

UNIVERSITE DE LIMOGES

ÉCOLE DOCTORALE ED n°524

FACULTÉ de MÉDECINE

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

Thèse N° [-----]

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Biologie-Santé

présentée et soutenue par

Élodie MESTRE

le 22 Octobre 2012

**Modifications phénotypiques induites par les inhibiteurs de la calcineurine
sur les cellules tubulaires proximales rénales et implication dans
l'adaptation cellulaire aux contraintes mécaniques**

Thèse dirigée par le Professeur Marie ESSIG

JURY :

Madame le Professeur Marie-Christine PERAULT-POCHAT

Présidente

Madame le Docteur Bénédicte BUFFIN-MEYER

Rapporteur

Monsieur le Professeur Alexandre HERTIG

Rapporteur

Madame le Professeur Marie ESSIG

Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

A Madame Bénédicte Buffin-Meyer et Monsieur Alexandre Hertig pour avoir accepté de rapporter ce travail.

A Madame Marie-Christine Perault-Pochat pour avoir bien voulu présider ce jury.

C'est un honneur que vous me faites en acceptant de participer à ce jury et en apportant votre regard d'experts sur mon travail. Merci à chacun d'entre vous pour le temps que vous avez accepté d'y consacrer.

A Marie Essig,

Merci infiniment Marie pour la confiance que tu m'as accordée il y'a trois ans, lorsque tu m'as proposé ce sujet. Merci de ton encadrement, de ta disponibilité malgré un emploi du temps de ministre, de tes conseils et de tes encouragements précieux. J'ai beaucoup appris grâce à toi.

Au Professeur Pierre Marquet,

Je vous suis très reconnaissante pour m'avoir accueillie au sein de l'unité et pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans le laboratoire. Ces trois ans dans l'unité m'ont permis d'évoluer. Merci de votre gentillesse, de votre disponibilité et de vos encouragements.

A l'équipe Inserm U-850

Un grand merci à vous tous pour votre aide tout au long de ces trois années. Merci pour votre gentillesse et votre soutien.

Un merci spécial pour François-Ludovic, pour ton aide précieuse sur l'iTRAQ.

RÉSUMÉ

La cyclosporine A (CsA) et le tacrolimus (Tac) sont deux inhibiteurs de la calcineurine (ICN) couramment utilisés dans les protocoles d'immunosuppression pour prévenir les rejets de greffe. Si la survie du greffon à court terme a été considérablement augmentée grâce à l'utilisation de ces traitements, ils présentent une néphrotoxicité susceptible de contribuer à long terme, à l'apparition de lésions rénales ainsi qu'à des altérations chroniques de la fonction rénale dénommées dysfonction chronique du greffon. Ces phénomènes complexes et d'origines multi-factorielles conduisent au déclin progressif, irréversible de la fonction rénale et à la perte du greffon. Malgré de nombreuses études, l'origine exacte des atteintes rénales reste mal connue et bien que cette néphrotoxicité ait souvent été corrélée à des concentrations sanguines élevées en ICN, elle apparaît également à dose thérapeutique.

La calcineurine est impliquée dans la régulation de nombreuses autres voies intracellulaires, qui pourraient être des éléments clés de cette nocivité intrinsèque des ICN. L'une de ces régulations, mise en évidence dans les neurones et les myocytes, est celle du cytosquelette et nous avons émis l'hypothèse qu'une dysrégulation, par les ICN, du cytosquelette des cellules tubulaires proximales pourrait être à l'origine de modifications phénotypiques perturbant le fonctionnement tubulaire normal et l'adaptation aux contraintes mécaniques liées au flux tubulaire.

Le but de ce travail a été de déterminer les effets des inhibiteurs de la calcineurine sur le cytosquelette des cellules tubulaires proximales ainsi que sur l'adaptation des cellules tubulaires proximales à un flux tubulaire élevé correspondant à une situation de réduction néphronique.

Nous montrons que la CsA modifie l'organisation de différents composants du cytosquelette et que cet effet, indépendant de la voie NFAT, pourrait potentiellement impliquer la cofiline. Ces modifications du cytosquelette sont proches de celles observées en présence d'un flux tubulaire élevé mais il ne semble pas y avoir d'effets synergiques entre la CsA et le flux tubulaire. Par ailleurs, la technique de protéomique différentielle iTRAQ, mise en place dans le laboratoire dans le cadre de cette étude, nous a permis d'analyser, sans hypothèse a priori, l'expression protéique des cellules exposées conjointement à la CsA et à un flux tubulaire élevé.

Ces résultats nous conduisent à formuler de nouvelles hypothèses quant aux mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans la néphrotoxicité induite par les ICN ainsi que leur contribution à l'adaptation des cellules aux contraintes mécaniques

Mots clés : cyclosporine A, tacrolimus, cytosquelette, néphrotoxicité, contraintes mécaniques

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
RÉSUMÉ	4
TABLE DES MATIERES.....	5
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	8
INTRODUCTION GENERALE.....	9
Chapitre I : INTRODUCTION.....	11
I. La calcineurine (CaN).....	12
<i>I.1. Généralités sur la calcineurine</i>	<i>12</i>
I.1.1. Structure	12
I.1.2. Localisation et rôles de la calcineurine.....	13
I.1.3. Régulation de l'activation de la calcineurine	13
<i>I.2. Fonctions immunologiques et non-immunologiques de la calcineurine</i>	<i>15</i>
I.2.1. Fonctions immunologiques	15
I.2.2. Fonctions non-immunologiques.....	17
I.2.2.a. Rôle de la calcineurine au niveau du cerveau	18
I.2.2.b. Rôle de la calcineurine au niveau du cœur	20
I.2.2.c. Rôle de la calcineurine au niveau rénal.....	21
I.2.2.d. Autres fonctions de la calcineurine.....	22
II. Les inhibiteurs de la calcineurine	23
<i>II.1. Historique.....</i>	<i>23</i>
<i>II.2. Mode d'action pharmacologique des inhibiteurs de la calcineurine</i>	<i>24</i>
<i>II.3. Néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine</i>	<i>25</i>
II.3.1. Néphrotoxicité aiguë des inhibiteurs de la calcineurine	26
II.3.2. Néphrotoxicité chronique des inhibiteurs de la calcineurine	29
<i>II.1. Principaux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la toxicité des inhibiteurs de la calcineurine.....</i>	<i>32</i>
II.1.1. Prolifération cellulaire et apoptose	32
II.1.1.a. Effets de la CsA sur la prolifération cellulaire	32
II.1.1.b. Effets de la CsA sur l'apoptose	32
II.1.2. Vasoconstriction induite par les ICN.....	33
II.1.2.a. Activation du système rénine-angiotensine-aldostérone.....	34
II.1.2.b. Modification de la production de facteurs vasoactifs.....	34
II.1.3. Stress oxydant	36
II.1.4. Effets sur le TGF- β	37
II.1.5. Transition épithélio-mésenchymateuse	37
II.1.6. Stress du réticulum endoplasmique et autophagie	39

