blood* **115**, 3398–3406 (2010).
268. Kerr, B. A. & Byzova, T. V. alphaB-crystallin: a novel VEGF chaperone. *Blood* **115**, 3181–3183 (2010).
269. Carra, S., Sivilotti, M., Chávez Zobel, A. T., Lambert, H. & Landry, J. HspB8, a small heat shock protein mutated in human neuromuscular disorders, has in vivo chaperone activity in cultured cells. *Hum Mol Genet* **14**, 1659–1669 (2005).
270. Carra, S., Brunsting, J. F., Lambert, H., Landry, J. & Kampinga, H. H. HspB8 participates in protein quality control by a non-chaperone-like mechanism that requires eIF2{alpha} phosphorylation. *J Biol Chem* **284**, 5523–5532 (2009).
271. Carra, S., Seguin, S. J. & Landry, J. HspB8 and Bag3: a new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy* **4**, 237–239 (2008).
272. Hu, Z. *et al.* Structure, function, property, and role in neurologic diseases and other diseases of the sHsp22. *Journal of Neuroscience Research* **85**, 2071–2079 (2007).
273. Fan, G.-C. *et al.* Heat shock protein 20 interacting with phosphorylated Akt reduces doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiotoxicity. *Circ Res* **103**, 1270–1279 (2008).
274. Ahmad, Md. F., Raman, B., Ramakrishna, T. & Rao, Ch. M. Effect of Phosphorylation on α B-crystallin: Differences in Stability, Subunit Exchange and Chaperone Activity of Homo and Mixed Oligomers of α B-Crystallin and its Phosphorylation-mimicking Mutant. *Journal of Molecular Biology* **375**, 1040–1051 (2008).
275. Sugiyama, Y. *et al.* Muscle develops a specific form of small heat shock protein

- complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation. *J Biol Chem* **275**, 1095–1104 (2000).
276. Xun, W. *et al.* Dual Functions in Response to Heat Stress and Spermatogenesis: Characterization of Expression Profile of Small Heat Shock Proteins 9 and 10 in Goat Testis. *Biomed Res Int* **2015**, 686239 (2015).
277. Gao, X. *et al.* At elevated temperatures, heat shock protein genes show altered ratios of different RNAs and expression of new RNAs, including several novel HSPB1 mRNAs encoding HSP27 protein isoforms. *Exp Ther Med* **22**, 900 (2021).
278. Cox, D., Selig, E., Griffin, M. D. W., Carver, J. A. & Ecroyd, H. Small Heat-shock Proteins Prevent α -Synuclein Aggregation via Transient Interactions and Their Efficacy Is Affected by the Rate of Aggregation. *J Biol Chem* **291**, 22618–22629 (2016).
279. Alderson, T. R. *et al.* Local unfolding of the HSP27 monomer regulates chaperone activity. *Nature Communications* **10**, 1068 (2019).
280. Kostenko, S. & Moens, U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3289–3307 (2009).
281. Dierick, I. *et al.* Genetic variant in the HSPB1 promoter region impairs the HSP27 stress response. *Human Mutation* **28**, 830–830 (2007).
282. Jiang, Q. *et al.* Defective heat shock factor 1 inhibits the growth of fibrosarcoma derived from simian virus 40/T antigen-transformed MEF cells. *Mol Med Rep* **12**, 6517–6526 (2015).
283. Mehlen, P., Hickey, E., Weber, L. A. & Arrigo, A. P. Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells. *Biochem Biophys Res Commun* **241**, 187–192 (1997).
284. Diaz-Latoud, C., Buache, E., Javouhey, E. & Arrigo, A.-P. Substitution of the unique cysteine residue of murine Hsp25 interferes with the protective activity of this stress protein through inhibition of dimer formation. *Antioxid Redox Signal* **7**, 436–445 (2005).
285. Jovceviski, B. *et al.* Phosphomimics Destabilize Hsp27 Oligomeric Assemblies and Enhance Chaperone Activity. *Chemistry & Biology* **22**, 186–195 (2015).
286. Nappi, L. *et al.* Ivermectin inhibits HSP27 and potentiates efficacy of oncogene targeting in tumor models. *J Clin Invest* **130**, 699–714 (2020).
287. Hollander, J. M. *et al.* Overexpression of wild-type heat shock protein 27 and a nonphosphorylatable heat shock protein 27 mutant protects against ischemia/reperfusion injury in a transgenic mouse model. *Circulation* **110**, 3544–3552 (2004).
288. Lavoie, J. N., Lambert, H., Hickey, E., Weber, L. A. & Landry, J. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* **15**, 505–516 (1995).
289. Suga, H. *et al.* Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal pathway in vasopressin-induced HSP27 phosphorylation in aortic smooth muscle A10 cells. *Arch Biochem Biophys* **438**, 137–145 (2005).
290. Geum, D., Son, G. H. & Kim, K. Phosphorylation-dependent Cellular Localization and Thermoprotective Role of Heat Shock Protein 25 in Hippocampal Progenitor Cells *. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 19913–19921 (2002).
291. Cairns, J., Qin, S., Philp, R., Tan, Y. H. & Guy, G. R. Dephosphorylation of the small heat shock protein Hsp27 in vivo by protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **269**, 9176–9183 (1994).
292. Ge, H. *et al.* SUMOylation of HSP27 by small ubiquitin-like modifier 2/3 promotes proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Biol Ther* **18**, 552–559 (2017).

