

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Biologie – Santé

Faculté de Médecine

Inserm UMR-S850 « Pharmacologie des immunosuppresseurs et transplantation »

Thèse N° []

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Pharmacologie et sciences du médicament

Présentée et soutenue par

Virginie de MERINDOL-DESCAZEAUD

Le 3 janvier 2011

**MODIFICATIONS DU CYTOSQUELETTE DES CELLULES
TUBULAIRES PROXIMALES RENALES
PAR LES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE :
ROLE DANS LA DYSFONCTION CHRONIQUE DU GREFFON**

Directeur de thèse : Pr. Marie ESSIG

JURY :

Monsieur le Professeur Thierry HAUET	Président
Monsieur le Professeur François VRTOVSNIK	Rapporteur
Monsieur le Professeur Marc HAZZAN	Rapporteur
Monsieur le Professeur Lionel ROSTAING	Examineur
Monsieur le Docteur Julien ALLARD	Examineur
Madame le Professeur Marie ESSIG	Directeur de Thèse

A Florian,

A mes parents et mes frères,

Merci pour votre amour, votre confiance, votre soutien, votre patience ... Merci pour tout

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

Monsieur Marc Hazzan et Monsieur François Vrtovsnik pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse,

Monsieur Thierry Hauet, Monsieur Lionel Rostaing et Monsieur Julien Allard pour avoir bien voulu participer à la soutenance de ce mémoire.

C'est un honneur de vous compter parmi les membres de ce jury et de vous présenter mon travail. Merci à chacun d'entre vous pour le temps que vous avez accepté d'y consacrer.

A Marie Essig,

Difficile de résumer 3 années de collaboration en quelques mots. Le plus simple serait de te remercier pour la manière dont tu as encadré et soutenu ce travail, pour ta disponibilité, ta compréhension et ta confiance. Tous les thésards n'ont pas la chance d'être guidé de la sorte. Merci d'avoir partagé ton savoir et tes conseils précieux.

Au Professeur Pierre Marquet,

Je vous suis très reconnaissante de m'avoir accueillie dans votre équipe dès ma cinquième année de Pharmacie. La route fut sinueuse par la suite pour atteindre le doctorat ... mais merci d'avoir accepté de me recevoir il y a 3 ans et de m'avoir proposé un projet si intéressant. C'est un honneur d'avoir pu réaliser cette thèse parmi vous.

A Nicolas Picard,

C'est avec toi que tout a commencé en 2004. Merci d'avoir accepté une petite stagiaire sans expérience pendant ta thèse et de m'avoir ainsi donné l'envie de poursuivre dans cette voie.

A tous les « collègues » de l'équipe 850,

Merci à chacun pour sa contribution, qu'elle ait été scientifique, administrative ou amicale.

Aux copains pharmaciens et médecins,

Tout cela vous dépasse un peu mas je vous assure, j'ai vraiment travaillé durant ces trois dernières années ... ayez une pensée pour moi quand vous vendrez ou prescrirez du Neoral !

RESUME

La ciclosporine et le tacrolimus sont deux inhibiteurs de la calcineurine couramment utilisés dans les protocoles d'immunosuppression pour prévenir les rejets de greffe. Alors que la survie à court terme des greffons a été fortement améliorée grâce à l'utilisation de ces traitements, la survie à long terme est encore compromise par l'apparition d'une forme particulière de maladie rénale, appelée néphropathie chronique d'allogreffe ou dysfonction chronique du greffon, qui conduit au déclin progressif et irréversible de la fonction rénale. L'origine exacte des atteintes rénales observées au cours de cette pathologie n'est pas encore connue mais il semble que l'utilisation des inhibiteurs de la calcineurine contribue fortement à leur apparition en raison du degré très élevé de leur toxicité rénale, en dehors de tout surdosage médicamenteux. Une des hypothèses pour expliquer l'importance de cette néphrotoxicité est que ces molécules, même à doses thérapeutiques, induisent des modifications phénotypiques des différentes structures rénales qui perturbent le fonctionnement normal des cellules et favorisent leur comportement pathologique.

Le but de ce travail a été d'identifier les effets des inhibiteurs de la calcineurine sur le phénotype et sur l'organisation du cytosquelette des cellules du tube proximal qui est précocement le siège des lésions histologiques de la dysfonction chronique du greffon.

Nous montrons que la CsA modifie le phénotype des cellules tubulaires proximales en perturbant l'organisation du cytosquelette d'actine et en inhibant le système fibrinolytique, et que ces modifications peuvent participer à l'apparition des lésions fibrosantes observées dans les greffons rénaux après la transplantation. Cette étude permet également d'identifier en la cofiline une voie de signalisation potentiellement impliquée dans les effets de la CsA sur l'organisation du cytosquelette rénal. En revanche, les premiers résultats obtenus avec le tacrolimus ne reproduisent pas les effets de la ciclosporine sur le cytosquelette.

Ce travail permet de formuler un certain nombre d'hypothèses sur les mécanismes physiopathologiques qui participent à la détérioration progressive de la structure et de la fonction des cellules tubulaires proximales après la transplantation rénale et sur la contribution des inhibiteurs de la CaN dans ce processus.

Mots clé : Calcineurine, ciclosporine, tacrolimus, dysfonction chronique du greffon, cytosquelette, système fibrinolytique, fibrose.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	9
Chapitre I: INTRODUCTION.....	11
I. LE CYTOSQUELETTE.....	12
<i>I. 1. Organisation générale.....</i>	13
I. 1. 1. Les filaments d'actine (152,186).....	13
I. 1. 2. Les filaments intermédiaires (65,66).....	14
I. 1. 3. Les microtubules (149,225)	15
<i>I. 2. Cytosquelette et fonction des cellules tubulaires proximales</i>	16
I. 2. 1. Organisation spécifique du cytosquelette dans les cellules tubulaires proximales	18
I. 2. 2. Rôle du cytosquelette dans les pathologies rénales.....	19
I. 2. 2. a. Le syndrome d'ischémie-reperfusion	19
I. 2. 2. b. Les maladies kystiques	20
I. 2. 2. c. La réduction néphronique	20
II. LA CALCINEURINE.....	22
<i>II. 1. Caractéristiques de la calcineurine.....</i>	22
II. 1. 1. Structure	22
II. 1. 2. Distribution	23
II. 1. 3. Régulation	24
<i>II. 2. Fonction immunologique</i>	25
<i>II. 3. Fonctions non-immunologiques</i>	27
II. 3. 1. Rôle de la calcineurine dans le cerveau	27
II. 3. 2. Rôle de la calcineurine dans les cellules musculaires.....	28
II. 3. 3. Autres fonctions	28
III. CALCINEURINE ET REINS.....	29
<i>III. 1. Rôle de la calcineurine dans le développement rénal.....</i>	29
<i>III. 2. Toxicité des inhibiteurs de la calcineurine</i>	30
III. 2. 1. Néphrotoxicité de la ciclosporine	30
III. 2. 2. Physiopathologie	31
III. 2. 2. a. Vasoconstriction.....	32
III. 2. 2. b. Stimulation du système rénine-angiotensine-aldostérone.....	33
III. 2. 2. c. Stimulation des facteurs de croissance.....	33
III. 2. 3. Principaux effets cellulaires.....	34
III. 2. 3. a. Apoptose et Sénescence cellulaire	34
III. 2. 3. b. Remodelage de la matrice extracellulaire	35
<i>III. 3. Modifications du cytosquelette des cellules rénales</i>	35
IV. HYPOTHESE DE TRAVAIL.....	36

Chapitre II : TRAVAUX PERSONNELS.....	37
I. REGULATION DE L'ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE PAR LA CALCINEURINE	38
II. MODIFICATIONS DE L'ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE ET DE L'EXPRESSION DU TPA INDUITES PAR LA CICLOSPORINE DANS LES CELLULES TUBULAIRES RENALES	53
III. EFFETS DU LE TACROLIMUS SUR LES CELLULES TUBULAIRES PROXIMALES.....	72
Chapitre III : CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION.....	78
Chapitre IV : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	83
Chapitre V : ANNEXES.....	102

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

Ang II :	Angiotensine II
CaM :	Calmoduline
CaN A :	Calcineurine A
CaN B :	Calcineurine B
CaN :	Calcineurine
CsA :	Ciclosporine
CypA :	Cyclophiline A
DROS :	Dérivés réactifs de l'oxygène
FI-AT :	Fibrose interstitielle – atrophie tubulaire
FK506 :	Tacrolimus
MEC :	Matrice extracellulaire
MMP :	Métalloprotéases
NCA :	Néphropathie chronique d'allogreffe
NFAT :	Facteur nucléaire des cellules T activées
PAI-1 :	Inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1
tPA :	Activateur tissulaire du plasminogène
uPA :	Urokinase

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Architecture cellulaire et voies de transport dans les cellules épithéliales.	17
Figure 2 : Structure et séquence de la calcineurine A.	23
Figure 3 : Régulation de la calcineurine.	24
Figure 4 : Activation de la prolifération lymphocytaire par la calcineurine.	26
Figure 5 : Principales fonctions de la calcineurine.	27
Figure 6 : Physiopathologie de la néphrotoxicité de la ciclosporine.	32
Figure 7 : CsA-induced reorganization of actin and cytokeratin in proximal tubular cells.	50
Figure 8 : Role of calcineurin-induced organization of the cytoskeleton in brain, heart and kidney.	52
Figure 9 : CsA-induced reorganization of the actin cytoskeleton in LLC-PK1 cells.	63
Figure 10 : CsA modified <i>in vivo</i> the actin cytoskeleton of proximal tubule.	64
Figure 11 : Effect of CsA treatment on the fibrinolytic system (A) and matrix metalloproteinases (B).	65
Figure 12 : CsA cytotoxicity.	66
Figure 13 : The NFAT pathway is not involved in CsA-induced F-actin and tPA modifications.	67
Figure 14 : The cofilin pathway is involved in CsA-induced F-actin and tPA modifications.	68
Figure 15 : Effets du tacrolimus sur les activateurs du plasminogène (A) et les métalloprotéases (B).	74
Figure 16 : Effets du tacrolimus sur l'organisation du cytosquelette d'actine.	75
Figure 17 : Cytotoxicité du tacrolimus dans les cellules LLC-PK1.	76
Tableau 1 : Caractéristiques du cytosquelette.	12
Tableau 2 : Main proteins involved in calcineurin's regulation of cytoskeleton.	44
Tableau 3 : Dosage des concentrations intracellulaires de tacrolimus dans les cellules LLC-PK1 par TFC-MS/MS.	73

INTRODUCTION GENERALE

La découverte de la ciclosporine et de ses propriétés immunosuppressives dans les années 1970 marque un tournant dans l'histoire de la transplantation. Les nombreuses recherches concernant son rôle et son mécanisme d'action ont permis de comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans les phénomènes de rejet et d'en améliorer ainsi la prise en charge. Même s'il existe aujourd'hui plusieurs types de médicaments immunosuppresseurs, les inhibiteurs de la calcineurine restent la classe thérapeutique de choix pour prévenir le rejet des greffes.

La transplantation rénale est une thérapeutique de mieux en mieux maîtrisée et dont le nombre ne cesse d'augmenter chaque année. Alors que la survie du greffon à court terme a fortement été améliorée grâce, entre autre, à la meilleure connaissance des mécanismes immunologiques et à l'amélioration des traitements immunosuppresseurs, la survie à long terme du greffon et du patient pose encore un véritable problème. En effet, rapidement après la transplantation, le rein est le siège d'une forme particulière de maladie rénale, appelée néphropathie chronique d'allogreffe (NCA) ou dysfonction chronique du greffon.

La NCA est un facteur pronostic majeur de la perte du greffon à long terme. Il s'agit d'une maladie multifactorielle, résultant d'une série d'agressions à la fois immunologiques et non immunologiques qui conduisent à la destruction progressive des néphrons et à l'altération irréversible de la fonction rénale. Dès la première année post-greffe, la NCA est caractérisée par l'apparition précoce mais silencieuse d'atteintes tubulo-interstitielles avec des lésions typiques de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire (FI-AT) associées à d'importants phénomènes inflammatoires. Au-delà de cette première année, alors que l'inflammation tend à diminuer, les atteintes tubulo-interstitielles ne cessent de progresser et sont accompagnées d'atteintes glomérulaires et vasculaires (glomérulosclérose, hyalinose artériolaire). L'évolution à long terme de ces atteintes conduit au déclin progressif et irréversible de la fonction rénale.

L'origine exacte de ces modifications n'est pas encore connue mais il semble que l'utilisation de certains médicaments immunosuppresseurs contribue fortement à l'apparition des lésions rénales. Paradoxalement, malgré la diminution des rejets aigus et la modulation à

court terme des processus de fibrose secondaires aux phénomènes de rejets, certains traitements s'accompagnent d'une néphrotoxicité irréversible qui progresse irrémédiablement et devient quasiment universelle 10 ans après la greffe. Parmi les principales molécules utilisées, les inhibiteurs de la calcineurine présentent un degré très élevé de toxicité rénale et il est maintenant admis que cette néphrotoxicité, en dehors de tout surdosage médicamenteux, est un facteur important favorisant la NCA.

Une des hypothèses pour expliquer l'importance de cette néphrotoxicité est que ces molécules, en dehors de tout surdosage, induisent un certain nombre de modifications phénotypiques des différentes structures rénales qui perturbent le fonctionnement normal des cellules et favorisent leur comportement pathologique.

Dans ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés aux effets des inhibiteurs de la calcineurine sur le phénotype et l'organisation du cytosquelette des cellules du tube proximal qui est la structure rénale majoritaire du cortex et qui est précocement le siège de lésions histologiques de NCA.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

I. LE CYTOSQUELETTE

Le cytosquelette est une structure dynamique tridimensionnelle qui assure l'ossature des cellules. En perpétuelle adaptation face aux contraintes extra- et intracellulaires, le cytosquelette joue un rôle majeur dans le maintien de la forme des cellules et dans leur motilité (déplacement, chimiotropisme, chimiotaxie, endo- et exocytose). Il permet également le mouvement des chromosomes au cours de la mitose, le mouvement des organites cellulaires ainsi que leur ancrage aux différentes structures de la cellule. Enfin le cytosquelette permet à la cellule d'acquérir une polarité et de s'adapter aux forces de pression et de tension.

Le cytosquelette est un réseau complexe de protéines filamenteuses qui, par leur interaction, confèrent à la cellule des propriétés d'élasticité ou de rigidité leur permettant de s'adapter aux contraintes mécaniques. Il existe trois types de filaments de tailles et de natures différentes : les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques du cytosquelette.

	MICROFILAMENTS	FILAMENTS INTERMÉDIAIRES	MICROTUBULES
Diamètre	7 nm	10 nm	25 nm
Apparence	Filaments hélicoïdaux	Filaments formés de 8 protofilaments	Tubes creux formés de 13 protofilaments
Composition	Actine (monomère globulaire)	I : Kératines II : Vimentine / Desmine / GFAPs III : Neurofilaments IV : Lamines nucléaires	Tubuline α et β (dimère globulaire)
Poids moléculaire	42 kDa	40 – 130 kDa	50 kDa
Nucléotide lié	ATP (1:1)	aucun	GTP (2 par dimère)

I. 1. ORGANISATION GENERALE

I. 1. 1. LES FILAMENTS D'ACTINE [148, 182]

L'actine est une protéine monomérique globulaire (forme G) qui a la propriété de se polymériser pour former des microfilaments (forme F). Les monomères d'actine se polymérisent en présence d'ATP en une hélice de 5-9 nm de diamètre et forment un filament flexible et polaire avec une extrémité où la croissance est rapide, dite + ou barbée, et une extrémité où la croissance est lente, dite - ou pointue. Les microfilaments sont des structures dynamiques en perpétuel renouvellement. Après l'incorporation des monomères d'ATP-actine dans le polymère, l'ATP est hydrolysé en ADP. La perte du phosphate modifie l'affinité de liaison de l'actine qui se dissocie alors du filament et se retrouve libre sous forme de monomères d'ADP-actine. Ainsi libérés, ces monomères devront être rechargés en ATP pour être à nouveau incorporés au filament.

La polymérisation et l'organisation des microfilaments sont contrôlées par de nombreuses protéines liées à l'actine (ABP, *Actin-Binding Proteins*). Le nombre de protéines identifiées ne cesse d'augmenter, il en existe aujourd'hui plus de 160 distinctes, ce qui démontre la finesse et la complexité de la régulation exercée sur ces filaments. Elles peuvent cependant être regroupées selon leur rôle et leur influence sur la balance polymérisation/dépolymérisation, même si certaines peuvent avoir plusieurs fonctions [33].

Les plus importantes sont les protéines qui favorisent la dépolymérisation des filaments pour contrebalancer leur croissance rapide. Il en existe deux types : les protéines de coupure (« *severing proteins* ») comme la gelsoline qui se fixe sur les filaments et induit leur dislocation, et les facteurs de dépolymérisation comme la cofiline qui impose une torsion supplémentaire au filament d'actine et entraîne ainsi sa dépolymérisation à l'extrémité -. Ces deux types de protéines peuvent également empêcher la polymérisation des filaments : la gelsoline en restant fixée à l'extrémité + du filament, à l'image de la protéine de coiffe capZ, et la cofiline en se liant aux monomères d'actine dans le cytosol comme le font les protéines de séquestration (thymosine, DNase I).

A l'inverse, certaines protéines favorisent la polymérisation des microfilaments comme la profiline qui catalyse l'échange $ADP \rightarrow ATP$ sur les monomères d'actine (en présence de

cofiline uniquement), ou le complexe Arp2/3 qui induit la nucléation de l'actine à partir de filaments existants.

Certaines protéines comme la topomoduline ou la tropomyosine stabilisent également les filaments en s'y fixant et empêchent ainsi leur dépolymérisation.

Enfin, les myosines permettent le mouvement des filaments, et d'autres protéines comme la spectrine ou la vinculine permettent l'ancrage des filaments à la membrane.