II.1.6.a. Stress du réticulum et réponse adaptative	39
II.1.6.b. Autophagie induite par la cyclosporine.....	40
II.2. Résumé des principaux mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité des ICN	41
III. Le Cytosquelette	43
III.1. Structure générale	43
III.1.1. Les microfilaments d'actine	43
III.1.1.a. Les protéines ABP (Actin Binding Protein).....	44
III.1.1.a. De la dynamique de l'actine à la transcription génique.....	48
III.1.1.b. Résumé des mécanismes impliqués dans la régulation de l'actine.....	49
III.1.2. Les filaments intermédiaires	51
III.1.2.a. Structure	51
III.1.2.b. Différentes classes de protéines	51
III.1.2.c. Rôle des filaments intermédiaires	53
III.1.3. Les microtubules.....	54
III.1.3.a. Structure	54
III.1.3.b. Protéines associées et fonctions cellulaires.....	54
III.1. Cytosquelette et cellules épithéliales.....	55
III.2. Rôle du cytosquelette et implication dans la physiopathologie	57
III.2.1. Modification du cytosquelette des cellules épithéliales rénales: exemple de la transition épithélio-mésenchymateuse.....	59
III.2.2. Implication du cytosquelette dans les maladies rénales	61
III.2.2.a. Les ciliopathies	61
III.2.2.b. Le syndrome d'ischémie-reperfusion	62
IV. Cytosquelette et contraintes mécaniques.....	64
IV.1. Définition du « shear stress ».....	64
IV.2. Réponse des cellules au shear stress	66
IV.2.1. Capteurs des contraintes mécaniques.....	66
IV.2.1.a. Protéines membranaires	66
IV.2.1.b. Sous-structures membranaires spécifiques.....	68
IV.2.2. Modifications intracellulaires et voies de signalisation	69
IV.2.2.a. Réorganisation du cytosquelette induite par le FSS.....	69
IV.2.2.b. Voies de signalisation via des protéines kinases.....	72
IV.2.2.c. Facteurs de transcription.....	76
V. Hypothèse de travail	78
Chapitre II: TRAVAUX PERSONNELS	79
I. Etude des modifications phénotypiques induites par les inhibiteurs de la calcineurine sur les cellules tubulaires proximales rénales	80
II. Influence de la cyclosporine A sur l'adaptation cellulaire aux contraintes mécaniques	104
Chapitre III : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	125
Chapitre IV : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	132
Chapitre V: ANNEXES.....	150

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

Ang II :	Angiotensine II
CaM :	Calmoduline
CaN :	Calcineurine
CsA:	Cyclosporine A
Cyp A:	Cyclophiline A
Cyp B:	Cyclophiline B
DCG:	Dysfonction Chronique du Greffon
DFG :	Débit de Filtration Glomérulaire
FI-AT:	Fibrose Interstitielle-Atrophie Tubulaire
FKBP12 :	FK506 binding protein 12kDa
FSS:	Fluid Shear Stress
ICN:	Inhibiteur de la Calcineurine
iTRAQ:	Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification
MALDI :	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
MRTF:	Myocardin-Related Transcription Factor
MS;	Spectrométrie de masse
MS/MS:	Spectrométrie de masse en tandem
NFAT:	Nuclear Factor of Activated T-cells
PTC:	Proximal Tubular Cell
SRF:	Serum Response Factor
Tac/FK506:	Tacrolimus
TEM:	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF- β :	Transforming Growth Factor- β

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation de la structure de la calcineurine.....	12
Figure 2 : Schéma des mécanismes d'activation des lymphocytes T.....	17
Figure 3 : Localisation de la calcineurine dans les différents organes et principales fonctions associées.....	18
Figure 4 : Structure chimique de la cyclosporine (A) et du tacrolimus (B).....	24
Figure 5 : Représentation schématique du mode d'action des inhibiteurs de la calcineurine.	25
Figure 6 : Biopsie rénale montrant les lésions histologiques caractéristiques de la toxicité aigüe des ICN.....	27
Figure 7 : Schéma d'une biopsie rénale représentant les différentes lésions histologiques de la néphropathie chronique d'allogreffe ainsi que les facteurs favorisant leur apparition.	30
Figure 8 : Schéma récapitulatif des différents acteurs moléculaires participant à la TEM et implication de la CsA.	38
Figure 9 : Représentation schématique récapitulant les principaux mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité aigüe ou chronique des ICN et leurs conséquences.	42
Figure 10 : Signaux contrôlant la phosphorylation et la déphosphorylation de la cofiline.....	46
Figure 11 : Représentation schématique des protéines impliquées dans la régulation de la dynamique de l'actine.....	50
Figure 12 : Schéma de la distribution des protéines des filaments intermédiaires dans le corps humain.	52
Figure 13 : Schéma du cytosquelette d'une cellule épithéliale.	57
Figure 14 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la TEM.....	61
Figure 15 : Modèle de mécanotransduction et rôle des protéines Rho GTPases.	74
Figure 16 : Schéma récapitulatif des signaux activés par le shear stress (FSS).....	77

INTRODUCTION GENERALE

La découverte de la cyclosporine 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.

Les travaux de recherche réalisés dans le domaine des traitements immunosuppresseurs ont permis de mieux comprendre les paramètres pharmacocinétiques / pharmacodynamiques / pharmacogénétiques de ces médicaments et de développer leur suivi thérapeutique pharmacologique afin d'optimiser leur efficacité au niveau individuel. Si la survie du greffon à court terme a été fortement améliorée, en particulier grâce à une meilleure connaissance des mécanismes immunologiques impliqués dans les rejets et à l'optimisation des traitements immunosuppresseurs, la survie du greffon à long terme reste problématique. En effet, l'administration d'ICN au long cours participe à l'apparition de lésions rénales vasculaires et tubulo-interstitielles, évoluant ultérieurement vers des lésions de fibrose interstitielle, d'atrophie tubulaire (FI-AT) ou de glomérulosclérose. Ces lésions, qui sont par ailleurs d'origines multi-factorielles, peuvent contribuer à l'apparition d'une forme particulière de pathologie rénale appelée dysfonction chronique du greffon (DCG), qui conduit à la destruction progressive des néphrons et à l'altération 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 DCG.

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 DCG. Nous avons également étudié l'idée selon laquelle la cyclosporine et le flux urinaire pourraient avoir un effet synergique en altérant l'organisation du cytosquelette et en empêchant ainsi une adaptation et une réponse efficace des cellules aux conditions pathologiques.

Chapitre I : INTRODUCTION

I. La calcineurine (CaN)

I.1. Généralités sur la calcineurine

I.1.1. Structure

La calcineurine est une sérine/thréonine phosphatase initialement décrite par Klee et Krinks en 1978 (1). Au niveau structural, la calcineurine est un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique d'environ 59 kDa, la calcineurine A et d'une sous-unité régulatrice d'environ 19 kDa, la calcineurine B.

L'activité phosphatase de la calcineurine est localisée au niveau de la sous-unité catalytique, ou CaN A. En plus du domaine phosphatase, cette sous unité contient un domaine de liaison à la sous unité régulatrice (domaine BHH), un domaine de liaison à la calmoduline et un domaine permettant l'interaction avec le Ca^{2+} . La sous-unité régulatrice contient elle deux domaines globulaires de liaisons au Ca^{2+} , permettant chacun la fixation de deux ions Ca^{2+} , soit 4 sites de fixation (figure 1).