293. Heiden, M. G. V. & DeBerardinis, R. J. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. *Cell* **168**, 657–669 (2017).
294. Brouwers, O. *et al.* Overexpression of Glyoxalase-I Reduces Hyperglycemia-induced Levels of Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Diabetic Rats *. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 1374–1380 (2011).
295. Oya-Ito, T., Liu, B.-F. & Nagaraj, R. H. Effect of methylglyoxal modification and phosphorylation on the chaperone and anti-apoptotic properties of heat shock protein 27. *J Cell Biochem* **99**, 279–291 (2006).
296. Bellier, J. *et al.* Methylglyoxal Scavengers Resensitize KRAS-Mutated Colorectal Tumors to Cetuximab. *Cell Reports* **30**, 1400–1416.e6 (2020).
297. Chi, K. N. *et al.* PACIFIC trial: A randomized phase II study of apatersen and abiraterone in patients (Pts) with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) who have had PSA progression while receiving abiraterone (ABI). *JCO* **35**, 146–146 (2017).
298. Rosenberg, J. E. *et al.* Apatersen plus docetaxel versus docetaxel alone in platinum-resistant metastatic urothelial carcinoma (Borealis-2). *Br J Cancer* **118**, 1434–1441 (2018).
299. Spigel, D. R. *et al.* A Randomized, Double-Blinded, Phase II Trial of Carboplatin and Pemetrexed with or without Apatersen (OGX-427) in Patients with Previously Untreated Stage IV Non-Squamous-Non-Small-Cell Lung Cancer: The SPRUCE Trial. *Oncologist* **24**, e1409–e1416 (2019).
300. Sevin, M. *et al.* HSP27 is a partner of JAK2-STAT5 and a potential therapeutic target in myelofibrosis. *Nat Commun* **9**, 1431 (2018).
301. Wettstein, G. *et al.* Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB J.* **27**, 1549–1560 (2013).
302. Kammoun, M. *et al.* The Invalidation of HspB1 Gene in Mouse Alters the Ultrastructural Phenotype of Muscles. *PLoS ONE* **11**, e0158644 (2016).
303. Crowe, J. *et al.* Heat Shock Protein B1-Deficient Mice Display Impaired Wound Healing. *PLOS ONE* **8**, e77383 (2013).
304. Stetler, R. A. *et al.* Hsp27 protects against ischemic brain injury via attenuation of a novel stress-response cascade upstream of mitochondrial cell death signaling. *J Neurosci* **28**, 13038–13055 (2008).
305. Shi, Y. *et al.* Endothelium-targeted overexpression of heat shock protein 27 ameliorates blood-brain barrier disruption after ischemic brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E1243–E1252 (2017).
306. Ehrnsperger, M., Gaestel, M. & Buchner, J. Analysis of chaperone properties of small Hsp's. *Methods Mol Biol* **99**, 421–429 (2000).
307. Ehrnsperger, M., Lilie, H., Gaestel, M. & Buchner, J. The dynamics of Hsp25 quaternary structure. Structure and function of different oligomeric species. *J Biol Chem* **274**, 14867–14874 (1999).
308. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Milzani, A., Di Simplicio, P. & Colombo, R. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radic Biol Med* **31**, 1624–1632 (2001).
309. Paul, C. *et al.* Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol* **22**, 816–834 (2002).
310. Voll, E. A. *et al.* Heat shock protein 27 regulates human prostate cancer cell motility and metastatic progression. *Oncotarget* **5**, 2648–2663 (2014).
311. Kamada, M. *et al.* Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther* **6**, 299–308 (2007).
312. Wang, J. *et al.* Her2 promotes early dissemination of breast cancer by suppressing the p38-MK2-Hsp27 pathway that is targetable by Wip1 inhibition. *Oncogene* **39**, 6313–6326

(2020).

