

UNIVERSITE DE LIMOGES

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE - SANTÉ

FACULTÉ DE MÉDECINE

INSERM UMR-S850 - « Pharmacologie des immunosuppresseurs en transplantation »

Thèse N° []

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline: Pharmacologie

Présentée et soutenue par

Fabien LAMOUREUX

Le 2 novembre 2011

**Étude protéomique des modifications phénotypiques des
cellules rénales exposées aux immunosuppresseurs
inhibiteurs de la calcineurine**

Thèse co-dirigée par les Professeurs Marie ESSIG et Louis-Noël GASTINEL

JURY :

Monsieur le Professeur Olivier LAPREVOTE	Président
Monsieur le Docteur Joost Peter SCHANSTRA	Rapporteur
Monsieur le Professeur Dany ANGLICHEAU	Rapporteur
Monsieur le Professeur Louis-Noël GASTINEL	Directeur de Thèse
Madame le Professeur Marie ESSIG	Directeur de Thèse

A Stéphanie...

... A nos filles, Jeanne et Adèle

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Olivier Laprèvote

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de présider ce jury de thèse et c'est un honneur de vous compter parmi nous. J'ai été très sensible à l'intérêt que vous portez pour l'analyse par spectrométrie de masse, en particulier l'imagerie que nous avons découverte grâce à vous. Votre regard d'expert sur ce travail compte beaucoup pour nous.

A Messieurs les Docteurs Joost-Peter Schanstra et Dany Anglicheau

Je vous remercie sincèrement de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail de thèse en acceptant d'en être rapporteurs. Nous apprécions vos compétences respectives dans les domaines de la recherche de biomarqueurs, de l'étude des mécanismes responsables de la fibrose rénale et des mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine. C'est un grand honneur que vous nous faites en participant ce jury.

Aux Professeurs Marie Essig et Louis-Noël Gastinel

Je vous remercie pour votre encadrement et votre disponibilité au cours de ces trois années de thèse. Vous m'avez fait partager vos compétences et votre savoir-faire dont la complémentarité nous ont permis de faire avancer ce travail. Cela a été un grand plaisir de travailler avec vous.

A Monsieur le Professeur Pierre Marquet

Je vous remercie vivement pour la confiance que vous m'avez accordée et pour la formation dont j'ai pu bénéficier au cours de mon internat dans le Laboratoire de Pharmacologie, Toxicologie – Pharmacovigilance du CHU de Limoges ainsi que pendant ces années de recherche dans l'unité Inserm 850. Je quitte cette unité avec le sentiment d'avoir beaucoup appris et évolué à vos côtés. Merci pour votre disponibilité, votre rigueur et vos compétences... longue vie à l'unité Inserm 850.

Au Professeur Christian Thuillez et au Docteur Patricia Compagnon

Je vous remercie sincèrement pour votre aide et la confiance que vous m'avez accordée en me proposant de travailler à vos côtés dans le Laboratoire de Pharmacologie du CHU de Rouen. A notre collaboration que je souhaite durable et fructueuse.

Au Docteur Franck Saint-Marcoux

Merci vivement pour la formation de qualité et l'aide précieuse que tu m'as apportées, avec toujours beaucoup de disponibilité et de sympathie, durant huit années à Limoges.

Au Docteur Nicolas Picard

C'est toujours un grand plaisir et très agréable de travailler avec toi. Je te remercie de m'avoir fait partager tes connaissances et ta passion contagieuse pour la Pharmacogénétique. Merci également pour tes conseils avisés et ta sympathie, ne change rien.

Au Docteur Jean-Baptiste Woillard

A mon ami, co-interne et partenaire de « sport-études doctorat ». Je te remercie pour ta gentillesse, ton soutien et tes conseils de statisticien maintenant émérite au cours de ces longues années d'études que nous avons partagées quotidiennement à Limoges.

A Elodie Mestre, A François-Ludovic Sauvage, au Docteur Khaled Benkali

Je vous remercie beaucoup pour votre aide précieuse et votre sympathie, indispensables à la bonne réalisation de ce travail.

A l'ensemble du personnel de l'unité Inserm 850 et du Laboratoire de Pharmacologie, Toxicologie – Pharmacovigilance du CHU de Limoges

Il s'agit avant tout d'un travail d'équipe et je tiens à remercier tous mes co-doctorants de l'unité pour leur aide, leur soutien, leur amitié et pour m'avoir supporté dans ce bureau, merci à Jana Stojanova, Alaa Saabi, Zeinab Daher, Sofiane Lotmani, Olivier Gensburger, Koukeb Rougieg-Malki, Virginie Descazeaud. Merci également à Annick Rousseau, Jean-Hervé Comte (notre Mc Gyver...) et à Patricia Festa pour leur aide et leur disponibilité. Merci au Professeur Gérard Lachâtre et au Docteur Jean-Michel Gaulier pour la formation de grande qualité qu'ils m'ont apportée dans le domaine de la Toxicologie.

A mes Parents, A mes Frères, ma Famille et mes Amis

Les bras toujours ouverts... et moi devant, Merci pour votre amour votre soutien au cours de toutes ces années d'études, labyrinthe dont j'ai peut-être enfin trouvé une sortie...

RESUME

Les médicaments inhibiteurs de la calcineurine, la cyclosporine (CsA) et le tacrolimus (TAC), sont utilisés depuis plus de 30 ans dans les protocoles d'immunosuppression afin de prévenir les rejets du greffon et traiter des maladies auto-immunes. Si ces traitements ont considérablement amélioré la survie du greffon à court terme, ils présentent une néphrotoxicité susceptible de contribuer à long terme, à l'apparition de lésions rénales (ou néphropathie chronique d'allogreffe en transplantation rénale) ainsi qu'à des altérations chroniques de la fonction rénale (ou dysfonction chronique du greffon en transplantation rénale). Ces phénomènes complexes et d'origines multi-factorielles peuvent conduire au déclin progressif, irréversible de la fonction rénale et à la perte du greffon. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine sont nombreux et, bien que largement étudiés, restent mal compris. Bien que cette néphrotoxicité ait souvent été corrélée à des concentrations sanguines élevées en inhibiteurs de la calcineurine, nous avons formulé au cours de ce travail l'hypothèse que même à des doses thérapeutiques, ces médicaments induisent des modifications phénotypiques des cellules rénales qui perturbent leur comportement et favorisent l'apparition d'atteintes rénales. Notre objectif principal a été de développer et de mettre en application une approche de protéomique à large échelle, basée sur la spectrométrie de masse, afin d'identifier et de quantifier les modifications d'expression protéique induites par la CsA et le TAC sur un modèle des cellules rénales en culture. La méthodologie utilisée est l'approche SILAC ou « *Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture* », qui consiste en un marquage métabolique de toutes les protéines cellulaires avec des acides aminés alourdis par l'isotope stable 13 du carbone. Nous montrons que l'expression intra-cellulaire et la sécrétion de nombreuses protéines sont modulées par la CsA et que le TAC exerce une influence différente sur l'expression de ces protéines. Nos résultats confirment certaines observations précédemment décrites et nous conduisent également à formuler de nouvelles hypothèses concernant les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans la néphrotoxicité induite par les inhibiteurs de la calcineurine. Des études ultérieures seront développées pour tester si certaines de ces protéines pourraient être utilisées comme biomarqueurs potentiels de cette néphrotoxicité chez des patients transplantés et traités par CsA ou TAC.

Mots clés : calcineurine, cyclosporine, tacrolimus, rein, néphrotoxicité, protéomique, SILAC, spectrométrie de masse.

Productions scientifiques au cours de ce travail de thèse

Articles

LAMOUREUX F., MESTRE E., ESSIG M., SAUVAGE F.L., MARQUET P. AND GASTINEL L.N. Quantitative proteomic analysis of cyclosporine-induced toxicity in a human kidney cell line and comparison with tacrolimus. *Journal Of Proteomics*, 2011, sous presse (PMID: 21964257).

LAMOUREUX F., GASTINEL L.N., MESTRE E., MARQUET P., ESSIG M. Mapping cyclosporine-induced changes in protein secretion by renal cells using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). Proposé pour publication dans *Journal Of Proteomics* (Septembre 2011).

LAMOUREUX F., PINAULT E., ESSIG M., MESTRE E., MARQUET P. AND GASTINEL L.N. Comparing SILAC and Two-Dimensional Gel Electrophoresis Analysis for Measuring Cyclosporine A-induced Quantitative Changes in Protein Expression. En preparation pour *Fundamental and Clinical Pharmacology*.

LAMOUREUX F., PICARD N., BOUSSERA B., SAUVAGE F.L. AND MARQUET P. Sirolimus and everolimus intestinal absorption and interaction with calcineurine inhibitors: a differential effect between cyclosporine and tacrolimus. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 2011, sous presse (PMID: 21631587).

PICARD N., LEVOIR L., LAMOUREUX F., YEE S.W., GIACOMINI K.M. AND MARQUET P. Interaction of sirolimus and everolimus with hepatic and intestinal organic anion-transporting polypeptide transporters. *Xenobiotica*, 2011;41(9):752-7.

Communications orales et affichées

LAMOUREUX F., MESTRE E., MARQUET P., SAUVAGE F.L., ESSIG M. AND GASTINEL L.N. SILAC quantitative proteomic analysis of calcineurin inhibitors-induced toxicity in a human kidney cell line reveals different toxicity profiles between cyclosporine and tacrolimus. Abstract publié dans *Therapeutic Drug Monitoring*, 2011;33(4). Présenté sous forme de poster et de communication orale lors du 12^{ème} congrès de l'International

Association of Therapeutic Drug Monitoring (IATDMCT), Stuttgart, Allemagne, oct. 2011 et récompensé par le prix du meilleur poster.

LAMOUREUX F., GASTINEL L.N., MARQUET P., ESSIG M. Quantitative proteomic analysis of CsA-induced toxicity in renal cells reveals the perturbation of multiple cellular pathways. Abstract publié dans *Fundamental and Clinical Pharmacology* 2011;25(S1). Présenté sous forme de poster lors du 6^{ème} congrès des sociétés de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T), Grenoble, mars 2011.

PICARD N., LEVOIR L., LAMOUREUX F., YEE S.W., GIACOMINI K.M. AND MARQUET P. Interaction of everolimus and sirolimus with the hepatic and intestinal Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs). Abstract publié dans *Fundamental and Clinical Pharmacology* 2010;24(S1). Présenté sous forme de poster lors du 5^{ème} congrès des sociétés de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T), Bordeaux, mars 2010.

LAMOUREUX F., PICARD N., BOUSSERA B., SAUVAGE F.L. AND MARQUET P. Effects of calcineurin inhibitors and implication of efflux transporters and CYP3A on the intestinal flux of mTOR inhibitors. Abstract publié dans *Therapeutic Drug Monitoring*, 2009;31(5). Présenté sous forme de poster lors du 11^{ème} congrès de l'International Association of Therapeutic Drug Monitoring (IATDMCT), Montréal, Canada, oct. 2009.

LAMOUREUX F., PICARD N., BOUSSERA B., SAUVAGE F.L. AND MARQUET P. Implication of efflux transporters and CYP3A on the transepithelial flux of mTOR inhibitors across human intestinal Caco-2 cell monolayers and interaction with Cyclosporine A. Abstract publié dans *Fundamental and Clinical Pharmacology* 2009;23(S1). Présenté sous forme de communication orale courte et de poster lors du 4^{ème} congrès des sociétés de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T), Marseille, avril 2009.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	14
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	16
I. LES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE.....	17
<i>I.1. Historique.....</i>	<i>17</i>
<i>I.2. Mécanisme d'action pharmacologique des inhibiteurs de la calcineurine.....</i>	<i>18</i>
<i>I.3. La néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine : aspects histologiques et fonctionnels.....</i>	<i>21</i>
I.3.1. Néphrotoxicité aiguë des inhibiteurs de la calcineurine.....	23
I.3.1.a. Généralités	23
I.3.1.b. Conséquences fonctionnelles et histologiques	24
I.3.2. Néphrotoxicité chronique des inhibiteurs de la calcineurine	27
I.3.2.a. Généralités	27
I.3.2.b. Conséquences fonctionnelles et histologiques	29
<i>I.4. Principaux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine.....</i>	<i>32</i>
I.4.1. Généralités	32
I.4.2. Prolifération cellulaire et apoptose	33
I.4.2.a. Effets de la CsA sur la prolifération cellulaire	33
I.4.2.b. Apoptose induite par les ICN.....	34
I.4.3. Stress du réticulum endoplasmique et autophagie	37
I.4.3.a. Stress du réticulum et réponse adaptative	37
I.4.3.b. Stress du réticulum induit par les inhibiteurs de la calcineurine.....	40
I.4.3.c. Autophagie induite par la cyclosporine	41
I.4.4. Stress oxydant	42
I.4.5. Vasoconstriction induite par les inhibiteurs de la calcineurine	43
I.4.5.a. Perturbations du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone	43
I.4.5.b. Modification de la sécrétion des médiateurs vasoactifs	44
I.4.5.c. Action des ICN sur le système nerveux sympathique	47
I.4.6. Transition épithélio-mésenchymateuse et modifications du cytosquelette	47
I.4.6.a. Transition épithélio-mésenchymateuse induite par les ICN.....	47
I.4.6.b. Modifications du cytosquelette induites par les ICN.....	48
<i>I.5. Résumé des principaux mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité des ICN</i>	<i>50</i>
II. APPROCHES PROTEOMIQUES QUANTITATIVES D'ANALYSE DES MODIFICATIONS PHENOTYPIQUES INDUITES PAR LES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE.....	52
II.1. <i>Choix de la stratégie de protéomique quantitative.....</i>	<i>52</i>
II.2. <i>Approches protéomiques basées sur une séparation des protéines par électrophorèse</i>	<i>54</i>
II.2.1. <i>Électrophorèse bi-dimensionnelle des protéines sur gel de polyacrylamide (2D-PAGE ou 2-DE)</i>	<i>54</i>
II.2.2. <i>Analyse protéomique différentielle par électrophorèse en gel et fluorescence (2D-DIGE)</i>	<i>57</i>
II.3. <i>Approches protéomiques basées sur une séparation des peptides par chromatographie.....</i>	<i>58</i>
II.3.1. <i>Protéomique quantitative par marquage chimique in vitro</i>	<i>58</i>
II.3.1.a. <i>Approche ICAT ou « Isotope-Coded Affinity Tag »</i>	<i>58</i>
II.3.1.b. <i>Approche iTRAQ ou « Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification »</i>	<i>61</i>
II.3.2. <i>Protéomique quantitative par marquage métabolique : SILAC ou « Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture »</i>	<i>63</i>
II.4. <i>Résumé des avantages et inconvénients de ces approches protéomiques quantitatives</i>	<i>67</i>
III. HYPOTHESE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS	69

CHAPITRE II : TRAVAUX PERSONNELS.....	70
I. ETUDE DES PERTURBATIONS PROTEIQUES INDUITES PAR LA CYCLOSPORINE DANS UNE LIGNEE CELLULAIRE RENALE PAR LA METHODE SILAC ET COMPARAISON AVEC LE TACROLIMUS; ANALYSE DES EFFETS POTENTIELS DE LA N-ACETYLCYSTEINE SUR CES PERTURBATIONS.....	72
II. ETUDE DES EFFETS DE LA CYCLOSPORINE SUR LA SECRETION PROTEIQUE D'UNE LIGNEE CELLULAIRE RENALE PAR APPROCHE SILAC.....	92
III. COMPARAISON DE DEUX APPROCHES PROTEOMIQUES POUR L'ETUDE QUANTITATIVE DES PERTURBATIONS PROTEIQUES INDUITES PAR LA CYCLOSPORINE : 2D-PAGE ET SILAC.	121
CHAPITRE III : DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	140
I. DISCUSSION ET CONCLUSIONS	141
<i>I.1. SILAC : Application à l'étude des modifications phénotypiques de cellules rénales exposées aux ICN et bénéfiques par rapport aux approches protéomiques ou transcriptomiques classiques</i>	<i>141</i>
I.1.1. Mise en application du SILAC à l'étude des perturbations protéomiques induites par les ICN.....	141
I.1.2. SILAC et approches protéomiques ou transcriptomiques classiques	142
<i>I.2. Limites de la méthodologie SILAC</i>	<i>144</i>
I.2.1. Choix du modèle expérimental.....	144
I.2.2. Détermination de valeurs seuils pour identifier les protéines perturbées par l'approche SILAC.....	146
I.2.3. Interprétation des données et validation des résultats générés par l'approche SILAC	147
II. PERSPECTIVES.....	148
CHAPITRE IV : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151
CHAPITRE V : ANNEXES.....	167
I. AUTRES PUBLICATIONS REALISEES AU COURS DE CE TRAVAIL DE THESE	168
<i>I.1. Etude des mécanismes d'absorption intestinale du sirolimus et de l'everolimus, interaction avec la cyclosporine et le tacrolimus</i>	<i>168</i>
<i>I.2. Etude de l'implication des transporteurs OATP dans l'absorption intestinale et hépatique du sirolimus et de l'everolimus</i>	<i>179</i>

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

CDK:	Cyclines dépendantes des kinases
CsA :	Cyclosporine A
CypA :	Cyclophiline A
CypB :	Cyclophiline B
EGF :	Facteur de croissance épidermique
FI-AT :	Fibrose interstitielle – Atrophie tubulaire
FKBP12 :	12 kDa FK506-binding protein
HEK-293 :	Human Embryonic Kidney cells
ICAT :	Isotope-Coded Affinity Tag
ICN :	Inhibiteurs de la calcineurine
IL-2 :	Interleukine 2
iTRAQ :	Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification
MS:	Spectrométrie de masse (Mass spectrometry)
MS/MS :	Spectrométrie de masse en tandem (Tandem mass spectrometry)
mTOR :	Mamalian target of rapamycin
NCA :	Néphropathie chronique d'allogreffe
RE :	Réticulum endoplasmique
SILAC :	Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture
TAC / FK506 :	Tacrolimus
TGFβ :	Transforming growth factor β
TNFα :	Tumor necrosis factor α
UPR :	Unfolded Protein Response
2-D-PAGE / 2-DE :	Electrophorèse bi-dimensionnelle des protéines sur gel de polyacrylamide
2-D DIGE :	Analyse protéomique différentielle par électrophorèse en gel et fluorescence

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Structures chimiques de la Cyclosporine A (A) et du Tacrolimus (B).....	18
Figure 2 : Représentation schématique du mécanisme d'action pharmacologique des immunosuppresseurs inhibiteurs de la calcineurine.....	20
Figure 3 : (A) Prévalence de signes histologiques de néphrotoxicité induite par les ICN, en fonction du temps, dans une cohorte de patients transplantés rénaux. (B) Prévalence de la néphropathie chronique d'allogreffe (NCA) dans une cohorte de patients transplantés rénaux traités par ICN.	22
Figure 4 : Biopsie de transplant rénal montrant des aspects histopathologiques caractéristiques de la néphrotoxicité aigüe induite par les ICN.	24
Figure 5 : Représentation schématique d'une biopsie rénale indiquant les principales caractéristiques histopathologiques de la néphropathie chronique d'allogreffe et les principaux facteurs favorisant son apparition.	28
Figure 6 : Artériolopathie hyaline vue en microscopie électronique.	30
Figure 7 : Néphrotoxicité chronique aux ICN à un stade évolué.....	31
Figure 8 : Activation de l'apoptose par la Cyclosporine A au niveau des cellules tubulaires rénales.....	36
Figure 9 : Représentation schématique de la voie de sécrétion des protéines.	38
Figure 10 : Représentation schématique des 3 voies de transduction du signal (PERK, ATF6 et IRE1) lors de la réponse UPR suite à un stress du réticulum endoplasmique.....	39
Figure 11 : Images en microscopie confocale (×100), indiquant, dans les cellules LLC-PK1 traitées par CsA, une modification globale de la structure cellulaire, une rigidification latérale du cytosquelette d'actine qui est proche de celle observée en situation de flux tubulaire.....	49

Figure 12 : Représentation schématique récapitulant les principaux mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité aigüe ou chronique des ICN et leurs conséquences.	51
Figure 13 : Différents types d’approches de protéomique quantitative : impact du marquage et/ou des étapes de préparation des échantillons sur la qualité de la quantification différentielle.	53
Figure 14 : Représentation schématique du principe général de l’analyse protéomique par 2D-PAGE.	56
Figure 15 : (A) Structure chimique du réactif de marquage ICAT. (B) Principe de l’approche protéomique quantitative ICAT.	60
Figure 16 : (A) Structure chimique du réactif de marquage iTRAQ. (B) Principe de l’approche protéomique quantitative iTRAQ.....	62
Figure 17 : Représentation schématique du principe de la technique SILAC.	64

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La découverte de médicaments aux propriétés immunosuppressives tels que la cyclosporine (CsA) et le tacrolimus (TAC) a révolutionné, depuis près de quatre décennies, la prise en charge des patients transplantés. Les inhibiteurs de la calcineurine (ICN), dont font partie la CsA et le TAC, constituent aujourd'hui la base des protocoles d'immunosuppression pour prévenir le rejet des greffons ou traiter des maladies d'origine auto-immunes et leur utilisation a permis de réduire très sensiblement l'incidence des réactions de rejets aigus et d'améliorer la survie à court terme des greffons. La CsA et le TAC sont caractérisés par une importante variabilité de réponse interindividuelle et présentent un index thérapeutique étroit, exposant potentiellement les patients à un risque accru de survenue d'effets indésirables en cas de surdosage ou à l'inverse, à un échec thérapeutique avec risque de rejet du greffon en cas de sous-immunosuppression. Les travaux de recherche réalisés dans le domaine des traitements immunosuppresseurs ont permis de mieux comprendre les paramètres pharmacocinétiques / pharmacodynamiques / pharmacogénétiques de ces médicaments et de développer leur suivi thérapeutique pharmacologique afin d'optimiser leur efficacité au niveau individuel. Si la survie du greffon à court terme a été fortement améliorée, en particulier grâce à une meilleure connaissance des mécanismes immunologiques impliqués dans les rejets et à l'optimisation des traitements immunosuppresseurs, la survie du greffon à long terme reste problématique. En effet, l'administration d'ICN au long cours participe à l'apparition de lésions rénales vasculaires et tubulo-interstitielles, évoluant ultérieurement vers des lésions de fibrose interstitielle, d'atrophie tubulaire (FI-AT) ou de glomérulosclérose. Ces lésions, qui sont par ailleurs d'origines multi-factorielles, peuvent contribuer à l'apparition d'une forme particulière de pathologie rénale appelée néphropathie chronique d'allogreffe (NCA). En transplantation rénale, l'apparition de NCA constitue un facteur pronostic majeur de la perte du greffon à long terme. Les lésions de NCA, décelables par

biopsie dès la première année post-greffe, sont dans un premier temps cliniquement silencieuses mais évoluent inexorablement vers une altération progressive et irréversible de la fonction rénale. La prise chronique d'ICN s'accompagne chez certains patients d'une néphrotoxicité qui devient quasiment universelle à 10 ans post-greffe. Cette néphrotoxicité, observable en dehors de tout surdosage médicamenteux, est un facteur important de l'apparition de NCA et de nombreux mécanismes concernant cette toxicité ont été décrits à ce jour. Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité rénale des ICN et la découverte de biomarqueurs précoces de son apparition pourraient, dans un futur proche, contribuer à améliorer la survie des greffons à long terme en adaptant la prise en charge des patients à risque.

Au cours de ce travail, nous avons développé et mis en application une approche protéomique quantitative à large échelle pour étudier certaines modifications phénotypiques induites par des concentrations pharmacologiques d'ICN sur des cellules rénales humaines en culture. Nous avons employé une méthodologie protéomique quantitative récente, appelée SILAC (ou « Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture »), et particulièrement appropriée pour comparer les niveaux d'expression de plusieurs centaines de protéines issues de cellules exposées aux ICN par rapport à des cellules témoins.

L'objectif de ce travail en utilisant un modèle cellulaire *in vitro* est d'identifier des protéines, tant intracellulaires qu'extracellulaires et/ou sécrétées, dont le niveau d'expression est significativement perturbé par ces traitements afin d'établir des schémas de réponse des cellules aux stress causés par les ICN et de préciser ou de confirmer des mécanismes précédemment décrits. Des protéines identifiées comme perturbées dans ce modèle *in vitro* pourront par la suite être recherchées *in vivo* ou *ex vivo* dans des prélèvements urinaires, sanguins ou des biopsies rénales de patients transplantés, chez lesquels une néphrotoxicité d'origine médicamenteuse est suspectée.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

I. LES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE

I.1. HISTORIQUE

La CsA, découverte en 1970 à l'occasion de recherches sur de nouveaux produits antifongiques, est un métabolite d'un champignon du sol (*Tolypocladium inflatum*). Il s'agit d'un polypeptide cyclique avec de nombreux acides aminés N-méthylés et un acide aminé caractéristique en C9 dérivé de la méthylsérine. En 1976 Borel montre chez l'animal que la CsA a la capacité de supprimer la réponse immunologique sans entraîner de dépression médullaire [1].

L'introduction de la CsA, dès la fin des années 70, comme traitement immunosuppresseur après transplantation rénale a permis d'améliorer considérablement la survie des patients greffés, révolutionnant ainsi les pratiques médicales dans ce domaine. En 1978 Calne rapporte les premiers résultats en transplantation humaine : le produit utilisé seul est un puissant immunosuppresseur, mais les doses alors utilisées (17 mg/kg/j) sont néphrotoxiques [2,3]. Depuis les années 80, la CsA est largement utilisée comme traitement immunosuppresseur afin de réduire le risque de rejet d'allogreffe [4,5].

Le TAC (FK506 ou Fujimycin) a été isolé en 1984 lors d'études sur la recherche de nouveaux antibiotiques, à partir du bouillon de fermentation prélevé du sol Japonais qui contenait des bactéries *Streptomyces tsukubaensis*. Le nom de cette molécule résulte de la contraction de l'endroit où cet organisme a été trouvé (soit Tsukuba), de sa classe chimique (soit macrolide) et de ses propriétés immunosuppressives. La découverte de ses propriétés inhibitrices de la calcineurine, a rapidement permis son utilisation en transplantation rénale, hépatique et également cardiaque au même titre que la CsA [6,7]. Il est également employé pour le traitement de maladies inflammatoires cutanées telles que certaines formes de

dermatite atopique grave (eczéma), le vitiligo, les uvéites réfractaires graves. Si sa structure chimique est très différente de celle de la CsA (Figure 1), le FK506 présente un mode d'action analogue et provoque des lésions rénales semblables à celle-ci.