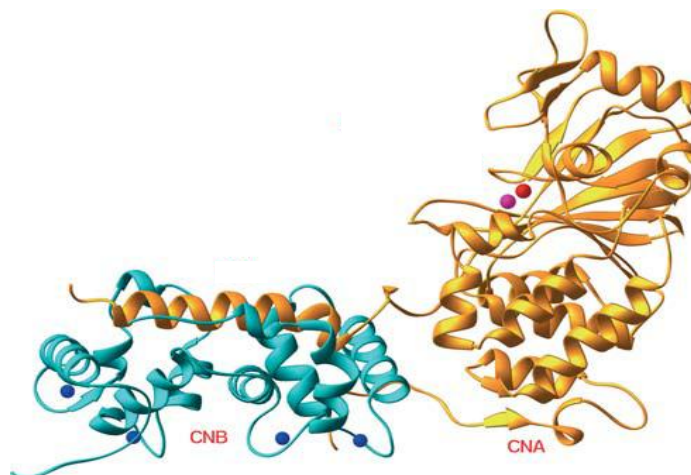


Figure 1: Représentation de la structure de la calcineurine.

La sous-unité catalytique est représentée en doré et la sous-unité régulatrice en cyan. Les sphères rouge, violette et bleue représentent respectivement les ions Zn^{2+} , Fe^{3+} et Ca^{2+} . (Adapté d'après Ke H. et Huai Q. 2003 (2)).

I.1.2. Localisation et rôles de la calcineurine

La calcineurine est une protéine localisée dans de nombreux organes indépendants du système immunitaire. Les isoformes ainsi que leur quantité varient selon les tissus, notamment au niveau du cerveau où elle est 10 à 20 % plus exprimée dans certaines zones comme le striatum et l'hippocampe. Les sous-unités A et B ont également été mises en évidence dans de nombreux autres tissus tels que les lymphocytes B et T (3), les ostéoclastes (4), les cellules de la glande surrénale (5), le foie (6), les poumons, le pancréas, le cœur, les cellules musculaires, les testicules, (7), les plaquettes, la thyroïde, les reins (8), ou encore la rétine (9). Elle est également présente au niveau cardiaque où elle participe au développement de pathologies comme l'hypertrophie cardiaque (10,11).

Dans le rein, plusieurs groupes se sont intéressés à la localisation de la calcineurine A. Il a été mis en évidence que l'isoforme A α est la forme prédominante dans le tubule proximal, alors que l'isoforme A β n'est que peu exprimée. Au niveau des tubules collecteurs corticaux, les isoformes α et β sont exprimées de manière similaire alors que dans les tubules collecteurs médullaires, c'est principalement l'isoforme β qui est retrouvée. Enfin, il a été mis en évidence une activité de la calcineurine dans les cellules mésangiales glomérulaires (12,13).

I.1.3. Régulation de l'activation de la calcineurine

Dans les cellules au repos, la calcineurine est sous forme d'un hétérodimère inactif composé de la sous-unité A et de la sous-unité B. A ce niveau, deux des quatre sites de liaisons au Ca²⁺ de la sous-unité B sont occupés par des molécules de Ca²⁺, même en présence d'une très faible concentration de Ca²⁺ intracellulaire. Les deux autres sites de liaison au Ca²⁺ nécessitent une concentration plus élevée en Ca²⁺, de l'ordre du micromolaire.(14–16).

Le mécanisme d'activation de ce complexe dépend d'une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ mais aussi de la présence de la calmoduline (CaM).

L'élévation de la concentration en Ca^{2+} consécutive à un stimulus induit à la fois une activation de la CaM, mais également la fixation d'ions Ca^{2+} sur les deux sites libres de la CaN B. Ce mécanisme entraîne un changement conformationnel de la calcineurine, et une exposition du site de liaison à la CaM de la sous-unité A permettant ainsi la fixation du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. S'ensuit alors une dissociation du domaine auto-inhibiteur de la sous-unité catalytique et une libération du site actif de l'enzyme (16,17). Dans ce processus, le rôle de la CaN B reste encore mal connu mais sa présence et sa fixation au Ca^{2+} aurait plutôt un rôle structural que directement régulateur (14).

Plusieurs protéines endogènes ont été montrées comme inhibiteurs ou régulateurs de la calcineurine. C'est le cas des protéines de la famille RCANs (Regulators of Calcineurin), d'abord identifiés comme inhibiteurs, dont on sait maintenant qu'ils ont un rôle double sur la calcineurine, pouvant ainsi l'activer ou l'inhiber selon leur état de phosphorylation (18,19). Au niveau neuronal, d'autres protéines comme AKAP79 participent à la signalisation de la calcineurine en assurant son adressage à la membrane post-synaptique (20,21).

Parmi les protéines régulatrices de la calcineurine, on retrouve également les immunosuppresseurs comme la cyclosporine A (CsA) et le tacrolimus. Ces molécules exercent leur rôle inhibiteur en se complexant à des isomérases spécifiques, la cyclophiline A (CypA) pour la CsA et la protéine FKBP-12 pour le tacrolimus (22,23). Au niveau des lymphocytes T, ces molécules induisent une inhibition de l'activité phosphatase que la calcineurine exerce sur le facteur de transcription NFAT, et ainsi empêchent la prolifération lymphocytaire. Leur mode d'action précis sera détaillé ultérieurement.

I.2. Fonctions immunologiques et non-immunologiques de la calcineurine

I.2.1. Fonctions immunologiques

Le principal rôle de la calcineurine est un rôle dans la réponse immunitaire des lymphocytes T (24) (figure 2). La stimulation antigénique des récepteurs TCR/CD28 des lymphocytes T provoque l'activation de la phospholipase C qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en inositol-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). L'IP3 induit alors une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , d'une part en stimulant la libération des stocks intracellulaires mais également en provoquant l'activation de canaux calciques et un influx de Ca^{2+} (canaux CRAC). Cette augmentation de Ca^{2+} permet l'activation de la calmoduline, qui forme un complexe avec la calcineurine. Ce dernier déphosphoryle ensuite le facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T cell), principal substrat de la calcineurine (25).

NFAT est une famille de facteur de transcription composée de cinq membres structurellement très proches : NFAT2/NFATc1, NFAT1/NFATc2, NFAT3/NFATc4 et NFAT4/NFATc3, ainsi que le NFAT5 localisé dans le noyau. L'activation de la calcineurine induit la prolifération lymphocytaire via la déphosphorylation du NFAT4. Une fois déphosphorylé, la séquence de localisation nucléaire (NLS) du NFAT est exposée ce qui induit son entrée dans le noyau, où il se complexe avec des cofacteurs comme le facteur AP-1, qui agit de concert pour induire la transcription de nombreux gènes, notamment des gènes codant pour des interleukines (26). De nombreuses cytokines comme l'IL-2, l'IL-4, l'IL-13, le $TNF\alpha$, l'IFN γ ou encore Fas ligand possèdent des promoteurs contenant des sites de liaison pour le NFAT. Les gènes dont la transcription est induite par le NFAT ou le complexe NFAT/AP-1 appartiennent à différentes classes comme les cytokines, les récepteurs de surface ou encore des facteurs de transcription (27–30). Les mécanismes de régulation du facteur NFAT sont des processus hautement dynamiques, permettant au NFAT de passer

rapidement d'une localisation nucléaire à une localisation cytoplasmique et inversement, en réponse à des changements de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} (31,32). Ainsi, l'action de la calcineurine sur la déphosphorylation du NFAT et sur son transport vers le noyau est contrebalancée par l'action de kinases qui agissent soit directement au niveau cytoplasmique en empêchant la translocation nucléaire du NFAT, soit au niveau du noyau, en favorisant un signal d'export. Parmi ces protéines kinases impliquées dans la phosphorylation du NFAT et donc dans sa localisation subcellulaire, on retrouve des protéines de la famille des MAP kinase telles que ERK, JNK ou encore la p38 kinase, la glycogène synthase 3 β (GSK3 β), la protéine kinase A (PKA) et la caséine kinase 1 α (CK1 α) (27,33–35). En l'absence d'une activité calcineurine, le NFAT est ainsi rapidement rephosphorylé et exporté du noyau.