Les microfilaments ont plusieurs fonctions qui leur sont propres. Ils participent aux phénomènes de contraction, de motilité et de division cellulaire ainsi qu'au maintien des domaines spécifiques de la membrane plasmique (bordure en brosse, domaine basolatéral), à la formation des excroissances cellulaires (filopodia, lamellipodia, microvillosités) et à celle des jonctions cellulaires [182].

I. 1. 2. LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES [62, 63]

Les filaments intermédiaires sont des filaments non ramifiés de 8-10 nm de diamètre qui sont formés par l'assemblage parallèle de protéines fibrillaires. Les nombreuses protéines qui constituent les filaments intermédiaires sont très conservées. Elles ont en commun un segment central disposé en hélice α qui permet leur assemblage alors que leurs extrémités sont globulaires. L'assemblage se fait par le super-enroulement des domaines α de deux protéines, identiques ou non selon le type de filament, on parle alors de protofilament. Les filaments intermédiaires sont formés par l'association de 8 protofilaments. Ils sont localisés en corbeille autour du noyau cellulaire et s'étendent vers la périphérie où ils prennent ancrage dans les desmosomes et les hémidesmosomes. Ces filaments sont dynamiques mais à la différence des microfilaments et des microtubules, ils ne sont pas polarisés et leur polymérisation peut avoir lieu en l'absence d'apport énergétique.

La spécificité cellulaire ou tissulaire des filaments dépend des protéines qui les constituent. Il en existe 5 classes différentes, principalement cytoplasmiques.

Les classes I et II sont celles des kératines, respectivement acides et basiques, qui s'associent en homo- ou hétérodimères pour former les cytokératines dans les cellules épithéliales.

La classe III comprend 4 protéines qui peuvent également former des homo- ou des hétérodimères : la vimentine essentiellement distribuée dans les fibroblastes, les leucocytes et les cellules endothéliales ; la desmine dans les cellules musculaires ; la protéine acide de la neuroglie dans les cellules gliales et la périphérine dans les neurones périphériques.

La classe IV est constituée des neurofilaments qui sont largement distribués le long des axones.

La classe V est celle des laminines, localisées dans le noyau.

Comme les microfilaments, les filaments intermédiaires permettent le maintien de la forme cellulaire. Ils sont prépondérants dans les cellules soumises aux contraintes mécaniques et sont donc particulièrement impliqués dans la réponse cellulaire à celles-ci. Ils participent également à l'organisation tridimensionnelle de la cellule en servant de point d'ancrage pour les organites, en stabilisant les sarcomères et en participant à la composition de la lamina nucléaire. Enfin ils participent aux jonctions cellulaires en se fixant aux desmosomes et aux hémidesmosomes.

I. 1. 3. LES MICROTUBULES [145, 221]

Les microtubules sont formés par la polymérisation d'une protéine globulaire, la tubuline. Celle-ci est composée de deux sous-unités, α et β , qui s'hétérodimérisent pour former l'unité de base de la structure des protofilaments. Chaque microtubule est formé par l'association de treize protofilaments de tubuline associés en cercle autour d'un espace vide. Comme les microfilaments, les microtubules sont des structures polarisées avec des extrémités à croissance variable et leur polymérisation nécessite la présence d'énergie sous forme de GTP, hydrolysé en GDP. La polymérisation débute dans le centrosome situé dans la zone perinucléaire puis s'étend dans toutes les directions vers la périphérie des cellules par l'extrémité à croissance rapide.

Des nombreuses protéines régulatrices jouent un rôle essentiel dans la fonction des microtubules dans la division des chromosomes au cours de la mitose, mais aussi dans le transport des vésicules cytoplasmiques ou dans la localisation de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique.

Ces protéines régulatrices sont essentiellement des protéines motrices comme les myosines (kinésines et dinéines), qui transforment l'énergie chimique stockée dans l'ATP en énergie mécanique utilisée pour déplacer les organites et les vésicules dans la cellule. Il existe également des protéines, dites associées aux microtubules (MAP, *Microtubule-Associated Proteins*) qui contrôlent quant à elles la rigidité et la vitesse d'assemblage des microtubules.

I. 2. CYTOSQUELETTE ET FONCTION DES CELLULES TUBULAIRES PROXIMALES

Les cellules tubulaires proximales sont des cellules de type épithélial. Elles sont relativement hautes et polarisées avec une membrane apicale riche en microvillosités qui présente une grande surface de contact avec le fluide tubulaire, et une membrane basolatérale d'une surface moins importante qui est en contact avec l'interstitium et les capillaires périlitubulaires par l'intermédiaire de la membrane basale qui sous-tend la structure entière. Les cellules sont reliées entre elles par des jonctions serrées ou *zonula occludens* à leur pôle apical et par des jonctions adhérentes latérales (*zonula adherens* et desmosomes) qui permettent la cohésion entre les cellules voisines. Les membranes basolatérales sont séparées les unes des autres par des espaces intercellulaires (Figure 1).

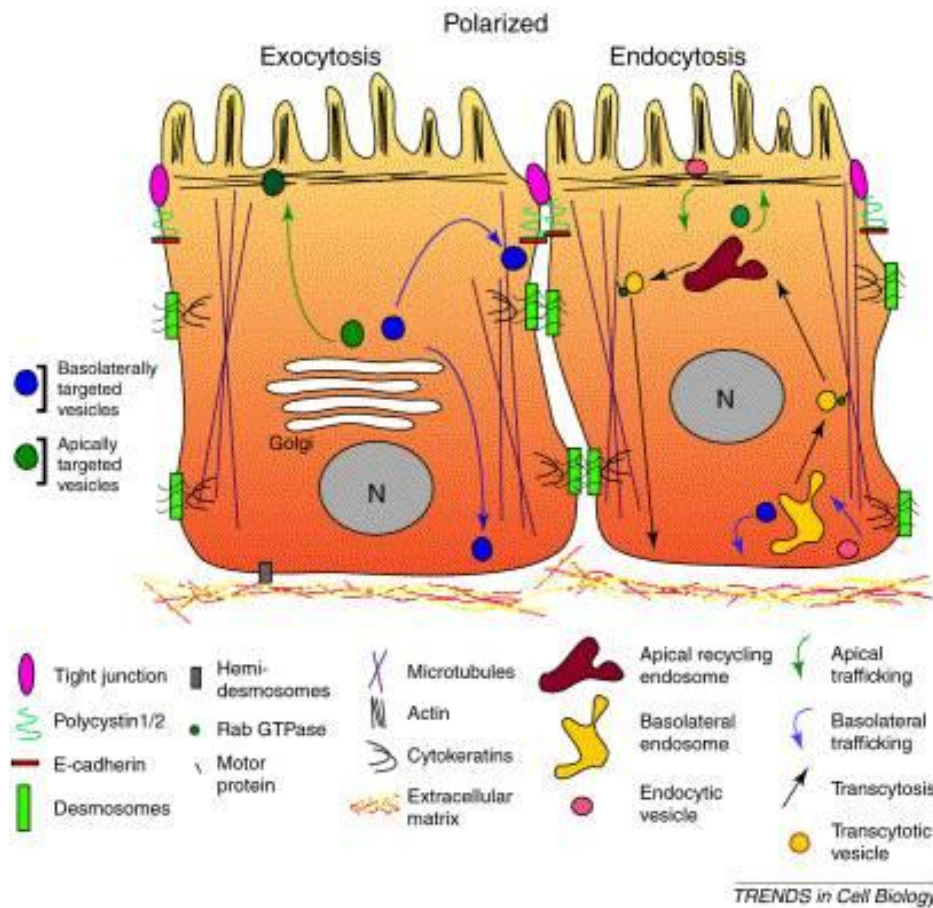


Figure 1 : Architecture cellulaire et voies de transport dans les cellules épithéliales.
(d'après Stein et col., 2002) [197]

I. 2. 1. ORGANISATION SPECIFIQUE DU CYTOSQUELETTE DANS LES CELLULES TUBULAIRES PROXIMALES

L'architecture spécifique des cellules tubulaires proximales est maintenue grâce au cytosquelette qui présente une organisation particulière.

Dans les cellules épithéliales, les filaments d'actine sont regroupés en trois régions [15]. La première région correspond à la bordure en brosse où les filaments constituent la structure interne des microvillosités en association avec la fimbrine et la villine. La deuxième région forme le réseau terminal qui est situé sous la membrane apicale et qui est formé de nombreux filaments d'actine de petite taille reliés entre eux par des protéines de type fodrine, tropomyosine, myosine II et α -actinine. Ce réseau prend naissance dans les jonctions adhérentes entre les cellules tubulaires et a pour principale fonction de maintenir la polarité cellulaire et de contrôler la perméabilité de l'épithélium. Enfin, la troisième zone est située au pôle basal des cellules. Il est constitué de courtes fibres de stress qui prennent naissance dans les plaques d'adhésion à la matrice extracellulaire (MEC) [135].

L'organisation cellulaire des microtubules est très différente de celle des microfilaments. Les microtubules sont distribués dans le cytoplasme avec les extrémités – et le centrosome situés sous la membrane apicale. L'orientation des extrémités + varie selon les épithéliums. Dans les cellules tubulaires, les microtubules sont organisés autour du noyau avec les extrémités + orientées vers la membrane basale [223]. Les microtubules participent aussi à la formation du cil primaire qui est présent à la surface des cellules tubulaires proximales. Toutes les cellules épithéliales rénales, à l'exception des cellules intercalaires, sont dotées d'un cil primaire unique à leur surface apicale. Le cil primaire est constitué d'une membrane qui prolonge la membrane cellulaire et d'un axonème central composé de neuf doublets de microtubules prenant racine dans un corpuscule basal du centrosome. Le cil primaire des cellules épithéliales rénales différenciées est un cil non motile qui possède des propriétés mécano- et chimio-sensorielles et qui contrôle ainsi l'activité cellulaire [162].

Contrairement aux cellules non polarisées où ils sont distribués à travers le cytoplasme et autour du noyau, les filaments intermédiaires de kératine des cellules tubulaires polarisées,

sont localisés principalement au niveau apical, avec quelques filaments isolés qui longent la membrane latérale et se fixent dans les desmosomes [150].

I. 2. 2. ROLE DU CYTOSQUELETTE DANS LES PATHOLOGIES RENALES

I. 2. 2. a. Le syndrome d'ischémie-reperfusion

Le syndrome d'ischémie-reperfusion rénal est une forme particulière d'inflammation qui résulte de modifications structurales et moléculaires que subissent les cellules tubulaires lors d'une phase d'ischémie suivie d'une phase de reperfusion. L'hypoxie initiale au cours de l'ischémie entraîne un dysfonctionnement cellulaire, réversible ou non, qui touche principalement l'épithélium tubulaire proximal. La production anormale de dérivés réactifs de l'oxygène (DROS) qui en découle modifie alors l'organisation du cytosquelette et induit la perte de la polarité cellulaire [222]. Les DROS entraînent la redistribution des protéines membranaires comme les molécules d'adhérence et la Na^+/K^+ -ATPase vers le pôle apical de la cellule, la disparition de la bordure en brosse, la diminution de la réabsorption du Na^+ et le détachement des cellules de la membrane basale [183]. Lorsque l'atteinte est modérée et le temps d'ischémie limité, les lésions peuvent disparaître lors du retour du sang oxygéné. Cependant, la phase de reperfusion peut aussi induire une accélération et une exacerbation des ces lésions. Le retour brutal de l'oxygène après la phase de privation amplifie la production massive de DROS qui activent l'endothélium et favorisent le recrutement des leucocytes circulants et les phénomènes inflammatoires. La transplantation rénale est une situation quasi-expérimentale d'ischémie-reperfusion rénale. Il est admis actuellement qu'une partie des lésions de FI-AT de la NCA résultent de l'évolution fibrosante de ce processus initial [159].

Au cours du phénomène d'ischémie-reperfusion, la réorganisation du cytosquelette touche principalement les filaments d'actine et les microtubules. Les filaments intermédiaires ne semblent pas modifiés [223]. De nombreux travaux ont mis en évidence le réarrangement de l'actine. Les filaments initialement apicaux forment des agrégats dans la bordure en brosse et le cytoplasme et les fibres basales disparaissent. L'organisation latérale est également perturbée ce qui entraîne l'ouverture des jonctions serrées [54, 87, 130]. Ces modifications s'accompagnent d'une dépolymérisation des microtubules et d'une délocalisation du centrosome de la membrane apicale vers le cytoplasme, avec pour conséquence une

repolymérisation anormale et une désorganisation des microtubules dans le cytoplasme [1, 223].

I. 2. 2. b. Les maladies kystiques

Les polykystoses rénales (PKR) sont des maladies génétiques hétérogènes caractérisées par une dilatation des tubules et la formation de kystes qui désorganisent l'architecture rénale et détruisent progressivement le parenchyme rénal. Les PKR sont des ciliopathies [194], causées par la mutation de gènes codant pour des protéines présentes dans le cil primaire et/ou le centrosome des cellules épithéliales tubulaires, ou pour des facteurs de transcription connus pour réguler l'expression de ces protéines [3, 152, 228, 235]. De récentes observations ont confirmé le lien entre l'appareil ciliaire-centrosomal et la PKR chez des souris privées de cils primaires rénaux qui développent rapidement des reins polykystiques [110]. La plus fréquente PKR est la polykystose autosomique dominante. Elle est liée à la mutation des gènes codant pour les polycystines 1 et 2 [73, 129], deux protéines majeures du cil primaire qui appartiennent à une voie de signalisation mécanosensible du Ca^{2+} et qui inhibent la croissance des cellules tubulaires [143]. Les mutations géniques de ces protéines modifient la signalisation intracellulaire issue du cil primaire et induisent ainsi une croissance cellulaire continue, une perte de la polarité planaire et la formation de kystes tubulaires [48].

I. 2. 2. c. La réduction néphronique

La réduction néphronique est un phénomène fréquemment observé dans les pathologies rénales qui se traduit par l'apparition d'atteintes glomérulaires et tubulo-interstitielles entraînant la destruction progressive des néphrons fonctionnels [91]. Elle s'accompagne d'une augmentation du flux tubulaire mise en évidence grâce au développement des nombreux modèles de réduction néphronique (néphrectomie totale ou partielle) et d'une augmentation des forces de cisaillement (« shear stress ») exercées à la surface des cellules [69, 237]. L'augmentation des forces de cisaillement entraîne alors une modification phénotypique des cellules tubulaires avec une profonde réorganisation du cytosquelette d'actine, renforcé au niveau apical et latéral, et une redistribution des jonctions cellulaires associées [34, 41].

Le cytosquelette est donc un composant cellulaire majeur qui contribue au maintien d'un phénotype cellulaire normal, en particulier dans les cellules épithéliales qui doivent en permanence s'adapter aux contraintes extracellulaires, et dont la désorganisation peut conduire à l'apparition de certaines pathologies.

II. LA CALCINEURINE

Initialement identifiée comme un inhibiteur de l'activité calmoduline-dépendante de la phosphodiesterase des nucléotides cycliques [224], la calcineurine (CaN) a été isolée pour la première fois en 1978 par Klee et col. qui lui ont par la suite donné son nom en raison de sa localisation neuronale et de sa capacité à fixer le calcium [92, 93]. Ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard que la véritable fonction de la CaN a été identifiée par Liu et col. qui ont découvert qu'elle était la cible de la ciclosporine (CsA) et du tacrolimus (FK506), deux puissants immunosuppresseurs [112]. Cette découverte ainsi que les recherches réalisées par la suite pour identifier les voies de signalisation impliquées dans l'immunosuppression ont permis de révéler le rôle majeur que tient la CaN dans la transduction des signaux calcium (Ca^{2+})-dépendants et son implication dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux.

II. 1. CARACTERISTIQUES DE LA CALCINEURINE

II. 1. 1. STRUCTURE

La CaN (également appelée phosphatase 2B, PP2B) est une sérine/thréonine phosphatase, au même titre que les phosphatases 1, 2A et 2C, mais elle est la seule à être activée par la présence de Ca^{2+} et de calmoduline (CaM). La CaN est un hétéro-dimère très conservé chez tous les eucaryotes. Elle est constituée d'une sous-unité dite catalytique, la calcineurine A (CaN A) et d'une sous-unité dite régulatrice, la calcineurine B (CaN B) [171].

La CaN A (57 à 65 kDa) contient le domaine catalytique de l'enzyme. Il est suivi en C-terminal de trois domaines régulateurs : un domaine de liaison à la CaN B, un domaine de liaison à la CaM et un domaine auto-inhibiteur (Figure 2). La conformation de ce dernier bloque l'activité de l'enzyme en l'absence de Ca^{2+} et de CaM en formant une hélice α qui masque le site de fixation de l'enzyme à son substrat [90]. Il existe trois isoformes de cette sous-unité qui sont extrêmement conservées entre les espèces : les isoformes ubiquitaires α et β , et l'isoforme γ qui est exclusivement testiculaire [136].

La CaN B (19kDa) est constituée de 4 motifs « EF-hand » sur lesquels se fixent le Ca^{2+} avec une forte affinité [2]. Elle contient également un site de myristoylation du côté N-terminal qui semble faciliter l'interaction de la CaN avec les lipides membranaires mais dont le rôle exact est encore débattu [24, 49, 241]. Il existe deux isoformes de la CaN B chez les mammifères : l'isoforme B1 qui est ubiquitaire et qui est exprimée avec les isoformes α et β de la CaN A, et l'isoforme B2 retrouvée uniquement dans les testicules avec la CaN $A\gamma$.