Ainsi, en 2007, on estimait qu'un traitement immunosuppresseur à base d'inhibiteurs de la calcineurine (CsA ou TAC) est utilisé chez plus de 90% des patients transplantés rénaux [8].

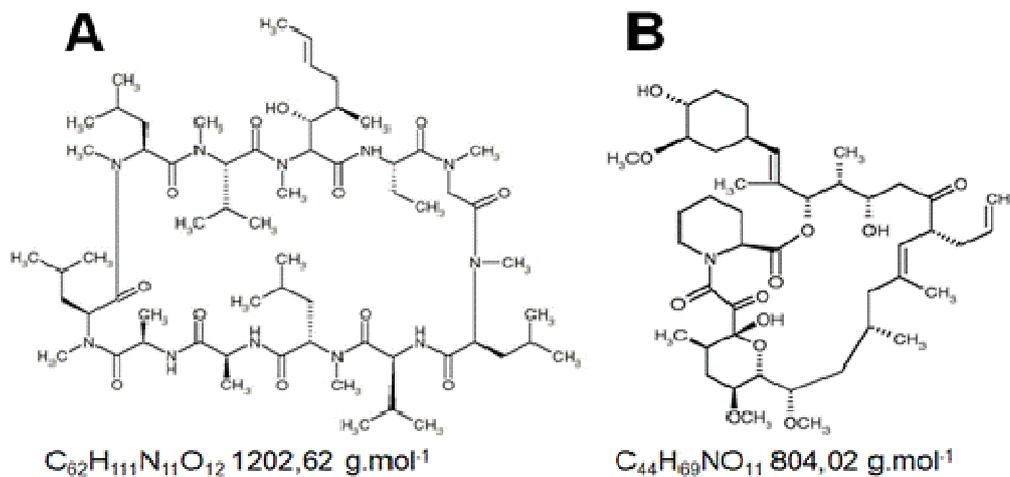


Figure 1 : Structures chimiques de la Cyclosporine A (A) et du Tacrolimus (B).

I.2. MECANISME D'ACTION PHARMACOLOGIQUE DES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE

L'activité immunosuppressive de la CsA et du TAC résulte de leur action inhibitrice de la calcineurine (Figure 2), après formation d'un complexe intracellulaire par liaison aux cyclophilines et à la protéine FKBP12, respectivement [9,10]. La cyclophiline A (CypA, gène PPIA) et la cyclophiline B (CypB, gène PPIB), qui sont les isoformes de cyclophilines les plus abondantes au niveau cellulaire, présentent avec FKBP12 (gène FKBP1A) une activité enzymatique peptidyl-prolyl isomerase (ou rotamase) et sont impliquées dans le repliement des protéines cellulaires en catalysant la formation de ponts disulfures. Au niveau cellulaire la

CypA et FKBP12 sont des protéines cytoplasmiques, alors que CypB est localisée au niveau du réticulum endoplasmique [11,12].

La calcineurine est une sérine/thréonine phosphatase calcium- et calmoduline-dépendante (PPP3C) intervenant dans la réponse immunitaire des lymphocytes T. La stimulation de lymphocytes T par un antigène provoque l'activation de la phospholipase C qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). L'IP3 entraîne une libération de calcium intracellulaire et une activation de la calmoduline, laquelle s'unit à la calcineurine. Le complexe calmoduline-calcineurine déphosphoryle le NF-AT (nuclear factor of activated T cell) qui est présent dans les cellules lymphoïdes quiescentes à l'état phosphorylé (NF-AT-p). Le NF-AT déphosphorylé pénètre dans le noyau et active la transcription du gène de l'interleukine 2 (IL-2) [13]. L'IL-2 ainsi produit par les lymphocytes T activés exerce des effets de type autocrine et paracrine en activant des récepteurs situés sur la membrane de diverses cellules, lymphocytes T et lymphocytes NK, lymphocytes B activés. La stimulation des récepteurs de l'IL-2 conduit à l'activation de la protéine kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycine ou RAFT1, rapamycine FKBP target) et de la protéine FRAP (FKBP-rapamycine associated protein), lesquelles activent à leur tour les CDK (cycline dependent kinases) et le cycle cellulaire. L'IL-2 est un facteur de croissance pour les lymphocytes T. Elle active leur transformation en lymphocytes T cytotoxiques de type CD8+ qui sécrètent l'interféron γ , lequel stimule la libération par les macrophages de TNF_α (Tumor Necrosing Factor α) et de TGF_β (Transforming Growth Factor β). L'IL-2 stimule la croissance et l'activité cytolytique des cellules NK (natural killer). Elle stimule la maturation des lymphocytes B et la synthèse d'anticorps. Par ces actions l'IL-2 participe à la défense de l'organisme contre les protéines qui lui sont étrangères, en particulier celles du greffon.

La fixation des complexes CsA-cyclophiline A et Tacrolimus-FKBP12 à la calcineurine permet d'inhiber son activité phosphatase. Cette inhibition conduit ainsi à un blocage de transcription de l'IL-2 en empêchant la déphosphorylation et donc la translocation nucléaire de NFAT dans les lymphocytes T activés [14,15].

Cependant, la calcineurine et NFAT étant des protéines ubiquitaires, l'inhibition pharmacologique de ces voies de signalisation par la CsA ou le tacrolimus ne s'exerce pas exclusivement dans les lymphocytes T activés. Ceci pourrait expliquer, au moins partiellement, certains mécanismes de toxicité des inhibiteurs de la calcineurine, en particulier la néphrotoxicité de ces traitements, indépendamment de l'immunosuppression qu'ils entraînent [16].

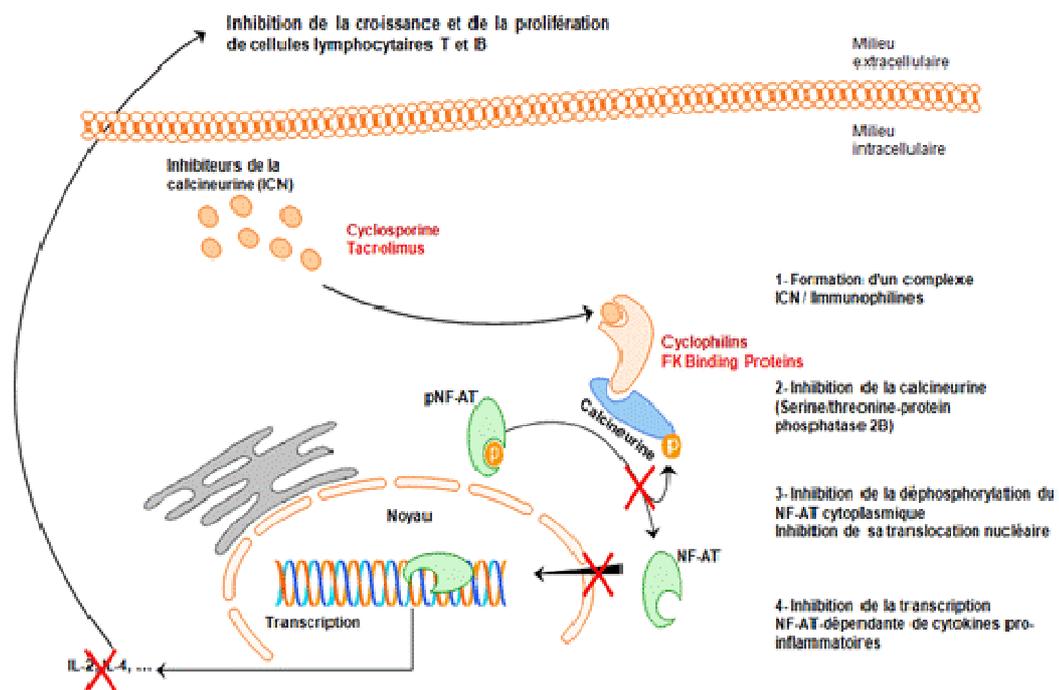


Figure 2 : Représentation schématique du mécanisme d'action pharmacologique des immunosuppresseurs inhibiteurs de la calcineurine.

I.3. LA NEPHROTOXICITE DES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE : ASPECTS HISTOLOGIQUES ET FONCTIONNELS

L'apparition des ICN a considérablement amélioré la survie du greffon à court terme des patients transplantés rénaux. Leur utilisation est cependant fortement limitée par la sévérité de leurs effets secondaires, en particulier par les effets néphrotoxiques qu'ils entraînent [17,18]. La néphrotoxicité induite par la CsA fut rapidement décrite lors de ses premières utilisations cliniques chez des patients transplantés rénaux et hépatiques [2,3]. CsA et TAC provoquent des lésions rénales histologiquement semblables, bien que leurs structures chimiques soient très différentes.

La néphrotoxicité aiguë des ICN est essentiellement vasculaire et à l'origine de lésions consécutives à une vasoconstriction des artérioles afférentes induite par ces médicaments. Bien que les mécanismes exacts de la néphrotoxicité aiguë relative aux ICN restent imprécis, cette vasoconstriction serait attribuable à une altération des fonctions des cellules endothéliales, entraînant une diminution de la production de vasodilatateurs (prostaglandines, monoxyde d'azote...) et une libération accrue de vasoconstricteurs (endothéline, thromboxane A₂...).

La néphrotoxicité chronique des ICN apparaît quant à elle plus complexe. La répétition des phénomènes de toxicité aiguë pourrait participer à l'apparition de cette toxicité chronique qui fait intervenir des mécanismes moléculaires variés.

Globalement, cette néphrotoxicité aiguë ou chronique est aussi modulée par une variabilité interindividuelle importante de sensibilité vis-à-vis des ICN. Les caractéristiques clinico-pathologiques de la néphrotoxicité induite par les ICN ont évolué depuis les deux dernières décennies avec la réduction des doses administrées et l'essor du suivi thérapeutique pharmacologique des immunosuppresseurs. L'incidence de la néphrotoxicité aiguë a donc significativement diminué. En revanche, la néphrotoxicité chronique des ICN reste la

première cause non immunologique de la perte tardive du greffon [19,20]. Selon certaines études, des signes de cette toxicité induite par les ICN (**Figure 3A**), ainsi que des signes de NCA d'origines multi-factorielles (**Figure 3B**), seraient décelables chez près de 97% et 100% des patients après 10 ans de traitement par ICN, respectivement [19,20].

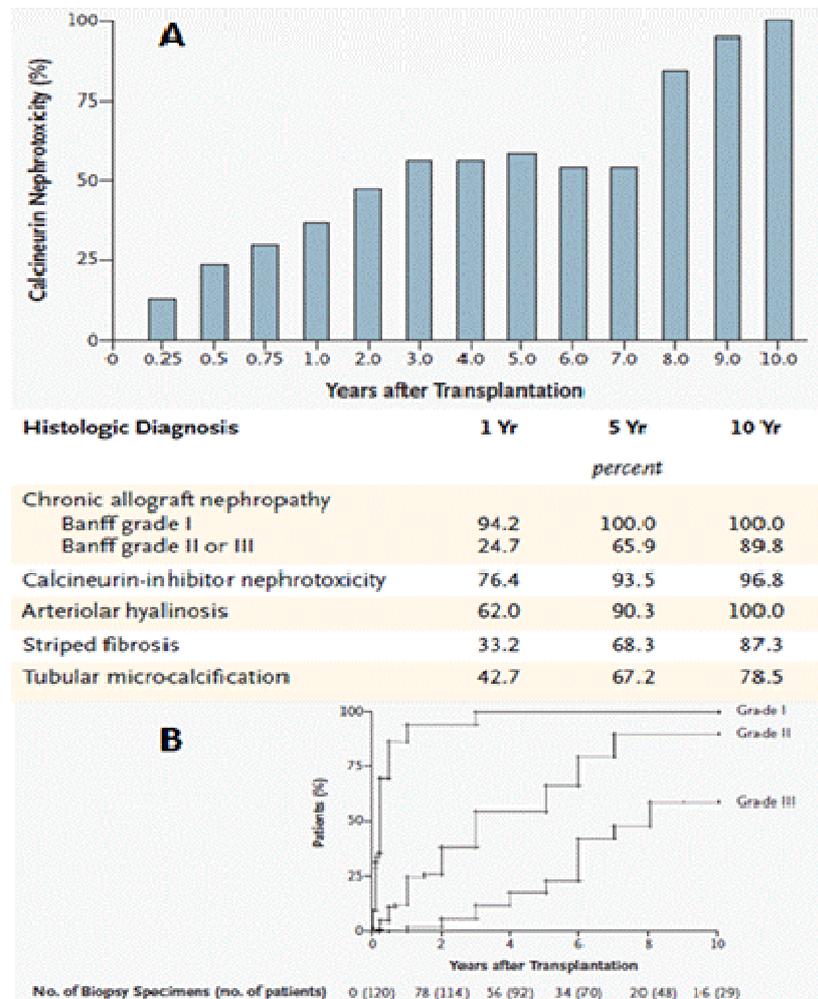


Figure 3 : (A) Prévalence de signes histologiques de néphrotoxicité induite par les ICN, en fonction du temps, dans une cohorte de patients transplantés rénaux. (B) Prévalence de la néphropathie chronique d'allogreffe (NCA) dans une cohorte de patients transplantés rénaux traités par ICN.

NCA légère (Grade I), modérée (Grade II) et sévère (Grade III). Selon les critères de la classification de Banff. Le nombre de prélèvements biopsiques (et de patients à risque) sont indiqués sous la figure. Adapté de Nankivell et al., 2003 [19].

En clinique, la classification de Banff est généralement utilisée pour attribuer un score à ces lésions de néphropathie chronique d'allogreffe, en fonction de critères quantitatifs ou qualitatifs ou la topographie des lésions [21]. Cette classification, du nom d'une localité canadienne où s'est réuni un collège d'experts internationaux, a été initialement publiée en 1993 et remaniée régulièrement suite aux conférences de consensus organisées tous les deux ans. Son but est de standardiser les paramètres morphologiques et cliniques qui établissent l'échelle de gravité d'un rejet, de façon à harmoniser les données publiées dans ce domaine. Globalement, la classification de Banff permet d'attribuer méthodiquement un score du même nom aux lésions, aiguës ou chroniques, du greffon rénal observées sur biopsies en fonction des atteintes glomérulaires (g, cg), interstitielles (i, ci), tubulaires (t, ct), artérielles (v, cv), des capillaires péri-tubulaires (cpt) et des dépôts de C4d (C4d0-3).

I.3.1. Néphrotoxicité aiguë des inhibiteurs de la calcineurine

I.3.1.a. Généralités

La néphrotoxicité aiguë induite par les ICN est en partie caractérisée par des troubles hémodynamiques liés à un déséquilibre entre agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs endogènes, à l'origine d'une vasoconstriction artérioles afférentes rénales [22,23]. Ces perturbations hémodynamiques sont généralement réversibles par réduction de la posologie ou arrêt du traitement par ICN [24]. Les ICN administrés à des doses pharmacologiques peuvent entraîner une vasoconstriction et une baisse du débit de filtration glomérulaire. Cette toxicité fonctionnelle observée précocement après la greffe, se traduit par une élévation de la créatinine plasmatique et s'associe parfois à des concentrations sanguines élevées de l'ICN. Histologiquement, la néphrotoxicité aiguë induite par les ICN associe artériolopathie avec vacuolisations tubulaires et microangiopathie thrombotique.

I.3.1.b. Conséquences fonctionnelles et histologiques

Il existe deux formes majeures de toxicité rénale induite par les ICN : une toxicité fonctionnelle, conséquence de la vasoconstriction décrite précédemment et n'ayant pas de traduction morphologique, et une toxicité structurelle se traduisant par des lésions morphologiques précoces ou tardives. Les lésions aiguës induites par les ICN peuvent toucher les artérioles, les glomérules, les tubules et l'interstitium. Anatomiquement, bien qu'aucune lésion histologique ne soit spécifique de la néphrotoxicité aiguë induite par les ICN, plusieurs aspects plus ou moins suggestifs peuvent être décrits : artériolopathies avec vacuolisations tubulaires (**Figure 4A**) et microangiopathies thrombotiques (**Figure 4B**).

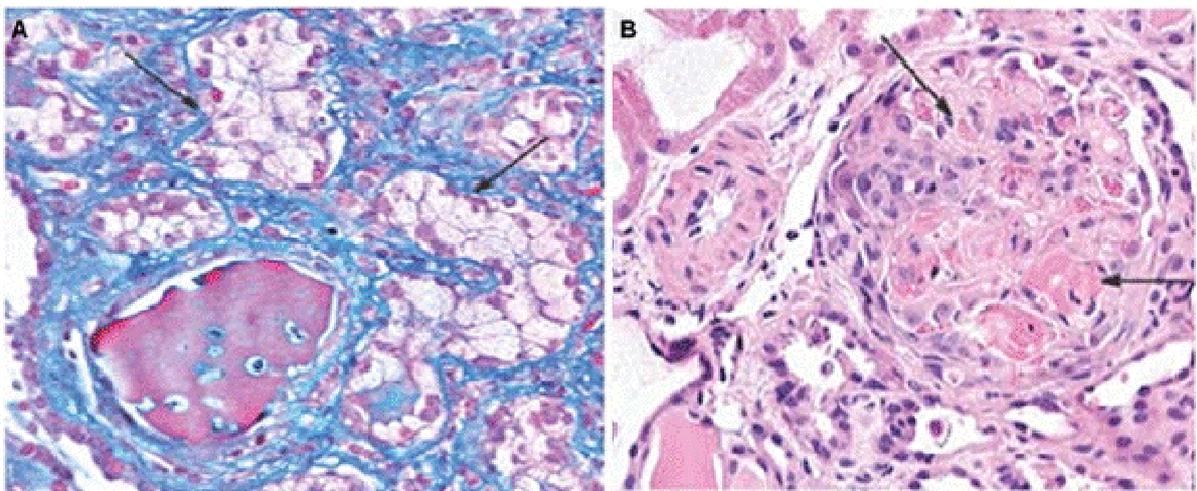


Figure 4 : Biopsie de transplant rénal montrant des aspects histopathologiques caractéristiques de la néphrotoxicité aiguë induite par les ICN.

(A) *Vacuolisations tubulaires (trichrome, $\times 200$). Les vacuoles sont petites, claires et distribuées de façon homogène dans le cytoplasme des myocytes artériolaires et des cellules tubulaires proximales. Elles correspondent à une dilatation du réticulum endoplasmique.* (B) *Microangiopathies thrombotiques induites par la CsA. Présence de dépôts hyalins dans la lumière des artérioles et des capillaires glomérulaires (Hematoxyline–eosine, $\times 400$). D'après Liptak et al., 2006 [25].*

Tubulopathie toxique

La tubulopathie toxique se traduit par une dégradation aiguë de la fonction rénale, le plus souvent associée à des concentrations sanguines élevées d'ICN. Elle est surtout notée, lors de traitement par ICN, au cours des épisodes de toxicité aiguë (mais parfois également présente en cas de toxicité chronique). Cette tubulopathie toxique est totalement réversible à l'arrêt du traitement (ou la réduction de posologie) par ICN. L'incidence de ces lésions a diminué depuis la réduction des concentrations sanguines d'ICN dans les protocoles d'entretien. La biopsie rénale montre des lésions focalisées des tubes proximaux, de type nécrose tubulaire aiguë (NTA), prédominantes au niveau de la partie contournée du tube proximal [26]. Ces lésions sont caractérisées par une vacuolisation isométrique du cytoplasme des cellules épithéliales résultant d'une augmentation du volume du réticulum endoplasmique et des lysosomes [27,28]. Ces vacuolisations tubulaires sont également observables en l'absence de dégradation de la fonction rénale sous ICN et ne semblent pas nécessairement associées avec une progression vers la néphrotoxicité chronique induite par les ICN [29]. Les vacuoles sont généralement claires et régulières, parfois associées à des anomalies mineures non spécifiques, telles que des inclusions éosinophiles (mitochondries géantes) ou des microcalcifications tubulaires dystrophiques. Elles ne sont pas spécifiques de la néphrotoxicité aiguë induite par les ICN après transplantation et sont visibles au cours de nécrose tubulaire aiguë d'origines variées, de certains traitements (solutés hyperosmotiques, produits de contraste, immunoglobulines intraveineuses...) ou encore en cas d'ischémie rénale [30,31].

Toxicité vasculaire aiguë

Les ICN exercent un effet toxique direct sur les cellules endothéliales, avec ou sans participation du phénomène d'agrégation plaquettaire. La libération de substances vasoactives

par les cellules endothéliales, comme l'angiotensine II, l'endothéline, les prostaglandines et le monoxyde d'azote, joueraient un rôle crucial dans la pathogénie induite par les ICN [26]. Deux types de toxicité vasculaire peuvent être identifiés : l'artériolopathie aigüe et la micro-angiopathie thrombotique.

L'artériolopathie aigüe est généralement retrouvée chez des patients présentant une augmentation de la créatinine plasmatique et des concentrations sanguines d'ICN anormalement élevées. La biopsie rénale indique des lésions confinées aux artérioles afférentes, caractérisées par un gonflement marqué, de type ballonisation, et une vacuolisation des cellules endothéliales et des myocytes de la média. Les vacuoles intracytoplasmiques des myocytes sont plus ou moins larges et plutôt claires, elles correspondent à une dilatation marquée du réticulum endoplasmique. Elles ne sont cependant pas spécifiques, car elles peuvent être observées au cours de nécrose tubulaire aigüe ischémique ou de certains syndromes néphrotiques [26].

La micro-angiopathie thrombotique (MAT) est le deuxième type de toxicité vasculaire liée aux ICN. Ces lésions de MAT sont plus rares et surviennent dans les premières semaines suivant la greffe. Ce type de lésion représente une complication sévère de la transplantation rénale et affecte 3 à 14% des patients recevant un traitement immunosuppresseur à base d'ICN [32]. Les lésions de MAT induites par les ICN restent le plus souvent confinées au parenchyme rénal et se traduisent donc uniquement par une augmentation brutale de la créatinine plasmatique. La biopsie rénale est alors le seul moyen de faire le diagnostic. Plus rarement, l'atteinte est systémique et caractérisée par un syndrome hémolytique et urémique associant une thrombocytopénie, une anémie hémolytique avec schizocytose et une insuffisance rénale aigüe oligo-anurique. L'intima des artères interlobulaires est parfois élargie par un œdème et des dépôts hyalins grumeleux et nodulaires, correspondant à une accumulation de protéines plasmatiques, sont alors observables dans la paroi vasculaire. Ces

dépôts sont composés le plus souvent de fibrine et plus rarement d'IgM, de C3 ou C1q [26,33]. Ces lésions de MAT ne sont pas spécifiques et doivent faire éliminer les autres diagnostics différentiels: rejet humoral aigu, causes infectieuses, syndrome hémolytique et urémique, anticorps anti-cardiolipines ou tumeurs malignes [34]. Les lésions de MAT, observées chez les patients transplantés et traités par ICN, semblent résulter de l'atteinte endothéliale secondaire à l'ischémie induite par la vasoconstriction. De plus, la CsA et le tacrolimus pourraient augmenter l'agrégation plaquettaire et activer des facteurs pro-thrombotiques [34]. Le diagnostic de MAT induite par les ICN nécessite une réduction posologique rapide du traitement par ICN en raison du risque de perte du greffon ou éventuellement, le remplacement de ce traitement par un immunosuppresseur d'une autre classe peut être envisagé [35].

I.3.2. Néphrotoxicité chronique des inhibiteurs de la calcineurine

I.3.2.a. Généralités

La néphrotoxicité chronique induite par les ICN qui survient généralement après plusieurs mois ou années d'exposition aux ICN, résulte de mécanismes toxiques complexes associant notamment, la répétition dans le temps des effets vasculaires indirects des ICN ainsi que des effets toxiques directs de ces traitements sur les cellules rénales. Les lésions rénales liées à la toxicité chronique des ICN sont fréquentes et leur incidence augmente avec la durée de greffe (et d'exposition aux ICN) [19]. Elle fut décrite dès 1984 par Myers *et al.* dans des biopsies rénales de patients ayant bénéficié d'une transplantation cardiaque [36]. Elle se caractérise cliniquement par une hypertension artérielle fréquente, une diminution progressive et souvent irréversible de la fonction rénale, parfois associée à une protéinurie et des concentrations sanguines élevées d'ICN. L'exposition chronique du rein aux ICN conduit progressivement à des remaniements de sa structure tels que la formation de fibrose

interstitielle et de hyalinose artériolaire, qui sont associées à des lésions de glomérulosclérose (**Figure 5**) [36-38]. Ces lésions de néphrotoxicité chronique sont le plus souvent irréversibles et peuvent donc entraîner à terme une insuffisance rénale terminale. Leur apparition nécessite donc de discuter une réduction de posologie ou le remplacement des ICN par d'autres immunosuppresseurs.

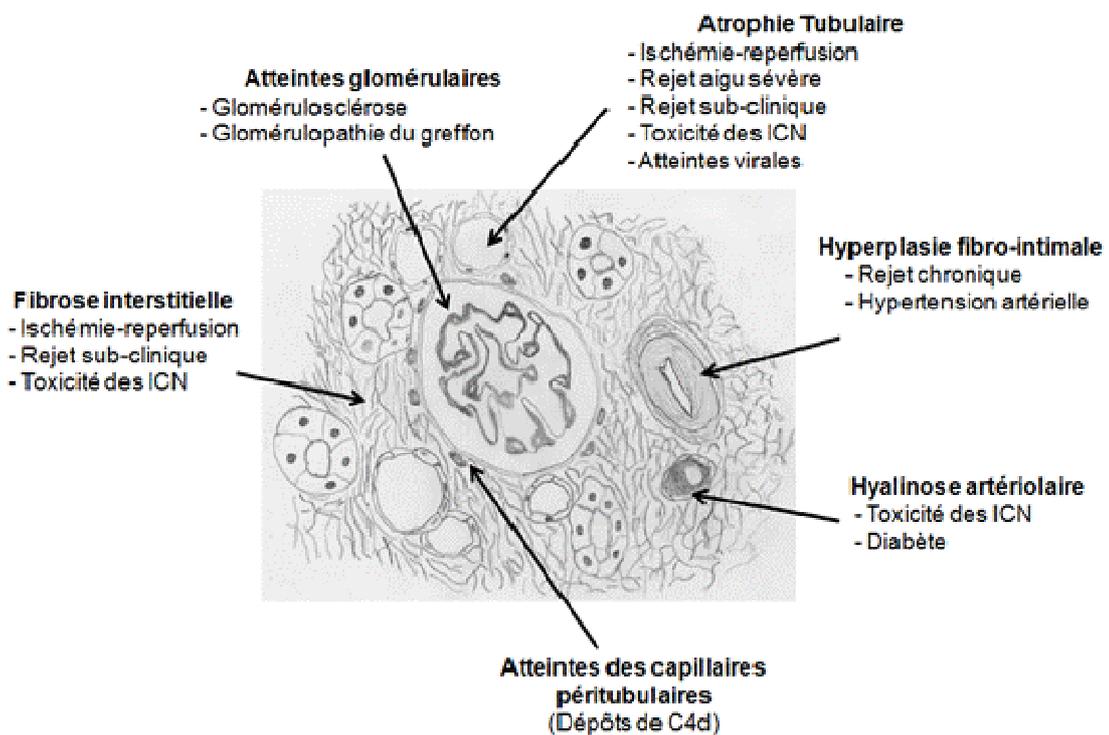


Figure 5 : Représentation schématique d'une biopsie rénale indiquant les principales caractéristiques histopathologiques de la néphropathie chronique d'allogreffe et les principaux facteurs favorisant son apparition.