Dans les lymphocytes T non activés, NFAT est présent sous forme phosphorylée inactive dans le cytoplasme. Sa déphosphorylation permet sa translocation dans le noyau où il exerce son rôle de facteur de transcription (36) et active l'expression de l'IL-2. Celle-ci induit de manière autocrine la transformation des lymphocytes T en lymphocytes CD8⁺ cytotoxiques qui sécrètent de l'interféron γ . Ce dernier agit alors sur les macrophages et induit la production de TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et de TGF β (Transforming Growth Factor β). L'IL-2 agit aussi de manière paracrine sur les autres acteurs du système immunitaire. Elle stimule la croissance et l'activité cytolytique des cellules NK (Natural Killer), la maturation des lymphocytes B et la production d'anticorps.

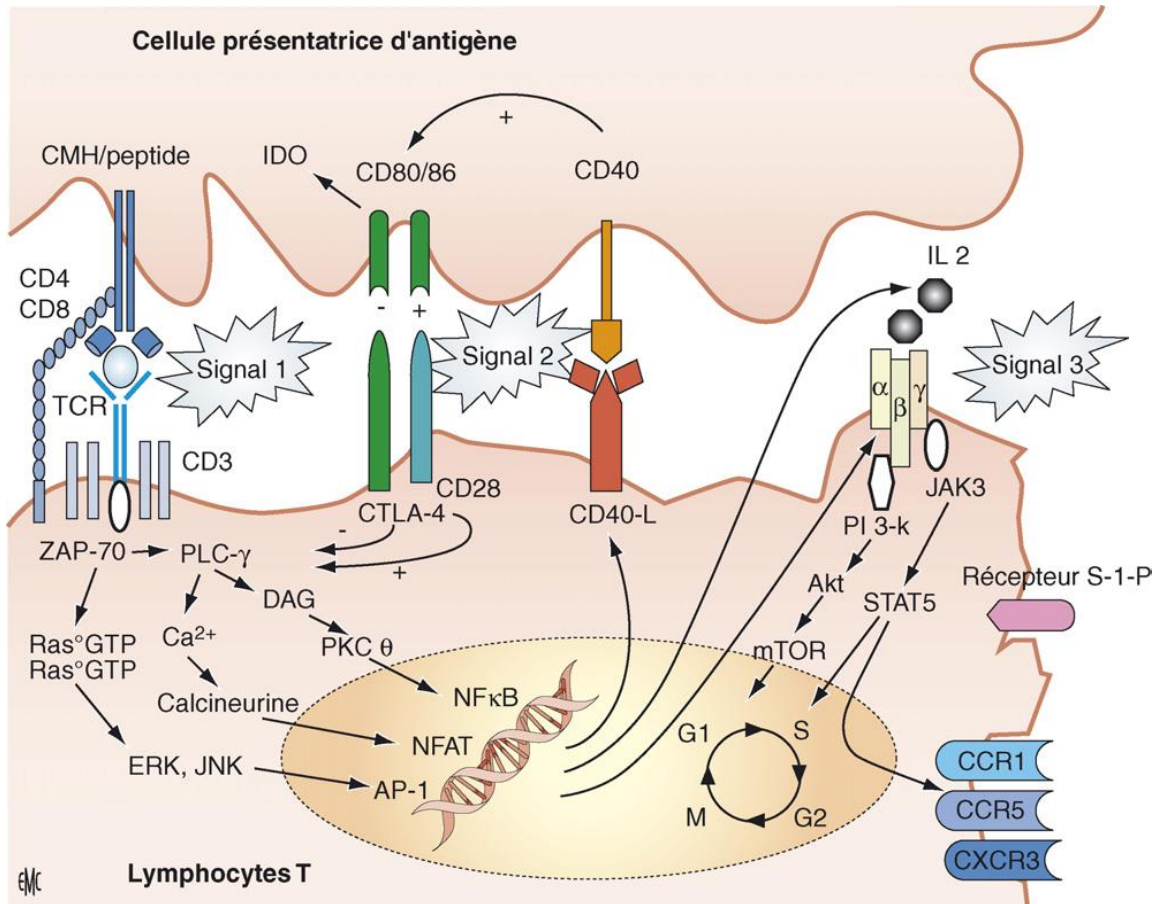


Figure 2 : Schéma des mécanismes d'activation des lymphocytes T.

L'activation complète des lymphocytes T nécessite 3 signaux : le premier est issu de l'activation du TCR par un antigène. Ce signal est relayé par les MAP kinase, la voie de la calcineurine et la voie de la PKC et aboutit à l'activation de facteurs de transcription, dont le NFAT qui induit l'expression d'IL-2. Le second signal, transmis par le corecepteur CD28, renforce le signal transmis par le TCR. Enfin, le troisième signal résulte de la stimulation du récepteur à l'IL-2 et délivre un message favorisant la prolifération et la sécrétion de cytokines (D'après Legendre C 2007 (37))

I.2.2. Fonctions non-immunologiques

En complément de son rôle dans le système immunitaire, la CaN participe à différents processus et a été impliquée dans différentes pathologies. La figure 3 représente les organes dans lesquels la CaN est retrouvée ainsi que les principales fonctions auxquelles elle a été associée.