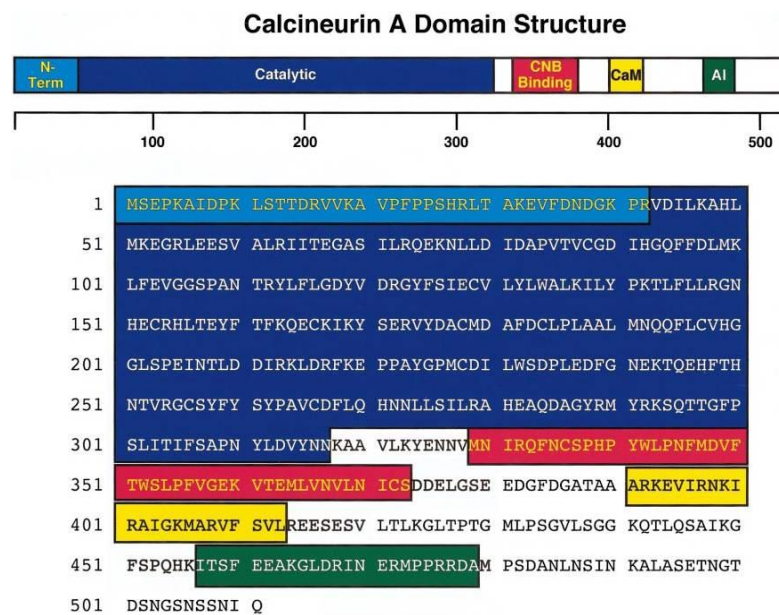


Figure 2 : Structure et séquence de la calcineurine A.

(d'après Rusnak et col., 2000) [171]

II. 1. 2. DISTRIBUTION

Chez les mammifères, la CaN est largement distribuée dans la plupart des tissus et des différents types cellulaires mais sa concentration est 10 à 20 fois plus importante dans le cerveau, en particulier dans l'hippocampe et le striatum [161, 171]. Les variations de distribution dans les autres tissus dépendent essentiellement des isoformes de chaque sous-unité.

Au niveau cellulaire, la CaN est majoritairement cytoplasmique, où elle peut être liée à la membrane plasmique ou, comme dans les neurones, aux éléments du cytosquelette [47, 232].

Elle a également été localisée dans le noyau des spermatides ou des lymphocytes T en association avec le facteur de transcription NFAT [133, 187].

II. 1. 3. REGULATION

La régulation de la CaN dépend de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et de la présence de la CaM. Lorsque la concentration de Ca^{2+} dans la cellule est inférieure à 10^{-7} M, les deux sous-unités sont liées mais l'enzyme est inactive. Au-delà de cette concentration, et en présence de CaM, le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ se fixe sur la sous-unité A et modifie de manière réversible sa structure en dissociant le domaine auto-inhibiteur du domaine catalytique et en dévoilant ainsi le site actif de l'enzyme [94] (Figure 3). Le rôle et le mécanisme d'activation de la CaN B sont encore mal compris mais il semble que sa présence soit indispensable à l'activation de la CaN A et que la fixation du Ca^{2+} sur la sous-unité B ait un rôle plus structural que régulateur de l'activité enzymatique [126, 198].

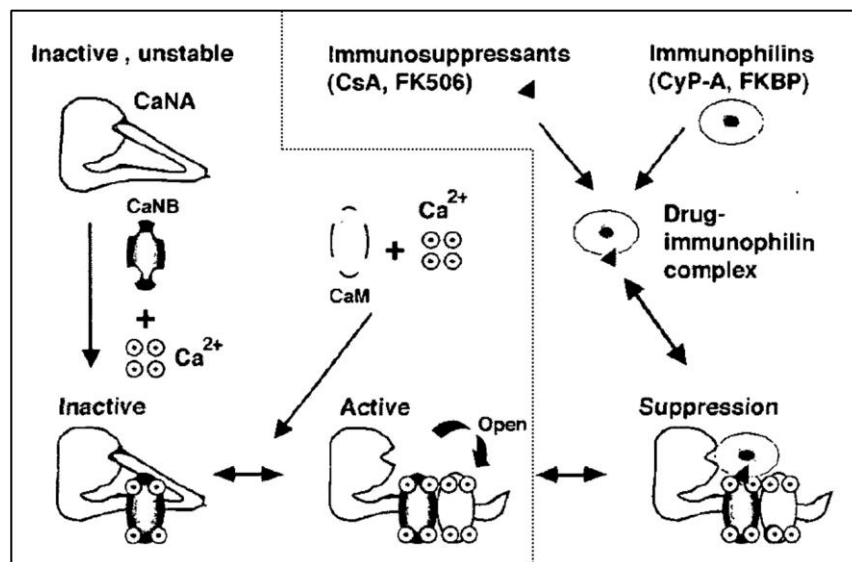


Figure 3 : Régulation de la calcineurine.

(d'après Shibasaki et col., 2002) [188]

La CsA et le tacrolimus sont deux inhibiteurs synthétiques et spécifiques de la CaN. Chacun forme un complexe avec une isomérase qui lui est propre, la cyclophiline A (CypA) pour la

CsA et la protéine FKBP-12 pour le tacrolimus. Le complexe drogue-immunophiline inhibe alors l'activation de la CaN en se fixant sur la sous-unité A et en bloquant ainsi le changement de conformation nécessaire à la libération du domaine catalytique. CsA et tacrolimus se fixent sur des sites de liaison qui sont très proches mais distincts de la CaN A et qui chevauchent le domaine de liaison des deux sous-unités (Figure 3) [112]. Les domaines de liaison de la CsA et du tacrolimus sont très conservés de la levure à l'homme mais aucun analogue endogène n'a été pour l'instant identifié. Il existe en revanche des inhibiteurs endogènes qui se fixent sur des domaines différents : AKAP79 dont le domaine de fixation chevauche celui du tacrolimus [24], CHP qui est un homologue de la CaN B [111], ou encore les protéines Cabin1/cain et CBP1/calciressine [98, 201].

II. 2. FONCTION IMMUNOLOGIQUE

La première fonction décrite de la CaN est son rôle dans le contrôle de l'activation des lymphocytes T. Cette fonction est la cible des traitements immunosuppresseurs [112]. La découverte de cette fonction a également permis d'identifier le facteur de transcription NFAT comme le principal substrat de la CaN [78].

La famille NFAT est constituée de 5 protéines très conservées : NFAT1/c2, NFAT2/c1, NFAT3/c4, NFAT4/c3 and NFAT5/TonEBP, qui, à l'exception de NFAT5, sont spécifiquement activées par la CaN, en réponse à l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire [165]. La stimulation de la prolifération lymphocytaire par la CaN est liée à l'activation de NFAT4, exclusivement exprimé dans les lymphocytes CD^{4+}/CD^{8+} [165].

En réponse à l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire dans les lymphocytes suite à l'activation du récepteur TCR/CD28, la CaN déphosphoryle NFAT dans le cytoplasme et induit ainsi sa translocation nucléaire. Une fois actif dans le noyau, NFAT s'associe à des facteurs co-activateurs comme AP-1 et se fixe sur le promoteur des gènes codant pour les cytokines de la réponse immunitaire. De nombreuses cytokines, comme IL-2, IL-3, IL-4, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ ou encore Fas ligand, possèdent un domaine de liaison à NFAT au niveau de leur promoteur. L'activation de la transcription de ces gènes par le NFAT entraîne l'expansion clonale des cellules T exprimant les marqueurs CD4 et CD8 et la stimulation des lymphocytes B et des monocytes [165] (Figure 4).

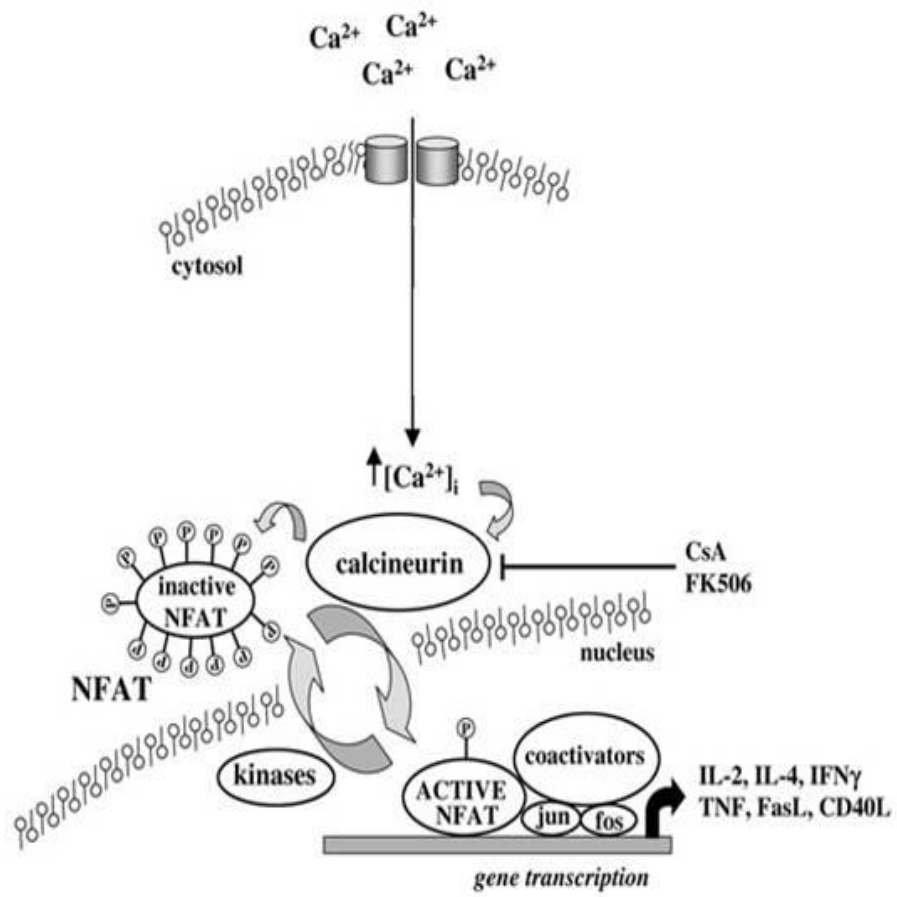


Figure 4 : Activation de la prolifération lymphocytaire par la calcineurine.

(d'après Cope AP., 2002) [26]

II. 3. FONCTIONS NON-IMMUNOLOGIQUES

D'une manière générale, la CaN est impliquée dans le développement de la plupart des organes dans lesquels elle est distribuée. Elle participe également à de nombreux processus cellulaires physiologiques et pathologiques (Figure 5).

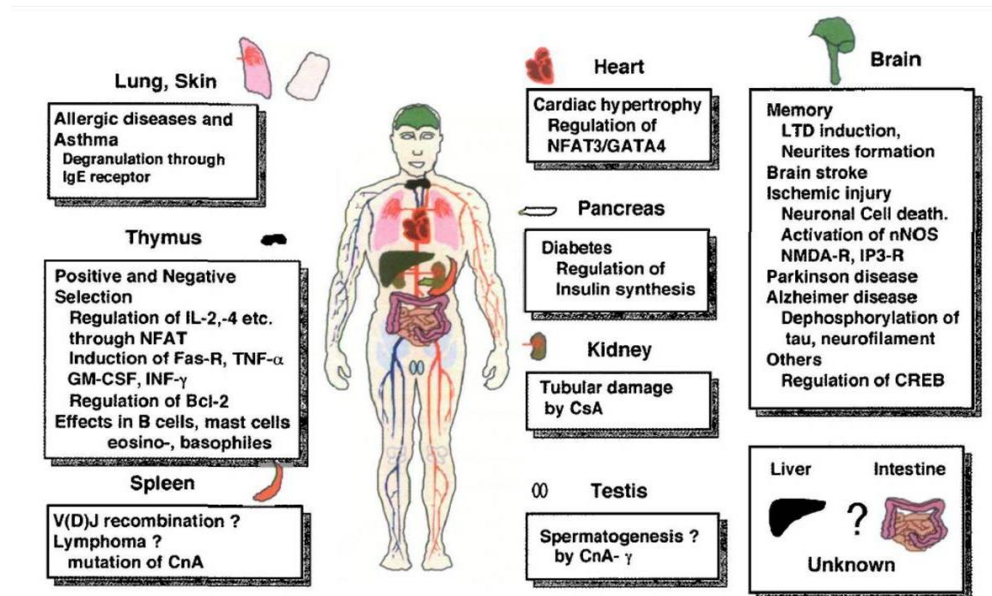


Figure 5 : Principales fonctions de la calcineurine.

(d'après Shibasaki et col., 2002) [188]

II. 3. 1. ROLE DE LA CALCINEURINE DANS LE CERVEAU

La CaN est très largement distribuée dans le cerveau, en particulier dans le striatum et l'hippocampe où elle est majoritairement liée aux éléments du cytosquelette ou de la membrane cellulaire [161].

Elle participe à la régulation de nombreuses protéines associées au cytosquelette neuronal comme la tubuline, les protéines tau et MAP-2 ou encore les neurofilaments, ce qui l'implique non seulement dans le maintien de l'architecture neuronale mais également dans les processus de formation et d'élongation neuronale.

La CaN est impliquée dans l'acquisition de la mémoire à long-terme. Son rôle a été confirmé chez des souris surexprimant la CaN qui présentent des déficits de la mémoire à long terme, ou qui, à l'inverse, montrent une amélioration des capacités d'apprentissage et de

mémoire lorsque la CaN est réversiblement inhibée [116, 118]. Cet effet passe entre autre par l'activation du facteur de transcription CREB et la modification de l'activité des récepteurs du NMDA [128, 232].

La CaN semble également jouer un rôle dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer. En effet, cette maladie est caractérisée par une hyperphosphorylation anormale du facteur tau qui pourrait être liée à un défaut d'activité de la CaN [105].

Enfin, les effets neuroprotecteurs de la CsA dans certains modèles d'ischémie cérébrale laissent penser que la CaN est également impliquée dans les dommages cérébraux causés par les accidents ischémiques [186, 189]. Cependant, le rôle propre de l'inhibition de la CaN n'est pas encore élucidé et les effets neuroprotecteurs de la CsA pourraient être liés à l'inhibition de la CypA [50].

II. 3. 2. ROLE DE LA CALCINEURINE DANS LES CELLULES MUSCULAIRES

Les tissus musculaires squelettique et cardiaque sont soumis à de fréquentes variations du Ca^{2+} intracellulaire qui régulent le fonctionnement des cellules. Il n'est donc pas surprenant que la CaN soit impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires dans ces tissus. Elle contrôle entre autre le développement des valves et du septum cardiaque [28, 164], ainsi que la différenciation et le remodelage des muscles squelettiques [51]. Plusieurs études ont également mis en évidence son rôle, principalement dépendant de l'activation de NFAT, dans les processus d'hypertrophie cardiaque et musculosquelettique [35, 132].

II. 3. 3. AUTRES FONCTIONS

Dans les autres organes, la CaN participe entre autre à la résorption osseuse, à l'activation des plaquettes, à la régulation de l'insulino-sécrétion ou encore à la motilité des spermatozoïdes [9, 153, 208, 210].

III. CALCINEURINE ET REINS

Alors que les fonctions cellulaires de la CaN ont été largement étudiées dans les systèmes immunitaire, nerveux et cardiovasculaire, peu de choses sont connues sur son rôle dans le rein. En effet, jusqu'à la récente mise en évidence de son implication dans le développement rénal, l'importance de la CaN au niveau rénal était principalement déduite des nombreux effets néphrotoxiques de la CsA et du tacrolimus.

Il est cependant admis que la CaN joue un rôle central dans la régulation des signaux dépendants du Ca^{2+} induits par des facteurs dont le rôle est particulièrement important dans le rein comme l'angiotensine II (Ang II), le TGF- β ou encore de l'IGF-I.

III. 1. ROLE DE LA CALCINEURINE DANS LE DEVELOPPEMENT RENAL

La découverte du rôle de la CaN dans le développement rénal est assez récente. Elle résulte de la mise au point d'animaux génétiquement invalidés pour les sous-unités A ou B de la CaN.

L'invalidation du gène de la CaN B au niveau du tractus urogénital est viable, mais l'abolition de toute activité CaN qui en découle conduit à un développement anormal des reins, des uretères et de la vessie, se traduisant par une diminution du péristaltisme pyelo-urétéral et une obstruction progressive des reins [21]. De même, l'administration de CsA à des lapins en gestation, aux moments spécifiques du début de la néphrogenèse et de la mise en place de la fonction rénale, conduit à une maturation postnatale anormale des reins et à une diminution du nombre de néphrons fonctionnels par rapport aux animaux contrôles [211].

Le rôle propre des deux isoformes α et β de la CaN A dans le développement rénal a également été étudié par Gooch et col. grâce à l'établissement de souris invalidées pour l'une ou l'autre des isoformes [55]. Les souris CaN $A\alpha^{-/-}$ présentent une maturation rénale postnatale anormale associée à une diminution de la prolifération cellulaire et à une augmentation de la mort cellulaire. A l'inverse, le développement rénal des souris CaN $A\beta^{-/-}$ est normal. D'une manière générale, les souris $\alpha^{-/-}$ sont de plus petite taille et elles présentent une diminution de leur masse rénale qui, au contraire de celle de la masse cardiaque, n'est pas proportionnelle à la diminution du poids corporel. Les atteintes rénales observées chez ces

souris touchent préférentiellement le cortex rénal, en particulier la zone néphrogénique, et la bande externe de la medulla externe. De plus, la sous-unité α semble également contrôler spécifiquement la prolifération des cellules mésangiales puisque les souris invalidées montrent une diminution de ces cellules accompagnée d'une augmentation de la mort cellulaire, alors que les cellules endothéliales et épithéliales persistent.

Le rôle de la CaN A α semble donc être prépondérant sur celui de la CaN A β avec une action sur la maturation rénale postnatale et non durant le développement embryonnaire. En effet, les atteintes sont modérées et sans conséquence fonctionnelle à la naissance mais elles progressent et deviennent plus prononcées durant les premières semaines de la vie, limitant ainsi la maturation terminale du tissu rénal. Les atteintes fonctionnelles apparaissent également tardivement. Elles se traduisent par une augmentation de la créatinine sérique, une diminution de la créatinine urinaire et par des dépôts excessifs de MEC.

Comme les deux isoformes contribuent à l'activité globale de la CaN chez les animaux sauvages, il semble que l'activité de la sous-unité α soit primordiale pour permettre le développement rénal. Il est possible que la sous-unité β intervienne préférentiellement dans un autre processus rénal encore non identifié. Une autre explication serait que la sous-unité α soit capable de compenser l'activité de la sous-unité β mais que l'inverse soit impossible.