D'après Alexander *et al.*, 2007 [39].

I.3.2.b. Conséquences fonctionnelles et histologiques

Artériolopathie hyaline

L'artériolopathie hyaline est le signe phare de la néphrotoxicité induite par les ICN. Débutant le plus souvent entre 3 et 12 mois après la greffe, elle est souvent prédite par une concentration sanguine résiduelle de ciclosporine élevée (>200ng/ml) et par des épisodes antérieurs de néphrotoxicité aiguë. Cette hyalinose se développe et persiste chez 75% des patients pendant les 10 ans qui suivent. Elle est surtout rencontrée chez des patients traités avec de fortes doses de CsA (>5mg/kg/j) dans les 5 premières années après transplantation [28]. Elle précède le développement de l'hypertension artérielle chez la majorité des patients et elle est généralement considérée comme irréversible. Cependant, dans de nombreux cas, une régression complète de l'artériolopathie hyaline induite par les ICN avec un remodelage des artérioles initialement atteintes est observable suite à une réduction de posologie ou un arrêt du traitement par ICN [27,40,41].

Histologiquement, cette hyalinose atteint préférentiellement les artérioles afférentes au niveau des portions les plus distales des artères interlobulaires. Au niveau de la média, les myocytes vacuolisés, présents au cours de l'artériolopathie aiguë induite par les ICN, se nécrosent secondairement et sont remplacés par des dépôts protéiques hyalins avec un aspect en chapelet (**Figure 6**) [26]. Dans les atteintes les plus évoluées, les dépôts sont abondants et peuvent être responsables d'une réduction ou encore d'une obstruction de la lumière (**Figure 6**). Ces lésions évoluées entraînent alors une hypoxie tissulaire et des lésions irréversibles glomérulaires et tubulo-interstitielles [27,28].

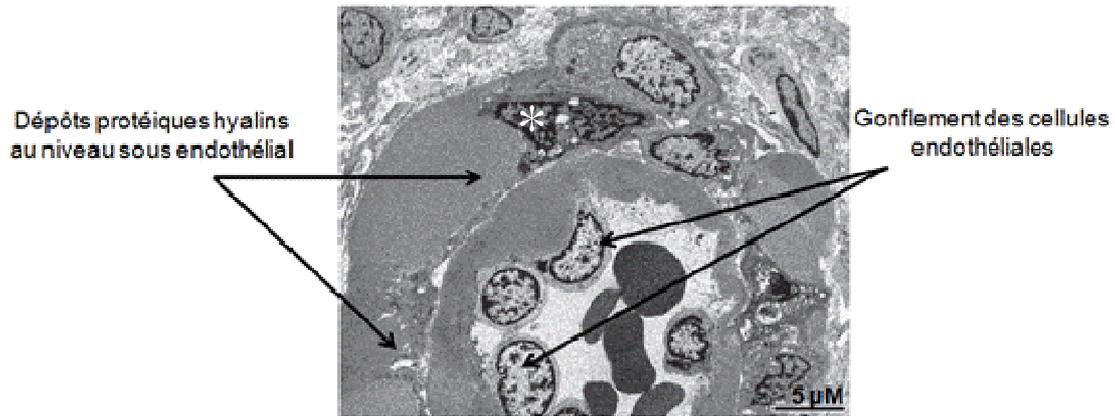


Figure 6 : Artériopathie hyaline vue en microscopie électronique.

L'image montre la présence de dépôts hyalins au niveau sous-endothélial et remplaçant progressivement les cellules musculaires lisses en apoptose (astérisque). Les cellules endothéliales apparaissent gonflées (×2500). D'après Liptak et al., 2006 [25].

L'étude des mécanismes moléculaires par lesquels le traitement chronique par ICN conduirait à la hyalinose artériolaire est compliquée par la difficulté de reproduire de tels processus sur des modèles *in vitro* ou animaux. Cependant, des travaux réalisés chez le rat avec un régime dépleté en sels, qui semble être un modèle valide pour étudier la néphrotoxicité chronique induite par ICN [42], ont montré que ces lésions débutaient par des modifications morphologiques des cellules musculaires lisses des artéroles afférentes suivies par des vacuolisations de ces cellules ainsi que par des discrets dépôts hyalins au niveau de la paroi vasculaire [43]. Si les mécanismes conduisant à ces modifications cellulaires restent à préciser, certains travaux suggèrent un rôle de l'inhibition pharmacologique de la Calcineurine et NFAT à ce niveau, possiblement associée à une vasoconstriction artériolaire prolongée du fait du déséquilibre entre les substances vasoactives induit par les ICN [44-46].

Fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (FI-AT)

Dans un contexte d'exposition chronique aux ICN, des lésions d'artériolopathie associées à un rétrécissement de la lumière artériolaire conduisent généralement à des lésions tubulo-interstitielles chroniques. Ces lésions sont caractérisées par une fibrose interstitielle associée à une atrophie tubulaire. La fibrose induite par les ICN est dans un premier temps focale, typiquement en bandes, localisée au niveau des rayons médullaires (**Figure 7**). Ces lésions deviennent par la suite progressivement diffuses et sont régulièrement associées à un infiltrat lymphoïde focal [26,28].

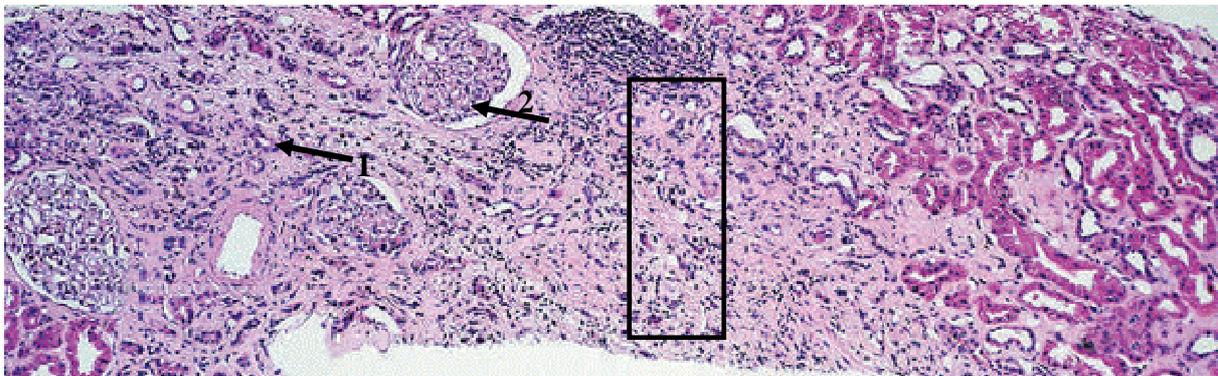


Figure 7 : Néphrotoxicité chronique aux ICN à un stade évolué.

L'image indique des atteintes du tissu rénal associant fibrose interstitielle en bandes (rectangle), atrophie tubulaire (flèche 1) et glomérulosclérose (flèche 2) (hématoxyline-éosine, ×100). D'après Liptak et al., 2006 [25].

Atteintes glomérulaires associées aux ICN

L'atteinte répétée des cellules endothéliales glomérulaires par les ICN peut conduire à une glomérulopathie. Cette atteinte glomérulaire est caractérisée par la formation d'une néo-membrane sous-endothéliale avec une duplication segmentaire et focale de la membrane basale, associée à un élargissement modéré de la matrice mésangiale. La glomérulopathie

induite par les ICN est associée à aux lésions d'artériopathie hyaline qui apparaissent plus sévères dans les glomérules atteints. L'analyse histochimique des glomérules atteints révèle fréquemment la présence de dépôts d'IgM, de C1q, de C3 et plus rarement d'IgA ou IgG [26].

D'autres lésions glomérulaires, moins spécifiques, sont également observables au cours de la néphrotoxicité induite par les ICN : hypertrophie glomérulaire compensatrice, glomérulite, expansion de la matrice mésangiale, collapsus capillaire et lésions de hyalinose segmentaire et focale (HSF). Les lésions d'HSF semblent plus résulter d'une hyperfiltration glomérulaire en réponse à une perte de néphrons fonctionnels que d'un effet toxique direct des ICN sur les podocytes et/ou les cellules endothéliales. Les lésions d'HSF sont généralement observées chez les transplantés rénaux traités par de faibles doses de CsA, ayant une survie prolongée de leur greffon et sont corrélées avec la sévérité de l'artériopathie hyaline [20,47,48].

I.4. PRINCIPAUX MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LA NEPHROTOXICITE DES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE

I.4.1. Généralités

L'ensemble des mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité, aiguë ou chronique, induite par la CsA reste mal connu et on distingue des effets toxiques directs et indirects des ICN sur les cellules rénales. Les mécanismes moléculaires actuellement décrits pour expliquer la néphrotoxicité induite par la CsA et le FK506 sont nombreux [49]. De multiples études, tant *in vitro* qu'*in vivo* ou *ex vivo*, ont démontré la capacité de la CsA à exercer un effet toxique direct sur les cellules du rein humain ou animal et ont permis de mieux comprendre certains des mécanismes moléculaires relatifs à cette toxicité, indépendamment d'effets toxiques indirects de la CsA tels que la vasoconstriction artérielle rénale [36,50-53]. Ces travaux suggèrent par ailleurs que la néphrotoxicité chronique induite par la CsA impliquerait

des voies de signalisation indépendantes de son activité thérapeutique liée à la seule inhibition de la calcineurine [54]. D'autre part, des facteurs génétiques modulant la susceptibilité des patients traités par CsA à développer des lésions de néphrotoxicité pourraient être à l'origine d'une variabilité interindividuelle importante. En effet, des travaux de génotypage réalisés par Hauser *et al.* sur une série de patients transplantés ont récemment démontré qu'une activité réduite du transporteur d'efflux P-gp, associée à certains polymorphismes génétiques, augmente le risque de développer une néphropathie induite par la CsA, probablement par augmentation de la concentration intracellulaire en CsA [55].

I.4.2. Prolifération cellulaire et apoptose

I.4.2.a. Effets de la CsA sur la prolifération cellulaire

Il est communément admis que la CsA exerce un effet majeur et concentration-dépendant sur la prolifération cellulaire de la plupart des lignées rénales humaines ou animales [56,57]. *In vitro*, la CsA entraîne un arrêt du cycle cellulaire et une augmentation de la mortalité cellulaire des cellules épithéliales rénales [58]. Les travaux de Jennings *et al.* à ce sujet ont ainsi montré que la diminution de la prolifération de lignées tubulaires rénales est associée à un vieillissement accéléré de ces cellules empruntant différentes voies de sénescence [59]. Ces travaux ont démontré la capacité de la CsA à augmenter l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire, CDKN1A et CDKN2A, dans des cellules tubulaires proximales humaines (HK-2) et des cultures primaires de cellules tubulaires proximales, respectivement. L'expression de ces inhibiteurs du cycle cellulaire dans les cellules tubulaires résulte d'une activation de la voie de signalisation de la protéine p53 et est associée à un arrêt de la croissance cellulaire en phase G0/G1, à un raccourcissement des télomères et une diminution de la synthèse d'ADN à l'origine de la sénescence de ces cellules [59].

I.4.2.b. Apoptose induite par les ICN

L'apoptose est un processus actif et complexe de mort cellulaire, à l'origine d'une perte de cellules tubulaires, tant physiologiquement nécessaire au maintien de l'homéostasie tissulaire que délétère lorsque la perte cellulaire est excessive [60]. La mort cellulaire par apoptose est observable au cours de diverses atteintes rénales aiguës ou chroniques [61,62]. Lorsqu'il devient excessif, le processus apoptotique entraîne un remaniement inapproprié du tissu rénal et conduit progressivement à l'apparition de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire, caractéristiques importantes de la néphropathie chronique induite par les ICN [61]. La capacité de la CsA à induire la mort cellulaire par apoptose a été démontrée sur des lymphocytes T [63] et également, sur les lignées cellulaires rénales LLC-PK1 et MCT [64,65] ainsi que des modèles animaux de néphropathie chronique induite par la CsA [66-68], où elle est à l'origine d'une altération de la structure rénale.

L'analyse histochimique de biopsies rénales obtenues chez des patients transplantés et présentant une néphropathie chronique induite par la CsA, a mis en évidence une activation de l'apoptose aux niveaux tubulaires et interstitiels [69]. Il est également établi que ces phénomènes apoptotiques et nécrotiques touchant les cellules rénales tubulaires et interstitielles sont corrélés avec la dose et de la durée d'administration de la CsA [64,65,70-72]. Le lien existant entre l'apoptose et l'apparition de lésions de fibrose interstitielle a été démontré dans un premier temps sur un modèle de néphropathie chronique à la CsA développé chez le rat dont le régime était déplété en sels [66]. Les travaux réalisés par Shihab *et al.* en 1999 ainsi que Yang *et al.* en 2002 sur des modèles murins équivalents indiquent clairement une augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques (en particulier : FAS, FAS-L, p53, CPP32, ratio bax/bcl-2 et caspase-3) au niveau des cellules tubulaires et interstitielles suite à un traitement prolongé par CsA [67,68].

L'ensemble des travaux *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*, réalisés au sujet de l'apoptose induite par la CsA suggèrent une toxicité essentiellement mitochondriale et directe de la CsA sur les cellules tubulaires rénales, à l'origine d'une activation de la voie apoptotique dite « intrinsèque » (ou « mitochondriale »), comme indiqué sur la **Figure 8** [73]. En effet, en présence de CsA, la réduction de l'expression de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et IAP, associée à l'augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax [70,74], sont à l'origine de la translocation mitochondriale de Bax qui active alors la libération intracytoplasmique de facteurs pro-apoptotiques et activateurs de caspases : Smac/Diablo et Cytochrome c [71]. Cette activation de l'apoptose « intrinsèque » entraîne une activation des caspases caractéristiques d'un stress cellulaire mitochondrial (caspases -2, -3 et -9), sans modifier ni l'activité de la caspase-8, spécifique de la voie apoptotique « extrinsèque » (ou voie des « cell death receptor »), ni celle de la caspase-12, généralement typique d'une induction apoptotique suite à un stress du reticulum endoplasmique [71]. Cependant, l'activation de l'apoptose des cellules rénales secondairement à un stress de réticulum endoplasmique (RE) induit par la CsA ne peut être exclu, puisque les travaux réalisés par Justo *et al.* en 2003 sur des cellules tubulaires de rat ont mis en évidence une augmentation de l'expression de GADD153/CHOP, une protéine connue pour son implication dans l'apoptose consécutive au stress du RE [71,75].

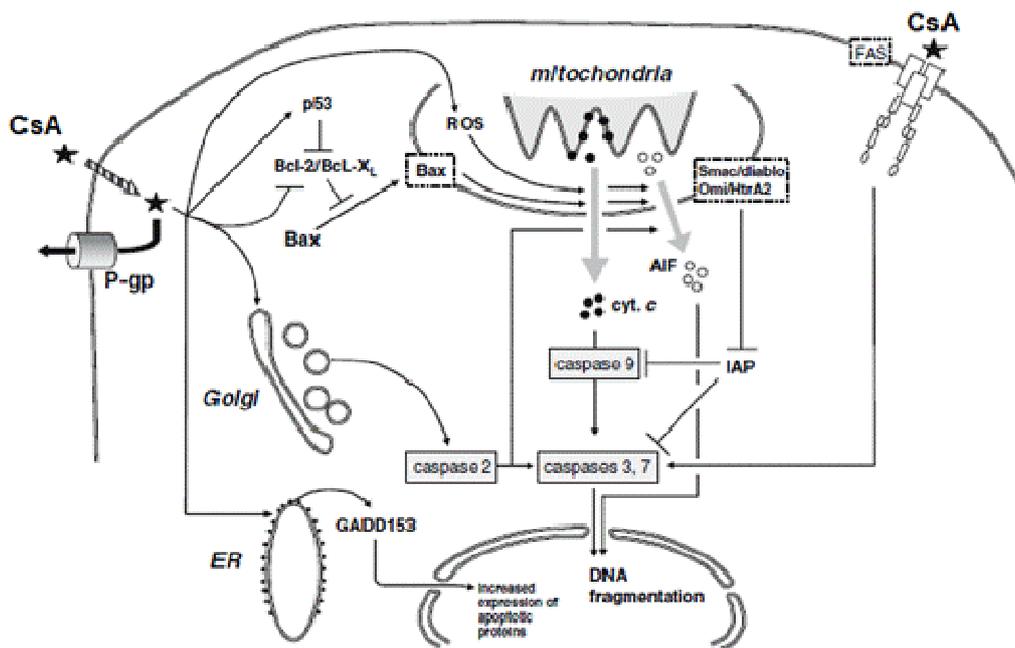


Figure 8 : Activation de l'apoptose par la Cyclosporine A au niveau des cellules tubulaires rénales.

D'après Servais *et al.*, 2008 [73].

D'autre part, des expérimentations *in vitro* et *in vivo* démontrent également la capacité de la cyclosporine à augmenter l'expression membranaire du récepteur FAS, suggérant une possible induction de la voie apoptotique « extrinsèque » [71,74,76]. L'hypothèse d'une activation de cette voie apoptotique reste cependant controversée puisque la CsA ne semble pas augmenter l'activité de la caspase-8 ou augmenter l'apoptose induite par FAS-L, ligand du récepteur FAS [71].

Enfin, une augmentation de l'expression de la protéine p53 a été observée au niveau des cellules tubulaires rénales d'animaux exposés à la CsA, suggérant une possible implication nucléaire et/ou lysosomale dans l'apoptose induite par la CsA [67,68].

I.4.3. Stress du réticulum endoplasmique et autophagie

I.4.3.a. Stress du réticulum et réponse adaptative

Les protéines sécrétées, membranaires ou retrouvées dans les organites intracellulaires, sont pour leur majorité synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) où elles sont repliées et assemblées en complexes multi-protéiques de façon à acquérir une conformation efficace avant leur transport vers leur site d'action (**Figure 9**). Le repliement de ces protéines est réalisé au niveau de la lumière du RE et nécessite l'intervention de protéines chaperonnes résidentes du RE, telles que la calnexine, la protéine BiP (ou GRP78 : Glucose-Regulated Protein 78kDa), les protéines-disulfide isomérases ou encore la GRP94, qui préviennent d'éventuelles erreurs de repliement [77]. A l'issue de ce processus, les protéines dont la conformation demeure inappropriée peuvent être retenues dans le RE, afin de subir une nouvelle action des protéines chaperonnes visant à acquérir une conformation adéquate, ou peuvent également être transloquées au niveau cytoplasmique où elles seront dégradées par le protéasome ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation).

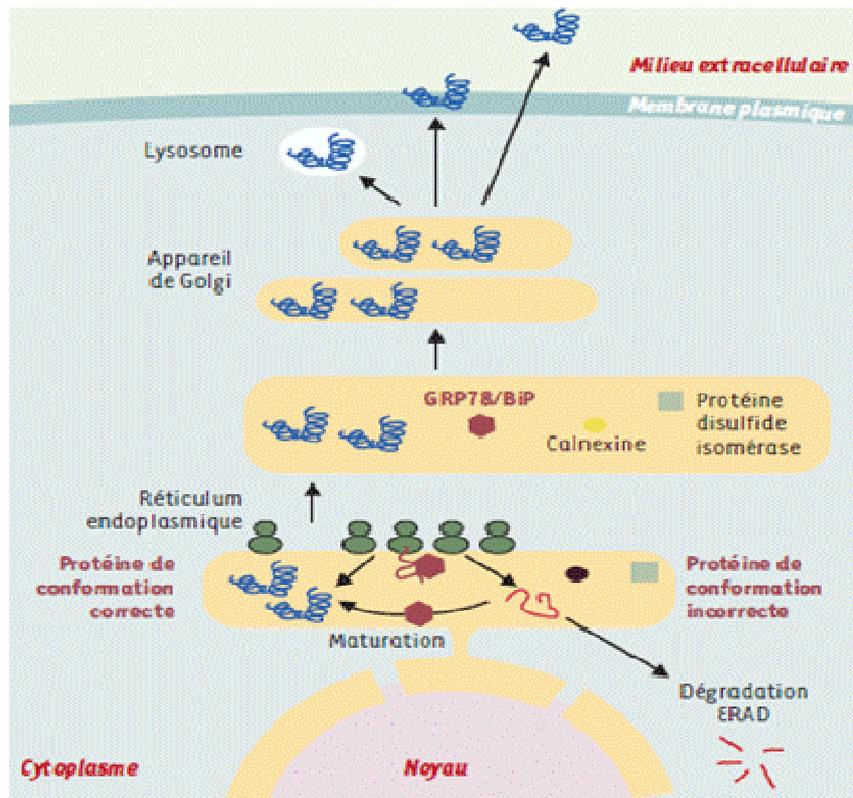


Figure 9 : Représentation schématique de la voie de sécrétion des protéines.

D'après Garlatti et Barouki, 2002 [78].

Au cours de certaines conditions, l'accumulation de protéines mal ou insuffisamment repliées dans le RE peut être à l'origine d'une saturation des systèmes de repliement et/ou de dégradation de ces protéines et activer une réponse de type « stress du réticulum endoplasmique ». La cellule soumise à un tel stress développe alors une réponse adaptative ou réponse UPR (du terme « Unfolded Protein Response ») visant à augmenter les capacités cellulaires de repliement et de dégradation protéiques (**Figure 10**). Cette réponse est donc un phénomène physiologique d'adaptation caractérisé d'une part, par l'activation de la transcription de gènes codant pour les chaperonnes, les protéines du système de dégradation ERAD et d'autre part, par une répression rapide et intense de la synthèse protéique limitant l'afflux de protéines néo-synthétisées dans le RE déjà saturé (**Figure 10**) [79,80].

Au cours d'un stress du RE intense et/ou prolongé, la réponse UPR peut s'avérer insuffisante et orienter la cellule vers un processus de mort cellulaire par apoptose, initiée par l'activation du gène codant pour le facteur de transcription CHOP/GADD153 [79,81,82]. D'une façon générale, les mutations ainsi que les erreurs transcriptionnelles ou traductionnelles peuvent altérer la conformation ou l'oligomérisation protéique et être à l'origine d'un stress du RE. Expérimentalement, le stress du RE est inductible par différentes substances chimiques telles que la tunicamycine (inhibiteur de la N-glycosylation), le dithiothréitol qui rompt les ponts disulfures, la bréfédine A qui bloque le transport protéique du RE vers l'appareil de Golgi ou encore la thapsigargine qui inhibe l'entrée de calcium dans le RE [83-85].

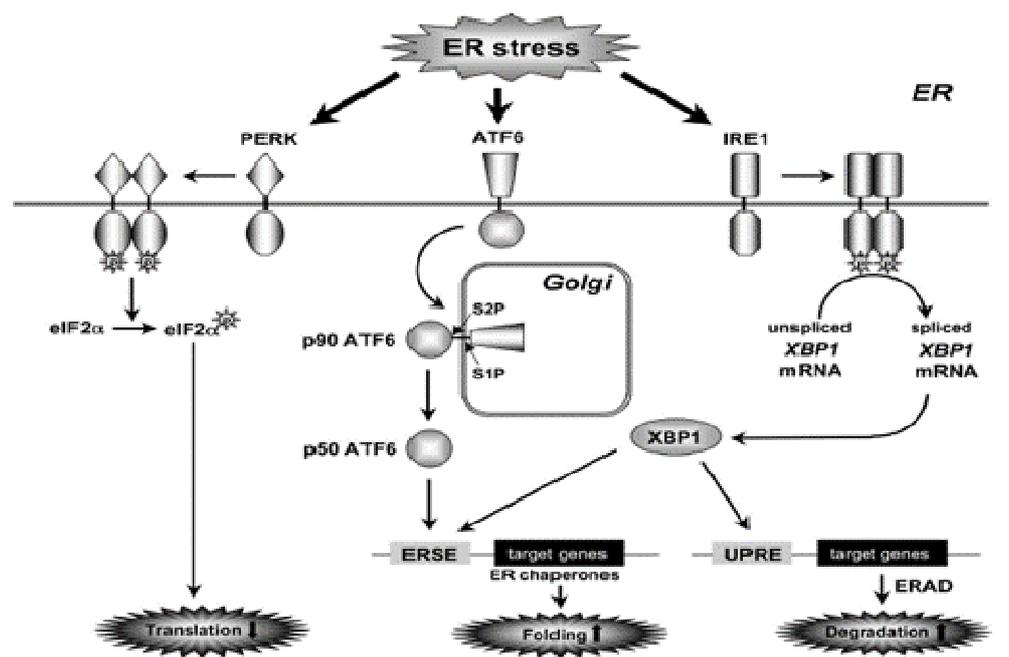


Figure 10 : Représentation schématique des 3 voies de transduction du signal (PERK, ATF6 et IRE1) lors de la réponse UPR suite à un stress du réticulum endoplasmique.

D'après Kitamura, 2008 [86].