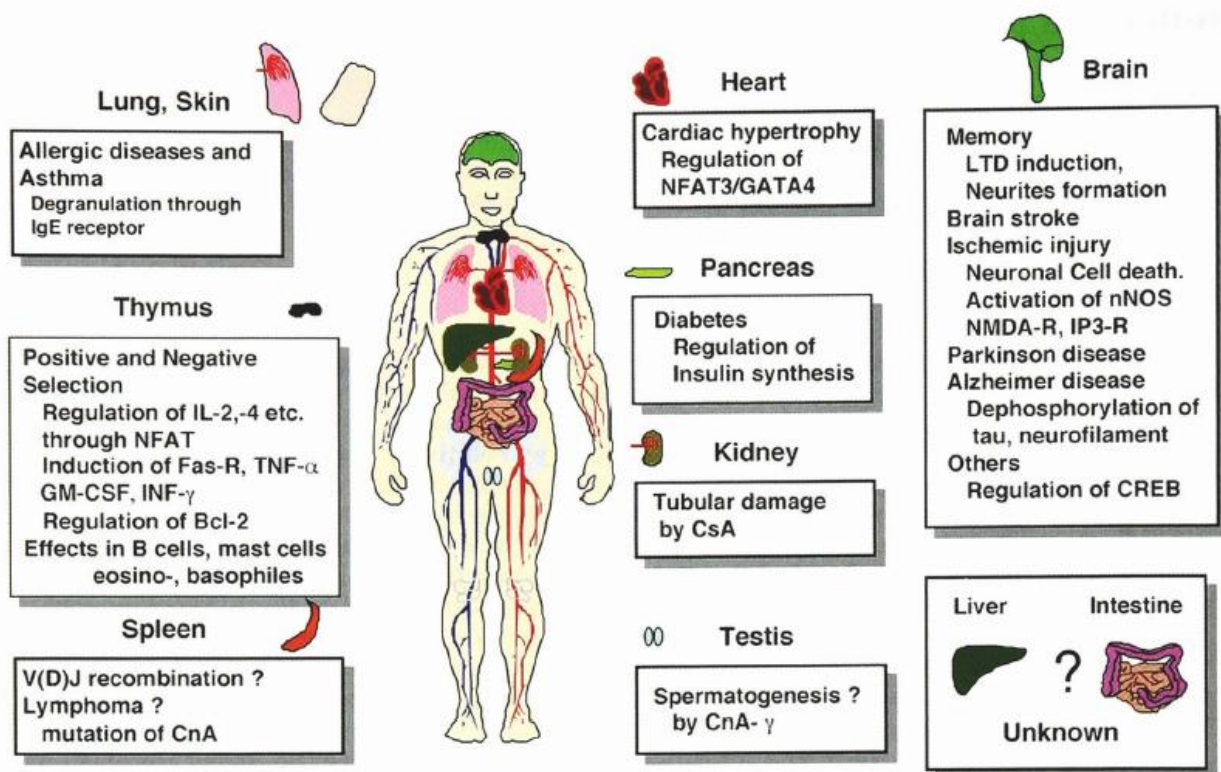


Figure 3 : Localisation de la calcineurine dans les différents organes et principales fonctions associées.

(D'après Shibasaki et *coll.* 2002 (38))

I.2.2.a. Rôle de la calcineurine au niveau du cerveau

Au niveau du cerveau, la calcineurine semble impliquée dans de nombreux processus physiologiques essentiels tels que le relargage de neurotransmetteurs au niveau des synapses, le développement et la maturation des réseaux neuronaux, la plasticité synaptique, l'excitabilité neuronale ainsi que les processus de mise en place de la mémoire. Des études ont montrées aussi qu'elle interviendrait dans certaines pathologies comme la maladie d'Alzeihmer, la maladie de Huntington ou encore la maladie de Parkinson.

Au niveau cellulaire, la calcineurine est principalement cytoplasmique et peut être liée aux éléments du cytosquelette. Les travaux de Goto et *coll.* sont les premiers à avoir impliqué la calcineurine dans la régulation du cytosquelette neuronal. Ils ont mis en évidence la capacité de la CaN à contrôler l'assemblage/désassemblage des microtubules (39).

Depuis, d'autres travaux ont confirmés le rôle de la CaN dans le contrôle direct de l'assemblage des microtubules, en participant à la déphosphorylation de la tubuline et de protéines associées aux microtubules telles que la protéine Tau ou MAP-2 (39–41). La CaN participe également à l'organisation des neurofilaments dans des neurones cultivés *in vitro* (42,43). Parallèlement, la CaN est aussi impliquée dans la croissance neuritique. Ce processus nécessite des réarrangements du cytosquelette, principalement via une réorganisation de l'actine et des microtubules, en réponse à des stimuli extracellulaires. Il a été mis en évidence que la CsA et le TAC inhibent l'élongation des axones dans des macroneurones du cervelet (40) et induisent un raccourcissement des neurites produits par des neurones de la chaîne dorsale ganglionnaire en culture (44). De plus, une inactivation locale et transitoire de la CaN conduit à la rétractation des cônes de croissance et à une déviation de l'axe de croissance suggérant une implication de la CaN dans la mise en place et la motilité des filopodes (44).

Plus récemment, il a été démontré que la calcineurine participait également au développement de la LFD (Low Frequency Depression) ou de la LTD (Long Term Depression) selon son état d'activation et sa localisation pré- ou post-synaptique. Cette action passerait par une régulation des états de phosphorylation de la tubuline et de l'actine (45).

La calcineurine joue un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie calcique associée au fonctionnement du cerveau. L'activation de la calcineurine consécutive à une dérégulation de l'homéostasie calcique a été montrée comme étant corrélée aux changements de la fonction neuronale liés à l'âge, comme le déclin des fonctions cognitives et la diminution de la mémoire. Cette suractivation de la calcineurine pourrait conduire à des phénomènes d'excitotoxicité responsables de la neurodégénération (46,47).

La calcineurine jouerait également un rôle dans la maladie d'Alzheimer. Cette hypothèse est supportée par le fait que les inhibiteurs de la calcineurine induisent une

hyperphosphorylation de la protéine Tau dans le cerveau de souris, conduisant à l'agrégation de cette protéine. De plus, des données issues d'études postmortem du cortex cérébral de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont montrées une diminution de l'activité de la calcineurine dans certaines zones, diminution corrélée avec la formation d'agrégats (48,49). Enfin, la calcineurine pourrait être en partie responsable de la perte de neurones puisqu'il est admis qu'une activité élevée de calcineurine sensibilise les cellules à l'apoptose (50).

Enfin, une particularité du cerveau par rapport aux autres tissus est l'expression de l'isoforme CnA γ dans certaines zones. Celle-ci serait potentiellement impliquée dans le développement de la schizophrénie, puisque des études ont montrée dans différents groupes ethniques que des polymorphismes au niveau du gène codant cette isoforme serait associée à l'apparition de la schizophrénie (51).

I.2.2.b. Rôle de la calcineurine au niveau du cœur

Dans les tissus musculaires squelettiques, aussi bien qu'au niveau du muscle cardiaque, le Ca^{2+} est un second messager essentiel à la réponse et à l'adaptation des cellules aux stimuli environnementaux.

Au niveau cardiaque, la voie de signalisation calcineurine/NFAT joue un rôle essentiel dès la phase de développement embryonnaire du coeur. L'activation de la calcineurine régule notamment la production de protéines nécessaires à la maturation et au remodelage des cardiomyocytes (52). De plus, une délétion du gène codant pour le facteur NFATc1 chez les souris provoque une altération de la morphogénèse, et notamment une malformation des valves cardiaques (53).

Le rôle le mieux établi de la calcineurine au niveau du cœur reste cependant son implication dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. Cette pathologie est caractérisée par une réorganisation du réseau de microtubules ainsi que par une surexpression d' α -tubuline, de β 1-tubuline (54,55) et de β -actine dans certains modèles

d'hypertrophie (56). De plus l'expression de la desmine est augmentée dans des modèles animaux d'hypertrophie cardiaque (57), mais également chez l'humain où elle apparaît désorganisée. La vimentine est également surexprimée et cette augmentation est corrélée à l'augmentation de la fibrose (58).