III. 2. TOXICITE DES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE

La CsA et le tacrolimus exercent les mêmes effets fibrogéniques et induisent le même type de lésions histologiques rénales, même si celles-ci semblent être moins importantes avec le tacrolimus [14]. Nous prendrons, dans ce travail, la CsA comme exemple pour décrire cette néphrotoxicité.

III. 2. 1. NEPHROTOXICITE DE LA CICLOSPORINE

La CsA présente deux formes de néphrotoxicité, l'une fonctionnelle et l'autre structurale.

La néphrotoxicité fonctionnelle est une toxicité aiguë, réversible et dose dépendante, qui apparaît même aux doses thérapeutiques et ne présente aucun signe histologique. Les troubles fonctionnels sont liés à un déséquilibre hémodynamique conduisant à une vasoconstriction intrarénale intense [10]. Les conséquences de cette vasoconstriction sont une diminution du

débit sanguin rénal, une augmentation des résistances vasculaires et une diminution variable du débit de filtration glomérulaire.

La toxicité structurale est quant à elle liée à l'exposition à long terme du rein à la CsA. Elle se traduit par l'apparition d'atteintes irréversibles des tissus vasculaires, glomérulaires et tubulo-interstitiels qui conduisent progressivement à la destruction du parenchyme rénal. Le premier signe histologique de cette toxicité est la vacuolisation des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales des artérioles afférentes. A un stade plus avancé, les cellules se nécrosent et sont remplacées par des dépôts de matériel protéique conduisant à l'épaississement des parois vasculaires et au développement d'une hyalinose artériolaire. Au stade terminal, ces dépôts protéiques provoquent une sténose des artérioles et la formation de thrombus fibrineux qui induisent une hypoxie tissulaire. Ces lésions vasculaires sont associées à des atteintes glomérulaires et tubulo-interstitielles irréversibles : glomérulosclérose, atrophie tubulaire, et fibrose interstitielle principalement.

III. 2. 2. PHYSIOPATHOLOGIE

Les mécanismes exacts de la néphrotoxicité ne sont pas encore élucidés mais un grand nombre de facteurs, tous modifiés par l'administration de CsA, sont impliqués dans la genèse de ces lésions (Figure 6). L'apparition des atteintes rénales résulte en partie de la vasoconstriction intrarénale prolongée et de l'hypoxie cellulaire qu'elle induit, mais aussi de l'activation du système rénine/angiotensine/aldostérone (SRAA) et de l'augmentation de la synthèse intrarénale des facteurs de croissance [13].

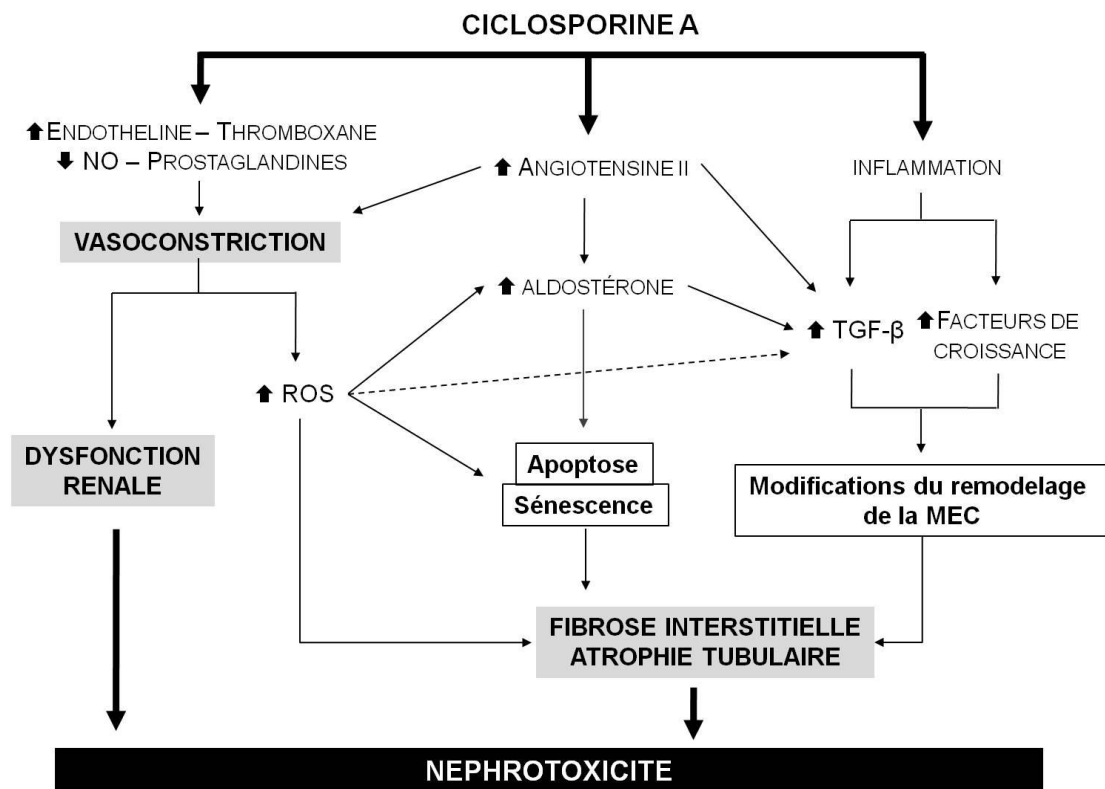


Figure 6 : Physiopathologie de la néphrotoxicité de la ciclosporine.

(d'après Bodadilla et col., 2007) [13]

III. 2. 2. a. Vasoconstriction

La vasoconstriction est essentiellement pré-glomérulaire. Elle est la conséquence d'une part de l'augmentation de facteurs vasoconstricteurs comme l'endothéline, le thromboxane et l'Ang II [96, 157, 158, 214], et d'autre part de la diminution de facteurs vasodilatateurs comme le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline [11, 12, 115, 157, 218]. Ce déséquilibre induit une diminution du débit plasmatique rénal et du coefficient d'ultrafiltration qui conduit à la diminution du débit de filtration glomérulaire [10-12].

En plus de son rôle dans la néphrotoxicité fonctionnelle, la vasoconstriction prolongée liée à l'exposition à long terme à la CsA, contribue également à l'apparition des atteintes histologiques de la néphrotoxicité structurale, par l'intermédiaire de l'hypoxie rénale qu'elle provoque et de la production de DROS qui aggrave les lésions cellulaires et favorise l'apoptose [11, 115].

III. 2. 2. b. Stimulation du système rénine-angiotensine-aldostérone

L'implication potentielle du SRAA a été révélée lors du développement des modèles murins de néphrotoxicité chronique de la CsA qui nécessitent, en plus d'une forte dose de CsA, un régime hyposodé pour que se développent des lésions comparables à celles présentes dans les biopsies des patients [37, 77].

La CsA favorise la synthèse de l'Ang II en stimulant l'expression de la rénine à la fois au niveau systémique et au niveau rénal [185]. L'Ang II joue alors un rôle majeur dans la néphrotoxicité. En effet, l'inhibition de l'enzyme de conversion ou du récepteur AT-1 prévient la progression des atteintes rénales à la fois fonctionnelles et morphologiques induites par la CsA [99]. De plus, l'infusion d'Ang II chez le rat induit des modifications histologiques rénales similaires à celles associées à la CsA [81].

L'Ang II est un facteur de croissance rénale et un puissant peptide vasoconstricteur qui participe au déséquilibre hémodynamique. Elle contribue également à l'apparition des atteintes structurales, en particulier la fibrose, en activant les cellules mésangiales, les cellules tubulaires et les fibroblastes interstitiels et en favorisant ainsi les processus inflammatoires et la production excessive des protéines de la MEC [125]. Enfin, elle conduit à la formation de l'aldostérone dont le rôle, ainsi que celui des récepteurs aux minéralocorticoïdes, est également prépondérant dans le développement de la néphrotoxicité structurale [13]. Fera et col. ont en effet montré que l'inhibition du récepteur de l'aldostérone chez des rats recevant de la CsA et présentant des signes de néphrotoxicité chronique, réduisait les lésions de FI-AT, et prévenait entièrement la diminution de la clairance de la créatinine [46]. Ces résultats suggèrent donc que l'aldostérone a un rôle de médiateur à la fois dans les atteintes fonctionnelles et dans les atteintes structurales. Il a par la suite été démontré que ces effets étaient liés à la prévention de la diminution de la filtration glomérulaire et au rétablissement d'un débit sanguin rénal normal [122].

III. 2. 2. c. Stimulation des facteurs de croissance

De nombreuses études expérimentales et cliniques ont mis en évidence l'augmentation du TGF- β induite par la CsA et l'implication de cette augmentation dans les effets néphrotoxiques de celle-ci [46, 88, 119, 190, 196, 219]. Au niveau rénal, le TGF- β est sécrété par les macrophages interstitiels, les fibroblastes et les cellules tubulaires épithéliales. Il joue un rôle majeur dans l'initiation de la fibrose rénale en stimulant directement la production des

protéines de la MEC et en diminuant la production des collagénases [76]. Cependant, aucune modification de la fibrose tubulo-interstitielle n'a été observée après l'administration d'anticorps anti-TGF- β dans plusieurs modèles expérimentaux présentant des lésions rénales avancées [76]. En revanche la neutralisation du TGF- β induit une amélioration de la clairance de la créatinine et réduit la hyalinose artériolaire dans ces mêmes modèles [76]. Des concentrations élevées de TGF- β sont également retrouvées dans les biopsies rénales de patients transplantés et traités par la CsA [19, 169].

Le VEGF est un autre facteur de croissance dont la synthèse est modulée par la CaN et dont l'expression est directement modifiée par son inhibition. L'augmentation de l'expression de VEGF par la CsA participe à la néphrotoxicité en favorisant le développement des lésions endothéliales et les processus inflammatoires. De plus, son expression est indirectement augmentée par le blocage du NO et par la stimulation de l'Ang II [220].

III. 2. 3. PRINCIPAUX EFFETS CELLULAIRES

III. 2. 3. a. Apoptose et Sénescence cellulaire

D'importants phénomènes d'apoptose ont été identifiés chez les patients transplantés recevant de la CsA depuis plusieurs années. Ces effets ont été reproduit à la fois *in vitro* dans plusieurs modèles cellulaires et *in vivo* chez le rat [61, 101, 151, 213]. L'apoptose induite par la CsA est préférentiellement liée à la voie intrinsèque. Elle est la conséquence de différentes modifications : l'augmentation de la synthèse des DROS, la diminution de l'expression de Bcl-2, l'augmentation et la translocation de Bax vers les mitochondries et l'activation du facteur de transcription p53. La CsA induit également une augmentation de l'expression de Fas et des caspases 2, 9 et 3 des cellules tubulaires [184].

La sénescence cellulaire est l'arrêt permanent de la croissance d'une cellule en phase G1 du cycle cellulaire. Elle est la conséquence d'un raccourcissement, à chaque cycle cellulaire, des télomères. Après un certain nombre de division, la cellule cesse de se diviser mais reste vivante et métaboliquement active. La CsA favorise ce processus dans les cellules mésangiales et les cellules tubulaires en augmentant la production de peroxyde d'oxygène cytotoxique qui dégrade l'ADN à la fois par une action directe et par un raccourcissement des

télomères. Elle favorise également la synthèse de facteurs d'activation de la sénescence cellulaire comme p53 et p16 [80].

III. 2. 3. b. Remodelage de la matrice extracellulaire

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle néfaste de la CsA sur le remodelage de la MEC ainsi que son implication dans l'initiation et la progression de la fibrose rénale observée à long terme. En plus des effets pro-fibrotiques de l'Ang II et de TGF- β , la CsA favorise la synthèse des protéines de la MEC comme les collagènes I et IV et la fibronectine [38, 119]. Elle ralentit également leur dégradation en augmentant l'expression et/ou l'activité des inhibiteurs des métalloprotéases TIMP-1 et TIMP-2 [36, 39, 119] et de l'inhibiteur du plasminogène PAI-1 [36, 76, 190].

III. 3. MODIFICATIONS DU CYTOSQUELETTE DES CELLULES RENALES PAR LES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE

Il existe peu d'études concernant les effets de la CsA sur l'organisation du cytosquelette des cellules rénales. La plupart des travaux portent en fait sur les protéines associées au cytosquelette plutôt que sur le cytosquelette lui-même. Les études montrent un certain nombre de modifications induites par la CsA comme une diminution de l'expression de la protéine d'adhésion cellulaire E-cadhérine [119, 195], une délocalisation de la protéine de jonction ZO-1 [195] ou encore une augmentation anormale de la présence de villine dans les surnageants cellulaires [240]. Une seule équipe a mis en évidence une réorganisation du cytosquelette d'actine induite par la CsA dans les cellules tubulaires proximales mais sans pour autant en expliquer les mécanismes [195]. Faul et col. ont récemment montré une modification de l'organisation de l'actine induite par la CsA dans les podocytes. En recherchant les mécanismes impliqués, ils ont identifié une nouvelle voie de signalisation de la CaN qui, par l'activation de la synaptopodine, contrôle l'organisation du cytosquelette d'actine dans ces cellules [45].

IV. HYPOTHESE DE TRAVAIL

Après avoir réalisé une synthèse de la littérature concernant les effets de l'inhibition de l'activité de la CaN sur le cytosquelette, principalement dans les neurones, les cardiomyocytes et les podocytes, nous avons émis l'hypothèse que les inhibiteurs de la CaN, en dehors de tout effet toxique, pouvaient également induire une modification de l'organisation du cytosquelette des cellules tubulaires proximales, avec pour conséquence un fonctionnement anormal de ces cellules dans leur environnement et une altération de leur capacité d'adaptation pouvant contribuer à l'établissement de situations pathologiques comme la NCA.

Le but de ce travail était donc d'étudier l'organisation du cytosquelette, en particulier les microfilaments d'actine, dans des cellules tubulaires proximales exposées à la CsA ou au tacrolimus, de rechercher les voies de signalisation impliquées dans d'éventuelles réorganisations et d'identifier les conséquences de ces modifications sur l'un des systèmes impliqués dans le remodelage de la MEC, le système fibrinolytique.

CHAPITRE II : TRAVAUX PERSONNELS

I. REGULATION DE L'ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE PAR LA CALCINEURINE

Depuis la découverte du rôle de la CaN dans la réponse immunitaire, de nombreuses études, en particulier dans le cerveau, le cœur et plus récemment dans les podocytes ont permis de révéler son rôle dans un grand nombre de phénomènes non immunologiques physiologiques ou pathologiques, dont certains sont assurés par la réorganisation du cytosquelette. La CaN est ainsi impliquée dans le contrôle du développement et de l'élongation neuronale, dans l'hypertrophie des cellules musculaires ou encore dans le maintien de l'intégrité de la structure des podocytes.

La description de ces propriétés non immunologiques a également permis d'identifier de nouvelles cibles de la CaN parmi lesquelles se trouvent des protéines de régulation du cytosquelette comme la cofiline, la protéine WASP-1 ou encore la synaptopodine. La découverte de ces nouveaux substrats ouvre ainsi de nouvelles perspectives d'étude des effets de la CaN, parallèlement à ses effets dépendants de l'activation de NFAT plus classiquement décrits. La régulation de ces protéines liées à l'actine permet ainsi à la CaN de contrôler directement l'organisation du cytosquelette qui joue un rôle essentiel dans le maintien du phénotype des cellules, en particulier dans les cellules épithéliales où il contrôle l'organisation hautement spécialisée de ce type cellulaire.

En préambule de l'étude concernant les effets de la CaN sur le cytosquelette des cellules tubulaires rénales, nous avons recensé l'ensemble des données publiées concernant le contrôle du cytosquelette par la CaN et par ses inhibiteurs, ainsi que les différentes voies intracellulaires impliquées dans ces effets.

Cette revue fait l'objet d'une publication dans le Journal of Cellular and Molecular Medicine.

**Calcineurin regulation of cytoskeleton organization: a new paradigm to
analyze the effects of cyclosporine on the kidney**

Virginie Descazeaud¹, Pierre Marquet^{1,3} and Marie Essig^{1,2,3}

¹Inserm, UMR-S850, Limoges, France 87042; ² Department of Nephrology, Dialysis and Transplantations, CHU Limoges, France 87042; ³Limoges University, France 87000

II. MODIFICATIONS DE L'ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE ET DE L'EXPRESSION DU tPA INDUITES PAR LA CICLOSPORINE DANS LES CELLULES TUBULAIRES RENALES

Contexte et Objectifs

De nombreuses études ont récemment mis en évidence les propriétés non immunologiques de la CsA dans différents types cellulaires. Dans les podocytes, Faul et col. ont montré que la CsA induisait une réorganisation du cytosquelette d'actine en prévenant la déphosphorylation de la synaptopodine par la CaN, ce qui pourrait expliquer ses propriétés anti-protéinuriques utilisées dans le traitement des syndrome néphrotiques [45].

Le but de notre étude était d'identifier si la CsA pouvait modifier l'organisation du cytosquelette des cellules tubulaires proximales, et si ces éventuelles modifications pouvaient être impliquées dans les phénomènes de fibrose interstitielle couramment observés dans les greffons rénaux exposés à la CsA.

Protocol expérimental

Cette étude a été menée sur des cellules tubulaires proximales de porc de la lignée LLC-PK1. Elle a été réalisée en deux temps : l'analyse des effets de la CsA sur le cytosquelette d'actine et sur les protéases impliquées dans la dégradation de la MEC dans un premier temps, et l'identification des voies de signalisation intracellulaire impliquées dans les effets observés dans un second temps.

Dans la première partie de l'étude, les cellules confluentes ont été exposées à la CsA (5 μ M) pendant 24h. Les microfilaments d'actine ont été marqués par la phalloïdine fluorescente et analysés en microscopie confocale. Les résultats ont été confrontés à l'analyse *in vivo* de l'organisation du cytosquelette d'actine des tubules proximaux dans des biopsies rénales de patients exposés à la CsA comparés à des biopsies témoins.

L'expression relative des protéases (tPA, uPA, PAI-1 et MMP) a été mesurée par PCR en temps réel selon la méthode des delta-delta-Ct. L'analyse des protéines et de leur activité

protéolytique a été réalisée dans les surnageants cellulaires par western-blot et zymographie respectivement.