313. Belkacemi, L. & Hebb, M. O. HSP27 knockdown produces synergistic induction of apoptosis by HSP90 and kinase inhibitors in glioblastoma multiforme. *Anticancer Res* **34**, 4915–4927 (2014).
314. Sheng, B. *et al.* Increased HSP27 correlates with malignant biological behavior of non-small cell lung cancer and predicts patient's survival. *Sci Rep* **7**, 13807 (2017).
315. Lampros, M., Vlachos, N., Voulgaris, S. & Alexiou, G. A. The Role of Hsp27 in Chemotherapy Resistance. *Biomedicines* **10**, 897 (2022).
316. Garrido, C. *et al.* HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res* **57**, 2661–2667 (1997).
317. Choi, S.-K., Kam, H., Kim, K.-Y., Park, S. I. & Lee, Y.-S. Targeting Heat Shock Protein 27 in Cancer: A Druggable Target for Cancer Treatment? *Cancers* **11**, 1195 (2019).
318. Garrido, C. *et al.* HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J* **13**, 2061–2070 (1999).
319. Charette, S. J. & Landry, J. The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **926**, 126–131 (2000).
320. Kim, E.-H. *et al.* Inhibition of heat shock protein 27-mediated resistance to DNA damaging agents by a novel PKC delta-V5 heptapeptide. *Cancer Res* **67**, 6333–6341 (2007).
321. Shiota, M. *et al.* Hsp27 regulates epithelial mesenchymal transition, metastasis, and circulating tumor cells in prostate cancer. *Cancer Res.* **73**, 3109–3119 (2013).
322. Z, F., W, L. & L, L. HSP27 promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of the β -catenin/MMP3 pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Translational cancer research* **8**, (2019).
323. Cordonnier, T. *et al.* Hsp27 regulates EGF/ β -catenin mediated epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer. *Int. J. Cancer* **136**, E496-507 (2015).
324. Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* **19**, 156–172 (2009).
325. Mizutani, H. *et al.* HSP27 modulates epithelial to mesenchymal transition of lung cancer cells in a Smad-independent manner. *Oncol Lett* **1**, 1011–1016 (2010).
326. Chen, W. *et al.* HSP27 associates with epithelial–mesenchymal transition, stemness and radioresistance of salivary adenoid cystic carcinoma. *J Cell Mol Med* **22**, 2283–2298 (2018).
327. Liu, Y. *et al.* Long noncoding RNA BX357664 regulates cell proliferation and epithelial-to-mesenchymal transition via inhibition of TGF- β 1/p38/HSP27 signaling in renal cell carcinoma. *Oncotarget* **7**, 81410–81422 (2016).
328. Kanagasabai, R. *et al.* Hsp27 protects adenocarcinoma cells from UV-induced apoptosis by Akt and p21-dependent pathways of survival. *Mol. Cancer Res.* **8**, 1399–1412 (2010).
329. Xu, Y. *et al.* Phosphorylated Hsp27 activates ATM-dependent p53 signaling and mediates the resistance of MCF-7 cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Cell. Signal.* **25**, 1176–1185 (2013).
330. O'Callaghan-Sunol, C., Gabai, V. L. & Sherman, M. Y. Hsp27 modulates p53 signaling and suppresses cellular senescence. *Cancer Res* **67**, 11779–11788 (2007).
331. Hayashi, N. *et al.* Hsp27 silencing coordinately inhibits proliferation and promotes Fas-induced apoptosis by regulating the PEA-15 molecular switch. *Cell Death Differ.* **19**, 990–1002 (2012).
332. Arrigo, A.-P. *et al.* Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid Redox Signal* **7**, 414–422 (2005).
333. Cybulsky, A. V. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and