Des études ont montré que l'activité enzymatique de la CaN ainsi que l'expression de cette dernière sont significativement augmentées dans le cœur de différents modèles animaux d'hypertrophie cardiaque (59,60) ainsi que chez l'humain (61,62). Il y a plus de 10 ans, Molkenin et *coll.* ont montrés dans différents modèles de rongeurs, que la surproduction de calcineurine conduisait à une importante hypertrophie cardiaque, et au final, à une insuffisance cardiaque. Les cardiomyocytes apparaissent désorganisés et hypertrophiques avec une importante caryomégalie et une dégénération des myofibres (63). De plus, ces travaux utilisant des souris transgéniques exprimant une forme constitutivement active du NFAT3 au niveau du cœur ont mis en évidence une hypertrophie cardiaque très prononcée ainsi qu'une augmentation de la fibrose (63), soulignant l'implication de ce facteur NFAT3.

L'inhibition pharmacologique de la calcineurine permet de prévenir le développement de cette hypertrophie, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ainsi, Sussman et *coll.* ont démontré que l'utilisation d'inhibiteurs de la calcineurine permet de prévenir l'apparition des manifestations phénotypiques liées à l'hypertrophie cardiaque ainsi que la désorganisation des myofibres dans des modèles de souris transgéniques (60). D'autres études plus récentes ont mis en évidence qu'une inhibition de l'isoforme β la calcineurine A induit une diminution de la taille basale du coeur chez des souris (63).

I.2.2.c. Rôle de la calcineurine au niveau rénal

Plusieurs fonctions essentielles de la calcineurine ont été mises en évidence dans le rein, notamment dans les processus de croissance, de développement et de maturation du rein à des stades précoces. La calcineurine permet de relayer les signaux calciques générés par

des facteurs tels que Wnt, le TGF- β , l'angiotensine II et également la polycystine I dans le but d'activer le NFAT (64).

Des travaux réalisés par Gooch et *coll.* ont mis en évidence que l'isoforme α de la calcineurine A est essentielle au développement et à la fonction rénal, alors de l'isoforme β ne semble pas indispensable à la structure et à la fonction rénale. En effets, des souris transgéniques ne possédant pas l'isoforme α présentent des symptômes proches de ceux observés lors d'une néphrotoxicité induite par les inhibiteurs de la calcineurine, tels qu'une augmentation des concentrations rénales de TGF- β , une augmentation de la créatinine sérique, une accumulation de matrice extracellulaire, une fibrose et une dysfonction rénale. Des souris dépourvus de l'isoforme β présentent elles, une altération de la translocation du NFATc, suggérant un rôle différent des 2 isoformes (13,65,66).

Les travaux de Faul et *coll.* ont permis d'identifier une nouvelle cible de la CaN dans les cellules rénales. En effet, l'étude réalisée sur des podocytes a mis en évidence que la CaN déphosphoryle la synaptopodine, qui est une protéine impliquée dans la régulation de l'actine. Cette déphosphorylation par la CaN empêche la synaptopodine de se lier à des protéines chaperones et facilite ainsi sa dégradation. A ce niveau, la CsA, en empêchant la déphosphorylation de la synaptopodine bloque sa dégradation et favorise la stabilisation du cytosquelette d'actine (67).

I.2.2.d. Autres fonctions de la calcineurine

Au sein des autres organes, la CaN participe à différentes fonctions. Au niveau de la peau, il a par exemple été montré qu'une invalidation de la CaN induit une diminution de la réparation de l'ADN dans les kératinocytes. Elle semble aussi induire l'apoptose en déphosphorylant la protéine Bad (68,69). La CaN est également présente dans différents tissus de l'œil, notamment au niveau de la rétine, de la cornée et du nerf optique où elle est fortement exprimée (70). Enfin, la CaN participe entre autre au remodelage osseux, à l'activation des plaquettes où encore à la mobilité des spermatozoïdes (71–73).

II. Les inhibiteurs de la calcineurine

II.1. Historique

La découverte de médicaments ayant des propriétés immunosuppressives tels que la cyclosporine (CsA) et le tacrolimus (TAC) a révolutionné, depuis plusieurs décennies, la prise en charge des patients transplantés. Les inhibiteurs de la calcineurine (ICN), dont font partie la CsA et le TAC, constituent aujourd'hui la base de nombreux protocoles d'immunosuppression pour prévenir le rejet des greffons et leur utilisation a permis de réduire très sensiblement l'incidence des réactions de rejets aigus et d'améliorer la survie à court terme des greffons.

La CsA, initialement isolée en 1970 à partir d'un prélèvement réalisé dans le sol en Norvège, est synthétisée par un champignon microscopique, *Tolypocladium inflatum*. Il s'agit d'un peptide cyclique comportant des acides aminés N-méthylés et un acide aminé dérivé de la méthylsérine en C9. Son action suppressive de la réponse immunologique a été mise en évidence chez l'animal en 1976 par Borel et coll. (74).

L'introduction de la CsA en transplantation rénale dès la fin des années 70 a permis un essor considérable en prévenant le rejet aigu des allogreffes et favorisant ainsi la survie à long terme des patients transplantés. Aujourd'hui encore, la CsA est largement utilisée dans le domaine de la transplantation.

La tacrolimus (TAC), aussi appelée FK506 ou encore Fujimycine a été isolé en 1984 à partir de prélèvements de sol réalisés au Japon et contenant des bactéries *Streptomyces tsukubaensis*. C'est un macrolide, du genre des lactones. Le nom de cette molécule résulte de la contraction de la ville où il a été découvert (Tsukuba), de sa classe chimique (macrolide) et de ses propriétés immunosuppressives (**Tsukuba macrolide immunosuppressant**). La découverte de ses propriétés immunosuppressives a rapidement conduit à son utilisation en transplantation rénale, hépatique et également cardiaque, tout comme la CsA (75–77). Bien que la structure chimique du TAC soit très différente de celle

de la CsA (figure 4), leur mode d'action est similaire et le TAC provoque des lésions semblables à celle observées chez les patients traités à la CsA.

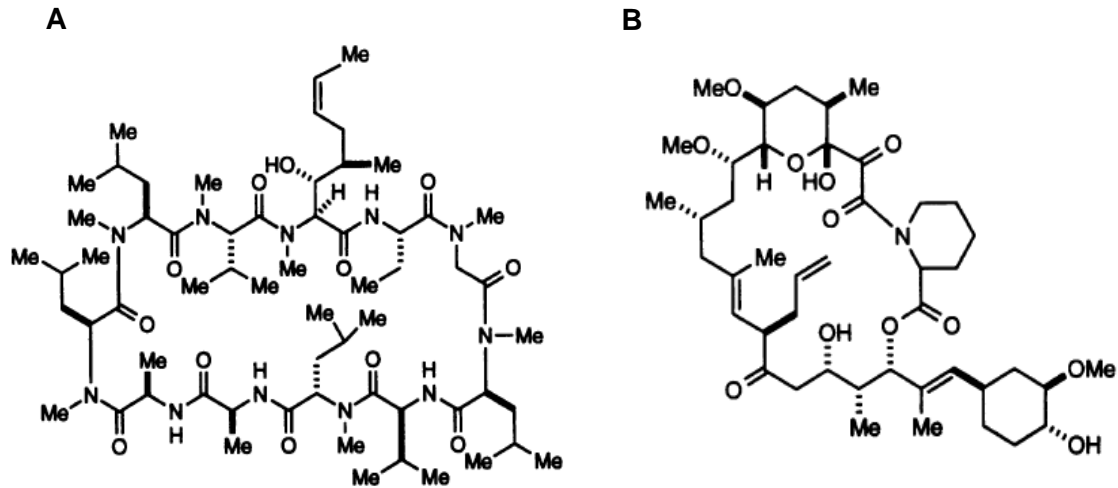


Figure 4 : Structure chimique de la cyclosporine (A) et du tacrolimus (B)

D'après Clardy J., 1995 (78)

II.2. Mode d'action pharmacologique des inhibiteurs de la calcineurine

L'action pharmacologique de la CsA et du TAC passe par l'inhibition d'une protéine cible commune, la calcineurine. Une fois à l'intérieur des cellules, la CsA et le TAC forment des complexes avec les immunophilines, respectivement les cyclophilines et la protéine FKBP12 (22,23).