La deuxième partie du travail portait sur l'étude des voies de signalisation. La voie du NFAT a été étudiée en remplaçant la CsA par un inhibiteur spécifique du NFAT : le peptide VIVIT (1 μ M). L'étude de la voie de signalisation dépendante de la cofiline a été réalisée en traitant les cellules avec la CsA et le peptide S3-R (100 μ g/ml), développé pour inhiber la phosphorylation de la cofiline. L'analyse du cytosquelette et des protéases a été réalisée comme décrit dans la première partie de l'étude.

L'ensemble des techniques utilisées est détaillé en Annexes 1 et 2.

Résultats

Les cellules LLC-PK1 exposées à la CsA montrent un réarrangement du cytosquelette d'actine se traduisant par un renforcement du réseau latéral et par l'apparition de nombreuses fibres de stress cytosoliques au niveau basal. *In vivo*, les biopsies de patients exposés à la CsA montrent également une redistribution du réseau d'actine du tube proximal avec un renforcement de la bordure en brosse. Ces modifications s'accompagnent d'une diminution de l'expression et de l'activité du tPA, indépendamment de l'effet inhibiteur du PAI-1. Les effets de la CsA n'ont pas été reproduits avec le traitement par le peptide VIVIT mais ils ont été neutralisés par l'exposition au peptide S3-R.

Conclusion

Cette étude montre que la CsA, en dehors de tout effet toxique, modifie le cytosquelette d'actine des cellules tubulaires proximales rénales, indépendamment de la voie du NFAT mais en lien avec une modification de l'état de phosphorylation de la cofiline. La réorganisation de l'actine et l'inhibition spécifique du système fibrinolytique qui l'accompagne pourraient ainsi jouer un rôle dans les modifications phénotypiques des cellules épithéliales observées au cours de la NCA et dans l'apparition de la fibrose interstitielle dans les greffons rénaux.

Ce travail fait l'objet d'une publication en cours de soumission au American Journal of Transplantation.

Independently of NFAT inhibition, cyclosporine modifies the actin cytoskeleton and the fibrinolytic system in proximal tubular cells

Descazeaud V¹, Marquet P^{1,3}, Essig M^{1,2,3}

¹Inserm, UMR-S850, Limoges, France 87042; ²Department of Nephrology, Dialysis and Transplantations, CHU Limoges, France 87042; ³Limoges University, France 87000

III. EFFETS DU LE TACROLIMUS SUR LES CELLULES TUBULAIRES PROXIMALES

Objectifs

Comme la CsA, le tacrolimus est un inhibiteur de la CaN mais sa structure est très différente et l'inhibition de la CaN passe par sa liaison à la protéine FKBP12 et non à la CypA.

Dans cette troisième partie du travail, nous avons regardé si l'exposition au tacrolimus reproduisait les effets de la CsA sur l'organisation du cytosquelette et sur le système fibrinolytique des cellules tubulaires proximales.

Ce travail a pour but d'appuyer l'hypothèse selon laquelle les effets observés avec la CsA sont liés à l'activité de la CaN ou, dans le cas contraire, de mettre en avant un éventuel effet dépendant de l'activité des immunophilines.

Protocol expérimental

Dans cette partie, nous avons reproduit, avec le tacrolimus, l'étude du cytosquelette ainsi que celle du système fibrinolytique décrites avec la CsA dans le chapitre précédent.

Résultats

Dans un premier temps, le dosage des concentrations intracellulaires de tacrolimus a permis de choisir la dose de 0.05 μM pour traiter les cellules afin d'obtenir après 24h d'exposition une concentration similaire à celle observée chez les patients traités avec le tacrolimus au moment du pic de concentration sanguine (0.01 $\mu\text{M} \pm 4\%$) (Tableau 3).

Tableau 3 : Dosage des concentrations intracellulaires de tacrolimus dans les cellules LLC-PK1 par TFC-MS/MS.

Concentration dans le milieu de culture (μM)	Concentration intracellulaire (μM)
0	n.d.
0.05	$0.01 \pm 4\%$
5	$0.41 \pm 15\%$

(n.d. : non déterminé)

Au cours de ce travail, nous avons montré que la dose de $0.05 \mu\text{M}$ de tacrolimus, à l'image de la dose de $5 \mu\text{M}$ de CsA, diminuait l'expression et l'activité du tPA dans les cellules tubulaires proximales (Figure 15A). En revanche, les effets du tacrolimus sur les MMP diffèrent de ceux observés avec la CsA puisque l'exposition au tacrolimus favorise l'expression et l'activité de ces protéases (Figure 15B). Enfin, à la différence de ce que nous avons observé avec la CsA, le tacrolimus ne modifie pas l'organisation du cytosquelette d'actine (Figure 16).

Il existe cependant avec le tacrolimus une toxicité cellulaire significative dès la concentration de $0,05 \mu\text{M}$ qui pourrait interférer avec les résultats (Figure 17).

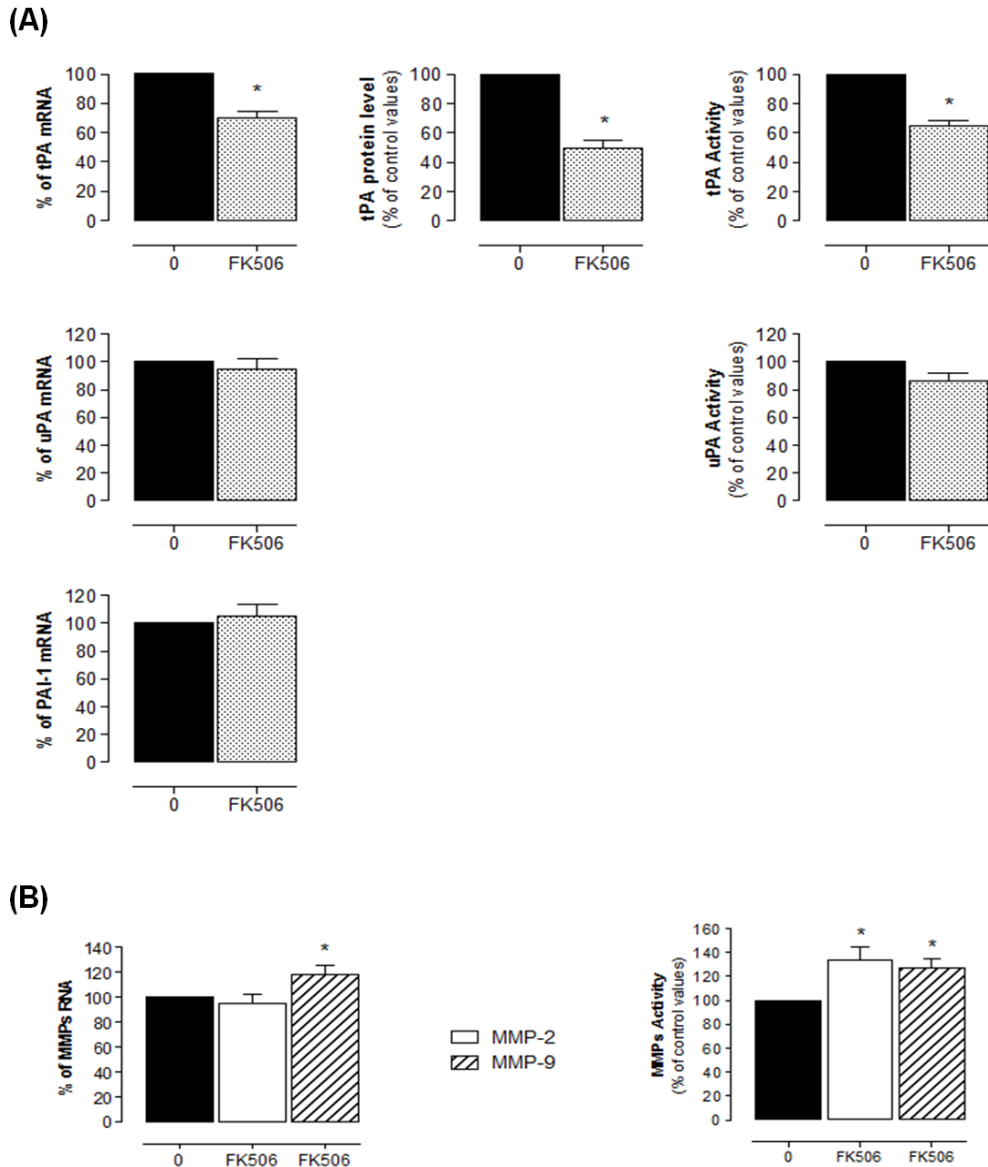


Figure 15 : Effets du tacrolimus sur les activateurs du plasminogène (A) et les métalloprotéases (B).

Les cellules LLC-PK1 confluentes ont été exposées à 0.05 μ M de tacrolimus pendant 24h. L'expression relative des gènes cibles (tPA, uPA, PAI-1, MMP-2 et MMP-9) a été mesurée avec la GAPDH comme gène de référence par PCR quantitative en temps réel après extraction des ARN. L'expression et l'activité protéolytique des protéines ont été mesurées respectivement par western blot et par zymographie dans les surnageants cellulaires concentrés. Les résultats sont issus de trois expériences indépendantes et sont exprimés en pourcentages par rapport aux valeurs témoins (test t unilatéral, * $p < 0.01$).

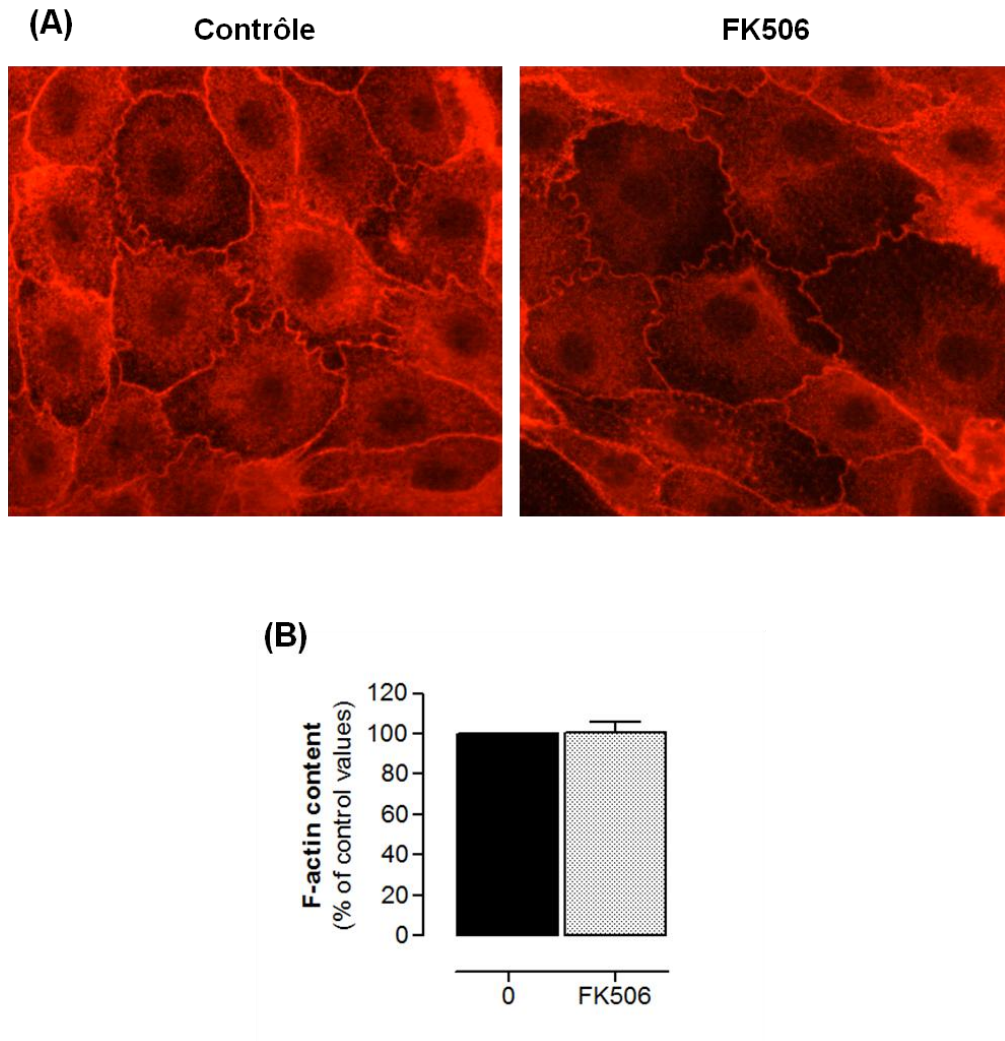


Figure 16 : Effets du tacrolimus sur l'organisation du cytosquelette d'actine.

Les cellules LLC-PK1 confluentes ont été exposées à 0.05 μ M de tacrolimus pendant 24h. (A) Les filaments d'actine ont été marqués par la phalloïdine-TRITC et analysés en microscopie confocale (x100). Les images sont représentatives de trois expériences indépendantes. (B) Le contenu cellulaire en F-actine a été mesuré par spectrofluorométrie (excitation 540 nm ; émission 590 nm) après extraction de la phalloïdine-TRITC couplée à l'actine par du méthanol. Les résultats sont issus de trois expériences indépendantes et sont exprimés en pourcentages par rapport aux valeurs témoins.

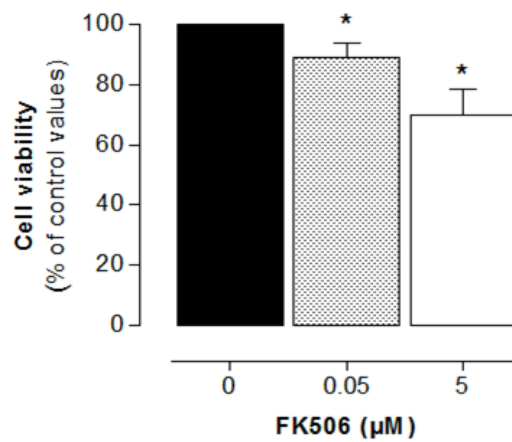


Figure 17 : Cytotoxicité du tacrolimus dans les cellules LLC-PK1.

Le test de viabilité cellulaire (test MTT) a été réalisé dans les cellules LLC-PK1 exposées au tacrolimus pendant 24h (0.05 µM et 5 µM). Les résultats sont issus de trois expériences indépendantes et sont exprimés en pourcentages par rapport aux valeurs témoins (test-t unilatéral, *p<0.01).

Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis de mettre en évidence les effets divergents du tacrolimus et de la CsA sur l'organisation du cytosquelette des cellules tubulaires proximales.

Plusieurs explications peuvent être proposées à ce stade. La première est que la toxicité observée dès la dose la plus faible de tacrolimus ne permette pas d'atteindre les concentrations suffisantes pour induire une modification visible du réseau d'actine alors même que les voies de signalisation intracellulaire ont déjà été modifiées. La seconde est que les effets de la CsA et du tacrolimus sur le cytosquelette et le système fibrinolytique ne résultent pas exclusivement de l'inhibition de l'activité phosphatase de la CaN mais de leur interaction dans le complexe tri-moléculaire avec la CaN et leurs immunophilines respectives, la CypA pour la CsA et la protéine FKBP12 pour le tacrolimus. Il a ainsi été montré que la CsA et le tacrolimus n'avaient pas le même effet sur la maturation intracellulaire de la hennin du fait des rôles différents de la CypA et de la protéine FKBP12 [156].

Ces premiers résultats justifient la poursuite de l'analyse fine du rôle respectif de la CaN et des immunophilines dans les effets observés dans les cellules tubulaires proximales. Ils devront aussi être étendus à l'analyse du cytosquelette des podocytes où l'utilisation de la CsA est large pour rétablir une organisation satisfaisante des pédicelles podocytaires, utilisation qui ne s'étendrait pas au tacrolimus si les résultats que nous avons obtenus sur le réseau d'actine des cellules tubulaires proximales se confirment.

CHAPITRE III : CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION

Au cours de ce travail, nous avons montré que la CsA modifie le phénotype des cellules tubulaires rénales en perturbant l'organisation du cytosquelette, et que ces modifications peuvent participer à l'apparition des lésions fibrosantes observées dans les greffons rénaux après la transplantation.

L'implication de la CaN dans le contrôle de l'organisation du cytosquelette est bien décrite dans le cerveau et dans le cœur, mais peu de choses ont été démontrées au niveau rénal. A ce jour, seul le travail de Faul et col. a mis en évidence dans les podocytes une régulation de l'actine par la CaN grâce à son effet direct sur la synaptopodine [45]. Au niveau tubulaire, nos résultats sont en accord avec la seule étude décrivant une réorganisation de l'actine induite par la CsA dans des cellules tubulaires proximales [38]. Cependant, notre étude est la première à identifier en la cofiline une voie de signalisation potentiellement impliquée dans cette réorganisation. La cofiline est une protéine de liaison à l'actine qui favorise la dépolymérisation des microfilaments et dont l'activation est induite par la dephosphorylation de la phosphatase slingshot (SSh) par la CaN. L'activation de la cofiline par la CaN a été démontrée dans les neurones et dans les plaquettes mais il n'existait jusqu'à présent aucune évidence de cette activation dans les cellules rénales. Nos résultats nécessitent cependant d'être complétés par l'étude de l'ensemble de la voie de signalisation intracellulaire liant la CaN et la cofiline dans les cellules tubulaires proximales. L'implication de la SSh, démontrée dans les neurones et les plaquettes, devra être confirmée dans les cellules rénales par l'utilisation en particulier de siRNA spécifique de cette protéine.