- autophagy in kidney diseases. *Nat Rev Nephrol* **13**, 681–696 (2017).
334. Chen, X. & Cubillos-Ruiz, J. R. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nat Rev Cancer* **21**, 71–88 (2021).
335. Kumano, M. *et al.* Co-targeting stress-activated Hsp27 and autophagy as a combinatorial strategy to amplify endoplasmic reticular stress in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* **11**, 1661–1671 (2012).
336. Lamoureux, F. *et al.* Suppression of heat shock protein 27 using OGX-427 induces endoplasmic reticulum stress and potentiates heat shock protein 90 inhibitors to delay castrate-resistant prostate cancer. *Eur. Urol.* **66**, 145–155 (2014).
337. Lelj-Garolla, B. *et al.* Hsp27 Inhibition with OGX-427 Sensitizes Non-Small Cell Lung Cancer Cells to Erlotinib and Chemotherapy. *Mol Cancer Ther* **14**, 1107–1116 (2015).
338. Yu, E. Y. *et al.* A randomized phase 2 study of a HSP27 targeting antisense, apatosen with prednisone versus prednisone alone, in patients with metastatic castration resistant prostate cancer. *Invest New Drugs* **36**, 278–287 (2018).
339. Ko, A. H. *et al.* A Randomized, Double-Blinded, Phase II Trial of Gemcitabine and Nab-Paclitaxel Plus Apatosen or Placebo in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer: The RAINIER Trial. *Oncologist* **22**, 1427–e129 (2017).
340. Baylot, V. *et al.* OGX-427 inhibits tumor progression and enhances gemcitabine chemotherapy in pancreatic cancer. *Cell Death Dis* **2**, e221 (2011).
341. Keefe, A. D., Pai, S. & Ellington, A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 537–550 (2010).
342. Seigneuric, R., Gobbo, J., Colas, P. & Garrido, C. Targeting cancer with peptide aptamers. *Oncotarget* **2**, 557–561 (2011).
343. Gibert, B. *et al.* Inhibition of heat shock protein 27 (HspB1) tumorigenic functions by peptide aptamers. *Oncogene* **30**, 3672–3681 (2011).
344. Hosokawa, N. *et al.* Inhibition of the activation of heat shock factor in vivo and in vitro by flavonoids. *Mol Cell Biol* **12**, 3490–3498 (1992).
345. Nagai, N., Nakai, A. & Nagata, K. Quercetin suppresses heat shock response by down regulation of HSF1. *Biochem Biophys Res Commun* **208**, 1099–1105 (1995).
346. Russo, M. *et al.* CK2 and PI3K are direct molecular targets of quercetin in chronic lymphocytic leukaemia. *Oncotarget* **8**, 42571–42587 (2017).
347. Heinrich, J.-C., Tuukkanen, A., Schroeder, M., Fahrig, T. & Fahrig, R. RP101 (brivudine) binds to heat shock protein HSP27 (HSPB1) and enhances survival in animals and pancreatic cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* **137**, 1349–1361 (2011).
348. Campbell, W. C., Fisher, M. H., Stapley, E. O., Albers-Schönberg, G. & Jacob, T. A. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* **221**, 823–828 (1983).
349. Park, A.-M. *et al.* Heat Shock Protein 27 Plays a Pivotal Role in Myofibroblast Differentiation and in the Development of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *PLoS ONE* **11**, e0148998 (2016).
350. Boutet, A. *et al.* Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J* **25**, 5603–5613 (2006).
351. Kim, J.-Y. *et al.* HSP27 inhibitor attenuates radiation-induced pulmonary inflammation. *Sci Rep* **8**, 4189 (2018).
352. Kim, J.-Y. *et al.* The Hsp27-Mediated I κ B α -NF κ B Signaling Axis Promotes Radiation-Induced Lung Fibrosis. *Clin Cancer Res* **25**, 5364–5375 (2019).
353. Murakami, T. & Sunada, Y. Schwann Cell and the Pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Adv Exp Med Biol* **1190**, 301–321 (2019).
354. Ackerley, S. *et al.* A mutation in the small heat-shock protein HSPB1 leading to distal hereditary motor neuropathy disrupts neurofilament assembly and the axonal transport of specific cellular cargoes. *Hum Mol Genet* **15**, 347–354 (2006).