La cyclophiline A (CyP A, codée par le gène PPIA) et la cyclophiline B (CyP B, codée par le gène PPIB) sont les isoformes les plus abondantes au niveau cellulaire et présentent, avec la protéine FKBP12 (codée par le gène FKBP1A) une activité peptidyl-prolyl isomérase (ou rotamase) participant à la structure des protéines en catalysant la formation de ponts disulfures. La CyP B est localisée au niveau du réticulum endoplasmique, alors que la CyP A et la protéine FKBP12 sont cytoplasmiques (79,80).

Une fois formés, les complexes CsA-cyclophiline et TAC-FKBP interagissent avec la calcineurine et inhibent son activité phosphatase. Cette inhibition empêche l'action de la calcineurine sur le NFAT, et donc bloque la translocation du NFAT au noyau. L'IL-2 n'est alors plus transcrite et ne peut pas exercer ses effets sur la prolifération lymphocytaire. Ce mode d'action est résumé dans la figure 5.

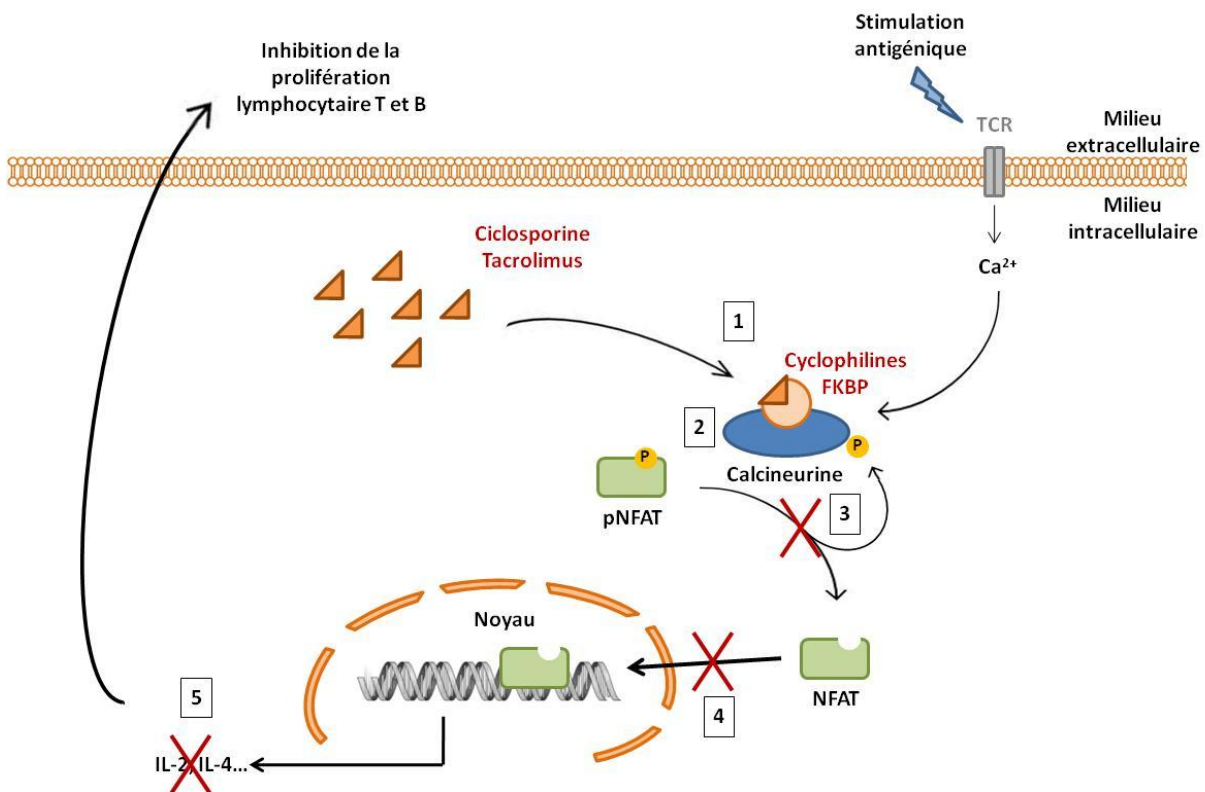


Figure 5 : Représentation schématique du mode d'action des inhibiteurs de la calcineurine.

1 : formation d'un complexe ICN/immunophilines, 2 : Inhibition de l'activité phosphatase de la calcineurine, 3 : Inhibition de la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT, 4 : Inhibition de la translocation nucléaire du NFAT, 5 : blocage de la transcription des cytokines pro-inflammatoires. (D'après thèse F. Lamoureux (81))

II.3. Néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine

L'apparition des inhibiteurs de la calcineurine comme traitements administrés aux patients transplantés a fortement amélioré la survie à court terme du greffon. Cependant,

leur utilisation est grandement limitée de part l'importance de leurs effets secondaires, et particulièrement de leur néphrotoxicité. Concernant la CsA, cette néphrotoxicité a été rapidement mise en évidence chez des patients transplantés rénaux et hépatiques (82,83), alors que les premières études réalisées chez l'animal n'avaient pas relevé de tels effets (84,85). L'introduction du tacrolimus étant plus récente, il existe moins de données disponibles mais il provoque des lésions histologiques similaires à celles observées avec la CsA.

La toxicité induite par les ICN peut être divisée en deux types : une toxicité aiguë principalement vasculaire, et une toxicité chronique due à une utilisation prolongée des ICN et aboutissant à des lésions irréversibles. Les mécanismes moléculaires complexes impliqués dans la néphrotoxicité chronique rendent la compréhension de ce phénomène difficile. La toxicité des ICN varie fortement d'un individu à l'autre, et l'essor du suivi pharmaceutique avec l'adaptation et la réduction des doses administrées a permis de diminuer fortement l'incidence de la néphrotoxicité aiguë. La néphrotoxicité chronique reste, elle, une des causes majeures non immunologiques de pertes du greffon (86,87).

II.3.1. Néphrotoxicité aiguë des inhibiteurs de la calcineurine

La toxicité aiguë due aux immunosuppresseurs apparaît rapidement après la transplantation, et ce même à des doses pharmacologiques d'ICN. Elle est caractérisée par une toxicité fonctionnelle réversible en diminuant les doses d'inhibiteurs de la calcineurine administrées. Cette toxicité fonctionnelle résulte des phénomènes de vasoconstriction et de diminution du débit de filtration glomérulaire induits par les ICN, et se traduit par une créatinine sérique élevée. Au niveau histologique, bien qu'aucune lésion ne soit spécifique, cette toxicité entraîne des altérations vasculaires et tubulaires, avec notamment une artériolopathie, des microangiopathies thrombotiques (figure 6 B) ainsi qu'une tubulopathie toxique avec présence de vacuoles (figure 6 A).