Le cytosquelette est un composant cellulaire essentiel des cellules tubulaires proximales puisqu'il participe au maintien de l'organisation cellulaire spécifique (domaine basal/domaine apical, bordure en brosse) et permet l'adaptation aux variations du flux tubulaire qui les recouvre. Essig et col. ont mis en évidence une réorganisation du cytosquelette d'actine des cellules tubulaires proximales lorsque celles-ci sont soumises à une augmentation du flux tubulaire [41]. Il est donc vraisemblable que les cellules tubulaires dont le cytosquelette est renforcé latéralement par l'exposition à la CsA perdent leurs propriétés d'élasticité et de déformabilité nécessaires à leur adaptation aux contraintes extracellulaires. Ces modifications pourraient ainsi entraîner une réponse inadaptée des cellules tubulaires à l'augmentation du flux tubulaire et à la situation de rein fonctionnel unique inhérentes à la transplantation rénale. L'utilisation de modèles de réduction néphronique, à la fois *in vitro* par exposition des cellules LLC-PK1 à un flux laminaire d'intensité croissante et *in vivo* avec le développement

de modèles animaux d'uni-néphrectomie ou de néphrectomie subtotale, permettrait de confirmer cette hypothèse en étudiant les effets des inhibiteurs de la CaN sur la réorganisation du cytosquelette induite par l'augmentation du flux tubulaire.

Enfin, comme les trois types de filaments qui composent le cytosquelette sont étroitement liés et s'organisent de manière interdépendante, il paraît également intéressant d'étudier les effets des inhibiteurs de la CaN sur l'organisation des filaments intermédiaires et des microtubules dans les cellules tubulaires rénales. Des travaux dans ce sens sont actuellement en cours dans notre laboratoire. Les premiers résultats montrent un réarrangement des filaments de cytokératine induit par la CsA mais l'étude approfondie des mécanismes impliqués dans cet effet doit encore être réalisée.

Au cours de ce travail, nous avons également mis en évidence l'inhibition du système fibrinolytique par les inhibiteurs de la CaN. A l'image de ce qui a été montré par Essig et col. dans les cellules tubulaires soumises à une augmentation des forces de cisaillement, la diminution du tPA est indépendante d'un effet sur le PAI-1 et semble être liée à la réorganisation du cytosquelette induite ici par la CsA. Cette idée est renforcée par la neutralisation des effets de la CsA sur le tPA lors de la perturbation du cycle de re-phosphorylation de la cofiline. Les mécanismes cellulaires exacts reliant l'organisation du cytosquelette à l'expression des gènes ne sont pas élucidés mais nous avons montré qu'ils n'étaient pas liés à l'activation du facteur de transcription NFAT dans les cellules tubulaires proximales. En revanche, plusieurs éléments laissent penser qu'ils pourraient être associés à la co-activation des facteurs de transcription MRTF et SRF comme cela a été démontré dans les cellules cardiaques et vasculaires [154]. En effet, cette voie de signalisation est activée par la polymérisation de l'actine dans les cellules LLC-PK1 et elle est impliquée dans les phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse [44]. Par ailleurs, l'expression de l'uPA ainsi que celle du PAI-1 sont régulées par le complexe MRTF-SRF dans les fibroblastes pulmonaires grâce à la présence du domaine de fixation du SRF dans le promoteur de ces gènes, et de nombreux autres gènes, également régulés par le complexe MRTF-SRF sont impliqués dans le remodelage de la MEC [239]. Il serait donc intéressant d'étudier l'état d'activation de cette voie dans des cellules exposées à la CsA et son rôle dans la régulation de l'expression du tPA.

Le tPA est un activateur du plasminogène qui participe au remodelage de la MEC en favorisant la synthèse de la plasmine et qui a été récemment impliqué dans l'activation des myofibroblastes rénaux par le biais de son récepteurs LRP1 [71]. Les conséquences possibles

de la diminution de l'activité protéolytique du tPA sont donc complexes avec d'une part le développement de la fibrose interstitielle du fait d'une dégradation insuffisante de la MEC et d'autre part une moindre activation des myofibroblastes interstitiels. Cependant, le tPA a aussi été impliqué dans l'activation par clivage du PDGF-CC, permettant ainsi l'action trophique de ce facteur de croissance sur les cellules [166]. Le PDGF-CC est exprimé dans le rein et son récepteur est présent sur les cellules tubulaires proximales. Il est possible d'envisager que la diminution du tPA, en réduisant l'activation locale du PDGF-CC, diminuerait l'action de ce facteur de croissance et favoriserait ainsi l'atrophie tubulaire fréquemment observée au cours de la dysfonction chronique du greffon.

Il convient aussi de poursuivre l'étude du rôle spécifique des immunophilines, et en particuliers de la CypA, dans les effets sur le cytosquelette et le système fibrinolytique observés en présence de CsA. En effet, les premiers résultats que nous avons obtenus avec le tacrolimus sont divergents de ceux obtenus avec la CsA sur l'organisation du cytosquelette. Comme précédemment discuté il est possible que la dose de tacrolimus ait été insuffisante pour exercer un effet sur le cytosquelette, mais plusieurs études suggèrent que la CypA peut en elle-même modifier l'organisation du cytosquelette. La CypA possède une activité peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPI) qui a déjà été impliquée dans le contrôle de l'organisation du cytosquelette d'actine de cellules issues d'ostéosarcomes [17] et de cellules rénales [156]. De plus, certains effets néphrotoxiques de la CsA ont récemment été rattachés à l'inhibition de l'activité PPI de la CypA. Il a ainsi été montré que la surexpression de la CypA chez les souris génétiquement modifiées neutralise les effets néphrotoxiques de la CsA et que la production de DROS ou l'acidose tubulaire distale induites par la CsA étaient liées à l'inhibition de l'activité PPI de la CypA [67, 68, 229]. Même s'il n'existe à ce jour aucune donnée publiée, il est donc possible que la CypA soit également impliquée dans les effets délétères de la CsA sur le cytosquelette des cellules tubulaires rénales. Cette hypothèse pourra être étudiée dans notre modèle d'étude par l'utilisation d'agents pharmacologiques inhibant spécifiquement la CypA ou par invalidation génique à l'aide de siRNA.

En conclusion, ce travail permet de formuler un certain nombre d'hypothèses sur les mécanismes physiopathologiques qui participent à la détérioration progressive de la structure et de la fonction des cellules tubulaires proximales après la transplantation rénale et sur la contribution des inhibiteurs de la CaN dans ce processus. La validation de ces hypothèses par des travaux futurs permettra d'élaborer de nouvelles stratégies immunosuppressives dénuées

d'effets délétères sur les cellules rénales et ainsi capables de prévenir la dysfonction chronique du greffon et l'échec de la transplantation rénale à long terme.

CHAPITRE IV : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abbate M, Bonventre JV, Brown D. The microtubule network of renal epithelial cells is disrupted by ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1994; **267**: F971-978.
2. Aitken A, Klee CB, Cohen P. The structure of the B subunit of calcineurin. *Eur J Biochem* 1984; **139**: 663-671.
3. Ansley SJ, Badano JL, Blacque OE, *et al.* Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 2003; **425**: 628-633.
4. Antos CL, McKinsey TA, Frey N, *et al.* Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 907-912.
5. Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, *et al.* Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 1999; **285**: 2129-2133.
6. Asanuma K, Kim K, Oh J, *et al.* Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1188-1198.
7. Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, *et al.* Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 485-491.
8. Ashworth SL, Southgate EL, Sandoval RM, *et al.* ADF/cofilin mediates actin cytoskeletal alterations in LLC-PK cells during ATP depletion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; **284**: F852-862.
9. Awumey EM, Moonga BS, Sodam BR, *et al.* Molecular and functional evidence for calcineurin-A alpha and beta isoforms in the osteoclast: novel insights into cyclosporin A action on bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **254**: 248-252.
10. Barros EJ, Boim MA, Ajzen H, *et al.* Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 1987; **32**: 19-25.
11. Bobadilla NA, Tapia E, Franco M, *et al.* Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int* 1994; **46**: 773-779.
12. Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, *et al.* Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am J Physiol* 1998; **274**: F791-798.
13. Bobadilla NA, Gamba G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **293**: F2-9.
14. Bosmans JL, Ysebaert DK, Verpooten GA. Chronic allograft nephropathy: what have we learned from protocol biopsies? *Transplantation* 2008; **85**: S38-41.
15. Brown D, Stow JL. Protein trafficking and polarity in kidney epithelium: from cell biology to physiology. *Physiol Rev* 1996; **76**: 245-297.

16. Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, *et al.* Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 4586-4591.
17. Calhoun CC, Lu YC, Song J, *et al.* Knockdown endogenous CypA with siRNA in U2OS cells results in disruption of F-actin structure and alters tumor phenotype. *Mol Cell Biochem* 2009; **320**: 35-43.
18. Carlyle WC, Toher CA, Vandervelde JR, *et al.* Changes in beta-actin mRNA expression in remodeling canine myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1996; **28**: 53-63.
19. Cattaneo D, Perico N, Gaspari F, *et al.* Nephrotoxic aspects of cyclosporine. *Transplant Proc* 2004; **36**: 234S-239S.
20. Ceglia I, Kim Y, Nairn AC, *et al.* Signaling pathways controlling the phosphorylation state of WAVE1, a regulator of actin polymerization. *J Neurochem* 2010; **114**: 182-190.
21. Chang CP, McDill BW, Neilson JR, *et al.* Calcineurin is required in urinary tract mesenchyme for the development of the pyeloureteral peristaltic machinery. *J Clin Invest* 2004; **113**: 1051-1058.
22. Chang H, Shyu KG, Lin S, *et al.* The plasminogen activator inhibitor-1 gene is induced by cell adhesion through the MEK/ERK pathway. *J Biomed Sci* 2003; **10**: 738-745.
23. Chang HY, Takei K, Sydor AM, *et al.* Asymmetric retraction of growth cone filopodia following focal inactivation of calcineurin. *Nature* 1995; **376**: 686-690.
24. Coghlan VM, Perrino BA, Howard M, *et al.* Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science* 1995; **267**: 108-111.
25. Collins JF, Pawloski-Dahm C, Davis MG, *et al.* The role of the cytoskeleton in left ventricular pressure overload hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol* 1996; **28**: 1435-1443.
26. Cope AP. Studies of T-cell activation in chronic inflammation. *Arthritis Res* 2002; **4 Suppl 3**: S197-211.
27. Coward RJ, Foster RR, Patton D, *et al.* Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent signaling and translocates nephrin, Podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 629-637.
28. de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, *et al.* Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 1998; **392**: 182-186.
29. de Merindol V, Mestre E, Essig M. Cyclosporine-induced modifications of proximal tubule actin organisation and tPA expression may contribute to the interstitial fibrosis during chronic allograft dysfunction. 43rd annual Meeting of the American Society of Nephrology, Denver. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**:793A:

30. De Windt LJ, Lim HW, Taigen T, *et al.* Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circ Res* 2000; **86**: 255-263.
31. De Windt LJ, Lim HW, Bueno OF, *et al.* Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 3322-3327.
32. Deng L, Huang B, Qin D, *et al.* Calcineurin inhibition ameliorates structural, contractile, and electrophysiologic consequences of postinfarction remodeling. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001; **12**: 1055-1061.
33. Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, *et al.* Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 2003; **83**: 433-473.
34. Duan Y, Gotoh N, Yan Q, *et al.* Shear-induced reorganization of renal proximal tubule cell actin cytoskeleton and apical junctional complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 11418-11423.
35. Dunn SE, Burns JL, Michel RN. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem* 1999; **274**: 21908-21912.
36. Duymelinck C, Deng JT, Dauwe SE, *et al.* Inhibition of the matrix metalloproteinase system in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 1998; **54**: 804-818.
37. 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**: 214-221.
38. Esposito C, Fornoni A, Cornacchia F, *et al.* Cyclosporine induces different responses in human epithelial, endothelial and fibroblast cell cultures. *Kidney Int* 2000; **58**: 123-130.
39. Esposito C, Parilla B, De Mauri A, *et al.* [Hepatocyte growth factor (HGF) reduces the expression of profibrotic factors in human isolated glomeruli]. *G Ital Nefrol* 2003; **20**: 376-380.
40. Essig M, Vrtovsnik F, Nguyen G, *et al.* Lovastatin modulates in vivo and in vitro the plasminogen activator/plasmin system of rat proximal tubular cells: role of geranylgeranylation and Rho proteins. *J Am Soc Nephrol* 1998; **9**: 1377-1388.
41. Essig M, Terzi F, Burtin M, *et al.* Mechanical strains induced by tubular flow affect the phenotype of proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **281**: F751-762.
42. Essig M, Friedlander G. Tubular shear stress and phenotype of renal proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14 Suppl 1**: S33-35.

43. Eto Y, Yonekura K, Sonoda M, *et al.* Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training. *Circulation* 2000; **101**: 2134-2137.
44. Fan L, Sebe A, Peterfi Z, *et al.* Cell contact-dependent regulation of epithelial-myofibroblast transition via the rho-rho kinase-phospho-myosin pathway. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 1083-1097.
45. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, *et al.* The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med* 2008; **14**: 931-938.
46. Feria I, Pichardo I, Juarez P, *et al.* Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 2003; **63**: 43-52.
47. Ferreira A, Kincaid R, Kosik KS. Calcineurin is associated with the cytoskeleton of cultured neurons and has a role in the acquisition of polarity. *Mol Biol Cell* 1993; **4**: 1225-1238.
48. Fischer E, Legue E, Doyen A, *et al.* Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genet* 2006; **38**: 21-23.
49. Fiumelli H, Riederer IM, Martin JL, *et al.* Phosphorylation of neurofilament subunit NF-M is regulated by activation of NMDA receptors and modulates cytoskeleton stability and neuronal shape. *Cell Motil Cytoskeleton* 2008; **65**: 495-504.
50. Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, *et al.* Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci* 1998; **18**: 5151-5159.
51. Friday BB, Horsley V, Pavlath GK. Calcineurin activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation. *J Cell Biol* 2000; **149**: 657-666.
52. Gaestel M, Benndorf R, Hayess K, *et al.* Dephosphorylation of the small heat shock protein hsp25 by calcium/calmodulin-dependent (type 2B) protein phosphatase. *J Biol Chem* 1992; **267**: 21607-21611.
53. Goldspink PH, McKinney RD, Kimball VA, *et al.* Angiotensin II induced cardiac hypertrophy in vivo is inhibited by cyclosporin A in adult rats. *Mol Cell Biochem* 2001; **226**: 83-88.
54. Golenhofen N, Doctor RB, Bacallao R, *et al.* Actin and villin compartmentation during ATP depletion and recovery in renal cultured cells. *Kidney Int* 1995; **48**: 1837-1845.
55. Gooch JL, Toro JJ, Guler RL, *et al.* Calcineurin A-alpha but not A-beta is required for normal kidney development and function. *Am J Pathol* 2004; **165**: 1755-1765.

56. Goto S, Yamamoto H, Fukunaga K, *et al.* Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin by calcineurin. *J Neurochem* 1985; **45**: 276-283.
57. Graef IA, Gastier JM, Francke U, *et al.* Evolutionary relationships among Rel domains indicate functional diversification by recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 5740-5745.
58. Graef IA, Wang F, Charron F, *et al.* Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell* 2003; **113**: 657-670.
59. Haq S, Choukroun G, Kang ZB, *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol* 2000; **151**: 117-130.
60. Haq S, Choukroun G, Lim H, *et al.* Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* 2001; **103**: 670-677.
61. Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, *et al.* 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**: 1501-1511.
62. Helfand BT, Chang L, Goldman RD. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci* 2004; **117**: 133-141.
63. Herrmann H, Bar H, Kreplak L, *et al.* Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 562-573.
64. Hill JA, Karimi M, Kutschke W, *et al.* Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload. *Circulation* 2000; **101**: 2863-2869.
65. Hirayama A, Adachi R, Otani S, *et al.* Cofilin plays a critical role in IL-8-dependent chemotaxis of neutrophilic HL-60 cells through changes in phosphorylation. *J Leukoc Biol* 2007; **81**: 720-728.
66. Homma K, Niino Y, Hotta K, *et al.* Ca(2+) influx through P2X receptors induces actin cytoskeleton reorganization by the formation of cofilin rods in neurites. *Mol Cell Neurosci* 2008; **37**: 261-270.
67. Hong F, Lee J, Song JW, *et al.* Cyclosporin A blocks muscle differentiation by inducing oxidative stress and inhibiting the peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase activity of cyclophilin A: cyclophilin A protects myoblasts from cyclosporin A-induced cytotoxicity. *Faseb J* 2002; **16**: 1633-1635.
68. Hong F, Lee J, Piao YJ, *et al.* Transgenic mice overexpressing cyclophilin A are resistant to cyclosporin A-induced nephrotoxicity via peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **316**: 1073-1080.

69. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, *et al.* Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 1981; **241**: F85-93.
70. Hryciw DH, Wang Y, Devuyst O, *et al.* Cofilin interacts with CIC-5 and regulates albumin uptake in proximal tubule cell lines. *J Biol Chem* 2003; **278**: 40169-40176.
71. Hu K, Wu C, Mars WM, *et al.* Tissue-type plasminogen activator promotes murine myofibroblast activation through LDL receptor-related protein 1-mediated integrin signaling. *J Clin Invest* 2007; **117**: 3821-3832.
72. Huang Y, Burkhardt JK. T-cell-receptor-dependent actin regulatory mechanisms. *J Cell Sci* 2007; **120**: 723-730.
73. Hughes J, Ward CJ, Peral B, *et al.* The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* 1995; **10**: 151-160.
74. Hull RN, Cherry WR, Weaver GW. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro* 1976; **12**: 670-677.
75. Ishibashi Y, Tsutsui H, Yamamoto S, *et al.* Role of microtubules in myocyte contractile dysfunction during cardiac hypertrophy in the rat. *Am J Physiol* 1996; **271**: H1978-1987.
76. Islam M, Burke JF, Jr., McGowan TA, *et al.* Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney Int* 2001; **59**: 498-506.
77. Jackson NM, Hsu CH, Visscher GE, *et al.* Alterations in renal structure and function in a rat model of cyclosporine nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; **242**: 749-756.
78. Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, *et al.* The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 1993; **365**: 352-355.
79. Janjic D, Wollheim CB. Islet cell metabolism is reflected by the MTT (tetrazolium) colorimetric assay. *Diabetologia* 1992; **35**: 482-485.
80. Jennings P, Koppelstaetter C, Aydin S, *et al.* Cyclosporine A induces senescence in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **293**: F831-838.
81. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, *et al.* Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1992; **19**: 464-474.
82. Jordan MC, Quednau BD, Roos KP, *et al.* Cyclosporin A regulates sodium-calcium exchanger (NCX1) gene expression in vitro and cardiac hypertrophy in NCX1 transgenic mice. *Ann N Y Acad Sci* 2002; **976**: 259-267.
83. Kamiya H, Okumura K, Ito M, *et al.* Calcineurin inhibitor attenuates cardiac hypertrophy due to energy metabolic disorder. *Can J Cardiol* 2001; **17**: 1292-1298.