355. Almeida-Souza, L. *et al.* Small heat-shock protein HSPB1 mutants stabilize microtubules in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *J Neurosci* **31**, 15320–15328 (2011).
356. Almeida-Souza, L. *et al.* Increased monomerization of mutant HSPB1 leads to protein hyperactivity in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *J Biol Chem* **285**, 12778–12786 (2010).
357. Yoshimura, A. *et al.* Genetic profile and onset features of 1005 patients with Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **90**, 195–202 (2019).
358. Muranova, L. K., Sudnitsyna, M. V., Strelkov, S. V. & Gusev, N. B. Mutations in HspB1 and hereditary neuropathies. *Cell Stress Chaperones* **25**, 655–665 (2020).
359. d'Ydewalle, C. *et al.* HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* **17**, 968–974 (2011).
360. Kalmar, B. *et al.* Mitochondrial deficits and abnormal mitochondrial retrograde axonal transport play a role in the pathogenesis of mutant Hsp27-induced Charcot Marie Tooth Disease. *Hum Mol Genet* **26**, 3313–3326 (2017).
361. Holmgren, A. *et al.* Charcot-Marie-Tooth causing HSPB1 mutations increase Cdk5-mediated phosphorylation of neurofilaments. *Acta Neuropathol* **126**, 93–108 (2013).
362. O'Neill, S., Ingman, T. G., Wigmore, S. J., Harrison, E. M. & Bellamy, C. O. Differential expression of heat shock proteins in healthy and diseased human renal allografts. *Ann Transplant* **18**, 550–557 (2013).
363. Sanchez-Niño, M. D. *et al.* HSP27/HSPB1 as an adaptive podocyte antiapoptotic protein activated by high glucose and angiotensin II. *Lab. Invest.* **92**, 32–45 (2012).
364. Agrawal, S., Guess, A. J., Chanley, M. A. & Smoyer, W. E. Albumin-induced podocyte injury and protection are associated with regulation of COX-2. *Kidney International* **86**, 1150–1160 (2014).
365. Shi, Y. *et al.* Rapid endothelial cytoskeletal reorganization enables early blood-brain barrier disruption and long-term ischaemic reperfusion brain injury. *Nat Commun* **7**, 10523 (2016).
366. Chen, S. W. C. *et al.* Mice that overexpress human heat shock protein 27 have increased renal injury following ischemia reperfusion. *Kidney Int* **75**, 499–510 (2009).
367. Kim, M. *et al.* Kidney-specific reconstitution of the A1 adenosine receptor in A1 adenosine receptor knockout mice reduces renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* **75**, 809–823 (2009).
368. Kim, M. *et al.* Selective renal overexpression of human heat shock protein 27 reduces renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* **299**, F347–358 (2010).
369. Vidyasagar, A., Reese, S., Acun, Z., Hullett, D. & Djamali, A. HSP27 is involved in the pathogenesis of kidney tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F707–F716 (2008).
370. Vidyasagar, A. *et al.* Tubular expression of heat-shock protein 27 inhibits fibrogenesis in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* **83**, 84–92 (2013).
371. Dai, T. *et al.* Glucose and diabetes: effects on podocyte and glomerular p38MAPK, heat shock protein 25, and actin cytoskeleton. *Kidney Int* **69**, 806–814 (2006).
372. Smoyer, W. E., Gupta, A., Mundel, P., Ballew, J. D. & Welsh, M. J. Altered expression of glomerular heat shock protein 27 in experimental nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.* **97**, 2697–2704 (1996).
373. Smoyer, W. E. & Ransom, R. F. Hsp27 regulates podocyte cytoskeletal changes in an in vitro model of podocyte process retraction. *FASEB J* **16**, 315–326 (2002).
374. Kainuma, S. *et al.* Heat shock protein 27 (HSPB1) suppresses the PDGF-BB-induced migration of osteoblasts. *Int J Mol Med* **40**, 1057–1066 (2017).
375. Yamaguchi, H. *et al.* Altered PDGF-BB-Induced p38 MAP Kinase Activation in Diabetic Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24**, 2095–2101 (2004).

376. Moghal, N. & Sternberg, P. W. Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 190–196 (1999).
377. Yammine, L., Zablocki, A., Baron, W., Terzi, F. & Gallazzini, M. Lipocalin-2 Regulates Epidermal Growth Factor Receptor Intracellular Trafficking. *Cell Rep* **29**, 2067–2077.e6 (2019).
378. Roepstorff, K. *et al.* Differential Effects of EGFR Ligands on Endocytic Sorting of the Receptor. *Traffic* **10**, 1115–1127 (2009).
379. Lavoie, J. N., Gingras-Breton, G., Tanguay, R. M. & Landry, J. Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization. *J Biol Chem* **268**, 3420–3429 (1993).
380. Landry, J., Chrétien, P., Lambert, H., Hickey, E. & Weber, L. A. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J. Cell Biol.* **109**, 7–15 (1989).
381. Mairesse, N. *et al.* Expression of HSP27 results in increased sensitivity to tumor necrosis factor, etoposide, and H₂O₂ in an oxidative stress-resistant cell line. *J Cell Physiol* **177**, 606–617 (1998).
382. Piotrowicz, R. S., Hickey, E. & Levin, E. G. Heat shock protein 27 kDa expression and phosphorylation regulates endothelial cell migration. *FASEB J* **12**, 1481–1490 (1998).
383. Horman, S., Fokan, D., Mosselmans, R., Mairesse, N. & Galand, P. Anti-sense inhibition of small-heat-shock-protein (HSP27) expression in MCF-7 mammary-carcinoma cells induces their spontaneous acquisition of a secretory phenotype. *Int J Cancer* **82**, 574–582 (1999).
384. Park, J.-H. *et al.* TAT-Hsp27 promotes adhesion and migration of murine dental papilla-derived MDPC-23 cells through beta1 integrin-mediated signaling. *Int J Mol Med* **26**, 373–378 (2010).
385. Han, L., Jiang, Y., Han, D. & Tan, W. Hsp27 regulates epithelial mesenchymal transition, metastasis and proliferation in colorectal carcinoma. *Oncol Lett* **16**, 5309–5316 (2018).
386. Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R. & Derynck, R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* **127**, 2021–2036 (1994).
387. Song, C. Y., Kim, B. C., Hong, H. K. & Lee, H. S. TGF-beta type II receptor deficiency prevents renal injury via decrease in ERK activity in crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* **71**, 882–888 (2007).
388. Zhou, A. *et al.* Blockade of TGF-beta action ameliorates renal dysfunction and histologic progression in anti-GBM nephritis. *Kidney Int* **64**, 92–101 (2003).
389. Liu, Z., Liu, Y., Long, Y., Liu, B. & Wang, X. Role of HSP27 in the multidrug sensitivity and resistance of colon cancer cells. *Oncology Letters* **19**, 2021 (2020).
390. Park, A.-M., Tsunoda, I. & Yoshie, O. Heat shock protein 27 promotes cell cycle progression by down-regulating E2F transcription factor 4 and retinoblastoma family protein p130. *J Biol Chem* **293**, 15815–15826 (2018).
391. Xie, K. *et al.* Yes-associated protein regulates podocyte cell cycle re-entry and dedifferentiation in adriamycin-induced nephropathy. *Cell Death Dis* **10**, 1–15 (2019).
392. Marshall, C. B., Krofft, R. D., Pippin, J. W. & Shankland, S. J. CDK inhibitor p21 is prosurvival in adriamycin-induced podocyte injury, in vitro and in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* **298**, F1140–F1151 (2010).
393. Wu, J. *et al.* Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends Pharmacol Sci* **38**, 226–256 (2017).
394. Acunzo, J., Katsogiannou, M. & Rocchi, P. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), α B-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. *Int J*

Biochem Cell Biol **44**, 1622–1631 (2012).

395. Voss, O. H. *et al.* Binding of Caspase-3 Prodomain to Heat Shock Protein 27 Regulates Monocyte Apoptosis by Inhibiting Caspase-3 Proteolytic Activation *. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 25088–25099 (2007).
396. Lan, H. Y., Nikolic-Paterson, D. J., Mu, W. & Atkins, R. C. Local macrophage proliferation in the pathogenesis of glomerular crescent formation in rat anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol* **110**, 233–240 (1997).
397. Lan, H. Y., Nikolic-Paterson, D. J., Mu, W., Vannice, J. L. & Atkins, R. C. Interleukin-1 receptor antagonist halts the progression of established crescentic glomerulonephritis in the rat. *Kidney Int* **47**, 1303–1309 (1995).
398. Bouchard, M., Souabni, A. & Busslinger, M. Tissue-specific expression of cre recombinase from the Pax8 locus. *Genesis* **38**, 105–109 (2004).
399. Koni, P. A. *et al.* Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J Exp Med* **193**, 741–754 (2001).
400. Moeller, M. J., Sanden, S. K., Soofi, A., Wiggins, R. C. & Holzman, L. B. Podocyte-specific expression of cre recombinase in transgenic mice. *Genesis* **35**, 39–42 (2003).
401. Zheng, Z., Pavlidis, P., Chua, S., D'Agati, V. D. & Gharavi, A. G. An ancestral haplotype defines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the laboratory mouse. *J Am Soc Nephrol* **17**, 1796–1800 (2006).
402. Podyacheva, E. Y., Kushnareva, E. A., Karpov, A. A. & Toropova, Y. G. Analysis of Models of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats and Mice. A Modern View From the Perspective of the Pathophysiologist and the Clinician. *Front Pharmacol* **12**, 670479 (2021).
403. Ramani, S. & Park, S. HSP27 role in cardioprotection by modulating chemotherapeutic doxorubicin-induced cell death. *J Mol Med* **99**, 771–784 (2021).
404. Venkatakrishnan, C. D. *et al.* HSP27 regulates p53 transcriptional activity in doxorubicin-treated fibroblasts and cardiac H9c2 cells: p21 upregulation and G2/M phase cell cycle arrest. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **294**, H1736–H1744 (2008).
405. Wilkinson, E. L., Sidaway, J. E. & Cross, M. J. Cardiotoxic drugs Herceptin and doxorubicin inhibit cardiac microvascular endothelial cell barrier formation resulting in increased drug permeability. *Biol Open* **5**, 1362–1370 (2016).
406. Jahn, S. K. *et al.* Distinct influence of the anthracycline derivative doxorubicin on the differentiation efficacy of mESC-derived endothelial progenitor cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1867**, 118711 (2020).
407. Sun, Z. *et al.* The TGF- β pathway mediates doxorubicin effects on cardiac endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* **90**, 129–138 (2016).
408. Lenoir, O., Tharaux, P.-L. & Huber, T. B. Autophagy in kidney disease and aging: lessons from rodent models. *Kidney Int* **90**, 950–964 (2016).
409. Dikic, I. & Elazar, Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 349–364 (2018).
410. Moktefi, A. *et al.* Repression of CMIP transcription by WT1 is relevant to podocyte health. *Kidney Int.* **90**, 1298–1311 (2016).
411. Ferrara, N., Gerber, H.-P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**, 669–676 (2003).
412. Apte, R. S., Chen, D. S. & Ferrara, N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* **176**, 1248–1264 (2019).
413. Muhl, L. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-B and its receptor (VEGFR1) in murine heart, lung and kidney. *Cell Tissue Res* **365**, 51–63 (2016).
414. Dimke, H. *et al.* Tubulovascular Cross-Talk by Vascular Endothelial Growth Factor A

- Maintains Peritubular Microvasculature in Kidney. *JASN* **26**, 1027–1038 (2015).
415. Shalaby, F. *et al.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62–66 (1995).
416. Sison, K. *et al.* Glomerular structure and function require paracrine, not autocrine, VEGF-VEGFR-2 signaling. *J Am Soc Nephrol* **21**, 1691–1701 (2010).
417. Eremina, V. *et al.* VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* **358**, 1129–1136 (2008).
418. Sawada, J., Li, F. & Komatsu, M. R-Ras Inhibits VEGF-Induced p38MAPK Activation and HSP27 Phosphorylation in Endothelial Cells. *J Vasc Res* **52**, 347–359 (2015).
419. Thuringer, D. *et al.* Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. *FASEB J* **27**, 4169–4183 (2013).
420. Straume, O. *et al.* Suppression of heat shock protein 27 induces long-term dormancy in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 8699–8704 (2012).
421. Crisostomo, P. R. *et al.* Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C675-682 (2008).
422. Parcellier, A. *et al.* HSP27 Is a Ubiquitin-Binding Protein Involved in I- κ B α Proteasomal Degradation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5790–5802 (2003).
423. Rocchi, P. *et al.* Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis. *Cancer Res.* **65**, 11083–11093 (2005).
424. Xu, Q. *et al.* Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene* **24**, 5552–5560 (2005).
425. Guo, H. *et al.* Functional promoter -1271G>C variant of HSPB1 predicts lung cancer risk and survival. *J Clin Oncol* **28**, 1928–1935 (2010).
426. Morris, A. D., Rowbottom, A. W., Martin, F. L., Woywodt, A. & Dhaygude, A. P. Biomarkers in ANCA-Associated Vasculitis: Potential Pitfalls and Future Prospects. *Kidney360* **2**, 586–597 (2021).
427. Nachman, P. H., Hogan, S. L., Jennette, J. C. & Falk, R. J. Treatment response and relapse in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated microscopic polyangiitis and glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* **7**, 33–39 (1996).
428. Berden, A. E. *et al.* Histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* **21**, 1628–1636 (2010).
429. Brix, S. R. *et al.* Development and validation of a renal risk score in ANCA-associated glomerulonephritis. *Kidney Int* **94**, 1177–1188 (2018).
430. Boudhabhay, I. *et al.* Reappraisal of Renal Arteritis in ANCA-associated Vasculitis: Clinical Characteristics, Pathology, and Outcome. *JASN* **32**, 2362–2374 (2021).
431. Yumura, W. *et al.* Assessment of the Birmingham vasculitis activity score in patients with MPO-ANCA-associated vasculitis: sub-analysis from a study by the Japanese Study Group for MPO-ANCA-associated vasculitis. *Mod Rheumatol* **24**, 304–309 (2014).
432. Chen, M., Wang, F. & Zhao, M.-H. Circulating neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a useful biomarker for assessing disease activity of ANCA-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* **48**, 355–358 (2009).
433. Hirsh, V. Managing treatment-related adverse events associated with egfr tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol* **18**, 126–138 (2011).
434. Miesen, L. *et al.* Establishment and characterization of a novel conditionally immortalized human parietal epithelial cell line. *Experimental Cell Research* **405**, 112712 (2021).

TRAVAUX ANNEXES

Réponse humorale secondaire aux SARS-CoV-2 chez les patients en insuffisance rénale chronique terminale dialysée

Au cours de la pandémie due au virus SARS-CoV-2, nous avons observé une mortalité accrue chez les patients en insuffisance rénale chronique terminale comparée à la population générale¹. En effet ces patients sont connus comme ayant une immunodéficience secondaire à la maladie rénale (Secondary Immunodeficiency Related to Kidney Disease : SIDKD) avec un surrisque de complications infectieuses et de réponse vaccinale insuffisante².

Dans le contexte de la pandémie COVID-19 et au vu des données initiales sur la mortalité des dialysés, l'équipe de recherche auquel j'étais affilié, en collaboration avec l'équipe de virologie de l'hôpital Henri-Mondor et de l'EFS s'est recentrée sur la réponse humorale dans les suites de l'infection à SARS-CoV-2 ainsi qu'au décours de la vaccination à travers l'étude de la sérologie anti-SARS-CoV-2 et de la réponse mémoire B dans le but d'adapter la prise en charge de la population des dialysés. Dans ce cadre-là, j'ai participé au sein du laboratoire à l'étude dans un premier temps du suivi sérologique des patients infectés par le COVID-19. Nous avons montré après analyse multivariée l'importance de l'immunodépression dans la réponse sérologique et étudier les facteurs associés à la vitesse de décroissance des anticorps anti-SARS-CoV-2.

Dans une seconde phase, chez les patients dialysés, j'ai contribué à montrer que la réponse immunitaire post vaccinale chez les dialysés par dosage des anticorps anti-SARS-CoV-2 et par étude des B mémoires offraient une réponse immunitaire efficace chez les dialysés, notamment chez les patients précédemment infectés par le COVID-19.

¹ Chawki et al. *Kidney International* 2021

² Steiger et al. *JASN* 2021

Kinetics of Anti-SARS-CoV-2 IgG Antibodies in Hemodialysis Patients Six Months after Infection. J Am Soc Nephrol. 2021 May

Sakhi H, Dahmane D, Attias P, Kofman T, Bouvier M, Lapidus N, Fourati S, El Karoui K

Background The humoral response against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in the hemodialysis population, including its dynamics over time, remains poorly understood.

Methods To analyze initial and long-term humoral responses against SARS-CoV-2 in a hemodialysis population, we retrospectively evaluated findings from SARS-CoV-2 IgG serologic assays targeting the nucleocapsid antigen or spike antigen up to 6 months of follow-up in patients on hemodialysis in the Paris, France, region who had recovered from coronavirus disease 2019 (COVID-19).

Results Our analysis included 83 patients (median age 65 years); 59 (71%) were male and 28 (34%) had presented with severe COVID-19. We observed positive initial SARS-CoV-2 IgG antinucleocapsid serology in 74 patients (89%) at a median of 67 days postdiagnosis. By multivariable analysis, immunocompromised status was the only factor significantly associated with lack of an IgG antinucleocapsid antibody response. Follow-up data were available at 6 months postdiagnosis for 60 of 74 patients (81%) with positive initial antinucleocapsid serology, and 15 (25%) of them had negative antinucleocapsid serology at month 6. In total, 14 of 15 sera were tested for antispikes antibodies, 3 of 14 (21%) of which were also negative. Overall, 97% of antinucleocapsid-antibody-positive specimens were also antispikes-antibody positive. Female sex, age >70 years, and nonsevere clinical presentation were independently associated with faster IgG antinucleocapsid titer decay in multivariable analysis. After adjustment for sex and age >70 years, nonsevere clinical presentation was the only factor associated with faster decay of IgG antispikes antibodies.

Conclusions This study characterizes evolution of the SARS-CoV-2 antibody response in patients on hemodialysis and identifies factors that are associated with lack of seroconversion and with IgG titer decay.

Immune Responses after a Third Dose of mRNA Vaccine Differ in Virus-Naive versus SARS-CoV-2-Recovered Dialysis Patients. Clin J Am Soc Nephrol. 2022 Jul

Attias P, Azzaoui I, El Karoui K, de La Selle A, Sokal A, Chappert P, Grimbert P, Fernandez I, Bouvier M, Samson C, Dahmane D, Rieu P, Nizard P, Fourati S, **Sakhi H***, Mahévas M*

Background and objectives After two doses of mRNA vaccine against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), patients on dialysis show a defective humoral response, but a third dose could increase anti-SARS-CoV-2 spike IgG titers. Responses could be different in virus-naive and SARS-CoV-2-recovered patients on dialysis. However, characterization of memory B cell response after three doses is lacking.

Design, setting, participants, & measurements We evaluated the dynamics of antireceptor binding domain IgG titers and antireceptor binding domain memory B cells until 6 months after two and three doses (administered within 6 months after the second dose) of mRNA vaccine in SARS-CoV-2-recovered and virus-naive dialysis populations. Results were analyzed by ordinary one-way ANOVA, the Kruskal–Wallis test, or the Wilcoxon matched-pairs test as appropriate.

Results In total, 108 individuals (59 patients on dialysis and 49 controls) were included. In virus-naive patients on dialysis, antireceptor binding domain IgG response was quantitatively lower after two doses compared with healthy controls, but IgG titers increased by three-fold after three doses ($P=0.008$). In SARS-CoV-2-recovered patients on dialysis, antireceptor binding domain IgG titers after two doses were significantly higher compared with virus-naive patients on dialysis but did not significantly increase after a third dose. Regarding memory B cell response, we detected receptor binding domain-specific memory B cells at similar proportions in virus-naive patients on dialysis and vaccinated controls after two doses. Moreover, a strong receptor binding domain-specific memory B cell expansion was observed after the third dose in virus-naive patients on dialysis (5.5-fold; $P<0.001$). However, in SARS-CoV-2-recovered patients on dialysis, antireceptor binding domain memory B cells remained unchanged after the third dose.

Conclusions The third dose of mRNA vaccine given within 6 months after the second dose boosts serologic and memory response in virus-naive patients but not in SARS-CoV-2-recovered patients on dialysis