I.4.3.b. Stress du réticulum induit par les inhibiteurs de la calcineurine

Une étude toxico-génomique récente réalisée par Pallet *et al.* a suggéré dans un premier temps la capacité de la CsA à induire un stress du RE avec, en particulier, une augmentation significative de l'expression de l'ARN messager de la protéine BiP sur un modèle de culture primaire de cellules rénales, épithéliales et humaines [87]. De plus, l'analyse histochimique de biopsies rénales, provenant de patients transplantés et présentant des signes de néphrotoxicité aiguë ou chronique induite par la CsA, a permis de confirmer l'augmentation de l'expression de ce marqueur du stress du RE [87]. Les résultats de ce travail suggèrent donc un intérêt potentiel de la protéine BiP comme biomarqueur précoce de la néphrotoxicité induite par la CsA. Parallèlement, des études *in vivo*, réalisées sur des souris et des rats avec ou sans transplantation rénale, ont montré que l'exposition, aiguë ou chronique, à la CsA entraîne un stress du RE au niveau des cellules tubulaires rénales [83,86,88-90].

Le rôle actif du stress du RE dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules tubulaires, la fibrose rénale et la mortalité cellulaire induites par la CsA a été mis en évidence par Pallet *et al.* [83]. Ce travail a également démontré que le stress du RE peut constituer une cible thérapeutique intéressante. En effet, le salubrinal, molécule qui diminue les effets délétères de ce stress, en inhibant la déphosphorylation du facteur eIF2 α et donc en stabilisant l'activation de la voie de signalisation de PERK (**Figure 10**), exerce un effet protecteur sur le rein de rats recevant de la CsA. Ainsi, la coadministration de salubrinal avec la CsA résulte, *in vitro* et *in vivo*, en un effet cyto- et néphroprotecteur en diminuant la mortalité cellulaire et la progression morpho-phénotypique des cellules épithéliales rénales vers un type cellulaire protomyofibroblastique, suggestif d'une TEM partielle [83,91]. Un autre travail récemment publié, démontre que, contrairement à la CsA, le FK506 n'induit pas de stress du RE et de modification morpho-phénotypique de type TEM sur un modèle de

cellules endothéliales [91]. Ce travail suggère de l'existence, *in vivo*, de mécanismes toxiques différents pour la CsA et le TAC, et potentiellement indépendants de leur mécanisme d'action pharmacologique commun. Cependant, la capacité du TAC à induire un stress du RE reste controversée puisque les travaux de Du *et al.* en 2009 ont démontré que des concentrations de TAC, toutefois largement supérieures à celles retrouvées au niveau rénal suite à une prise thérapeutique (10 à 50 μ M), pouvaient induire un réponse UPR sur des cellules tubulaires de rat [89].

I.4.3.c. Autophagie induite par la cyclosporine

Des données récentes ont mis en évidence la capacité du stress du RE à induire l'autophagie sur des cellules rénales tubulaires proximales de rat [92]. L'autophagie est un mécanisme physiologique cytoprotecteur par lequel la cellule tente de limiter les effets délétères liés au stress du RE en activant l'autodigestion de protéines et de certains organites intracellulaires [93,94]. En situation de stress, l'autophagie permet donc d'augmenter la viabilité cellulaire en diminuant le niveau de protéines de conformation incorrecte dans le RE et en les recyclant de manière à apporter des nutriments nécessaires aux fonctions cellulaires vitales, ainsi qu'en éliminant les organites cellulaires atteints [94,95]. La capacité de la CsA à activer l'autophagie suite au stress du RE a été mise en évidence par Pallet *et al.* en 2008, par analyse du marqueur de l'autophagie LC3II, sur des cultures primaires de cellules tubulaires humaines et *in vivo* par analyse immunohistochimique de coupes rénales chez le rat [96]. Ce travail suggère que l'augmentation d'expression du marqueur LC3II est rapide, intense et corrélée à celle de BiP. De plus, l'augmentation de LC3II est associée à une augmentation du nombre d'autophagosomes au niveau des cellules tubulaires proximales. Enfin, l'inhibition par siRNA, de l'autophagie induite par la CsA résulte en une augmentation significative de la mortalité des cellules tubulaires rénales *in vitro* [96]. L'ensemble de ces travaux suggère donc

qu'une détection précoce de l'autophagie induite par la CsA, par une mesure du niveau d'expression de LC3II dans les prélèvements biopsiques de patients transplantés rénaux, pourrait constituer une approche intéressante pour dépister la néphrotoxicité induite par la CsA et permettre d'anticiper l'apparition de lésions irréversibles induites par la CsA (réduction de posologie ou proposition d'une alternative thérapeutique par exemple).

I.4.4. Stress oxydant

La CsA présente la capacité, *in vitro* et *in vivo*, de générer un stress oxydant sur différents types cellulaires [97,98]. Au niveau rénal, des travaux suggèrent l'implication des radicaux libres et de substances réactives de l'oxygène (ROS) dans l'apparition des lésions de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire après une exposition chronique à la CsA. Ces substances sont formées au niveau du compartiment tubulo-interstitiel suite aux phénomènes hypoxiques et ischémiques locaux provoqués par la vasoconstriction induite par les ICN [99]. D'autres études suggèrent que la formation de radicaux libres et de ROS sont à l'origine d'atteintes cellulaires directes telles que sénescence ou apoptose au niveau du compartiment tubulo-interstitiel [59,100]. La production de radicaux libres et d'autres substances oxydantes pourrait ainsi être la cause de dégâts cellulaires par activation de voies de signalisation, impliquant notamment la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) ou encore certaines MAP kinases (ERK ou Extracellular signal-Regulated Kinases) et expliquer, en partie, la toxicité cellulaire rénale exercée par la CsA [101]. Cependant, le lien existant entre la production de ROS et l'activation de la voie de toxicité cellulaire impliquant PI3K reste controversé. En effet, un travail récent, sur cellules rénales murines, mettant en évidence l'effet protecteur d'un inhibiteur de PI3K sur la mortalité cellulaire induite par la CsA, suggère une implication de l'activation de PI3K en dehors de toute variation de la production de substances pro-oxydantes [102].

De nombreux travaux ont mis en évidence un effet bénéfique d'agents antioxydants, tels que la vitamine E ou la glycine, en prévention de l'apparition des lésions de fibrose interstitielle sur des modèles animaux de néphrotoxicité à la CsA [100,103-106] ainsi que sur des lignées cellulaires rénales [104,107,108]. L'apport exogène d'agents aux propriétés antioxydantes pourrait ainsi limiter l'apparition de ces lésions en diminuant les phénomènes de peroxydation lipidique liés à la formation de substances réactives de l'oxygène en quantité excessive. Plus récemment, les travaux réalisés par Padi *et al.* ont démontré que le carvedilol, β -bloquant largement utilisé dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, présente un effet rénoprotecteur sur un modèle animal de néphrotoxicité chronique induite par la CsA du fait de ses propriétés anti-lipopéroxydantes : amélioration significative de la fonction rénale et d'une diminution des remaniements tissulaires rénaux observables lors d'un traitement chronique par CsA [109].

I.4.5. Vasoconstriction induite par les inhibiteurs de la calcineurine

I.4.5.a. Perturbations du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone

La CsA est à l'origine d'une activation du système rénine-angiotensine (SRA) par action à la fois directe sur les cellules juxta-glomérulaires, en stimulant leur sécrétion / production de rénine [110] et indirecte, du fait de la vasoconstriction artériolaire résultant d'un déséquilibre entre agents vasodilatateurs (prostacycline, prostaglandine E2 et monoxyde d'azote ou NO) et vasoconstricteurs (endothéline, thromboxanes A2) [111]. L'activation du SRA aboutit, par l'action de l'angiotensine II, à une réduction du débit sanguin rénal, aggravant ainsi les troubles hémodynamiques causés par les ICN. Par ailleurs, la CsA potentialise les effets vasoconstricteurs de l'angiotensine II sur les cellules musculaires lisses, en modifiant les stocks de calcium intracellulaires et la contractilité des cellules musculaires lisses [112]. Les mécanismes moléculaires exacts par lesquels la CsA stimule la synthèse de

rénine par les cellules juxta-glomérulaires, induit le recrutement de cellules sécrétant la rénine au niveau des artérioles afférentes ou conduit à des altérations des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire demeurent mal expliqués [113]. Récemment, les travaux réalisés par Madsen *et al.* ont suggéré qu'une inhibition de la calcineurine par la CsA, mais pas le TAC, stimule l'exocytose de rénine dans des cultures primaires de cellules juxtaglomérulaires prélevées chez le rat [114].

I.4.5.b. Modification de la sécrétion des médiateurs vasoactifs

Perturbation de la vasodilatation induite par le monoxyde d'azote (NO)

Au niveau rénal, le monoxyde d'azote (NO) est un agent vasodilatateur important, assurant une régulation du tonus vasculaire en réponse aux contraintes mécaniques imposées par le flux sanguin. Outre son action vasodilatatrice, le NO intervient dans de nombreux processus physio-pathologiques rénaux en prévenant l'apparition de thromboses et d'ischémies glomérulaires, ainsi qu'en diminuant la prolifération des cellules mésangiales, la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire ou encore l'infiltration de cellules inflammatoires au niveau interstitiel [115]. Le NO est produit à partir de L-arginine sous l'action de l'enzyme NO-synthase (NOS), présente au niveau rénale sous trois isoformes : NOS-neuronale (nNOS), NOS-inductible (iNOS) et NOS-endothéliale (eNOS). Dans le rein, nNOS est spécifiquement exprimée par les cellules de la *macula densa*, iNOS est retrouvée dans les cellules mésangiales et tubulaires proximales, et eNOS est essentiellement exprimée dans les cellules endothéliales des artérioles (afférentes ou efférentes) et des capillaires glomérulaires [115,116].

Le rôle du NO dans la pathogénèse de la néphrotoxicité induite par la CsA a fait l'objet de nombreuses études. Dans un premier temps, la capacité de la CsA à modifier l'expression des différentes isoformes de NOS et à perturber la production de NO a été mise en évidence dans les cellules rénales de rats exposés chroniquement à la CsA [117-120]. Les travaux ultérieurs réalisés par Hortelano *et al.* en 2000 sur des cellules rénales tubulaires proximales ont démontré la capacité des ICN, CsA et TAC, à inhiber l'activité NOS, diminuant ainsi la production locale de monoxyde d'azote (NO) et donc la vasodilatation rénale induite par le NO [72]. Les ICN présentent en effet une capacité à diminuer l'activité de la NO synthase endothéliale (eNOS) par différents mécanismes, en particulier en inhibant la déphosphorylation calcineurine-dépendante de eNOS [121,122]. Par ailleurs, l'hypoxie induite par les ICN et résultant de la vasoconstriction rénale décrite précédemment entraîne une augmentation de la production de radicaux libres, d'ions superoxydes (peroxynitrites) dans les cellules endothéliales rénales, responsables d'une diminution de biodisponibilité du NO [123-126]. Les ICN seraient donc responsables d'une diminution de production et de biodisponibilité du NO, aggravant ainsi les phénomènes de vasoconstriction décrits précédemment et conduisant à des effets secondaires des ICN tels que hypertension et diminution du débit de filtration glomérulaire [127]. Par ailleurs, plusieurs équipes ont démontré l'effet bénéfique d'un apport exogène de L-arginine en prévention des troubles de la fonction rénale, de l'atteinte artériolaire et de la fibrose interstitielle chez le rat [128-130]. De plus, l'apport de L-arginine diminuerait l'accumulation de matrice extracellulaire et la surexpression de TGF- β 1 induites par la CsA [129].

Effet des ICN sur l'expression de la Cyclooxygénase-2 (COX-2)

Les ICN entraînent également une perturbation du ratio métabolites vasodilatateurs / vasoconstricteurs de l'acide arachidonique impliqués dans la régulation de la vasoconstriction

rénale. Les travaux réalisés par Sugimoto *et al.* suggèrent une régulation de l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) par fixation de NFAT sur une zone promotrice du gène de COX-2 dans un modèle de cellules mésangiales glomérulaires [131]. Ainsi, des travaux réalisés chez le rat ont démontré que l'inhibition pharmacologique de l'activité calcineurine par la CsA ou le tacrolimus était associée à une diminution de l'expression de COX-2, expliquant ainsi un mécanisme de perturbation de l'homéostasie vasculaire rénale par les ICN [132,133]. A ce niveau, on peut d'ailleurs constater un certain nombre de similarités entre les effets rénaux associés aux ICN et ceux des inhibiteurs sélectifs de COX-2, en particulier : vasoconstriction des artérioles rénales afférentes avec diminution du débit de filtration glomérulaire, rétention hydrosodée et potassique [134,135]. L'inhibition de l'expression de COX-2 par les ICN pourrait donc entraîner une diminution de synthèse de certains eicosanoïdes, tels que la prostaglandine E2, impliqués dans la régulation de l'homéostasie vasculaire, la synthèse et la sécrétion de rénine au niveau juxta-glomérulaire ou la rétention hydrosodée au niveau du tubule rénal [136].

Déséquilibre entre médiateurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs induit par les ICN

Les ICN sont responsables de perturbations vasculaires aiguës résultant d'un déséquilibre entre agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs, à l'origine d'une vasoconstriction artériolaire rénale. Une augmentation de la sécrétion d'endothéline attribuable à la CsA a été décrite sur cultures cellulaires [137], chez le rat [138,139] ou encore chez l'homme, dans des urines de patients transplantés hépatiques et traités par CsA ou tacrolimus [140]. D'autre part, une sécrétion accrue de thromboxane A2 vasoconstricteur a également été décrite par Rossini *et al.* au cours de néphrotoxicité aiguë induite par les ICN [141]. A ces effets s'ajoutent également une diminution de la libération d'agents vasodilatateurs telles que prostacycline, prostaglandine E2 et NO au niveau rénal, entraînant

un déséquilibre entre agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs et renforçant la vasoconstriction artériolaire rénale [111].

I.4.5.c. Action des ICN sur le système nerveux sympathique

Dès 1985, les travaux menés par Moss *et al.* chez le rat ont démontré la capacité de la CsA à activer les innervations rénales sympathiques afférentes et efférentes [142]. Les mécanismes moléculaires d'excitation sympathique par la CsA sont encore mal compris mais pourraient s'expliquer par un effet excitateur de l'inhibition de la calcineurine sur la libération de vésicules au niveau des terminaisons nerveuses [143,144]. Cet effet sympathique de la CsA entraîne une vasoconstriction rénale et une rétention hydrosodée avec diminution du débit de filtration glomérulaire [144]. Plus récemment, une étude clinique menée par Hausberg *et al.* en 2006 n'a pas retrouvé d'effet sympathique de la CsA chez des patients transplantés rénaux du fait de l'absence d'innervation et suggère que cet effet s'exerce essentiellement chez les sujets présentant un rein natif [145].

I.4.6. Transition épithélio-mésenchymateuse et modifications du cytosquelette

I.4.6.a. Transition épithélio-mésenchymateuse induite par les ICN

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) se définit par la capacité des cellules épithéliales à subir une transition vers d'autres phénotypes en fonction de la pression environnementale qu'elles subissent et de ses conséquences sur la régulation génique de ces cellules [146]. Contrairement aux cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses en culture sont caractérisées par leur capacité à former des couches cellulaires « désorganisées » avec une absence de polarisation apico-basale, de rares contacts focaux, une mobilité accrue ainsi qu'une morphologie, en aiguille, proche des fibroblastes. La TEM a été décrite au cours

de divers processus, tant physiologiques que pathologiques, tels que l'embryogénèse, la néoplasie et la fibrose rénale, hépatique ou pulmonaire [147].

Depuis quelques années, il a été montré que l'exposition à la CsA est associée *in vitro* [83,91] et *in vivo* [148] à l'apparition de modifications phénotypiques des cellules épithéliales évoquant un processus de TEM. Ces travaux ont également permis de mettre en évidence le rôle actif du stress du RE dans la TEM des cellules tubulaires et la fibrose rénale induites par la CsA. En clinique, la présence de marqueurs de TEM tels que l'expression *de novo* de la vimentine ou la translocation de la β -caténine sur la biopsie rénale réalisée à 3 mois de greffe permet ainsi de prédire le développement d'une fibrose du greffon à un an et s'avère associée à une dégradation de la fonction rénale [149]. À ce jour, la majorité des études concernant la TEM en transplantation rénale a été réalisée chez des receveurs sous CsA [150]. En revanche, le lien entre le TAC et la TEM reste peu étudié.

I.4.6.b. Modifications du cytosquelette induites par les ICN

L'implication de la calcineurine dans la régulation de l'organisation des microtubules a été initialement suggérée dans les cellules neuronales et les myocytes [151,152]. Quelques études se sont intéressées aux effets des ICN sur le cytosquelette des cellules rénales et l'expression de protéines associées à son organisation. Ces travaux ont montré un certain nombre de modifications induites par la CsA comme une diminution de l'expression de la protéine d'adhésion cellulaire E-cadhérine [153,154], une délocalisation de la protéine de jonction ZO-1 [154] ou encore une augmentation de l'expression de villine dans les surnageants cellulaires [155].

Quelques études ont aussi mis en évidence une réorganisation du cytosquelette d'actine induite par la CsA (mais pas TAC) dans les cellules rénales [154,156,157]. Ainsi

Faul *et al.* ont montré que la CsA est à l'origine d'une modification de l'organisation de l'actine dans les podocytes par le biais d'une nouvelle voie de signalisation impliquant la synaptopodine [157]. L'inhibition de la calcineurine par la CsA est à l'origine d'une stabilisation du réseau d'actine permettant le maintien de la structure cellulaire ce qui explique l'effet bénéfique de ce médicament dans le traitement des podocytopathies comme la néphrose lipidique ou la hyalinose segmentaire et focale (HSF) [157]. Nous avons montré dans le laboratoire qu'une telle du cytosquelette d'actine est aussi observée dans les cellules tubulaires proximales exposées à des doses pharmacologiques de CsA [156] Cette réorganisation qui est assez proche de celle qui est observée en réponse au flux tubulaire (**Figure 11**) pourrait altérer la réponse des cellules tubulaires aux modifications de flux associées à l'hyperfiltration et pourrait contribuer ainsi à la progression des lésions tubulo-interstitielles. Les mécanismes de cette réorganisation sont différents de ceux découverts par Faul et al et semblent impliquer une voie NFAT indépendante passant par la déphosphorylation de la cofiline, une des protéines de contrôle de l'actine [155].

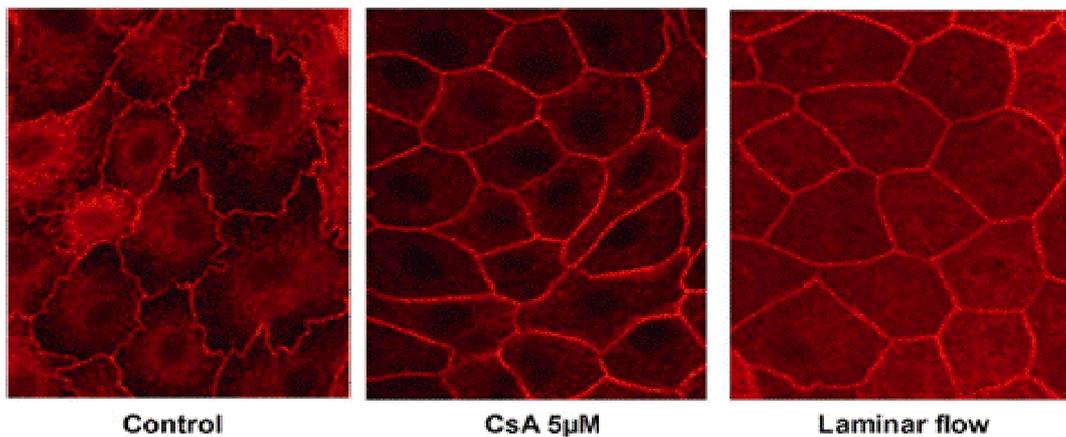


Figure 11 : Images en microscopie confocale ($\times 100$), indiquant, dans les cellules LLC-PK1 traitées par CsA, une modification globale de la structure cellulaire, une rigidification latérale du cytosquelette d'actine qui est proche de celle observée en situation de flux tubulaire.

Adapté de Descazeaud V. *et al.*, 2011 [156].

I.5. RESUME DES PRINCIPAUX MECANISMES IMPLIQUES DANS LA NEPHROTOXICITE DES ICN

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine, ainsi que la nature des lésions histologiques associées, apparaissent donc très complexes et variés. La **Figure 12** est un résumé des principaux effets, directs et indirects, des ICN et leurs conséquences sur la physiologie, l'histologie et la fonction rénale [49]. Cette figure illustre la complexité des mécanismes et voies de signalisation intervenant dans la pathogénèse de la néphrotoxicité induite par les ICN, qu'elle soit aiguë ou chronique, et qui touche différentes parties du tissu rénal. Par ailleurs, aux mécanismes figurant sur cette figure s'ajoutent également des mécanismes récemment décrits au niveau des cellules tubulaires proximales, tels que la réorganisation du cytosquelette des cellules tubulaires, le stress du réticulum endoplasmique et l'autophagie. La **Figure 12** montre que des lésions induites par les ICN, observables sur différents compartiments du rein, sont intimement liées par des relations de causes à effets. Cette figure indique également un lien existant entre certains mécanismes impliqués dans les néphrotoxicités, aiguë et chronique, des ICN. Dans le cadre de ce travail, nous nous intéressons aux modifications de l'expression protéique induites par les ICN et pouvant intervenir localement, au niveau tubulo-interstitiel, mais aussi potentiellement sur les structures alentour par le biais de protéines sécrétées.

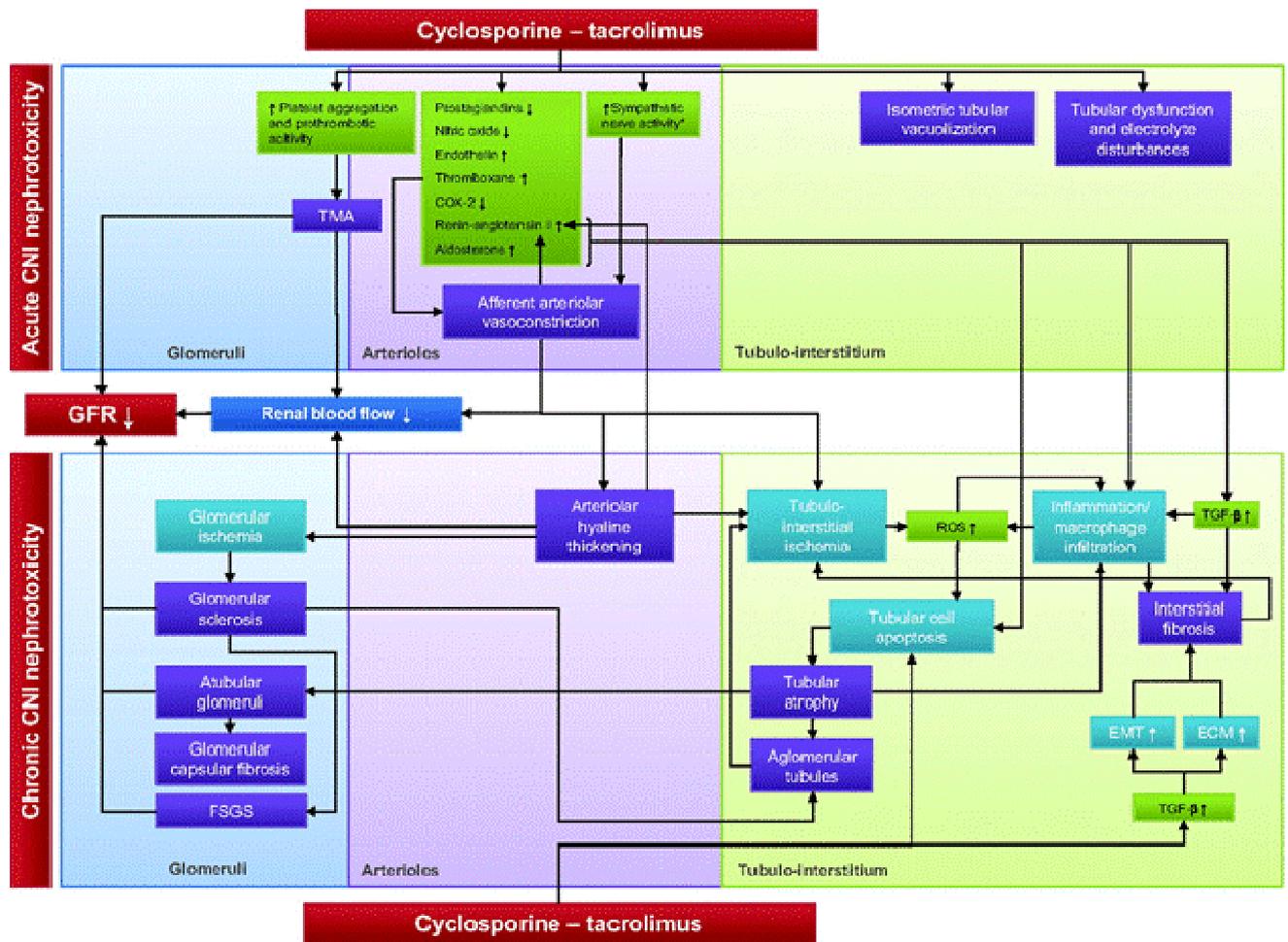


Figure 12 : Représentation schématique récapitulant les principaux mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité aiguë ou chronique des ICN et leurs conséquences.

Les mécanismes moléculaires de toxicité des inhibiteurs de la calcineurine (rectangles verts) sont reliés par des flèches aux conséquences histologiques et fonctionnelles (rectangles bleus) observées au niveau rénal (compartiments glomérulaires, artériolaires et tubulo-interstitiels). CNI, Inhibiteurs de la calcineurine; TMA, microangiopathie thrombotique; EMT, transition épithelio-mésenchymateuse; ECM, matrice extracellulaire; GFR, débit de filtration glomérulaire; FSGS, glomérulosclérose focale segmentaire; ROS, substances réactives de l'oxygène. D'après Naesens et al., 2009 [49].

II. APPROCHES PROTEOMIQUES QUANTITATIVES D'ANALYSE DES MODIFICATIONS PHENOTYPIQUES INDUITES PAR LES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE

II.1. CHOIX DE LA STRATEGIE DE PROTEOMIQUE QUANTITATIVE

Parmi les méthodes d'analyses physico-chimiques, la spectrométrie de masse occupe aujourd'hui une place importante grâce à ses performances, en terme de limite de détection, de sensibilité et de spécificité, et aux diverses techniques d'ionisation et de détection, qui permettent les investigations les plus variées. Son champ d'application s'est considérablement accru depuis les années cinquante, passant de la chimie et biochimie au milieu médical et pharmaceutique, ainsi que dans les domaines agro-alimentaires et environnementaux.