84. Karliner JS, Kagiya T, Simpson PC. Effects of pertussis toxin on alpha 1-agonist-mediated phosphatidylinositide turnover and myocardial cell hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Experientia* 1990; **46**: 81-84.
85. Kawamura K, Takano K, Suetsugu S, *et al.* N-WASP and WAVE2 acting downstream of phosphatidylinositol 3-kinase are required for myogenic cell migration induced by hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* 2004; **279**: 54862-54871.
86. Kayyali US, Zhang W, Yee AG, *et al.* Cytoskeletal changes in the brains of mice lacking calcineurin A alpha. *J Neurochem* 1997; **68**: 1668-1678.
87. Kellerman PS, Bogusky RT. Microfilament disruption occurs very early in ischemic proximal tubule cell injury. *Kidney Int* 1992; **42**: 896-902.
88. Khanna AK, Cairns VR, Becker CG, *et al.* Transforming growth factor (TGF)-beta mimics and anti-TGF-beta antibody abrogates the in vivo effects of cyclosporine: demonstration of a direct role of TGF-beta in immunosuppression and nephrotoxicity of cyclosporine. *Transplantation* 1999; **67**: 882-889.
89. Kim Y, Sung JY, Ceglia I, *et al.* Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature* 2006; **442**: 814-817.
90. Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR, *et al.* Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* 1995; **378**: 641-644.
91. Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I. The progression of renal disease. *N Engl J Med* 1988; **318**: 1657-1666.
92. Klee CB, Krinks MH. Purification of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to Sepharose. *Biochemistry* 1978; **17**: 120-126.
93. Klee CB, Crouch TH, Krinks MH. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 6270-6273.
94. Klee CB, Draetta GF, Hubbard MJ. Calcineurin. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1988; **61**: 149-200.
95. Kobayashi N. Mechanism of the process formation; podocytes vs. neurons. *Microsc Res Tech* 2002; **57**: 217-223.
96. Kon V, Sugiura M, Inagami T, *et al.* Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int* 1990; **37**: 1487-1491.
97. Kurz JE, Moore BJ, Henderson SC, *et al.* A cellular mechanism for dendritic spine loss in the pilocarpine model of status epilepticus. *Epilepsia* 2008; **49**: 1696-1710.
98. Lai MM, Burnett PE, Wolosker H, *et al.* Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J Biol Chem* 1998; **273**: 18325-18331.

99. Lassila M, Finckenberg P, Pere AK, *et al.* Comparison of enalapril and valsartan in cyclosporine A-induced hypertension and nephrotoxicity in spontaneously hypertensive rats on high-sodium diet. *Br J Pharmacol* 2000; **130**: 1339-1347.
100. Lautermilch NJ, Spitzer NC. Regulation of calcineurin by growth cone calcium waves controls neurite extension. *J Neurosci* 2000; **20**: 315-325.
101. Lee SY, Jo SK, Cho WY, *et al.* The effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone on renal tubular cell apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in cyclosporine A nephrotoxicity. *Transplantation* 2004; **78**: 1756-1764.
102. Leite MF, Page E, Ambler SK. Regulation of ANP secretion by endothelin-1 in cultured atrial myocytes: desensitization and receptor subtype. *Am J Physiol* 1994; **267**: H2193-2203.
103. Letourneau PC. The cytoskeleton in nerve growth cone motility and axonal pathfinding. *Perspect Dev Neurobiol* 1996; **4**: 111-123.
104. Li J, Yatani A, Kim SJ, *et al.* Neurally-mediated increase in calcineurin activity regulates cardiac contractile function in absence of hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2003; **59**: 649-657.
105. Lian Q, Ladner CJ, Magnuson D, *et al.* Selective changes of calcineurin (protein phosphatase 2B) activity in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Exp Neurol* 2001; **167**: 158-165.
106. Lieberman DN, Mody I. Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase. *Nature* 1994; **369**: 235-239.
107. Lim HW, Molkentin JD. Calcineurin and human heart failure. *Nat Med* 1999; **5**: 246-247.
108. Lim HW, De Windt LJ, Mante J, *et al.* Reversal of cardiac hypertrophy in transgenic disease models by calcineurin inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 2000; **32**: 697-709.
109. Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, *et al.* Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 2000; **101**: 2431-2437.
110. Lin F, Hiesberger T, Cordes K, *et al.* Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 5286-5291.
111. Lin X, Barber DL. A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 12631-12636.
112. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, *et al.* Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; **66**: 807-815.

113. Liu S, Liu P, Borrás A, *et al.* Cyclosporin A-sensitive induction of the Epstein-Barr virus lytic switch is mediated via a novel pathway involving a MEF2 family member. *Embo J* 1997; **16**: 143-153.
114. Liu YC, Storm DR. Dephosphorylation of neuromodulin by calcineurin. *J Biol Chem* 1989; **264**: 12800-12804.
115. Lopez-Ongil S, Saura M, Rodríguez-Puyol D, *et al.* Regulation of endothelial NO synthase expression by cyclosporin A in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol* 1996; **271**: H1072-1078.
116. Malleret G, Haditsch U, Genoux D, *et al.* Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 2001; **104**: 675-686.
117. Malyszko J, Malyszko JS, Pawlak K, *et al.* The coagulo-lytic system and endothelial function in cyclosporine-treated kidney allograft recipients. *Transplantation* 1996; **62**: 828-830.
118. Mansuy IM, Mayford M, Jacob B, *et al.* Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell* 1998; **92**: 39-49.
119. McMorrow T, Gaffney MM, Slattery C, *et al.* Cyclosporine A induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2005; **20**: 2215-2225.
120. Meberg PJ, Ono S, Minamide LS, *et al.* Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil Cytoskeleton* 1998; **39**: 172-190.
121. Meguro T, Hong C, Asai K, *et al.* Cyclosporine attenuates pressure-overload hypertrophy in mice while enhancing susceptibility to decompensation and heart failure. *Circ Res* 1999; **84**: 735-740.
122. Mejia-Vilet JM, Ramirez V, Cruz C, *et al.* Renal ischemia-reperfusion injury is prevented by the mineralocorticoid receptor blocker spironolactone. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **293**: F78-86.
123. Mende U, Kagen A, Cohen A, *et al.* Transient cardiac expression of constitutively active Galphaq leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 13893-13898.
124. Mervaala E, Muller DN, Park JK, *et al.* Cyclosporin A protects against angiotensin II-induced end-organ damage in double transgenic rats harboring human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 2000; **35**: 360-366.
125. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 2001; **38**: 635-638.

126. Milan D, Griffith J, Su M, *et al.* The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation. *Cell* 1994; **79**: 437-447.
127. Miralles F, Ibanez-Tallon I, Parra M, *et al.* Transcriptional regulation of the murine urokinase-type plasminogen activator gene in skeletal myoblasts. *Thromb Haemost* 1999; **81**: 767-774.
128. Miyata K, Omori N, Uchino H, *et al.* Involvement of the brain-derived neurotrophic factor/TrkB pathway in neuroprotective effect of cyclosporin A in forebrain ischemia. *Neuroscience* 2001; **105**: 571-578.
129. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, *et al.* PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 1996; **272**: 1339-1342.
130. Molitoris BA. Ischemia-induced loss of epithelial polarity: potential role of the actin cytoskeleton. *Am J Physiol* 1991; **260**: F769-778.
131. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, *et al.* A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998; **93**: 215-228.
132. Molkenin JD. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res* 2004; **63**: 467-475.
133. Moriya M, Fujinaga K, Yazawa M, *et al.* Immunohistochemical localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in the mouse testis: its unique accumulation in spermatid nuclei. *Cell Tissue Res* 1995; **281**: 273-281.
134. Mundel P, Heid HW, Mundel TM, *et al.* Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 1997; **139**: 193-204.
135. Murakami T, Ishikawa H. Stress fibers in situ in proximal tubules of the rat kidney. *Cell Struct Funct* 1991; **16**: 231-240.
136. Muramatsu T, Kincaid RL. Molecular cloning and chromosomal mapping of the human gene for the testis-specific catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A). *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **188**: 265-271.
137. Murat A, Pellieux C, Brunner HR, *et al.* Calcineurin blockade prevents cardiac mitogen-activated protein kinase activation and hypertrophy in renovascular hypertension. *J Biol Chem* 2000; **275**: 40867-40873.
138. Myers BD, Newton L. Cyclosporine-induced chronic nephropathy: an obliterative microvascular renal injury. *J Am Soc Nephrol* 1991; **2**: S45-52.
139. Nagata K, Somura F, Obata K, *et al.* AT1 receptor blockade reduces cardiac calcineurin activity in hypertensive rats. *Hypertension* 2002; **40**: 168-174.

140. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, *et al.* The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; **349**: 2326-2333.
141. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, *et al.* Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 2004; **78**: 557-565.
142. Narishige T, Blade KL, Ishibashi Y, *et al.* Cardiac hypertrophic and developmental regulation of the beta-tubulin multigene family. *J Biol Chem* 1999; **274**: 9692-9697.
143. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, *et al.* Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 2003; **33**: 129-137.
144. Nguyen T, Lindner R, Tedeschi A, *et al.* NFAT-3 is a transcriptional repressor of the growth-associated protein 43 during neuronal maturation. *J Biol Chem* 2009; **284**: 18816-18823.
145. Nogales E. Structural insight into microtubule function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001; **30**: 397-420.
146. Oie E, Bjornerheim R, Clausen OP, *et al.* Cyclosporin A inhibits cardiac hypertrophy and enhances cardiac dysfunction during postinfarction failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; **278**: H2115-2123.
147. Olson EN, Nordheim A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 353-365.
148. Ono S. Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int Rev Cytol* 2007; **258**: 1-82.
149. Ono T, Yamamoto H, Tashima K, *et al.* Dephosphorylation of abnormal sites of tau factor by protein phosphatases and its implication for Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 1995; **26**: 205-215.
150. Oriolo AS, Wald FA, Ramsauer VP, *et al.* Intermediate filaments: a role in epithelial polarity. *Exp Cell Res* 2007; **313**: 2255-2264.
151. Ortiz A, Lorz C, Catalan M, *et al.* Cyclosporine A induces apoptosis in murine tubular epithelial cells: role of caspases. *Kidney Int Suppl* 1998; **68**: S25-29.
152. Otto EA, Schermer B, Obara T, *et al.* Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat Genet* 2003; **34**: 413-420.
153. Pandey D, Goyal P, Dwivedi S, *et al.* Unraveling a novel Rac1-mediated signaling pathway that regulates cofilin dephosphorylation and secretion in thrombin-stimulated platelets. *Blood* 2009; **114**: 415-424.
154. Parmacek MS. Myocardin-related transcription factors: critical coactivators regulating cardiovascular development and adaptation. *Circ Res* 2007; **100**: 633-644.

155. Pellegrini L, Tan S, Richmond TJ. Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature* 1995; **376**: 490-498.
156. Peng H, Vijayakumar S, Schiene-Fischer C, *et al.* Secreted cyclophilin A, a peptidylprolyl cis-trans isomerase, mediates matrix assembly of hensin, a protein implicated in epithelial differentiation. *J Biol Chem* 2009; **284**: 6465-6475.
157. Perico N, Benigni A, Bosco E, *et al.* Acute cyclosporine A nephrotoxicity in rats: which role for renin-angiotensin system and glomerular prostaglandins? *Clin Nephrol* 1986; **25 Suppl 1**: S83-88.
158. Perico N, Benigni A, Zoja C, *et al.* Functional significance of exaggerated renal thromboxane A2 synthesis induced by cyclosporin A. *Am J Physiol* 1986; **251**: F581-587.
159. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, *et al.* Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004; **364**: 1814-1827.
160. Perreault CL, Shannon RP, Shen YT, *et al.* Excitation-contraction coupling in isolated myocardium from dogs with compensated left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol* 1994; **266**: H2436-2442.
161. Polli JW, Billingsley ML, Kincaid RL. Expression of the calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in rat brain: developmental patterns and the role of nigrostriatal innervation. *Brain Res Dev Brain Res* 1991; **63**: 105-119.
162. Praetorius HA, Spring KR. The renal cell primary cilium functions as a flow sensor. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; **12**: 517-520.
163. Rahman A, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. PP2B isolated from human brain preferentially dephosphorylates Ser-262 and Ser-396 of the Alzheimer disease abnormally hyperphosphorylated tau. *J Neural Transm* 2006; **113**: 219-230.
164. Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, *et al.* The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 1998; **392**: 186-190.
165. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 707-747.
166. Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *Febs J* 2005; **272**: 5723-5741.
167. Rico M, Mukherjee A, Konieczkowski M, *et al.* WT1-interacting protein and ZO-1 translocate into podocyte nuclei after puromycin aminonucleoside treatment. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **289**: F431-441.
168. Ritter O, Hack S, Schuh K, *et al.* Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation* 2002; **105**: 2265-2269.

169. Roos-van Groningen MC, Scholten EM, Lelieveld PM, *et al.* Molecular comparison of calcineurin inhibitor-induced fibrogenic responses in protocol renal transplant biopsies. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 881-888.
170. Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, *et al.* Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 3328-3333.
171. Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 2000; **80**: 1483-1521.
172. Sadoshima J, Izumo S. Signal transduction pathways of angiotensin II--induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers. *Circ Res* 1993; **73**: 424-438.
173. Saeki Y, Kurihara S, Hongo K, *et al.* Tension and intracellular calcium transients of activated ferret ventricular muscle in response to step length changes. *Adv Exp Med Biol* 1993; **332**: 639-647; discussion 647-638.
174. Saito T, Fukuzawa J, Osaki J, *et al.* Roles of calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2003; **35**: 1153-1160.
175. Sakata Y, Masuyama T, Yamamoto K, *et al.* Calcineurin inhibitor attenuates left ventricular hypertrophy, leading to prevention of heart failure in hypertensive rats. *Circulation* 2000; **102**: 2269-2275.
176. Samuel JL, Bertier B, Bugaisky L, *et al.* Different distributions of microtubules, desmin filaments and isomyosins during the onset of cardiac hypertrophy in the rat. *Eur J Cell Biol* 1984; **34**: 300-306.
177. Samuel JL, Marotte F, Delcayre C, *et al.* Microtubule reorganization is related to rate of heart myocyte hypertrophy in rat. *Am J Physiol* 1986; **251**: H1118-1125.
178. Sato H, Nagai T, Kuppuswamy D, *et al.* Microtubule stabilization in pressure overload cardiac hypertrophy. *J Cell Biol* 1997; **139**: 963-973.
179. Sauvage FL, Saint-Marcoux F, Duret B, *et al.* Screening of drugs and toxic compounds with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2006; **52**: 1735-1742.
180. Schaper J, Froede R, Hein S, *et al.* Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1991; **83**: 504-514.
181. Schlondorff J, Del Camino D, Carrasquillo R, *et al.* TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; **296**: C558-569.
182. Schmidt A, Hall MN. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; **14**: 305-338.

183. Schrier RW, Wang W, Poole B, *et al.* Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004; **114**: 5-14.
184. Servais H, Ortiz A, Devuyst O, *et al.* Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis* 2008; **13**: 11-32.
185. Shang MH, Yuan WJ, Zhang SJ, *et al.* Intrarenal activation of renin angiotensin system in the development of cyclosporine A induced chronic nephrotoxicity. *Chin Med J (Engl)* 2008; **121**: 983-988.
186. Sharkey J, Butcher SP. Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischaemia. *Nature* 1994; **371**: 336-339.
187. Shibasaki F, Price ER, Milan D, *et al.* Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* 1996; **382**: 370-373.
188. Shibasaki F, Hallin U, Uchino H. Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem* 2002; **131**: 1-15.
189. Shiga Y, Onodera H, Matsuo Y, *et al.* Cyclosporin A protects against ischemia-reperfusion injury in the brain. *Brain Res* 1992; **595**: 145-148.
190. Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, *et al.* Mechanism of fibrosis in experimental tacrolimus nephrotoxicity. *Transplantation* 1997; **64**: 1829-1837.
191. Shimoyama M, Hayashi D, Takimoto E, *et al.* Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation* 1999; **100**: 2449-2454.
192. Shimoyama M, Hayashi D, Zou Y, *et al.* Calcineurin inhibitor attenuates the development and induces the regression of cardiac hypertrophy in rats with salt-sensitive hypertension. *Circulation* 2000; **102**: 1996-2004.
193. Shimoyama M, Hayashi D, Zou Y, *et al.* [Calcineurin inhibitor attenuates the development and induces the regression of cardiac hypertrophy in rats with salt-sensitive hypertension]. *J Cardiol* 2001; **37**: 114-118.
194. Siroky BJ, Guay-Woodford LM. Renal cystic disease: the role of the primary cilium/centrosome complex in pathogenesis. *Adv Chronic Kidney Dis* 2006; **13**: 131-137.
195. Slattery C, Campbell E, McMorrow T, *et al.* Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *Am J Pathol* 2005; **167**: 395-407.
196. Soderling SH, Langeberg LK, Soderling JA, *et al.* Loss of WAVE-1 causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 1723-1728.

197. Stein M, Wandinger-Ness A, Roitbak T. Altered trafficking and epithelial cell polarity in disease. *Trends Cell Biol* 2002; **12**: 374-381.
198. Stemmer PM, Klee CB. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* 1994; **33**: 6859-6866.
199. Suetsugu S, Yamazaki D, Kurisu S, *et al.* Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev Cell* 2003; **5**: 595-609.
200. Sugimoto T, Stewart S, Guan KL. The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase. *J Biol Chem* 1997; **272**: 29415-29418.
201. Sun L, Youn HD, Loh C, *et al.* Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity* 1998; **8**: 703-711.
202. Sussman MA, Lim HW, Gude N, *et al.* Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science* 1998; **281**: 1690-1693.
203. Sutton TA, Molitoris BA. Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Semin Nephrol* 1998; **18**: 490-497.
204. Tagawa H, Rozich JD, Tsutsui H, *et al.* Basis for increased microtubules in pressure-hypertrophied cardiocytes. *Circulation* 1996; **93**: 1230-1243.
205. Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, *et al.* Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 1196-1201.
206. Takeda Y, Yoneda T, Demura M, *et al.* Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy. *Circulation* 2002; **105**: 677-679.
207. Takenawa T, Suetsugu S. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 37-48.
208. Tamura K, Fujimura T, Tsutsumi T, *et al.* Transcriptional inhibition of insulin by FK506 and possible involvement of FK506 binding protein-12 in pancreatic beta-cell. *Transplantation* 1995; **59**: 1606-1613.
209. Tanaka T, Takeda M, Niigawa H, *et al.* Phosphorylated neurofilament accumulation in neuronal perikarya by cyclosporin A injection in rat brain. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1993; **15**: 77-87.
210. Tash JS, Krinks M, Patel J, *et al.* Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *J Cell Biol* 1988; **106**: 1625-1633.

211. Tendron A, Decramer S, Justrabo E, *et al.* Cyclosporin A administration during pregnancy induces a permanent nephron deficit in young rabbits. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 3188-3196.
212. Teofoli P, Mancini A, Lotti T. Cyclosporine A inhibits tPA mRNA transcription in A431 cell line. *Skin Pharmacol* 1996; **9**: 137-140.
213. Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, *et al.* Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int* 1998; **53**: 897-908.
214. Thomson AW, McAuley FT, Whiting PH, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition or aldosterone antagonism reduces cyclosporine nephrotoxicity in the rat. *Transplant Proc* 1987; **19**: 1242-1243.
215. Tsutsui H, Ishihara K, Cooper Gt. Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Science* 1993; **260**: 682-687.
216. Tsutsui H, Tagawa H, Kent RL, *et al.* Role of microtubules in contractile dysfunction of hypertrophied cardiocytes. *Circulation* 1994; **90**: 533-555.
217. van Rooij E, Doevendans PA, de Theije CC, *et al.* Requirement of nuclear factor of activated T-cells in calcineurin-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 2002; **277**: 48617-48626.
218. Vaziri ND, Ni Z, Zhang YP, *et al.* Depressed renal and vascular nitric oxide synthase expression in cyclosporine-induced hypertension. *Kidney Int* 1998; **54**: 482-491.
219. Vieira JM, Jr., Noronha IL, Malheiros DM, *et al.* Cyclosporine-induced interstitial fibrosis and arteriolar TGF-beta expression with preserved renal blood flow. *Transplantation* 1999; **68**: 1746-1753.
220. Vitko S, Viklicky O. Cyclosporine renal dysfunction. *Transplant Proc* 2004; **36**: 243S-247S.
221. Wade RH. On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol* 2009; **43**: 177-191.
222. Wagner MC, Molitoris BA. Renal epithelial polarity in health and disease. *Pediatr Nephrol* 1999; **13**: 163-170.
223. Wald FA, Figueroa Y, Oriolo AS, *et al.* Membrane repolarization is delayed in proximal tubules after ischemia-reperfusion: possible role of microtubule-organizing centers. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; **285**: F230-240.
224. Wang JH, Desai R. A brain protein and its effect on the Ca²⁺-and protein modulator-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; **72**: 926-932.
225. Wang Y, Shibasaki F, Mizuno K. Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J Biol Chem* 2005; **280**: 12683-12689.

226. Wang Y, Jarad G, Tripathi P, *et al.* Activation of NFAT signaling in podocytes causes glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 1657-1666.
227. Wang Z, Nolan B, Kutschke W, *et al.* Na⁺-Ca²⁺ exchanger remodeling in pressure overload cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 2001; **276**: 17706-17711.
228. Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, *et al.* Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 2703-2710.
229. Watanabe S, Tsuruoka S, Vijayakumar S, *et al.* Cyclosporin A produces distal renal tubular acidosis by blocking peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity of cyclophilin. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **288**: F40-47.
230. Wilkins BJ, De Windt LJ, Bueno OF, *et al.* Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 7603-7613.
231. Wysolmerski RB, Lagunoff D. Inhibition of endothelial cell retraction by ATP depletion. *Am J Pathol* 1988; **132**: 28-37.
232. Yakel JL. Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription. *Trends Pharmacol Sci* 1997; **18**: 124-134.
233. Yamazaki D, Suetsugu S, Miki H, *et al.* WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature* 2003; **424**: 452-456.
234. Yamazaki D, Oikawa T, Takenawa T. Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *J Cell Sci* 2007; **120**: 86-100.
235. Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 2508-2516.
236. Yoshida T, Mishina M. Distinct roles of calcineurin-nuclear factor of activated T-cells and protein kinase A-cAMP response element-binding protein signaling in presynaptic differentiation. *J Neurosci* 2005; **25**: 3067-3079.
237. Yoshida Y, Fogo A, Shiraga H, *et al.* Serial micropuncture analysis of single nephron function in subtotal renal ablation. *Kidney Int* 1988; **33**: 855-867.
238. Zhao R, Du L, Huang Y, *et al.* Actin depolymerization factor/cofilin activation regulates actin polymerization and tension development in canine tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 2008; **283**: 36522-36531.
239. Zhe X, Yang Y, Schuger L. Imbalanced plasminogen system in lymphangioleiomyomatosis: potential role of serum response factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; **32**: 28-34.

240. Zimmerhackl LB, Mesa H, Kramer F, *et al.* Tubular toxicity of cyclosporine A and the influence of endothelin-1 in renal cell culture models (LLC-PK1 and MDCK). *Pediatr Nephrol* 1997; **11**: 778-783.
241. Zou Y, Hiroi Y, Uozumi H, *et al.* Calcineurin plays a critical role in the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation* 2001; **104**: 97-101.

CHAPITRE V : ANNEXES

ANNEXE 1 : MÉTHODES

Culture cellulaire

Les cellules tubulaires proximales de porc proviennent de la lignée LLC-PK1 établie par Hull et col. [74] et ont été obtenues auprès de l'ATCC (CL-101). Elles ont été cultivées à 37°C en atmosphère définie (5% CO₂, 95% air) dans un milieu de culture [D-MEM/F12/glutaMAX™] complété d'Hepes (15 mM) ; de NaHCO₃ (13.5 mM), de pénicilline (50 U/ml), de streptomycine (50 µg/ml), de sodium sélénite (50 nM) et de 5% de SVF.

24h avant le traitement par les agents pharmacologiques, le SVF a été retiré et remplacé par un mélange hormonal afin de faciliter la différenciation épithéliale des cellules constitué d'insuline (25 µg/ml), de transferrine (10.5 µg/ml), de dexaméthasone (0.1 µM), de triiodothyronine (5 nM) et de desmopressine (0.1 µM)].

Dosage intracellulaire de la CsA

Après deux lavages avec du HBSS glacé, les cellules ont été lysées dans du PFA (1%, pH7 ; 15 min à 37°C), grattées, centrifugées (13 000 rpm, 10 min) et conservées à -20°C jusqu'à analyse. Le dosage des inhibiteurs de la CaN dans les lysats cellulaires a été réalisé par chromatographie à flux turbulent couplée à la spectrométrie de masse en tandem, selon la méthode précédemment décrite par Sauvage et col. pour les échantillons sanguins et adaptée à l'incubation *in vitro* [179]

Test MTT

Le test de viabilité cellulaire a été réalisé selon la méthode décrite par Janjic et Wollheim [79]. Ce test est un indicateur de l'intégrité et de l'activité mitochondriale, assimilable à une mesure de la vitalité cellulaire, basé sur l'activité la succinate déshydrogénase.

Après le traitement par les différents agents pharmacologiques, le MTT a été ajouté au milieu de culture (concentration finale 2 mg/ml) et les cellules ont été placées pendant 4 h dans le noir à 37°C. Après élimination des surnageants cellulaires, les cristaux de formazan formés par la dégradation du MTT par la succinate deshydrogénase ont été dissous par un mélange d'isopropanol/HCl, (95:5 vol/vol) pendant 2 h dans le noir à 37°C. La conversion du MTT en formazan a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm en retirant le bruit de fond mesuré à 670 nm.

Marquage de l'actine

Les cellules, cultivées sur des lamelles de verre, ont été incubées en présence des différents agents pharmacologiques pendant 24 h. A la fin de la période d'incubation, les cellules ont été fixées avec du formaldéhyde (4% / PBS, 10 min.), perméabilisées avec du Triton X100 (0,1% / PBS, 5 min.) puis marquées par la phalloïdine fluorescente (phalloïdine-TRITC, 1:1000 / PBS, 30 min, 37°C). Les lamelles de verre ont ensuite été montées sur des lames porte-objet à l'aide d'un milieu de montage aqueux (ProLong[®] Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes) Les lames ont été conservées dans le noir à 4°C puis analysées en microscopie à épifluorescence et confocale.

Dosage de la F-actine

Le dosage intracellulaire de F-actine a été adapté à partir de la méthode de Wysolmerski et Lagunoff [231]. Les cellules ont été fixées, perméabilisées puis marquées par la phalloïdine-TRITC (1:100 / PBS, 30 min, 37°C). Après deux lavages avec du PBS, l'incubation des cellules en présence de méthanol pendant 12 h à -20°C a permis d'extraire la phalloïdine-TRITC couplée à l'actine. Les cellules ont alors été grattées et centrifugées (10 000 g, 5 min), et la fluorescence a été mesurée dans les surnageants par spectrofluorométrie (excitation 540 nm ; émission 590 nm).

Extraction des ARN et qPCR

L'extraction des ARN a été réalisée à l'aide du kit Purelink RNA Mini Kit (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Le rendement et la qualité de l'extraction ont été contrôlés par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm et les échantillons ont été stockés à -80°C jusqu'à l'étape de transcription inverse.

2 µg d'ARN ont alors été transcrits en ADNc à l'aide du kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) selon les instructions du fabricant.

Enfin, la PCR quantitative a été réalisée sur un séquenceur ABI Prism 7000 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et l'expression relative des gènes cibles (tPA, uPA, PAI-1, MMP-9 et MMP-2) et du gène de référence (GAPDH) ont été mesurées selon la méthode des delta-delta-Ct.

Préparation des échantillons pour l'analyse protéique

Après traitement, les surnageants cellulaires ont été récoltés, concentrés par évaporation et conservés à -20°C.

Les cellules ont été rincées avec du PBS glacé, grattées en présence de tampon de lyse [NaCl 150 mM, Tris-base 20 mM, glycerol 10%, NP40 1%, pH7.8, extemporanément supplémenté d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases 1%] et centrifugées (12 000 g, 5 min, 4°C). Les concentrations protéiques ont été mesurées par la méthode BCA et les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à analyse.

Western blot

Les western blot ont été réalisés sur les surnageants ou les lysats cellulaires selon les techniques usuelles en condition réductrice. Les protéines ont été dissoutes dans du tampon Laemmli contenant 5% de β -mercaptoéthanol, chauffées à 95°C pendant 5 min, séparées par électrophorèse sur un gel d'acrylamide et transférées sur une membrane PVDF. Après le blocage des sites non spécifiques par une solution de lait écrémé (5%) diluée dans du TBS contenant 0.1% de Tween 20 (TBS-T), les membranes ont été incubées en présence des anticorps primaires dirigés contre le tPA [dilution 1:500 dans une solution de lait écrémé/TBS-T (5%)] ou contre les formes phosphorylées de NFATc2 et de la cofiline [dilution 1:1000 dans une solution de BSA/TBS-T (5%)]. Après 3 lavages avec du TBS-T, les membranes ont été incubées en présence des anticorps secondaires appropriés couplés à la peroxydase (2 h à température ambiante). Les bandes immunoréactives ont été détectées à l'aide d'une réaction de chémiluminescence (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare Life, Waukesha, WI, USA) et quantifiées avec le programme ImageJ (NIH Image, National Institutes of Health, USA).

Zymographie

Les zymographies ont été réalisées sur les surnageants cellulaires concentrés selon la méthode précédemment décrite par Essig et col. [41]. Les protéines dissoutes dans du tampon Laemmli ont été séparées par électrophorèse sur un gel d'acrylamide à 10% en condition non réductrice. La gel a ensuite été lavé dans une solution de Triton X100 (2.5%) pendant 1h puis déposé sur un gel de fibrine-agarose composé de fibrinogène bovin enrichi en plasminogène

(12.5 mg/ml), de thrombine bovine (40 U/ml) et d'agarose (1%). L'activité des protéases a été analysée après incubation pendant 2 à 4 h à 37°C en atmosphère humide.

L'évaluation de l'activité de MMP a été réalisée en ajoutant de la gélatine (1 mg/ml) au gel d'acrylamide. Après le lavage dans la solution de Triton X100, le gel a été incubé pendant 24 h à 37°C dans un tampon zinc [Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 1 µM, pH7.5] puis coloré par à l'aide d'une solution de Bleu de Coomassie et décoloré à l'aide d'une solution aqueuse d'acide acétique et d'isopropanol (10:25 vol/vol).

Les gels ont été scannés et les zones de lyse correspondant aux activités protéolytiques ont été quantifiées à l'aide du programme ImageJ (NIH Image, National Institutes of Health, USA). Les valeurs sont exprimées en pourcentages par rapport aux valeurs témoins (moyenne ± SEM).

ANNEXE 2 : MATERIEL

L'ensemble des milieux de culture provient de chez GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA).

La CsA provient de chez Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland) et le tacrolimus de chez Astellas Pharma (Tokyo, Japan). Les solutions stocks ont été préparées dans l'éthanol à 96% et stockées à -20°C.

Les hormones, la phalloïdine-TRITC, le fibrinogène, la thrombine, le MTT ainsi que les cocktails d'inhibiteurs de protéases et de phosphatase proviennent de chez Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

L'anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre le tPA provient de chez American Diagnostica (Stamford, CT, USA) et les anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre le phospho-NFATc2 et contre la phospho-cofiline proviennent de chez Abnova (Taiwan) et Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) respectivement.

Les anticorps secondaires couplés à la peroxidase proviennent de chez Jackson ImmunoResearch Lab (West Grove, PA, USA) (anti-chèvre) et de chez Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) (anti-lapin).

Le peptide VIVIT provient de chez Calbiochem (Darmstadt, Germany) et le peptide S3-R (MASGVAVSDGVKVFNRRRRRRRR) a été synthétisé par Milligen (Labège, France).

TITRE Modifications du cytosquelette des cellules tubulaires proximales rénales par les inhibiteurs de la calcineurine : Rôle dans la dysfonction chronique du greffon.

RESUME La ciclosporine et le tacrolimus sont des inhibiteurs de la calcineurine utilisés comme immunosuppresseurs pour prévenir les rejets de greffe. Alors que la survie à court terme des greffons rénaux est bien maîtrisée, la survie à long terme est encore compromise par l'apparition d'une maladie rénale appelée dysfonction chronique du greffon qui conduit au déclin progressif et irréversible de la fonction rénale. Paradoxalement, l'utilisation des inhibiteurs de la calcineurine contribue à l'apparition des lésions en raison de leur importante néphrotoxicité qui induit, à dose thérapeutique, des modifications phénotypiques perturbant le fonctionnement normal des cellules.

Le but de ce travail était d'identifier les effets des inhibiteurs de la calcineurine sur l'organisation du cytosquelette des cellules du tube proximal et les conséquences sur le phénotype des cellules.

Nous montrons ici que la CsA, indépendamment de la voie du NFAT, perturbe le cytosquelette d'actine et inhibe le système fibrinolytique des cellules tubulaires proximales. Nous identifions également, pour la première fois au niveau rénal, la cofiline comme une voie de signalisation potentiellement impliquée dans les effets de la ciclosporine. En revanche, les premiers résultats obtenus avec le tacrolimus ne reproduisent pas les effets de la ciclosporine sur le cytosquelette.

Ce travail permet de formuler un certain nombre d'hypothèses sur les mécanismes physiopathologiques qui participent à la détérioration progressive de la structure et de la fonction des cellules tubulaires proximales après la transplantation rénale et sur la contribution des inhibiteurs de la calcineurine dans ce processus.

MOTS CLES Calcineurine, ciclosporine, tacrolimus, dysfonction chronique du greffon, cytosquelette, système fibrinolytique, fibrose.

TITRE Calcineurin inhibitors-induced modifications of the cytoskeleton in proximal tubular cells : Contribution to chronic allograft dysfunction.

ABSTRACT Cyclosporine and tacrolimus are calcineurin inhibitors widely used in the prevention of transplanted organ rejection. The use of calcineurin inhibitors has greatly improved graft survival in transplant allograft recipients but long term treatment has led to the recognition of some major and limiting side effects, including nephrotoxicity, that contribute to chronic allograft dysfunction and lead to end-stage renal disease by inducing phenotypic changes of renal cells and abnormal function.

The aim of this work was to identify the effects of calcineurin inhibitors exposure on the cytoskeleton organization of proximal tubular cells and the consequences of such modificationS on cell's phenotype.

We demonstrate here that, independently of the NFAT pathway, exposure to cyclosporine provokes a strong rearrangement of the actin cytoskeleton and a specific inhibition of the fibrinolytic system in renal proximal tubular cells. For the first time in kidney cells, we also identify cofilin pathway as a potential target of cyclosporine effect. On the other hand, exposure to tacrolimus does not reproduce the effects of cyclosporine on the cytoskeleton organization.

This work provide new fields of investigation to further understand the mechanisms implicated in the deterioration of proximal tubular cells structure after kidney transplantation and the contribution of calcineurin inhibitors.

KEY-WORDS Calcineurin, cyclosporine, tacrolimus, chronic allograft dysfunction, cytoskeleton, fibrinolytic system, fibrosis.

DISCIPLINE Pharmacologie et sciences du médicament

INSERM UMR-S850 « Pharmacologie des immunosuppresseurs en transplantation » Faculté de Médecine, Laboratoire de Pharmacologie médicale, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges