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéressons aux perturbations protéomiques quantitatives relatives, plutôt que qualitatives, induites par les inhibiteurs de la calcineurine dans les cellules rénales. Ainsi, nous présentons par la suite une liste non exhaustive des principales techniques protéomiques potentiellement applicables à l'étude des modifications quantitatives de l'expression protéique de lignées cellulaires rénales traitées par des inhibiteurs de la calcineurine : 2D-PAGE, 2D-DIGE, ICAT, iTRAQ et SILAC. Chacune de ces techniques présente ses avantages et ses inconvénients. Toutefois, pour les techniques les plus récentes, utilisant un marquage chimique (ICAT, iTRAQ) ou métabolique (SILAC) des peptides ou des protéines, il convient d'introduire l'étape de marquage le plus précocement possible dans le processus de préparation des échantillons (**Figure 13**).

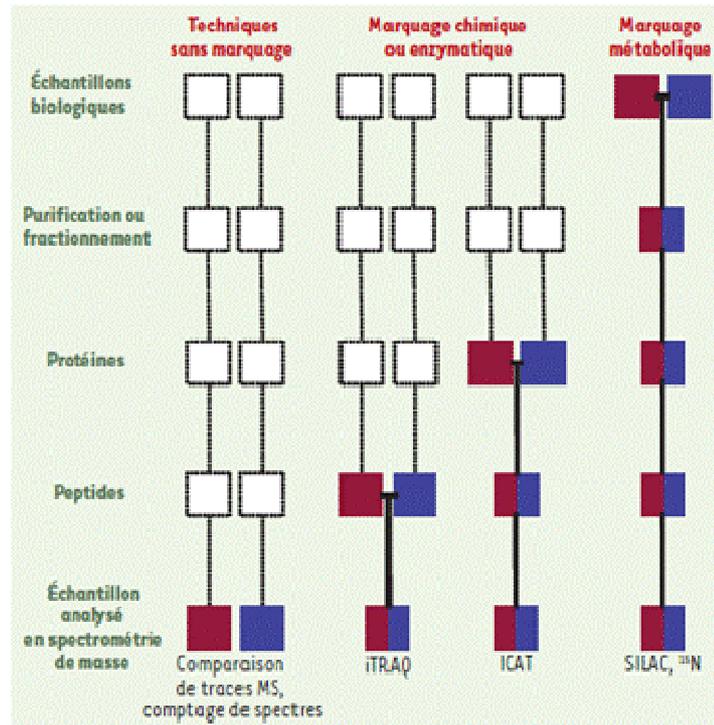


Figure 13 : Différents types d’approches de protéomique quantitative : impact du marquage et/ou des étapes de préparation des échantillons sur la qualité de la quantification différentielle.

Les échantillons à comparer sont représentés en rouge et bleu, la ligne pleine horizontale représente l’étape où ces échantillons sont combinés ; lignes verticales pointillées : étapes où les échantillons sont traités en parallèles au cours desquelles des erreurs de quantification non compensées peuvent être introduites. D’après Ong S.E. and Mann M., 2006 [158].

Comme il est indiqué dans la **Figure 13**, l’introduction précoce de ce marquage permet de limiter les erreurs de quantification liées à la manipulation « en parallèle » de chaque échantillon à comparer [159]. Ainsi, les méthodologies protéomiques utilisant un marquage (ICAT, iTRAQ ou SILAC) sont généralement considérée comme préférables et plus fiables que les approches de type « spectral count » qui consistent à comparer et à

quantifier directement les tracés MS et MS/MS issus de deux conditions expérimentales distinctes pour mesurer des différences d'expression protéiques (**Figure 13**). Par opposition aux approches protéomiques « classiques », basées sur la séparation électrophorétique des protéines (2-DE, 2-D DIGE), au cours de la stratégie SILAC cette étape de marquage est réalisée le plus précocement possible, ce qui en fait à l'heure actuelle une des méthodes de protéomique quantitative les plus fiables et les plus performantes.

II.2. APPROCHES PROTEOMIQUES BASEES SUR UNE SEPARATION DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE

II.2.1. Electrophorèse bi-dimensionnelle des protéines sur gel de polyacrylamide (2D-PAGE ou 2-DE)

La méthode la plus largement utilisée pour l'analyse protéomique est la 2D-PAGE, qui combine une première séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique par isoélectrofocalisation (IEF) suivie d'une deuxième séparation en fonction de leurs masses apparentes par SDS PAGE. Les protéines ainsi séparées apparaissent sous la forme de spots (ou taches) et sont ensuite colorées directement sur gel et l'intensité de leur coloration est directement proportionnelle à leur abondance. La variation d'expression relative d'une même protéine entre deux conditions expérimentales est appréciée au moyen d'un logiciel adapté à l'analyse différentielle des spots obtenus (**Figure 14**). Les spots correspondant aux protéines dont l'expression apparaît significativement modifiée sont en général excisés pour obtenir leur identification par spectrométrie de masse après leur digestion par la trypsine, soit directement par analyse MALDI/TOF/TOF soit par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). La 2D-PAGE est une technique assez résolutive, permettant de séparer jusqu'à 5000 protéines présentes dans un échantillon.

Cependant, cette technique affiche des limites considérables : elle présente en particulier un manque de reproductibilité inter-expériences, elle est difficilement applicable aux protéines membranaires, aux protéines de faible abondance ainsi qu'aux protéines présentant des points isoélectriques extrêmes (généralement inférieurs à 3 ou supérieurs à 8). Une confirmation de ces observations par une approche complémentaire reste donc nécessaire. La variabilité analytique inhérente à la 2D-PAGE nécessite également de fixer un seuil de détection des perturbations protéiques relativement élevé (en général $\geq 1,4$ entre deux conditions expérimentales), rendant difficile la mise en évidence de modifications phénotypiques fines. De plus, la quantité de matériel biologique requis est généralement important ($\geq 200\mu\text{g}$ de protéines par échantillon). Du fait de ces limites et de sa complexité technique, la 2D-PAGE est difficilement adaptable à une stratégie analytique « haut débit », nécessaire à l'étude des perturbations protéiques quantitatives induites par un (ou des) traitement(s) médicamenteux.

Cette approche protéomique est, à notre connaissance, la seule qui a été appliquée à l'analyse des modifications de l'expression protéique induites par la CsA, *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines (HK-2) et murines (PCT3) [160] ou *in vivo* à partir de prélèvement biopsiques ou biologiques provenant de modèles murins de néphrotoxicité aux ICN [161-163].

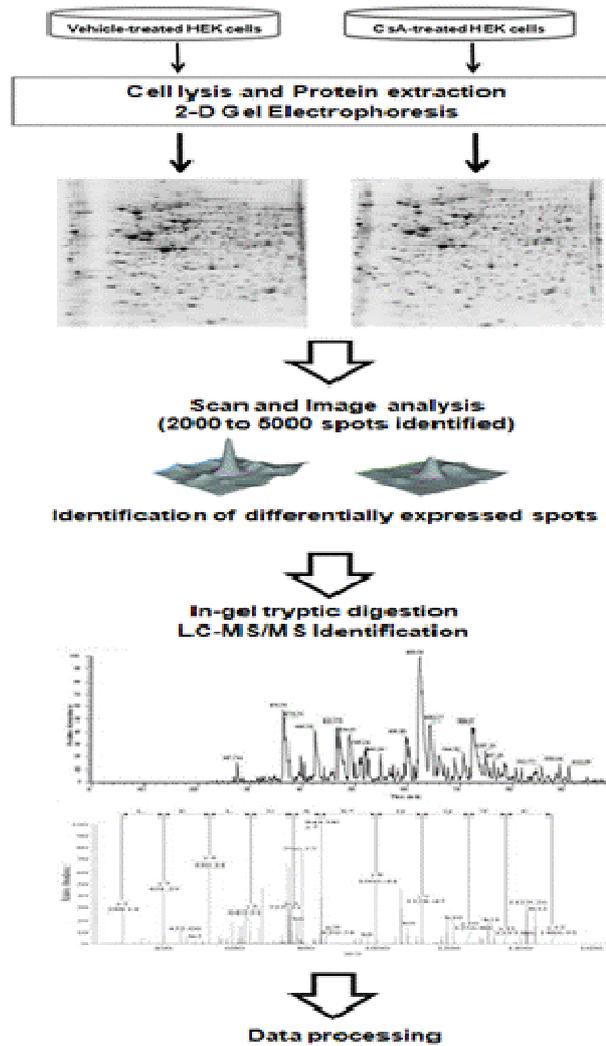


Figure 14 : Représentation schématique du principe général de l’analyse protéomique par 2D-PAGE.

Dès 1998, l’application de cette technique a permis de mettre en évidence une diminution significative de la protéine calbindin-D 28kDa dans des biopsies rénales de patients transplantés et présentant des signes de néphrotoxicité induite par la CsA [161]. Les analyses par 2D-PAGE de cellules rénales en culture [160] ou du tissu rénal de rats [163] et de souris [162] traités par CsA ont par la suite conduit à identifier des perturbations de protéines impliquées dans le métabolisme, la structure, l’adhésion ou l’homéostasie de la

cellule tubulaire rénale. Cette approche protéomique a ainsi permis de confirmer des mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénèse de la néphrotoxicité induite par la CsA et de suggérer de nouvelles hypothèses concernant les voies de signalisation cellulaire de cette toxicité.

II.2.2. Analyse protéomique différentielle par électrophorèse en gel et fluorescence (2D-DIGE)

Des améliorations ont été proposées pour palier certaines limites présentées par l'approche 2D-PAGE, telles que la technique 2D-DIGE qui a pour objectif d'améliorer la reproductibilité de l'analyse en comparant deux profils électrophorétiques 2D sur un même gel au moyen d'un marquage spécifique des lysines par fluorescence [164]. Dans cette technique, 2 échantillons (provenant de 2 conditions expérimentales différentes) sont marqués par 2 cyanines excitables à des longueurs d'ondes différentes, puis mélangés et soumis à une séparation 2D-PAGE classique. L'expression différentielle des protéines est déterminée ensuite grâce au rapport des intensités des fluorophores utilisés. Ainsi, en 2D-DIGE l'analyse de deux échantillons protéiques est réalisable sur un même gel grâce au marquage préalable par des fluorophores distincts. L'analyse protéomique différentielle est réalisée par excitation de fluorescence du gel aux longueurs d'ondes d'excitation appropriées à chaque cyanine et la superposition des deux colorations révèle l'expression protéique globale de chaque échantillon. La mesure de la différence de quantité de protéines pour chacun des spots présents sur le gel est effectuée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images approprié avant leur excision pour identification par spectrométrie de masse comme en 2D classique.

Par rapport à la technique 2-DE originale, cette approche permet de gagner en reproductibilité, en limitant la variabilité analytique résultant de la comparaison de deux gels, et de diminuer le nombre de réplicats à analyser. De plus, l'utilisation de fluorophores permet

d'améliorer la sensibilité et d'abaisser le seuil de détection des perturbations protéiques par rapport à la technique 2D-PAGE, rendant possible la détection de modifications phénotypiques plus fines (≥ 1.3 versus contrôle en général) ainsi que la quantification relative de protéines faiblement représentées (jusqu'à 1 ng) [165]. Malgré ces innovations, cette approche protéomique dérivée de la 2D-PAGE reste limitée par un manque de résolution pour l'analyse différentielle des protéines membranaires, acides ou basiques.

II.3. APPROCHES PROTEOMIQUES BASEES SUR UNE SEPARATION DES PEPTIDES PAR CHROMATOGRAPHIE

II.3.1. Protéomique quantitative par marquage chimique *in vitro*

II.3.1.a. Approche ICAT ou « Isotope-Coded Affinity Tag »

L'ICAT est la plus ancienne approche de protéomique quantitative relative basée sur la spectrométrie masse. Cette technique a été proposée par Gygi *et al.* en 1999 pour étudier *in vitro* les modifications protéiques quantitatives dans des mélanges complexes [166]. Elle repose sur un marquage chimique des protéines au moyen d'un réactif se greffant par alkylation sur les fonctions thiols des résidus cystéines (**Figure 15A**). Ce réactif est constitué de trois parties : i) l'iodoacétamide qui constitue la partie réactive en se liant aux fonctions « SH- » des cystéines ; ii) une partie centrale qui existe sous deux formes stables : soit « alourdie » par 8 atomes de carbone 13 (^{13}C) ou de deutérium (^2H), soit « légère » composée de 8 atomes de carbone 12 (^{12}C) ou d'hydrogène (^1H) ; iii) la biotine ou « affinity tag » qui permet d'isoler / enrichir ultérieurement les peptides marqués, grâce à leur forte affinité pour la streptavidine (**Figure 15A**). Le marquage des protéines par le réactif ICAT est réalisé après exposition des échantillons (cellules, tissus) à un traitement, chaque échantillon étant mis en

présence soit du réactif léger soit du réactif alourdi. Les protéines marquées, issues de deux conditions expérimentales distinctes, sont ensuite combinées en quantités égales (légères/alourdies, 1:1) et digérées en peptides par la trypsine. Les peptides obtenus sont purifiés sur colonne d'affinité grâce au groupement « affinity tag » du réactif ICAT et analysés par LC-MS/MS ou MALDI-TOF/TOF. La quantification différentielle de l'expression protéique est réalisée en mesurant le rapport « léger/alourdi » pour chaque paire de peptides (**Figure 15B**). Le principal inconvénient de cette approche est qu'elle se limite à la quantification de protéines présentant des groupements –thiols accessibles au réactif ICAT, ce qui rend l'étape d'extraction et de dénaturation des protéines déterminante.

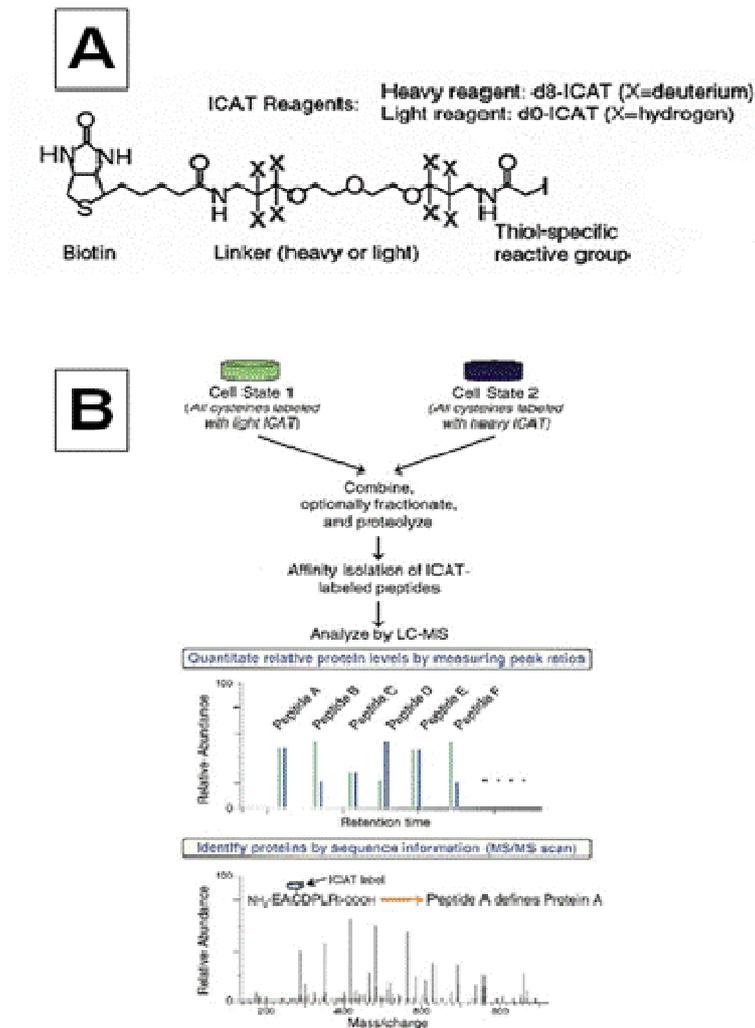


Figure 15 : (A) Structure chimique du réactif de marquage ICAT. (B) Principe de l’approche protéomique quantitative ICAT.

D’après Gygi S.P. *et al.*, 1999 [166].

Dans le domaine de la Pharmacologie et de la Toxicologie, la stratégie ICAT est régulièrement appliquée pour identifier des biomarqueurs de toxicité et étudier des voies de signalisation impliquées dans la réponse à certains traitements [167]. Cette approche protéomique est également employée en cancérologie pour comparer les profils d’expression protéiques entre lignées cellulaires saines et cancéreuses dans le but d’identifier des biomarqueurs tumoraux [168].

II.3.1.b. Approche iTRAQ ou « Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification »

La stratégie iTRAQ a été décrite en 2004, elle consiste en un marquage « multiplexé » des peptides et permet de comparer les profils d'expression protéique dans des échantillons différents (généralement, 4 à 8 échantillons sont comparés) [169]. Au cours de cette approche, les peptides sont marqués sur leur groupement amine (NH₂-) terminal par les réactifs iTRAQ. Pour chaque condition expérimentale, les peptides issus d'une digestion par la trypsine sont marqués par un réactif iTRAQ spécifique, de manière à introduire une variation de masse caractéristique de chaque population peptidique. Les réactifs iTRAQ sont constitués de 3 parties (**Figure 16A**) : i) le groupement « reporter », permettant le marquage des peptides, il diffère entre les 4 à 8 formes du réactif utilisées par sa masse (114 à 117 Da, pour 4 échantillons dans cet exemple) ; ii) le groupement « balance » dont la masse varie (de 31 à 28 Da, dans cet exemple), selon le groupement reporter associé, de manière à équilibrer et homogénéiser la masse finale du marquage entre les différentes conditions expérimentales ; iii) le groupement réactif qui lie de manière covalente les réactifs iTRAQ isobares aux amines primaires libres du peptide.

La combinaison entre les groupements « reporter » et « balance » est donc égale à 145 Da et le « reporter » confère à la méthode sa spécificité lors de l'analyse des peptides par MS/MS (**Figure 16B**). Après digestion tryptique et marquage des peptides par les réactifs iTRAQ, les échantillons provenant de 2 à 8 conditions expérimentales indépendantes sont mélangés en quantité égale. Le mélange peptidique est ensuite purifié et analysé par LC-MS/MS pour comparer les niveaux d'expression relatifs des protéines dans chaque échantillon.

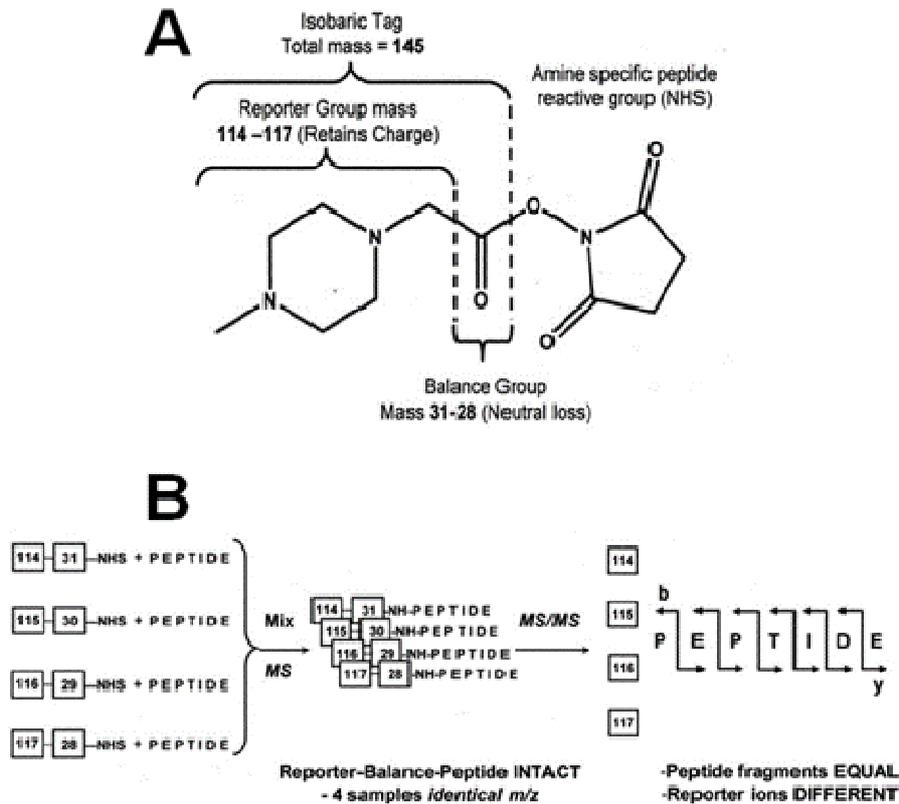


Figure 16 : (A) Structure chimique du réactif de marquage iTRAQ. (B) Principe de l'approche protéomique quantitative iTRAQ.

D'après Ross P.L. *et al.*, 2004 [169].

La méthodologie iTRAQ, comme la technique ICAT, est à ce jour essentiellement utilisée pour la recherche de biomarqueurs. A titre d'exemple, en transplantation rénale cette approche a récemment permis de proposer plusieurs protéines plasmatiques comme biomarqueurs précoces de rejet aigu du greffon rénal [170]. En cancérologie, l'approche protéomique iTRAQ a été mise en application avec succès pour comparer le profil d'expression protéique de cellules cancéreuses avec celui de cellules saines, et a permis d'identifier de nouveaux biomarqueurs spécifiques de certaines tumeurs rénales [171].

II.3.2. Protéomique quantitative par marquage métabolique : SILAC ou « Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture »

La méthodologie SILAC a été décrite pour la première fois en 2002 par l'équipe de Shao-En Ong et Matthias Mann [172]. Historiquement, elle s'applique à des cellules maintenues en culture mais récemment, l'approche SILAC a été adaptée *in vivo* au marquage de tissus et d'organes de souris [173] et de mouches [174]. Le principe général de la stratégie SILAC est présenté en **Figure 17**.

La première phase de la technique SILAC est une phase d'adaptation cellulaire qui consiste à cultiver une population de cellules dans un milieu particulier, contenant un ou plusieurs acides aminés essentiels isotopiquement alourdis (arginine, lysine, méthionine ^{13}C et/ou ^{15}N) et en présence de sérum de veau fœtal (SVF) déplété en acides aminés par dialyse. Plusieurs études ont démontré que l'utilisation de ces milieux de culture modifiés n'affectait en rien la croissance, la division, la morphologie ou la réponse biologique des cellules. Généralement, après 6 à 8 doublements cellulaires, on considère que la totalité des protéines cellulaires a incorporé les acides aminés alourdis (taux d'incorporation $\geq 99,9\%$) [158,159]. A cette étape, l'incorporation des acides aminés alourdis doit systématiquement être contrôlée par analyse MS des peptides issus de la population cellulaire « alourdie » (**Figure 17A**). Cette incorporation est considérée comme totale lorsque les pics MS correspondant aux peptides légers deviennent indétectables.

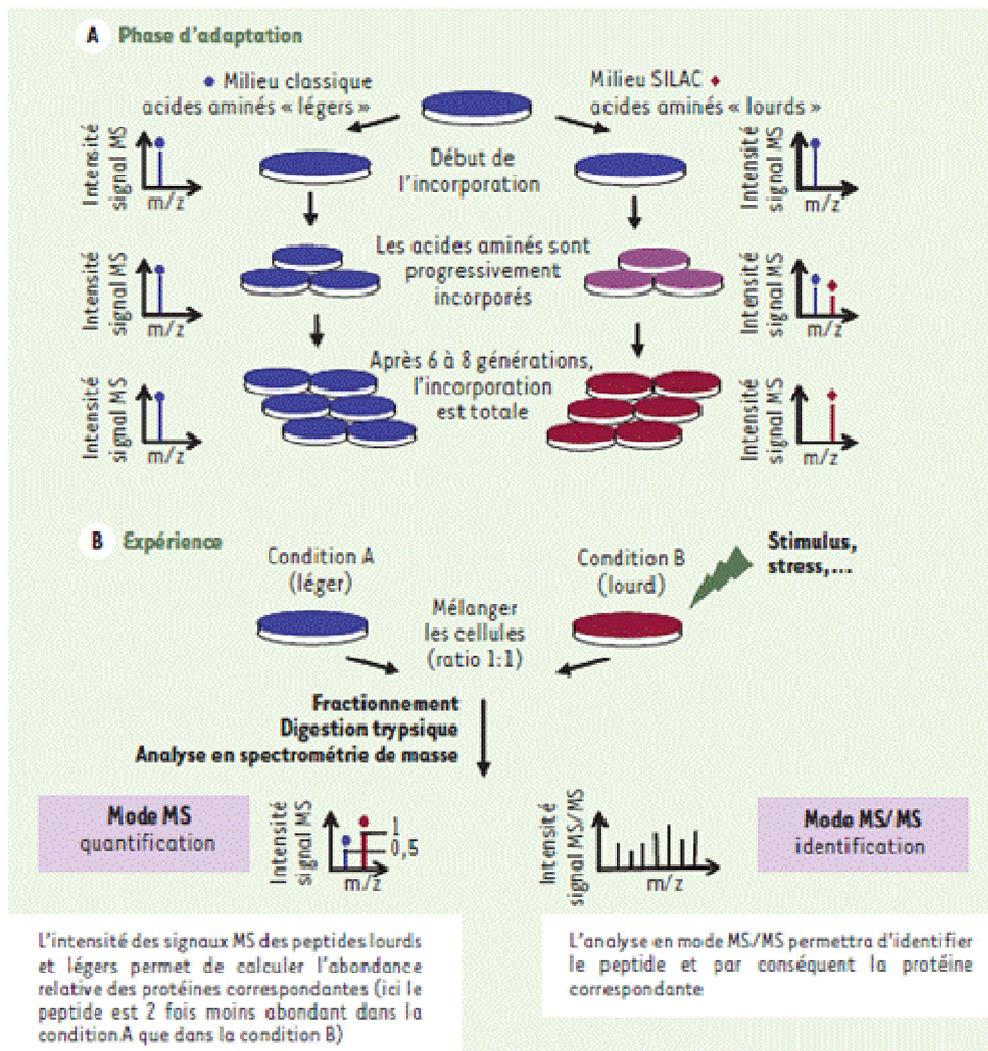


Figure 17 : Représentation schématique du principe de la technique SILAC.

(A) Phase d'adaptation des cellules en culture dans le milieu SILAC et incorporation des acides aminés alourdis dans le protéome cellulaire. (B) Phase expérimentale : exposition des cellules marquées à un traitement et analyse protéomique différentielle. D'après Emadali et al., 2009 [175], adapté de Ong S.E. and Mann M., 2006 [158].

Au cours de la phase expérimentale, une des deux populations cellulaires (« légère ou alourdie ») est soumise à un traitement, un stimulus ou un stress et l'autre population est utilisée comme contrôle (**Figure 17B**). Afin d'exclure toute perturbation protéomique

potentiellement induite par l'utilisation d'acides aminés alourdis, on réalise classiquement une analyse dite « forward SILAC » au cours de laquelle le traitement est appliqué aux cellules « alourdies » ainsi qu'une analyse réciproque, dite « reverse SILAC », au cours de laquelle le traitement est appliqué à la population « légère ». Les protéines provenant des deux populations cellulaires sont ensuite extraites et mélangées en quantités égales (rapport 1:1). A cette étape, un fractionnement des protéines peut éventuellement être réalisé par migration sur gel (1D) et les protéines sont digérées par la trypsine avant séparation des peptides par chromatographie liquide et analyse en MS puis MS/MS.

La digestion des protéines par la trypsine générant des peptides « arginine- » ou « lysine- » terminaux, l'information concernant l'origine expérimentale (« exposé » / « non-exposé ») de chaque protéine est conservée grâce à l'écart de masse constant introduit par le marquage isotopique qui est facilement détectable lors de l'analyse par spectrométrie de masse. En mode MS, chaque peptide est détecté sous la forme d'une paire constituée d'une forme « lourde » et d'une forme « légère » correspondant respectivement aux conditions expérimentales « exposée » et « non exposée ». L'analyse protéomique quantitative différentielle consiste alors à repérer ces paires peptidiques et à mesurer le rapport des intensités (ou des aires) obtenues pour les formes lourdes et légères, qui traduit la différence de concentration de ces peptides entre les populations cellulaires exposées et non exposées au traitement/stimulus étudié. La fragmentation des peptides par MS/MS permet ensuite de déterminer leur séquence en acides aminés et d'identifier les protéines dont ils sont issus en confrontant les spectres MS/MS obtenus à des banques de données de séquences protéiques au moyen de logiciels tels que MascotTM ou ProteinPilotTM.

Le développement récent de la stratégie SILAC chez la souris entière (souris SILAC) semble très prometteur pour étudier de manière quantitative les protéomes d'organes et de

fluides biologiques et déterminer les mécanismes biologiques liés aux phénotypes observés *in vivo* [173]. Dans ce modèle, une population de souris reçoit des aliments contenant de la lysine alourdie ($^{13}\text{C}_6$ -Lysine) et l'autre population reçoit une alimentation identique contenant de la lysine non marquée. Ces aliments destinés à la création de souris SILAC sont aujourd'hui commercialement disponibles (www.silantes.com/silacmouse.htm) et le marquage total de toutes les protéines est alors obtenu au cours de la deuxième génération de souris. De plus, les travaux de Krüger *et al.* ont permis de déterminer que le marquage n'a aucun effet apparent sur la croissance, la reproduction ou le comportement des animaux SILAC [173].

La méthode SILAC a été utilisée dans de nombreuses études afin de décrire des voies de signalisation cellulaires comme celles activées par l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou l'insuline [176,177]. D'un point de vue clinique, le SILAC est également considéré comme une méthode de choix pour identifier des biomarqueurs potentiels de maladies. Le SILAC a par exemple été utilisé pour comparer les différences d'expression protéique entre lignées cellulaires cancéreuses de prostate à fort ou à faible potentiel métastatique [178]. Il a également été employé avec succès pour comparer les profils d'expression protéique de lignées cellulaires pancréatiques ou mammaires normales et tumorales [179,180]. En Pharmacologie et Toxicologie, le SILAC a également été utilisé pour analyser les mécanismes moléculaires intervenant dans la réponse aux inhibiteurs du récepteur à l'EGF (récepteur EGFR ou ERBB2) utilisés dans le traitement de certaines tumeurs mammaires [181], mais également pour étudier au niveau protéique les mécanismes de toxicité cellulaire induite par des traitements comme la doxorubicine [182] ou des sels dérivés de l'arsenic [183]. Dans ces applications, la stratégie SILAC a renforcé la compréhension des voies de signalisation cellulaires impliquées dans la réponse toxique ou thérapeutique à ces traitements et a permis de suggérer de nouvelles hypothèses mécanistiques à ce niveau.

En revanche, l'inconvénient principal de la technique SILAC, pour l'étude des mécanismes protéiques impliqués dans une pathologie donnée ou pour la recherche de biomarqueurs, outre son coût, est que son utilisation se limite à la phase d'identification de protéines candidates à partir de cellules en culture. Le développement de modèles SILAC *in vivo*, qui est encore à ses débuts, pourrait donc s'avérer extrêmement utile dans un futur proche. Par ailleurs, le SILAC *in vivo* ne pouvant être étendu à l'homme, les techniques de protéomique citées précédemment, particulièrement iTRAQ et ICAT, demeurent complémentaires de l'approche SILAC et assurément plus adaptées pour l'identification et surtout pour la validation de biomarqueurs potentiels impliquant le criblage de nombreux échantillons cliniques [184].

II.4. RESUME DES AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE CES APPROCHES PROTEOMIQUES QUANTITATIVES

Le **Tableau I** sur la page suivante récapitule les principaux avantages et inconvénients des techniques protéomiques que nous venons de présenter, en termes de reproductibilité, de sensibilité ou de fiabilité concernant l'identification et la quantification de protéines (2D-PAGE, 2D-DIGE, ICAT, iTRAQ et SILAC).

Tableau I : Avantages et inconvénients des principales approches protéomiques quantitatives présentées dans ce travail.

Technique	Avantages	Inconvénients
2D-PAGE	<ul style="list-style-type: none"> • Approche bien documentée • Bonne résolution → Nombre de protéines identifiables : +++ → Qualité de l'identification des protéines : +++ • Applications larges: <i>in vivo</i>, <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Quantification par analyse d'images → Manque de sensibilité : seuil élevé (1,5) → Manque de reproductibilité / répétabilité • Restreinte aux protéines de Pi entre 3 et 8 • Co-migration des protéines • Quantité d'échantillon importante
2D-DIGE	<ul style="list-style-type: none"> • Meilleure reproductibilité vs. 2D-PAGE : <ul style="list-style-type: none"> → 2 échantillons par gel → Moins de réplicats nécessaires • Meilleure sensibilité (seuil 1,3 à 1,4 possible) • Bonne résolution → Nombre de protéines identifiables : +++ → Qualité de l'identification des protéines : +++ • Applications larges: <i>in vivo</i>, <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Quantification par analyse d'images • Plus coûteuse que 2D-PAGE • Restreinte aux protéines de Pi entre 3 et 8 • Co-migration des protéines • Quantité d'échantillon importante
ICAT	<ul style="list-style-type: none"> • Bonne résolution (HPLC) → Nombre de protéines identifiables : ++ → Qualité de l'identification des protéines : ++ • Quantification : spectrométrie de masse → Sensibilité +++ (seuils <1,5 systématiques) → Fiabilité de l'analyse • Bonne reproductibilité /répétabilité • Applications larges: <i>in vivo</i>, <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Marquage limité aux protéines présentant des fonctions –thiol accessibles • Combinaison tardive des échantillons → Biais de quantification possible
iTRAQ	<ul style="list-style-type: none"> • Analyse multiplexée • Bonne résolution (HPLC) : idem ICAT • Quantification : spectrométrie de masse → Sensibilité +++ (seuils <1,5 systématiques) → Fiabilité de l'analyse • Bonne reproductibilité /répétabilité • Applications larges: <i>in vivo</i>, <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Combinaison relativement tardive des échantillons → Biais de quantification limité mais possible • Marquage potentiellement limité par le rendement de la digestion trypsique
SILAC	<ul style="list-style-type: none"> • Bonne résolution (HPLC) : Idem ICAT • Quantification : spectrométrie de masse → Sensibilité +++ (seuils <1,5 systématiques) → Fiabilité de l'analyse • Bonne reproductibilité /répétabilité • Marquage complet et stable de l'ensemble du protéome cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Applications : essentiellement <i>in vitro</i> → encore limitées aux cellules en culture (possible chez la souris mais peu de recul) → non-envisageable chez l'homme

III. HYPOTHESE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

Après avoir réalisé une synthèse de la littérature concernant d'une part, les mécanismes moléculaires impliqués dans la néphrotoxicité des ICN et d'autre part, concernant les approches protéomiques quantitatives potentiellement applicables à l'étude des protéines perturbées par ces traitements dans des cellules rénales en culture, nous avons formulé l'hypothèse que la méthodologie SILAC nous permettrait d'identifier, sans a priori, des voies de signalisation modifiées par les ICN à doses pharmacologiques.

Les objectifs de ce travail étaient :

- i) de mettre au point dans notre laboratoire l'approche protéomique SILAC ;
- ii) de mettre en application cette méthodologie dans un modèle de cellules rénales humaines exposées à des doses pharmacologiques d'ICN afin d'identifier des protéines intracellulaires et extracellulaires dont le niveau d'expression est perturbé dans ces conditions et de rechercher à quelles voies de signalisation ces protéines appartiennent ;
- iii) d'évaluer les bénéfices apportés par l'approche SILAC pour rechercher des perturbations protéiques quantitatives dans ces conditions en la comparant à une technique protéomique plus classique que nous avons également utilisée : la 2D-PAGE.

CHAPITRE II : TRAVAUX PERSONNELS

TRAVAUX PERSONNELS

Les travaux personnels réalisés au cours de cette thèse concernent l'étude par la méthodologie SILAC des perturbations de l'expression protéique induites par des concentrations pharmacologiques de CsA et de TAC sur des cellules rénales en culture. Ils sont présentés sous la forme de deux articles scientifiques et d'une étude comparative des approches protéomiques SILAC et 2-DE.

- Le premier article concerne une étude protéomique quantitative des effets de la CsA sur l'expression des protéines intracellulaires ainsi qu'une comparaison de ces perturbations avec les effets obtenus en présence de TAC. Nous nous sommes par ailleurs intéressés au cours de ce travail aux effets potentiels d'un antioxydant, la N-acétylcystéine, sur les perturbations induites par la CsA. Cet article fait l'objet d'une publication dans la revue *Journal Of Proteomics* (doi : 10.1016/j.jprot.2011.09.05).
- Le second article porte sur l'étude des perturbations de l'expression des protéines extracellulaires induites par la CsA ainsi que les effets potentiels de la N-acétylcystéine à ce niveau, par analyse SILAC des protéines sécrétées dans les surnageants de culture cellulaire. Cet article est actuellement proposé pour publication dans la revue *Journal Of Proteomics* (Septembre 2011).
- La troisième partie de ce travail est une étude comparative des approches protéomiques SILAC et 2-DE classique. Parallèlement à l'analyse SILAC, nous avons employé la 2-DE pour étudier les perturbations des protéines intracellulaires induites par la CsA et compléter, voire confirmer au niveau protéique, les résultats générés par l'approche quantitative basée sur la spectrométrie de masse. Ce travail est présenté sous la forme d'un short report en cours de préparation que nous envisageons de soumettre dans la revue *Fundamental and Clinical Pharmacology*.

I. ETUDE DES PERTURBATIONS PROTEIQUES INDUITES PAR LA CYCLOSPORINE DANS UNE LIGNEE CELLULAIRE RENALE PAR LA METHODE SILAC ET COMPARAISON AVEC LE TACROLIMUS; ANALYSE DES EFFETS POTENTIELS DE LA N-ACETYLCYSTEINE SUR CES PERTURBATIONS.

Article 1

Quantitative proteomic analysis of cyclosporine-induced toxicity in a human kidney cell line and comparison with tacrolimus

F. LAMOUREUX, E. MESTRE, M. ESSIG, F-L. SAUVAGE, P. MARQUET, L-N. GASTINEL.

Journal Of Proteomics (2011), doi : 10.1016/j.jprot.2011.09.05.

II. ETUDE DES EFFETS DE LA CYCLOSPORINE SUR LA SECRETION PROTEIQUE D'UNE LIGNEE CELLULAIRE RENALE PAR APPROCHE SILAC.

Article 2

Mapping cyclosporine-induced changes in protein secretion by renal cells using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC)

F. LAMOUREUX, L-N. GASTINEL, E. MESTRE, P. MARQUET, M. ESSIG.

Proposé pour publication dans la revue *Journal Of Proteomics* (septembre 2011).

III. COMPARAISON DE DEUX APPROCHES PROTEOMIQUES POUR L'ETUDE QUANTITATIVE DES PERTURBATIONS PROTEIQUES INDUITES PAR LA CYCLOSPORINE : 2D-PAGE ET SILAC.

Présenté sous la forme d'un « short report » en préparation pour *Fundamental and Clinical Pharmacology*.

Objectifs

Dans cette troisième partie du travail, nous avons employé, parallèlement à l'analyse par SILAC, l'approche protéomique 2-DE qui a été conventionnellement utilisée pour étudier à large échelle les modifications de l'expression des protéines intracellulaires induites par la CsA dans les cellules rénales HEK. Ce travail a pour but de comparer les résultats obtenus par ces deux techniques et également de compléter ou confirmer les résultats obtenus par la technique SILAC.

Protocole expérimental

La méthodologie SILAC utilisée pour cette étude est celle qui a été présentée précédemment dans la partie I. Pour l'analyse protéomique par 2-DE, dont la procédure expérimentale est décrite ci-après, nous avons utilisé les mêmes lysats cellulaires que ceux utilisés pour l'analyse SILAC. L'étude par 2-DE des protéines différenciellement exprimées suite au traitement des cellules HEK par 5 μ M de CsA a été réalisée par l'analyse de 4 échantillons indépendants en duplicat (soit un total de 8 gels par condition expérimentale: CsA vs témoin).

Résultats

La technique 2-DE nous a permis d'identifier plus de 2000 spots dont 20 ont été identifiés comme significativement perturbés par la CsA. Parmi les protéines potentiellement perturbées par la CsA, seulement 5 ont été identifiées par les deux approches SILAC et 2-DE. Cette approche nous permet de confirmer l'augmentation de l'expression de deux protéines impliquées dans des stress cellulaires : Cathepsin-D (pro-apoptotique) et GRP-78 (marqueur du stress du RE). Bien que l'approche 2-DE permet une identification robuste des protéines, avec un nombre de peptides identifiés généralement plus important, la quantification différentielle par la méthode SILAC apparaît plus précise et reproductible, avec un CV moyen de 11%, par rapport à la technique 2-DE (23%). Par ailleurs, les problèmes de co-migration des protéines par la technique 2-DE conduisant à l'identification fréquente de plusieurs protéines au sein d'un même spot, l'analyse SILAC semble plus puissante et plus fiable au cours de cette étude.

CHAPITRE III : DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

I.1. SILAC : APPLICATION A L'ETUDE DES MODIFICATIONS PHENOTYPIQUES DE CELLULES RENALES EXPOSEES AUX ICN ET BENEFICES PAR RAPPORT AUX APPROCHES PROTEOMIQUES OU TRANSCRIPTOMIQUES CLASSIQUES

I.1.1. Mise en application du SILAC à l'étude des perturbations protéomiques induites par les ICN

Au cours de ce travail, qui s'inscrit depuis 2008 dans une thématique nouvelle de notre unité alliant culture cellulaire, chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et utilisation d'outils bioinformatiques pour le traitement / l'interprétation des données générées, nous avons mis au point et mis en application la méthodologie SILAC avec succès dans notre laboratoire. Cette approche nous a permis de décrire pour la première fois des modifications phénotypiques subtiles du protéome intracellulaire et du sécrétome de cellules rénales HEK-293 exposées aux inhibiteurs de la calcineurine (ICN), cyclosporine (CsA) et tacrolimus (TAC). Nos résultats indiquent que la CsA, utilisée à des doses pharmacologiques pendant un temps relativement court (24h), perturbe l'expression de protéines intra- et extra-cellulaires impliquées dans différentes voies de signalisation, relatives en particulier à des stress cellulaires tels que le stress du réticulum endoplasmique, l'apoptose ou l'inflammation, ainsi que des protéines impliquées dans la régulation de la transcription, la composition de la matrice extra-cellulaire ou l'organisation du cytosquelette. Ces résultats nous permettent en outre, de confirmer et de préciser au niveau protéique des mécanismes moléculaires précédemment décrits dans le domaine de la toxicité cellulaire induite par la CsA, mais également de formuler de nouvelles hypothèses concernant cette toxicité. Nos observations suggèrent notamment le recrutement de la voie de signalisation cyclophilines / basigin dans notre modèle cellulaire. Cette voie de signalisation a été montrée comme potentiellement impliquée dans des processus inflammatoires pouvant conduire à l'apparition de fibrose

tissulaire et pourrait par la suite constituer une piste intéressante à étudier en situation clinique [185-187]. D'autre part, cette approche protéomique innovante nous permet de mettre en évidence des différences intéressantes entre les profils de toxicité respectifs de la CsA et du TAC ainsi que de suggérer une réduction de certaines perturbations protéiques induites par la CsA lorsqu'elle est associée à l'antioxydant N-acétylcystéine.

I.1.2. SILAC et approches protéomiques ou transcriptomiques classiques

Si la méthodologie SILAC est, comme toute approche protéomique à large échelle, coûteuse, en termes d'équipements ou de matériels consommables, et exigeante en ce qui concerne le temps nécessaire au traitement et à l'interprétation des données générées, elle s'avère relativement facile à mettre en œuvre et hautement performante en permettant une quantification précise et reproductible d'un nombre important de protéines au cours d'une expérience. Les travaux présentés ici constituent la première approche protéomique quantitative basée sur la spectrométrie de masse appliquée à l'étude des perturbations protéiques induites par les ICN dans une lignée cellulaire rénale. D'autres travaux se sont intéressés à ces perturbations en utilisant des approches « large échelle », au niveau protéique avec la méthodologie 2-DE [160-163] et également au niveau transcriptomique [87,188]. Bien que, ces approches aient mis en évidence la perturbation de voies de signalisation majeures dans les cellules rénales traitées par CsA (telles que le stress du RE, le stress oxydant, l'organisation du cytosquelette ou le métabolisme du calcium), elles présentent des contraintes qui limitent l'interprétation des résultats obtenus. L'approche protéomique 2-DE présente en effet un manque de reproductibilité et de résolution, qui imposent l'analyse d'un nombre important de réplicats (techniques et biologiques). De plus, le manque de sensibilité de l'analyse quantitative des spots protéiques sur gel requiert des valeurs seuils (cut-off), en intensité (abondance des protéines), généralement élevées pour apprécier une sur- ou sous-

expression protéique (usuellement >1,4), rendant difficile, voire impossible, la détection de perturbations protéiques fines induites par un traitement médicamenteux [189]. Une autre limite récurrente de l'analyse protéomique par 2-DE est son manque de résolution à l'origine de la co-migration de protéines qui conduit régulièrement à l'identification de plusieurs protéines dans un même spot différenciellement exprimé et impose une validation par d'autres techniques de la (ou les) protéine(s) effectivement perturbé(es) [190]. Bien que l'utilisation de gels de grande taille ait été proposée pour augmenter la résolution des analyses 2-DE en diminuant les phénomènes de co-migration des protéines, cette amélioration est fortement limitée par un manque de reproductibilité qui est alors accru et difficilement maîtrisable [189]. Enfin, si l'approche 2-DE est limitée pour analyser des perturbations protéomiques quantitatives induites par un traitement, l'utilisation de colorants adaptés la rend cependant intéressante pour l'étude de modifications protéomiques post-traductionnelles (qualitatives) en permettant une détection facile et rapide de phosphoprotéines ou de glycoprotéines (colorants Pro-Q[®] Diamond phosphoprotein gel stain et Pro-Q[®] Emerald 300 glycoprotein gel stain, Invitrogen, respectivement).

D'autre part, les approches transcriptomiques de type microréseaux d'ADN ou « microarrays » ont récemment permis d'identifier de nouvelles voies de signalisation perturbées par les ICN dans des cellules rénales en culture, tel que le stress du réticulum endoplasmique en mettant en évidence une augmentation de la transcription de la protéine Bip (ou GRP78) [87]. Cependant, les approches transcriptomiques sont essentiellement limitées par le fait que le niveau d'expression des gènes ne reflète pas nécessairement le niveau d'expression protéique final en considérant les mécanismes régulateurs et modifications, post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles, pouvant intervenir en aval de la transcription [191]. Les méthodologies protéomiques quantitatives basées sur la spectrométrie de masse et

le SILAC en particulier, apparaissent donc intéressantes en permettant une analyse précise directement au niveau d'expression protéique.

I.2. LIMITES DE LA METHODOLOGIE SILAC

Les principales limites et problèmes inhérents à la technique SILAC que nous avons rencontrés lors de sa mise en application résident essentiellement dans: (i) le choix d'un modèle expérimental *in vitro* approprié ; (ii) le choix d'une valeur seuil pour déterminer les protéines significativement perturbées suite au traitement par ICN ; (iii) la quantité d'informations générées par cette approche à « large échelle », leur validation et leur interprétation/traduction en voies de signalisation par traitement bioinformatique et, (iiii) la complexité des échantillons et le manque de reproductibilité de l'analyse par MALDI-TOF/TOF en termes de peptides (et de protéines) détecté(e)s.

I.2.1. Choix du modèle expérimental

La méthodologie SILAC, outre ses applications *in vivo* très récentes chez la souris, est une approche encore essentiellement *in vitro* et la nature du modèle cellulaire choisi est primordiale pour permettre une interprétation et une extrapolation cohérentes des résultats obtenus par rapport à la pathologie observée *in vivo*. Bien que les cultures primaires de cellules tubulaires rénales d'origine humaine puissent constituer un modèle de choix pour étudier mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité des ICN, l'application du SILAC dans ce modèle apparaît quasiment impossible. En effet, le nombre de dédoublements cellulaires et du temps de culture nécessaires à une incorporation complète des acides aminés alourdis dans le protéome cellulaire semblent trop importants pour éviter l'apparition de modifications morpho-/phénotypiques majeures de cellules primaires en culture, ainsi l'approche iTRAQ

(au cours de laquelle le marquage peptidique est réalisé après exposition aux conditions expérimentales) apparaît particulièrement adaptée aux études protéomiques *in vivo* ou *ex vivo*. Nous avons donc initialement choisi pour ce travail d'utiliser la méthodologie SILAC dans des lignées cellulaires rénales tubulaires proximales d'origine murine (NRK) et porcine (LLC-PK1). Ces modèles cellulaires, sur lesquels nous avons dans un premier temps optimisé notre approche protéomique, nous ont permis d'obtenir des résultats intéressants, cohérents avec certaines des perturbations présentées dans ce travail : en particulier l'analyse SILAC dans les cellules murines a révélé une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans des stress cellulaires (Calnexin : 2.21, GRP78 : 3.85, ORP-150 : 2.74, Cathepsin D : 2.98), l'organisation du cytosquelette d'actine (ARP2/3 : 1.84) ainsi que la diminution de protéines nucléaires (Histone H2A : 0.51, HNRNP A1 : 0.47, HNRNP A2/B1 : 0.49). Cependant, les bases de données protéiques murines ou porcines étant globalement moins fournies que les bases de données humaines, trop peu de protéines ont pu être identifiées avec certitudes dans ces lignées animales. Pour ces raisons, nous avons finalement appliqué le SILAC sur la lignée cellulaire humaine HEK-293 (lignée cellulaire rénale d'origine embryonnaire), qui présente une morphologie épithéliale pavimenteuse et se cultive dans un milieu compatible avec le marquage SILAC (contrairement à d'autres lignées humaines telles que HK-2, dont les milieux de culture recommandés n'étaient, jusqu'à récemment, pas disponibles pour la technique SILAC). Le choix d'une lignée humaine nous a permis par la suite d'augmenter considérablement le nombre de protéines identifiées ainsi que la qualité de leur identification, passant pour certaines du statut de probable à avérée. Par ailleurs, parmi les protéines identifiées comme perturbées par la CsA dans notre modèle expérimental, un certain nombre ayant été précédemment observées dans d'autres modèles cellulaires ou *in vivo*, nous confirmons son intérêt pratique pour étudier les mécanismes toxiques des ICN au niveau rénal. Enfin, comme décrit en introduction, la néphrotoxicité induite par les ICN

résultant de mécanismes complexes touchant différents tissus au niveau rénal (cellules épithéliales tubulaires, vasculaires et myocytes), notre modèle cellulaire ne peut donc refléter que partiellement cette toxicité et certains des résultats observés nécessiteront une validation sur des modèles expérimentaux *in vivo* ou *ex vivo*.

I.2.2. Détermination de valeurs seuils pour identifier les protéines perturbées par l'approche SILAC

Le choix de valeurs seuils adaptées pour identifier les protéines significativement sur- ou sous-exprimées suite à un traitement donné, reste un problème récurrent pour les approches protéomiques à large échelle comme le SILAC. En effet, la plupart des auteurs utilisant la technique SILAC choisissent habituellement ces valeurs seuils (ou cut-off) de manière arbitraires, avec des rapports seuils « exposé/non-exposé » variant généralement entre 1,25 et 1,5 selon les études [192]. Il n'y a donc pas de valeurs seuils pré-établies pour les analyses SILAC et le choix de ces valeurs dépend de la qualité des données obtenues et du nombre de protéines quantifiées. Ainsi, pour déterminer ces valeurs, nous avons proposé au cours de ce travail une approche statistique basée sur la répartition des rapports SILAC pour l'ensemble de la population de protéines quantifiées. Lorsque le nombre de protéines quantifiées est suffisamment important, la normalité de distribution des rapports SILAC, centrée sur 1, peut être testée par rapport à une distribution de référence en utilisant le test de Kolmogorov-Smirnov. Le biais systématique potentiellement introduit lors de la détermination de la concentration protéique (Bradford) dans les 2 échantillons a été corrigé préalablement. Si cette distribution s'apparente à une distribution normale centrée sur $1 \pm$ écart-type (protéines non perturbées), nous proposons ainsi de considérer les protéines présentant des rapports moyens d'expression SILAC « exposé/non-exposé » s'écartant de plus ou moins 2 écart-types autour de la moyenne, comme significativement perturbées.

I.2.3. Interprétation des données et validation des résultats générés par l'approche SILAC

Au vu du nombre de protéines différentiellement exprimées et identifiées, le problème de la validation des résultats se pose pour les analyses SILAC, tout comme pour d'autres approches à large échelle, qu'elles soient protéomiques, transcriptomiques ou métabolomiques. En effet, le SILAC qui s'apparente à un criblage ou screening des perturbations protéiques induites par les ICN dans un modèle *in vitro*, génère une quantité d'informations importante pouvant entraîner des difficultés dans l'interprétation et la validation des résultats par rapport aux mécanismes de toxicité étudiés. En confrontant nos résultats aux données de la littérature, nous avons pu dans un premier temps établir l'existence de mécanismes toxiques induits par les ICN dans notre modèle cellulaire comparables à certains mécanismes moléculaires précédemment décrits dans d'autres modèles (stress du réticulum endoplasmique, apoptose ou dégradation de composants de la matrice extra-cellulaire), validant ainsi notre modèle expérimental et analytique. Nous avons également validé par des méthodes complémentaires (Western-blot par exemple) certaines des différences d'expression mesurées pour plusieurs protéines comme la cyclophiline B intra- et extra-cellulaire. La quantification protéique relative obtenue avec la technique SILAC résulte d'une quantification au niveau peptidique et l'augmentation (ou la diminution) d'expression potentielle d'une protéine mesurée par SILAC peut donc, dans certaines situations, résulter d'une augmentation de son clivage (de sa dégradation) à l'origine d'une augmentation (ou d'une diminution) des peptides mesurés sans variation réelle de l'expression ou de l'activité de cette protéine au niveau cellulaire. Les perturbations observées uniquement par la technique SILAC sont donc à interpréter avec précautions et nécessitent leur validation systématique des perturbations observées au niveau protéique par des

approches plus classiques de biologie moléculaire : Western-blot, immuno-fluorescence, mesure d'activité enzymatique ou siRNA, par exemple. Enfin, lorsque ces résultats sont validés au niveau protéique, des outils bioinformatiques récemment développés (parmi lesquels : DAVID[®] Bioinformatic Resources, Ingenuity[®] Pathway Analysis, Reactome[®] ou GNCPro[®]) permettent de constituer des listes complexes de protéines perturbées ainsi que les voies de signalisation dans lesquelles elles sont impliquées et apportent une aide précieuse au cours de ce type d'analyses [193].

II. PERSPECTIVES

Parmi les protéines et voies de signalisation, identifiées dans ce travail comme perturbées par les ICN, certaines seront étudiées plus en détail par des techniques classiques de biologie moléculaire *in vitro* mais également *in vivo*, sur des prélèvements biopsiques et/ou fluides biologiques de patients transplantés traités par ICN, afin de confirmer ou d'infirmer leur implication dans la pathogénèse de la néphrotoxicité induite par ces traitements. Notre approche expérimentale constitue donc une première étape vers une meilleure compréhension de cette pathogénèse et la découverte de candidats biomarqueurs de cette toxicité.

L'analyse *in vitro* de la CypB par immunofluorescence nous apportera des précisions concernant la relocalisation de cette protéine dans les cellules rénales exposées à la CsA (diminution de son expression intracellulaire et augmentation de son expression extracellulaire). D'autre part, une approche par siRNA pour la CypB permettra d'établir un lien éventuel entre la diminution de son expression intracellulaire et le stress du RE induit par la CsA dans les cellules rénales. Nous envisageons, suite à ce travail, de doser la cyclophiline B (CypB) par technique ELISA dans le sérum de patients présentant des signes de

néphrotoxicité induite par les ICN qui sera comparée aux niveaux d'expression observés dans un groupe de patients sains. Nous étudierons également une probable augmentation de l'interaction cyclophilines / basigin en s'intéressant à la colocalisation de ces protéines par immunofluorescence, *in vitro* sur des cellules rénales tubulaires proximales mais également *ex vivo* sur des biopsies rénales de patients traités par CsA et présentant des lésions de NCA attribuables à ce traitement. Par ailleurs, une approche *in vivo* sur un modèle de souris déficientes pour la basigin (Knock-down *bsg*^{-/-}), traitées ou non par CsA, pourrait s'avérer très intéressante puisqu'un rôle de la basigin dans le développement de lésions de fibrose rénale a été récemment mis en évidence sur ce modèle *Bsg*^{-/-} [185].

Après nous être intéressés aux perturbations protéiques induites par les ICN à doses pharmacologiques sur les cellules rénales et pendant des périodes d'exposition relativement courtes, nous avons initié l'étude par SILAC des perturbations induites par ces traitements pendant une durée plus longue d'exposition aux ICN. Au cours de ces expériences, nous avons habitué notre modèle cellulaire HEK cultivé en milieu SILAC à recevoir quotidiennement les mêmes concentrations d'ICN sur des périodes de 7, 14 et 28 jours, afin de mimer d'une certaine manière les conditions d'exposition chronique aux ICN. Les résultats de ces travaux nous permettront d'étudier la cinétique des perturbations que nous avons décrites après 24 heures et d'identifier des perturbations qui perdurent ou s'accroissent lorsque la durée d'exposition aux ICN augmente. L'approche SILAC sera également poursuivie afin d'étudier les modulations de l'expression protéique induites par d'autres traitements immunosuppresseurs tels que l'acide mycophénolique, l'everolimus, le sirolimus ainsi que leurs associations avec les ICN, pour une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'action pharmacologiques ou toxiques. En effet, l'association des ICN à ces autres classes de médicaments immunosuppresseurs donne lieu à des interactions pharmacodynamiques, par

inhibition de transporteurs d'efflux, d'influx ou d'enzymes du métabolisme, comme nous l'avons récemment montré au cours de travaux réalisés parallèlement à ce travail de thèse (travaux présentés en Annexes) [194,195]. L'étude par SILAC de ces associations thérapeutiques pourrait donc nous permettre de mettre en évidence une toxicité accrue des ICN en présence d'inhibiteurs de mTOR (sirolimus, everolimus) dans les cellules rénales, par augmentation de la concentration intracellulaire d'ICN. Enfin, nous étudions aujourd'hui la possibilité d'appliquer le SILAC *in vivo*, comme récemment décrit dans des modèles murins [173], afin d'étudier les mécanismes impliqués dans la toxicité rénale des ICN, après exposition chronique à ces traitements sur l'organisme entier, dans un modèle qui se rapprocherait donc des conditions cliniques.

CHAPITRE IV : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976;6:468-75.
- [2] Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 1978;2:1323-7.
- [3] Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Henderson RG, Aziz S, Lewis P. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet* 1979;2:1033-6.
- [4] Bennett WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM. Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int* 1996;50:1089-100.
- [5] Perico N, Detcheva A, Khalil EI, Remuzzi G. Cyclosporine induces glomerulosclerosis: three-dimensional definition of the lesions in a rat model of renal transplant. *Kidney Int* 1996;49:1283-8.
- [6] Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R, Jain A. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet* 1989;2:1000-4.
- [7] Fung JJ, bu-Elmagd K, Todo S, Shapiro R, Tzakis A, Jordan M, Armitage J, Jain A, Alessiani M, Martin M, . Overview of FK506 in transplantation. *Clin Transpl* 1990;115-21.
- [8] Andreoni KA, Brayman KL, Guidinger MK, Sommers CM, Sung RS. Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1996-2005. *Am J Transplant* 2007;7:1359-75.
- [9] Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 1989;337:473-5.
- [10] Siekierka JJ, Hung SH, Poe M, Lin CS, Sigal NH. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 1989;341:755-7.
- [11] Price ER, Zydowsky LD, Jin MJ, Baker CH, McKeon FD, Walsh CT. Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1903-7.
- [12] Swanson SK, Born T, Zydowsky LD, Cho H, Chang HY, Walsh CT, Rusnak F. Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3741-5.

- [13] Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992;357:695-7.
- [14] Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 1991;352:803-7.
- [15] Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, Curran T, Rao A. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 1993;365:352-5.
- [16] Liu EH, Siegel RM, Harlan DM, O'Shea JJ. T cell-directed therapies: lessons learned and future prospects. *Nat Immunol* 2007;8:25-30.
- [17] Bennett WM, Burdmann E, Andoh T, Elzinga L, Franceschini N. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. *Miner Electrolyte Metab* 1994;20:214-20.
- [18] Bennett WM, Burdmann EA, Andoh TF, Houghton DC, Lindsley J, Elzinga LW. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9 Suppl 4:141-5.
- [19] Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349:2326-33.
- [20] Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 2004;78:557-65.
- [21] Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008;8:753-60.
- [22] Dieperink H, Starklint H, Leyssac PP, Kemp E. Glomerulotubular function in cyclosporine-treated rats. A lithium clearance, occlusion time/transit time and micropuncture study. *Proc Eur Dial Transplant Assoc Eur Ren Assoc* 1985;21:853-9.
- [23] Murray BM, Paller MS, Ferris TF. Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int* 1985;28:767-74.
- [24] English J, Evan A, Houghton DC, Bennett WM. Cyclosporine-induced acute renal dysfunction in the rat. Evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation* 1987;44:135-41.
- [25] Liptak P, Ivanyi B. Primer: Histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006;2:398-404.
- [26] Moreau A, Noël L-H. Pathologie de la transplantation - Toxicité médicamenteuse. In: Flammarion Médecine-Sciences, ed. *Atlas de pathologie rénale*. 2008; 860-871

- [27] Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickleit V, Ryffel B. The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol* 1998;49:356-63.
- [28] Morozumi K, Takeda A, Uchida K, Mihatsch MJ. Cyclosporine nephrotoxicity: how does it affect renal allograft function and transplant morphology? *Transplant Proc* 2004;36:251S-6S.
- [29] Naesens M, Kambham N, Concepcion W, Salvatierra O, Jr., Sarwal M. The evolution of nonimmune histological injury and its clinical relevance in adult-sized kidney grafts in pediatric recipients. *Am J Transplant* 2007;7:2504-14.
- [30] Legendre C, Thervet E, Page B, Percheron A, Noel LH, Kreis H. Hydroxyethylstarch and osmotic-nephrosis-like lesions in kidney transplantation. *Lancet* 1993;342:248-9.
- [31] Randhawa PS, Saad RS, Jordan M, Scantlebury V, Vivas C, Shapiro R. Clinical significance of renal biopsies showing concurrent acute rejection and tacrolimus-associated tubular vacuolization. *Transplantation* 1999;67:85-9.
- [32] Goplani KR, Vanikar AV, Shah PR, Gumber M, Feroz A, Patel HV, Kasat P, Falodia J, Saboo D, Kaswaan K, Geerish MS, Pandya T, Trivedi HL. Postrenal transplant hemolytic uremic syndrome/thrombotic microangiopathy: Ahmedabad experience. *Transplant Proc* 2008;40:1114-6.
- [33] Bren A, Pajek J, Grego K, Buturovic J, Ponikvar R, Lindic J, Knap B, Vizjak A, Ferluga D, Kandus A. Follow-up of kidney graft recipients with cyclosporine-associated hemolytic-uremic syndrome and thrombotic microangiopathy. *Transplant Proc* 2005;37:1889-91.
- [34] Ponticelli C. De novo thrombotic microangiopathy. An underrated complication of renal transplantation. *Clin Nephrol* 2007;67:335-40.
- [35] Yango A, Morrissey P, Monaco A, Butera J, Gohh RY. Successful treatment of tacrolimus-associated thrombotic microangiopathy with sirolimus conversion and plasma exchange. *Clin Nephrol* 2002;58:77-8.
- [36] Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perlroth M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med* 1984;311:699-705.
- [37] Mihatsch MJ, Thiel G, Ryffel B. Morphologic diagnosis of cyclosporine nephrotoxicity. *Semin Diagn Pathol* 1988;5:104-21.
- [38] Mihatsch MJ, Thiel G, Ryffel B. Histopathology of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 1988;20:759-71.
- [39] Alexander SI, Fletcher JT, Nankivell B. Chronic allograft nephropathy in paediatric renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 2007;22:17-23.
- [40] Collins BS, Davis CL, Marsh CL, McVicar JP, Perkins JD, Alpers CE. Reversible cyclosporine arteriopathy. *Transplantation* 1992;54:732-4.

- [41] Morozumi K, Thiel G, Albert FW, Banfi G, Gudat F, Mihatsch MJ. Studies on morphological outcome of cyclosporine-associated arteriopathy after discontinuation of cyclosporine in renal allografts. *Clin Nephrol* 1992;38:1-8.
- [42] Elzinga LW, Rosen S, Bennett WM. Dissociation of glomerular filtration rate from tubulointerstitial fibrosis in experimental chronic cyclosporine nephropathy: role of sodium intake. *J Am Soc Nephrol* 1993;4:214-21.
- [43] Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Andoh T, Bennett WM, Couser WG, Alpers CE. Cyclosporine A induced arteriopathy in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 1995;48:431-8.
- [44] Graef IA, Chen F, Chen L, Kuo A, Crabtree GR. Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* 2001;105:863-75.
- [45] Amberg GC, Rossow CF, Navedo MF, Santana LF. NFATc3 regulates Kv2.1 expression in arterial smooth muscle. *J Biol Chem* 2004;279:47326-34.
- [46] Nieves-Cintron M, Amberg GC, Nichols CB, Molkentin JD, Santana LF. Activation of NFATc3 down-regulates the beta1 subunit of large conductance, calcium-activated K⁺ channels in arterial smooth muscle and contributes to hypertension. *J Biol Chem* 2007;282:3231-40.
- [47] Gandhi M, Olson JL, Meyer TW. Contribution of tubular injury to loss of remnant kidney function. *Kidney Int* 1998;54:1157-65.
- [48] Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. Evolution and pathophysiology of renal-transplant glomerulosclerosis. *Transplantation* 2004;78:461-8.
- [49] Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:481-508.
- [50] von WE, Hayry P. Cyclosporin-A deposits in renal allografts. *Lancet* 1983;2:189-92.
- [51] Suzuki S, Oka T, Ohkuma S, Kuriyama K. Biochemical mechanisms underlying cyclosporine-induced nephrotoxicity. Effect of concomitant administration of prednisolone. *Transplantation* 1987;44:363-8.
- [52] Mihatsch MJ, Ryffel B, Hermle M, Brunner FP, Thiel G. Morphology of cyclosporine nephrotoxicity in the rat. *Clin Nephrol* 1986;25 Suppl 1:S2-S8.
- [53] Jennings P, Koppelstaetter C, Helbert M-J, Pfaller W. Renal culture models: contribution to the understanding of nephrotoxic mechanisms. In: Boston: Kluwer, ed. *Clinical Nephrotoxins: Renal Injury from Drugs and Chemicals*. 2003; 115-147
- [54] Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992;357:695-7.
- [55] Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, Scheuermann EH, Wegner B, Gossmann J, Ackermann H, Seidl C, Hoher B, Zanger UM, Geiger H, Eichelbaum M, Schwab M.

- ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1501-11.
- [56] Sun J, Wang Y. Effects of cyclosporin A on proliferation of cultured rat mesangial cells. *J Tongji Med Univ* 1997;17:115-7.
- [57] Seki Y, Toba K, Fuse I, Sato N, Niwano H, Takahashi H, Tanabe N, Aizawa Y. In vitro effect of cyclosporin A, mitomycin C and prednisolone on cell kinetics in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Thromb Res* 2005;115:219-28.
- [58] Lally C, Healy E, Ryan MP. Cyclosporine A-induced cell cycle arrest and cell death in renal epithelial cells. *Kidney Int* 1999;56:1254-7.
- [59] Jennings P, Koppelstaetter C, Aydin S, Abberger T, Wolf AM, Mayer G, Pfaller W. Cyclosporine A induces senescence in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:F831-F838.
- [60] Ortiz A, Lorz C, Catalan MP, Justo P, Egido J. Role and regulation of apoptotic cell death in the kidney. Y2K update. *Front Biosci* 2000;5:D735-D749.
- [61] Ortiz A. Renal cell loss through cell suicide. *Kidney Int* 2000;58:2235-6.
- [62] Ortiz A. Nephrology forum: apoptotic regulatory proteins in renal injury. *Kidney Int* 2000;58:467-85.
- [63] Ying S, Khan LN, Meng Q, Barnes NC, Kay AB. Cyclosporin A, apoptosis of BAL T-cells and expression of Bcl-2 in asthmatics. *Eur Respir J* 2003;22:207-12.
- [64] Healy E, Dempsey M, Lally C, Ryan MP. Apoptosis and necrosis: mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. *Kidney Int* 1998;54:1955-66.
- [65] Ortiz A, Lorz C, Catalan M, Ortiz A, Coca S, Egido J. Cyclosporine A induces apoptosis in murine tubular epithelial cells: role of caspases. *Kidney Int Suppl* 1998;68:S25-S29.
- [66] Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, Shankland SJ, Couser WG, Bennett WM, Johnson RJ. Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int* 1998;53:897-908.
- [67] Yang CW, Faulkner GR, Wahba IM, Christianson TA, Bagby GC, Jin DC, Abboud HE, Andoh TF, Bennett WM. Expression of apoptosis-related genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity in mice. *Am J Transplant* 2002;2:391-9.
- [68] Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Yi H, Bennett WM. Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis. *Kidney Int* 1999;56:2147-59.
- [69] Ito H, Kasagi N, Shomori K, Osaki M, Adachi H. Apoptosis in the human allografted kidney. Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated DUTP-biotin nick end labeling. *Transplantation* 1995;60:794-8.

- [70] Han SY, Chang EJ, Choi HJ, Kwak CS, Park SB, Kim HC, Mun KC. Apoptosis by cyclosporine in mesangial cells. *Transplant Proc* 2006;38:2244-6.
- [71] Justo P, Lorz C, Sanz A, Egido J, Ortiz A. Intracellular mechanisms of cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:3072-80.
- [72] Hortelano S, Castilla M, Torres AM, Tejedor A, Bosca L. Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:2315-23.
- [73] Servais H, Ortiz A, Devuyst O, Denamur S, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis* 2008;13:11-32.
- [74] Lee SY, Jo SK, Cho WY, Kim HK, Won NH. The effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone on renal tubular cell apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in cyclosporine A nephrotoxicity. *Transplantation* 2004;78:1756-64.
- [75] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004;11:381-9.
- [76] Kim SI, Song HY, Hwang JH, Chong DL, Lee HY, Han DS, Moon JI, Kim YS, Park KI, Kim KS, Choi KH. Cyclosporine nephrotoxicity: the mechanisms of cell injury by cyclosporine A in renal proximal tubular cells. *Transplant Proc* 2000;32:1621-2.
- [77] Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 1999;286:1888-93.
- [78] Garlatti M, Barouki R. Le stress du réticulum endoplasmique: adaptation et toxicité. *Medecine / Sciences* 2002;18:585-94.
- [79] Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000;101:451-4.
- [80] Mori K, Ogawa N, Kawahara T, Yanagi H, Yura T. mRNA splicing-mediated C-terminal replacement of transcription factor Hac1p is required for efficient activation of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4660-5.
- [81] Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 1998;12:982-95.
- [82] Welihinda AA, Tirasophon W, Kaufman RJ. The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene Expr* 1999;7:293-300.
- [83] Pallet N, Bouvier N, Bendjallah A, Rabant M, Flinois JP, Hertig A, Legendre C, Beaune P, Thervet E, Anglicheau D. Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am J Transplant* 2008;8:2283-96.

- [84] Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 1999;13:1211-33.
- [85] Pahl HL. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiol Rev* 1999;79:683-701.
- [86] Kitamura M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F323-F334.
- [87] Pallet N, Rabant M, Xu-Dubois YC, Lecorre D, Mucchielli MH, Imbeaud S, Agier N, Hertig A, Thervet E, Legendre C, Beaune P, Anglicheau D. Response of human renal tubular cells to cyclosporine and sirolimus: a toxicogenomic study. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;229:184-96.
- [88] Han SW, Li C, Ahn KO, Lim SW, Song HG, Jang YS, Cho YM, Jang YM, Ghee JY, Kim JY, Kim SH, Kim J, Kwon OJ, Yang CW. Prolonged endoplasmic reticulum stress induces apoptotic cell death in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Am J Nephrol* 2008;28:707-14.
- [89] Du S, Hiramatsu N, Hayakawa K, Kasai A, Okamura M, Huang T, Yao J, Takeda M, Araki I, Sawada N, Paton AW, Paton JC, Kitamura M. Suppression of NF-kappaB by cyclosporin a and tacrolimus (FK506) via induction of the C/EBP family: implication for unfolded protein response. *J Immunol* 2009;182:7201-11.
- [90] Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* 2006;11:5-13.
- [91] Bouvier N, Flinois JP, Gilleron J, Sauvage FL, Legendre C, Beaune P, Thervet E, Anglicheau D, Pallet N. Cyclosporine triggers endoplasmic reticulum stress in endothelial cells: a role for endothelial phenotypic changes and death. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:F160-F169.
- [92] Kawakami T, Inagi R, Takano H, Sato S, Ingelfinger JR, Fujita T, Nangaku M. Endoplasmic reticulum stress induces autophagy in renal proximal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:2665-72.
- [93] Hoyer-Hansen M, Jaattela M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ* 2007;14:1576-82.
- [94] Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, Yin XM. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol* 2007;171:513-24.
- [95] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008;132:27-42.
- [96] Pallet N, Bouvier N, Legendre C, Gilleron J, Codogno P, Beaune P, Thervet E, Anglicheau D. Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity. *Autophagy* 2008;4:783-91.

- [97] Lopez-Ongil S, Saura M, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M, Lamas S. Regulation of endothelial NO synthase expression by cyclosporin A in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol* 1996;271:H1072-H1078.
- [98] Wolf A, Trendelenburg CF, ez-Fernandez C, Prieto P, Houy S, Trommer WE, Cordier A. Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:1328-34.
- [99] Djamali A. Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allografts. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:F445-F455.
- [100] Zhong Z, Arteel GE, Connor HD, Yin M, Frankenberg MV, Stachlewitz RF, Raleigh JA, Mason RP, Thurman RG. Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine. *Am J Physiol* 1998;275:F595-F604.
- [101] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002;296:1655-7.
- [102] Sarro E, Tornavaca O, Plana M, Meseguer A, Itarte E. Phosphoinositide 3-kinase inhibitors protect mouse kidney cells from cyclosporine-induced cell death. *Kidney Int* 2008;73:77-85.
- [103] Wolf A, Clemann N, Frieauff W, Ryffel B, Cordier A. Role of reactive oxygen formation in the cyclosporin-A-mediated impairment of renal functions. *Transplant Proc* 1994;26:2902-7.
- [104] Wang C, Salahudeen AK. Cyclosporine nephrotoxicity: attenuation by an antioxidant-inhibitor of lipid peroxidation in vitro and in vivo. *Transplantation* 1994;58:940-6.
- [105] Wang C, Salahudeen AK. Lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity: effects of vitamin E. *Kidney Int* 1995;47:927-34.
- [106] Jenkins JK, Huang H, Ndebele K, Salahudeen AK. Vitamin E inhibits renal mRNA expression of COX II, HO I, TGFbeta, and osteopontin in the rat model of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 2001;71:331-4.
- [107] Galletti P, Di Gennaro CI, Migliardi V, Indaco S, Della RF, Manna C, Chiodini P, Capasso G, Zappia V. Diverse effects of natural antioxidants on cyclosporin cytotoxicity in rat renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1551-8.
- [108] Perez de LG, Arribas I, Prieto A, Parra T, de AG, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M. Cyclosporin A-induced hydrogen peroxide synthesis by cultured human mesangial cells is blocked by exogenous antioxidants. *Life Sci* 1998;62:1745-53.
- [109] Padi SS, Chopra K. Salvage of cyclosporine A-induced oxidative stress and renal dysfunction by carvedilol. *Nephron* 2002;92:685-92.
- [110] Kurtz A, Della BR, Kuhn K. Cyclosporine A enhances renin secretion and production in isolated juxtaglomerular cells. *Kidney Int* 1988;33:947-53.
- [111] Ruster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2985-91.

- [112] Lassila M. Interaction of cyclosporine A and the renin-angiotensin system; new perspectives. *Curr Drug Metab* 2002;3:61-71.
- [113] Iijima K, Hamahira K, Kobayashi A, Nakamura H, Yoshikawa N. Immunohistochemical analysis of renin activity in chronic cyclosporine nephropathy in childhood nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:2265-71.
- [114] Madsen K, Friis UG, Gooch JL, Hansen PB, Holmgaard L, Skott O, Jensen BL. Inhibition of calcineurin phosphatase promotes exocytosis of renin from juxtaglomerular cells. *Kidney Int* 2010;77:110-7.
- [115] Kone BC. Nitric oxide in renal health and disease. *Am J Kidney Dis* 1997;30:311-33.
- [116] Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol* 1997;272:F561-F578.
- [117] Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, Garcia-Torres R, Bolio A, Lopez-Zetina P, Herrera-Acosta J. Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am J Physiol* 1998;274:F791-F798.
- [118] Takenaka T, Hashimoto Y, Epstein M. Diminished acetylcholine-induced vasodilation in renal microvessels of cyclosporine-treated rats. *J Am Soc Nephrol* 1992;3:42-50.
- [119] Diederich D, Yang Z, Luscher TF. Chronic cyclosporine therapy impairs endothelium-dependent relaxation in the renal artery of the rat. *J Am Soc Nephrol* 1992;2:1291-7.
- [120] Stroes ES, Luscher TF, de Groot FG, Koomans HA, Rabelink TJ. Cyclosporin A increases nitric oxide activity in vivo. *Hypertension* 1997;29:570-5.
- [121] Kou R, Greif D, Michel T. Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A. *J Biol Chem* 2002;277:29669-73.
- [122] Lungu AO, Jin ZG, Yamawaki H, Tanimoto T, Wong C, Berk BC. Cyclosporin A inhibits flow-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase by altering cholesterol content in caveolae. *J Biol Chem* 2004;279:48794-800.
- [123] Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension* 1994;23:957-61.
- [124] Zhong Z, Arteel GE, Connor HD, Yin M, Frankenberg MV, Stachlewitz RF, Raleigh JA, Mason RP, Thurman RG. Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine. *Am J Physiol* 1998;275:F595-F604.
- [125] Navarro-Antolin J, Lamas S. Nitrosative stress by cyclosporin A in the endothelium: studies with the NO-sensitive probe diaminofluorescein-2/diacetate using flow cytometry. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16 Suppl 1:6-9.
- [126] Navarro-Antolin J, Lopez-Munoz MJ, Klatt P, Soria J, Michel T, Lamas S. Formation of peroxynitrite in vascular endothelial cells exposed to cyclosporine A. *FASEB J* 2001;15:1291-3.

- [127] Roullet JB, Xue H, McCarron DA, Holcomb S, Bennett WM. Vascular mechanisms of cyclosporin-induced hypertension in the rat. *J Clin Invest* 1994;93:2244-50.
- [128] Yang CW, Kim YS, Kim J, Kim YO, Min SY, Choi EJ, Bang BK. Oral supplementation of L-arginine prevents chronic cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Exp Nephrol* 1998;6:50-6.
- [129] Shihab FS, Yi H, Bennett WM, Andoh TF. Effect of nitric oxide modulation on TGF-beta1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 2000;58:1174-85.
- [130] Shihab FS, Bennett WM, Isaac J, Yi H, Andoh TF. Nitric oxide modulates vascular endothelial growth factor and receptors in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 2003;63:522-33.
- [131] Sugimoto T, Haneda M, Sawano H, Isshiki K, Maeda S, Koya D, Inoki K, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R. Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T-cell transcription factor in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1359-68.
- [132] Hocherl K, Dreher F, Vitzthum H, Kohler J, Kurtz A. Cyclosporine A suppresses cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2427-36.
- [133] Hocherl K, Kees F, Kramer BK, Kurtz A. Cyclosporine A attenuates the natriuretic action of loop diuretics by inhibition of renal COX-2 expression. *Kidney Int* 2004;65:2071-80.
- [134] Komers R, Anderson S, Epstein M. Renal and cardiovascular effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Am J Kidney Dis* 2001;38:1145-57.
- [135] Rossat J, Maillard M, Nussberger J, Brunner HR, Burnier M. Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-depleted subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1999;66:76-84.
- [136] Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 1990;70:1067-116.
- [137] Nakahama H. Stimulatory effect of cyclosporine A on endothelin secretion by a cultured renal epithelial cell line, LLC-PK1 cells. *Eur J Pharmacol* 1990;180:191-2.
- [138] Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harvie BR, Ichikawa I, Hoover RL. Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int* 1990;37:1487-91.
- [139] Perico N, Dadan J, Remuzzi G. Endothelin mediates the renal vasoconstriction induced by cyclosporine in the rat. *J Am Soc Nephrol* 1990;1:76-83.
- [140] Textor SC, Burnett JC, Jr., Romero JC, Canzanella VJ, Taler SJ, Wiesner R, Porayko M, Krom R, Gores G, Hay E. Urinary endothelin and renal vasoconstriction with cyclosporine or FK506 after liver transplantation. *Kidney Int* 1995;47:1426-33.

- [141] Rossini M, Belloni A, Remuzzi G, Perico N. Thromboxane receptor blockade attenuates the toxic effect of cyclosporine in experimental renal transplantation. *Circulation* 1990;81:I61-I67.
- [142] Moss NG, Powell SL, Falk RJ. Intravenous cyclosporine activates afferent and efferent renal nerves and causes sodium retention in innervated kidneys in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:8222-6.
- [143] Zhang W, Li JL, Hosaka M, Janz R, Shelton JM, Albright GM, Richardson JA, Sudhof TC, Victor RG. Cyclosporine A-induced hypertension involves synapsin in renal sensory nerve endings. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9765-70.
- [144] Zhang W, Victor RG. Calcineurin inhibitors cause renal afferent activation in rats: a novel mechanism of cyclosporine-induced hypertension. *Am J Hypertens* 2000;13:999-1004.
- [145] Hausberg M, Lang D, Levers A, Suwelack B, Kisters K, Tokmak F, Barenbrock M, Kosch M. Sympathetic nerve activity in renal transplant patients before and after withdrawal of cyclosporine. *J Hypertens* 2006;24:957-64.
- [146] Neilson EG. Plasticity, nuclear diapause, and a requiem for the terminal differentiation of epithelia. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1995-8.
- [147] Pallet N, Anglicheau D. Transition épithélio-mésenchymateuse: aspects fondamentaux. *Actualités Néphrologiques* 2008;9:87-98.
- [148] Hertig A, Verine J, Mougenot B, Jouanneau C, Ouali N, Sebe P, Glotz D, Ancel PY, Rondeau E, Xu-Dubois YC. Risk factors for early epithelial to mesenchymal transition in renal grafts. *Am J Transplant* 2006;6:2937-46.
- [149] Hertig A, Anglicheau D, Verine J, Pallet N, Touzot M, Ancel PY, Mesnard L, Brousse N, Baugey E, Glotz D, Legendre C, Rondeau E, Xu-Dubois YC. Early epithelial phenotypic changes predict graft fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:1584-91.
- [150] Hazzan M, Hertig A, Buob D, Copin MC, Noel C, Rondeau E, Dubois-Xu YC. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Predicts Cyclosporine Nephrotoxicity in Renal Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1375-81.
- [151] Goto S, Yamamoto H, Fukunaga K, Iwasa T, Matsukado Y, Miyamoto E. Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin by calcineurin. *J Neurochem* 1985;45:276-83.
- [152] Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Usukura M, Mabuchi H. Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy. *Circulation* 2002;105:677-9.
- [153] McMorrow T, Gaffney MM, Slattery C, Campbell E, Ryan MP. Cyclosporine A induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:2215-25.
- [154] Slattery C, Campbell E, McMorrow T, Ryan MP. Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *Am J Pathol* 2005;167:395-407.

- [155] Zimmerhackl LB, Mesa H, Kramer F, Kolmel C, Wiegele G, Brandis M. Tubular toxicity of cyclosporine A and the influence of endothelin-1 in renal cell culture models (LLC-PK1 and MDCK). *Pediatr Nephrol* 1997;11:778-83.
- [156] Descazeaud V, Mestre E, Marquet P, Essig M. Calcineurin regulation of cytoskeleton organization: a new paradigm to analyze the effects of calcineurin inhibitors on the kidney. *J Cell Mol Med* 2011;
- [157] Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, Chang JM, Choi HY, Campbell KN, Kim K, Reiser J, Mundel P. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med* 2008;14:931-8.
- [158] Ong SE, Mann M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc* 2006;1:2650-60.
- [159] Ong SE, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol* 2005;1:252-62.
- [160] Puigmule M, Lopez-Hellin J, Sune G, Tornavaca O, Camano S, Tejedor A, Meseguer A. Differential proteomic analysis of cyclosporine A-induced toxicity in renal proximal tubule cells. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:2672-86.
- [161] Aicher L, Wahl D, Arce A, Grenet O, Steiner S. New insights into cyclosporine A nephrotoxicity by proteome analysis. *Electrophoresis* 1998;19:1998-2003.
- [162] O'Connell S, Slattery C, Ryan MP, McMorrow T. Identification of novel indicators of cyclosporine A nephrotoxicity in a CD-1 mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;252:201-10.
- [163] Shu Z, Pu X, Xiong X, Li Q, Wang Y, Zhai S. Differential expression of plasma proteins in cyclosporine A-induced rat acute nephrotoxicity. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73:592-8.
- [164] Unlu M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997;18:2071-7.
- [165] Shaw J, Rowlinson R, Nickson J, Stone T, Sweet A, Williams K, Tonge R. Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics* 2003;3:1181-95.
- [166] Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999;17:994-9.
- [167] Kennedy S. The role of proteomics in toxicology: identification of biomarkers of toxicity by protein expression analysis. *Biomarkers* 2002;7:269-90.
- [168] Kang UB, Ahn Y, Lee JW, Kim YH, Kim J, Yu MH, Noh DY, Lee C. Differential profiling of breast cancer plasma proteome by isotope-coded affinity tagging method reveals biotinidase as a breast cancer biomarker. *BMC Cancer* 2010;10:114.

- [169] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlet-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:1154-69.
- [170] Freue GV, Sasaki M, Meredith A, Gunther OP, Bergman A, Takhar M, Mui A, Balshaw RF, Ng RT, Opushneva N, Hollander Z, Li G, Borchers CH, Wilson-McManus J, McManus BM, Keown PA, McMaster WR. Proteomic signatures in plasma during early acute renal allograft rejection. *Mol Cell Proteomics* 2010;9:1954-67.
- [171] Siu KW, DeSouza LV, Scorilas A, Romaschin AD, Honey RJ, Stewart R, Pace K, Youssef Y, Chow TF, Yousef GM. Differential protein expressions in renal cell carcinoma: new biomarker discovery by mass spectrometry. *J Proteome Res* 2009;8:3797-807.
- [172] Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:376-86.
- [173] Kruger M, Moser M, Ussar S, Thievensen I, Lubner CA, Forner F, Schmidt S, Zanivan S, Fassler R, Mann M. SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell* 2008;134:353-64.
- [174] Sury MD, Chen JX, Selbach M. The SILAC fly allows for accurate protein quantification in vivo. *Mol Cell Proteomics* 2010;9:2173-83.
- [175] Emadali A., Gallagher-Gambarelli M. La protéomique quantitative par la méthode SILAC, Techniques et perspectives. *Médecine Sciences* 2009;25:835-42.
- [176] Blagoev B, Ong SE, Kratchmarova I, Mann M. Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. *Nat Biotechnol* 2004;22:1139-45.
- [177] Kruger M, Kratchmarova I, Blagoev B, Tseng YH, Kahn CR, Mann M. Dissection of the insulin signaling pathway via quantitative phosphoproteomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2451-6.
- [178] Everley PA, Krijgsveld J, Zetter BR, Gygi SP. Quantitative cancer proteomics: stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) as a tool for prostate cancer research. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:729-35.
- [179] Gronborg M, Kristiansen TZ, Iwahori A, Chang R, Reddy R, Sato N, Molina H, Jensen ON, Hruban RH, Goggins MG, Maitra A, Pandey A. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:157-71.
- [180] Liang X, Zhao J, Hajivandi M, Wu R, Tao J, Amshey JW, Pope RM. Quantification of membrane and membrane-bound proteins in normal and malignant breast cancer cells isolated from the same patient with primary breast carcinoma. *J Proteome Res* 2006;5:2632-41.

- [181] Bose R, Molina H, Patterson AS, Bitok JK, Periaswamy B, Bader JS, Pandey A, Cole PA. Phosphoproteomic analysis of Her2/neu signaling and inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9773-8.
- [182] Dong X, Xiong L, Jiang X, Wang Y. Quantitative proteomic analysis reveals the perturbation of multiple cellular pathways in jurkat-T cells induced by doxorubicin. *J Proteome Res* 2010;9:5943-51.
- [183] Xiong L, Wang Y. Quantitative proteomic analysis reveals the perturbation of multiple cellular pathways in HL-60 cells induced by arsenite treatment. *J Proteome Res* 2010;9:1129-37.
- [184] Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* 2006;24:971-83.
- [185] Kato N, Kosugi T, Sato W, Ishimoto T, Kojima H, Sato Y, Sakamoto K, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo S, Kadomatsu K. Basigin/CD147 promotes renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *Am J Pathol* 2011;178:572-9.
- [186] Yurchenko V, Constant S, Eisenmesser E, Bukrinsky M. Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clin Exp Immunol* 2010;160:305-17.
- [187] De CF, Allain F, Caliez A, Spik G, Vanhoutte PM. High binding capacity of cyclophilin B to chondrocyte heparan sulfate proteoglycans and its release from the cell surface by matrix metalloproteinases: possible role as a proinflammatory mediator in arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2197-206.
- [188] Jennings P, Aydin S, Bennett J, McBride R, Weiland C, Tuite N, Gruber LN, Perco P, Gaora PO, Ellinger-Ziegelbauer H, Ahr HJ, Kooten CV, Daha MR, Prieto P, Ryan MP, Pfaller W, McMorrow T. Inter-laboratory comparison of human renal proximal tubule (HK-2) transcriptome alterations due to Cyclosporine A exposure and medium exhaustion. *Toxicol In Vitro* 2009;23:486-99.
- [189] Molloy MP, Brzezinski EE, Hang J, McDowell MT, VanBogelen RA. Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics* 2003;3:1912-9.
- [190] Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9390-5.
- [191] Rhodes DR, Barrette TR, Rubin MA, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62:4427-33.
- [192] Kruger M, Kratchmarova I, Blagoev B, Tseng YH, Kahn CR, Mann M. Dissection of the insulin signaling pathway via quantitative phosphoproteomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2451-6.
- [193] Huang dW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44-57.

- [194] Lamoureux F, Picard N, Boussera B, Sauvage FL, Marquet P. Sirolimus and everolimus intestinal absorption and interaction with calcineurin inhibitors: a differential effect between cyclosporine and tacrolimus. *Fundam Clin Pharmacol* 2011;
- [195] Picard N, Levoir L, Lamoureux F, Yee SW, Giacomini KM, Marquet P. Interaction of sirolimus and everolimus with hepatic and intestinal organic anion-transporting polypeptide transporters. *Xenobiotica* 2011;41:752-7.

CHAPITRE V : ANNEXES

I. AUTRES PUBLICATIONS REALISEES AU COURS DE CE TRAVAIL DE THESE

I.1. ETUDE DES MECANISMES D'ABSORPTION INTESTINALE DU SIROLIMUS ET DE L'EVEROLIMUS, INTERACTION AVEC LA CYCLOSPORINE ET LE TACROLIMUS

Objectifs

Les inhibiteurs de la mTOR (ImTOR), Sirolimus (SRL) et Everolimus (EVR) sont des médicaments immunosuppresseurs caractérisés par une importante variabilité pharmacocinétique inter-individuelle. SRL et EVR présentent une faible biodisponibilité orale qui augmente lorsqu'ils sont associés aux inhibiteurs de la calcineurine (ICN), Cyclosporine (CsA) et Tacrolimus (TAC). Les objectifs de ce travail étaient d'étudier *in vitro* les mécanismes impliqués dans l'absorption intestinale des ImTOR seuls ou associés aux ICN.

Protocole expérimental

Dans cette étude nous avons utilisé la lignée cellulaire intestinale humaine Caco-2 pour étudier le passage dans le sens apical/basal (A/B) et basal/apical (B/A) de l'EVR et du SRL, seuls, associés aux ICN et en présence d'un inhibiteur spécifique du transporteur d'efflux P-gp (connu sous le nom de GF120918).

Résultats

EVR et SRL présentent un transport polarisé au niveau des cellules intestinales Caco-2, avec un transport dans le sens B/A (efflux) 9 fois et 6 fois plus important que dans le sens A/B (absorption), respectivement. Une inhibition de la p-gp par le GF120918 diminue significativement cet efflux, suggérant que EVR et SRL sont substrats de la P-gp au niveau intestinal. Cet efflux est par ailleurs significativement diminué par ajout de CsA ou de TAC, qui résulte en une augmentation majeure du transport dans le sens A/B. Cependant, l'ajout de CsA entraîne, contrairement au TAC, une augmentation spécifique du transport dans le sens B/A, suggérant un mécanisme plus complexe que nous devons préciser par des travaux ultérieurs.

I.2. ETUDE DE L'IMPLICATION DES TRANSPORTEURS OATP DANS L'ABSORPTION INTESTINALE ET HEPATIQUE DU SIROLIMUS ET DE L'EVEROLIMUS

Objectifs

Les ImTOR (SRL et EVR) sont caractérisés par une variabilité pharmacocinétique inter-individuelle importante. Comme le travail présenté précédemment, cette étude vise à mieux comprendre les mécanismes intervenant dans le transport cellulaire des ImTOR en étudiant la capacité de l'EVR et du SRL à être transportés par (ou à inhiber) les principales protéines d'influx de la famille OATP (Organic Anion Transporting Polypeptides) exprimées au niveau hépatique et intestinal.

Protocole expérimental

Nous avons réalisé des expériences de capture cellulaire des ImTOR, à différentes concentrations, en mesurant les concentrations intracellulaires et extracellulaires de SRL et EVR après des temps d'incubation variables. Au cours de ce travail, nous avons utilisé la lignée cellulaire HEK-293T transfectée de manière à sur-exprimer les principaux transporteurs OATP exprimés au niveau hépatique et intestinale : OATP1A2, 1B1 ou 1B3. Nous avons également testé les lignées cellulaires HepaRG (lignée hépatocytaire humaine) et Caco-2 (lignée intestinale humaine).

Résultats

Aucune augmentation du transport des ImTOR n'a été observée sur la lignée HEK transfectées, suggérant que EVR et SRL ne sont pas substrats des OATP1A2, 1B1 et 1B3. Cependant, les ImTOR présentent la capacité de diminuer la capture cellulaire de molécules spécifiquement transportées par ces protéines : inhibition de la capture de l'³H-estrone sulphate (OATP1A2 et 1B1) et du MPAG (OATP1B3), suggérant une inhibition de ces transporteurs par EVR et SRL. Par ailleurs, sur lignée HepaRG et Caco-2, l'ajout d'un inhibiteur non spécifique des OATP (probenecid) ne modifie pas la capture des deux ImTOR, suggérant également qu'ils ne sont pas substrats des principaux OATP hépatiques et intestinaux.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	14
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	16
I. LES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE.....	17
<i>I.1. Historique.....</i>	<i>17</i>
<i>I.2. Mécanisme d'action pharmacologique des inhibiteurs de la calcineurine.....</i>	<i>18</i>
<i>I.3. La néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine : aspects histologiques et fonctionnels.....</i>	<i>21</i>
I.3.1. Néphrotoxicité aiguë des inhibiteurs de la calcineurine.....	23
I.3.1.a. Généralités	23
I.3.1.b. Conséquences fonctionnelles et histologiques	24
I.3.2. Néphrotoxicité chronique des inhibiteurs de la calcineurine	27
I.3.2.a. Généralités	27
I.3.2.b. Conséquences fonctionnelles et histologiques	29
<i>I.4. Principaux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine.....</i>	<i>32</i>
I.4.1. Généralités	32
I.4.2. Prolifération cellulaire et apoptose	33
I.4.2.a. Effets de la CsA sur la prolifération cellulaire.....	33
I.4.2.b. Apoptose induite par les ICN.....	34
I.4.3. Stress du réticulum endoplasmique et autophagie	37
I.4.3.a. Stress du réticulum et réponse adaptative	37
I.4.3.b. Stress du réticulum induit par les inhibiteurs de la calcineurine.....	40
I.4.3.c. Autophagie induite par la cyclosporine	41
I.4.4. Stress oxydant	42
I.4.5. Vasoconstriction induite par les inhibiteurs de la calcineurine	43
I.4.5.a. Perturbations du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone	43
I.4.5.b. Modification de la sécrétion des médiateurs vasoactifs	44
I.4.5.c. Action des ICN sur le système nerveux sympathique	47
I.4.6. Transition épithélio-mésenchymateuse et modifications du cytosquelette	47
I.4.6.a. Transition épithélio-mésenchymateuse induite par les ICN.....	47
I.4.6.b. Modifications du cytosquelette induites par les ICN.....	48
<i>I.5. Résumé des principaux mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité des ICN</i>	<i>50</i>
II. APPROCHES PROTEOMIQUES QUANTITATIVES D'ANALYSE DES MODIFICATIONS PHENOTYPIQUES INDUITES PAR LES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE.....	52
<i>II.1. Choix de la stratégie de protéomique quantitative.....</i>	<i>52</i>
<i>II.2. Approches protéomiques basées sur une séparation des protéines par électrophorèse</i>	<i>54</i>
II.2.1. Électrophorèse bi-dimensionnelle des protéines sur gel de polyacrylamide (2D-PAGE ou 2-DE)	54
II.2.2. Analyse protéomique différentielle par électrophorèse en gel et fluorescence (2D-DIGE)	57
<i>II.3. Approches protéomiques basées sur une séparation des peptides par chromatographie.....</i>	<i>58</i>
II.3.1. Protéomique quantitative par marquage chimique in vitro	58
II.3.1.a. Approche ICAT ou « Isotope-Coded Affinity Tag »	58
II.3.1.b. Approche iTRAQ ou « Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification »	61
II.3.2. Protéomique quantitative par marquage métabolique : SILAC ou « Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture »	63
<i>II.4. Résumé des avantages et inconvénients de ces approches protéomiques quantitatives</i>	<i>67</i>
III. HYPOTHESE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS	69

CHAPITRE II : TRAVAUX PERSONNELS.....	70
I. ETUDE DES PERTURBATIONS PROTEIQUES INDUITES PAR LA CYCLOSPORINE DANS UNE LIGNEE CELLULAIRE RENALE PAR LA METHODE SILAC ET COMPARAISON AVEC LE TACROLIMUS; ANALYSE DES EFFETS POTENTIELS DE LA N-ACETYLCYSTEINE SUR CES PERTURBATIONS.....	72
II. ETUDE DES EFFETS DE LA CYCLOSPORINE SUR LA SECRETION PROTEIQUE D'UNE LIGNEE CELLULAIRE RENALE PAR APPROCHE SILAC.....	92
III. COMPARAISON DE DEUX APPROCHES PROTEOMIQUES POUR L'ETUDE QUANTITATIVE DES PERTURBATIONS PROTEIQUES INDUITES PAR LA CYCLOSPORINE : 2D-PAGE ET SILAC.	121
CHAPITRE III : DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	140
I. DISCUSSION ET CONCLUSIONS	141
<i>I.1. SILAC : Application à l'étude des modifications phénotypiques de cellules rénales exposées aux ICN et bénéfiques par rapport aux approches protéomiques ou transcriptomiques classiques</i>	<i>141</i>
<i>I.1.1. Mise en application du SILAC à l'étude des perturbations protéomiques induites par les ICN</i>	<i>141</i>
<i>I.1.2. SILAC et approches protéomiques ou transcriptomiques classiques</i>	<i>142</i>
<i>I.2. Limites de la méthodologie SILAC</i>	<i>144</i>
<i>I.2.1. Choix du modèle expérimental.....</i>	<i>144</i>
<i>I.2.2. Détermination de valeurs seuils pour identifier les protéines perturbées par l'approche SILAC</i>	<i>146</i>
<i>I.2.3. Interprétation des données et validation des résultats générés par l'approche SILAC</i>	<i>147</i>
II. PERSPECTIVES.....	148
CHAPITRE IV : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151
CHAPITRE V : ANNEXES.....	167
I. AUTRES PUBLICATIONS REALISEES AU COURS DE CE TRAVAIL DE THESE	168
<i>I.1. Etude des mécanismes d'absorption intestinale du sirolimus et de l'everolimus, interaction avec la cyclosporine et le tacrolimus</i>	<i>168</i>
<i>I.2. Etude de l'implication des transporteurs OATP dans l'absorption intestinale et hépatique du sirolimus et de l'everolimus</i>	<i>179</i>

Fabien LAMOUREUX

TITRE Étude protéomique des modifications phénotypiques des cellules rénales exposées aux immunosuppresseurs inhibiteurs de la calcineurine.

RESUMÉ Les médicaments inhibiteurs de la calcineurine, la cyclosporine (CsA) et le tacrolimus (TAC), sont utilisés depuis plus de 30 ans dans les protocoles d'immunosuppression afin de prévenir les rejets du greffon et traiter des maladies auto-immunes. Si ces traitements ont considérablement amélioré la survie du greffon à court terme, ils contribuent à long terme à l'apparition d'une atteinte rénale appelée néphropathie chronique d'allogreffe ainsi qu'à une dysfonction chronique du greffon, qui conduit au déclin progressif, irréversible de la fonction rénale et à la perte du greffon, en dehors de tout surdosage médicamenteux. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine sont nombreux et, bien que largement étudiés, restent mal compris. Notre objectif principal a été de développer et de mettre en application une approche protéomique à large échelle, basée sur la spectrométrie de masse, afin d'identifier et de quantifier les modifications d'expression protéique induites par la CsA et le TAC sur un modèle de cellules rénales en culture. La méthodologie utilisée est l'approche SILAC (ou *Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture*), qui consiste en un marquage métabolique des protéines cellulaires avec des acides aminés alourdis par du carbone isotope 13. Nous montrons que l'expression intra-cellulaire et la sécrétion de nombreuses protéines sont modulées par la CsA et que le TAC agit différemment sur ces mêmes protéines. Nos résultats confirment ainsi des observations précédemment décrites et nous conduisent également à formuler de nouvelles hypothèses concernant les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans la néphrotoxicité induite par les inhibiteurs de la calcineurine. Des études ultérieures seront développées pour tester certaines de ces protéines comme biomarqueurs potentiels de cette néphrotoxicité chez des patients transplantés et traités par CsA ou TAC.

MOTS CLÉS Calcineurine, cyclosporine, tacrolimus, rein, néphrotoxicité, protéomique, SILAC, spectrométrie de masse.

TITLE Quantitative proteomic analysis of calcineurin inhibitors-induced toxicity in kidney cells.

ABSTRACT Cyclosporine (CsA) and tacrolimus (TAC) are calcineurin inhibitors (CNIs) that have been widely used for more than 30 years to prevent allograft rejection and to treat immune disorders. Although the use of these immunosuppressive drugs has greatly improved short-term graft survival in transplant allograft recipients, long-term treatment can result in major and limiting side effects, including nephrotoxicity that contributes to chronic allograft nephropathy and rejection. CNIs-induced nephrotoxicity has been studied for years but the precise molecular mechanisms underlying such toxicity are complex and remain poorly understood. The aim of this work was to investigate CNIs-induced proteomic perturbations in renal cell using SILAC, a quantitative proteomic strategy based on mass spectrometry. SILAC (or *Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture*) consists in the metabolic labeling of the whole cell proteome by substitution of essential amino acids by their "heavy" variants containing isotopic carbon-13, which has been successfully applied to reveal drug-related quantitative proteomic perturbations. Our results revealed perturbed expression level for numerous intracellular and secreted proteins following cell exposure with CsA. Moreover, using SILAC TAC toxicity profile appeared different from that of CsA, suggesting different molecular mechanisms leading to renal toxicity of both immunosuppressants. These results provide a new insight and are consistent with recent data regarding the molecular mechanisms of CNIs-induced nephrotoxicity. Our findings also offer new directions for future research aiming to identify specific biomarkers of CsA nephrotoxicity. Some of the proteins identified here are going to be tested as potential biomarkers of CNIs nephrotoxicity in subsequent clinical studies.

KEY-WORDS Calcineurin, cyclosporine, tacrolimus, kidney, nephrotoxicity, proteomics, SILAC, mass spectrometry.

DISCIPLINE Pharmacologie et sciences du médicament

INSERM UMR-S850 – Pharmacologie des immunosuppresseurs et de la transplantation

Faculté de Médecine, laboratoire de Pharmacologie médicale, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges