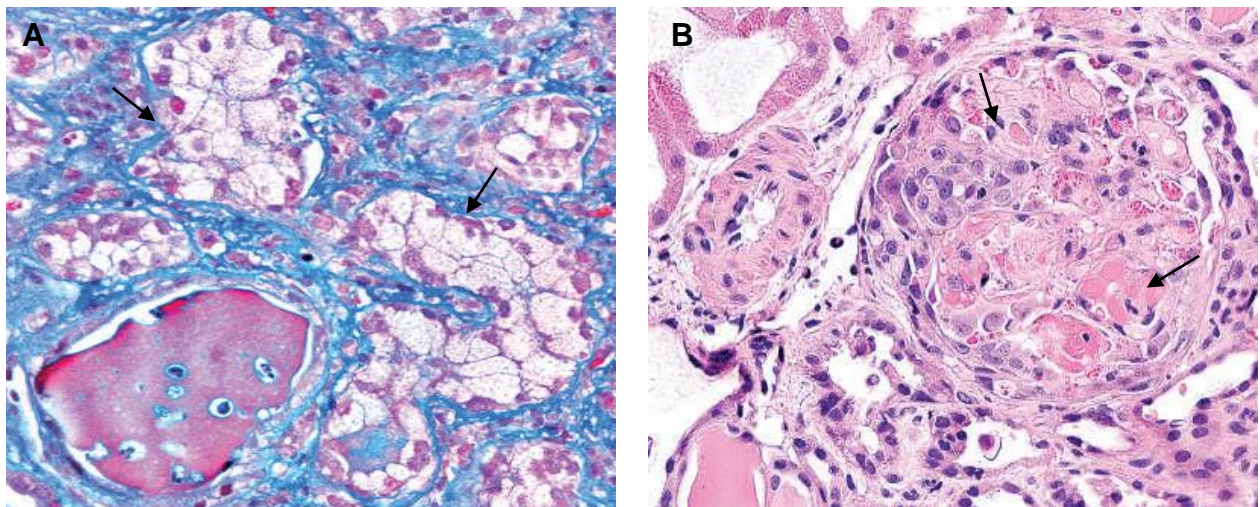


Figure 6 : Biopsie rénale montrant les lésions histologiques caractéristiques de la toxicité aiguë des ICN.

(A) Vacuolisations tubulaires : les vacuoles sont petites et distribuées de manière homogène dans le cytoplasme des myocytes et des cellules tubulaires proximales (trichrome, x200). (B) Microangiopathies thrombotiques induites par la CsA. Présence de dépôts hyalins dans la lumière des artérioles et des capillaires glomérulaires (Hématoxyline/Eosine, x400) (D'après Liptak et Ivanyi, 2006 (88))

Lésions vasculaires

Au niveau vasculaire, la néphrotoxicité s'exerce directement sur les cellules endothéliales. Sous l'effet des immunosuppresseurs, la libération de facteurs vasoactifs est modifiée, avec une augmentation des facteurs vasoconstricteurs tels que l'endothéline ou le thromboxane (89,90), une activation du système rénine-angiotensine (91,92) et une diminution de la synthèse de facteurs vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline et la prostaglandine E2 (93–95). Histologiquement, les biopsies de patients montrent une vasoconstriction des artérioles efférentes mais aussi et surtout, des artérioles afférentes pré-glomérulaires, avec un gonflement marqué et une vacuolisation des cellules endothéliales. Ces lésions conduisent à une diminution significative aboutissant à terme à une réduction du débit de filtration glomérulaire et à une dysfonction rénale (96,97).

La deuxième atteinte vasculaire pouvant résulter d'un traitement aux ICN est la micro-angiopathie thrombotique (MAT). Plus rares ces lésions se caractérisent essentiellement par la présence de thromboses fibrineuses glomérulaires et artériolaires plus ou moins étendues. Les lumières des capillaires glomérulaires contiennent quelques polynucléaires neutrophiles et parfois des agrégats plaquettaires. L'atteinte peut devenir systémique et se caractérise alors par un syndrome hémolytique et urémique. Ces lésions ne sont pas spécifiques de la toxicité des ICN et, de nombreux facteurs peuvent être à l'origine de telles lésions, il est donc important d'éliminer les autres causes possibles (infections, rejet humoral aigu, tumeurs malignes) (88,98).

Tubulopathie toxique

Histologiquement, la néphrotoxicité des inhibiteurs est également associée à une vacuolisation isométrique tubulaire, résultant d'une expansion du réticulum endoplasmique et d'une augmentation des lysosomes, retrouvée aussi bien chez l'homme que chez l'animal (99,100). Il est intéressant de noter que cette vacuolisation peut être présente même en l'absence de dysfonction du greffon et ne serait pas associée à la progression vers une toxicité chronique de la CsA et du tacrolimus (101). Le mécanisme par lequel les ICN induisent cette vacuolisation reste flou, mais elle pourrait être la conséquence de l'ischémie causée par la vasoconstriction. Cependant, la possibilité d'une action directe de l'inhibition de la calcineurine dans les cellules tubulaires proximales rénales ne peut être exclue (102).

II.3.2. Néphrotoxicité chronique des inhibiteurs de la calcineurine

La néphrotoxicité chronique des ICN reste le problème majeur des traitements immunosuppresseurs. Cette forme chronique survient en général plusieurs mois ou années après la transplantation et se caractérise par le développement de lésions structurales irréversibles pouvant conduire à une insuffisance rénale terminale. L'apparition de ces lésions est fréquente et leur incidence augmente avec la durée post-transplantation, pouvant atteindre, après 10 ans, jusqu'à 100% des patients transplantés (86). Au niveau clinique, elle est caractérisée par une augmentation lente des concentrations de créatinine sérique, une hypertension et parfois une protéinurie. Certains patients présentent également des concentrations élevées d'ICN dans leur sérum (88). Au niveau histologique, la toxicité chronique a été décrite pour la première fois par Myers *et coll.* en 1984, sur des biopsies rénales de patients transplantés cardiaques. Dans cette étude, il a été mis en évidence des atteintes de la structure rénale, avec présence d'une fibrose tubulo-interstitielle et d'une atrophie tubulaire, accompagnée de lésions de glomérulosclérose (103). Des travaux réalisés plus tard ont permis de confirmer ces effets des inhibiteurs de la calcineurine sur la morphologie rénale. La comparaison entre CsA et Tac a montré des changements morphologiques similaires, indiquant une implication de l'inhibition de la voie calcineurine dans le développement de ces lésions. Seules des différences cliniques entre ces deux drogues ont été mises en évidence, telles qu'une hypertension moins prononcée chez les patients exposés au Tac, ou encore des concentrations de glucose sanguin plus faibles chez les patients traités à la CsA (104–106). Ces études ont permis de montrer que les trois compartiments du rein peuvent être affectés de manière irréversible par les ICN : les vaisseaux, l'interstitium tubulaire et le glomérule (figure 7).

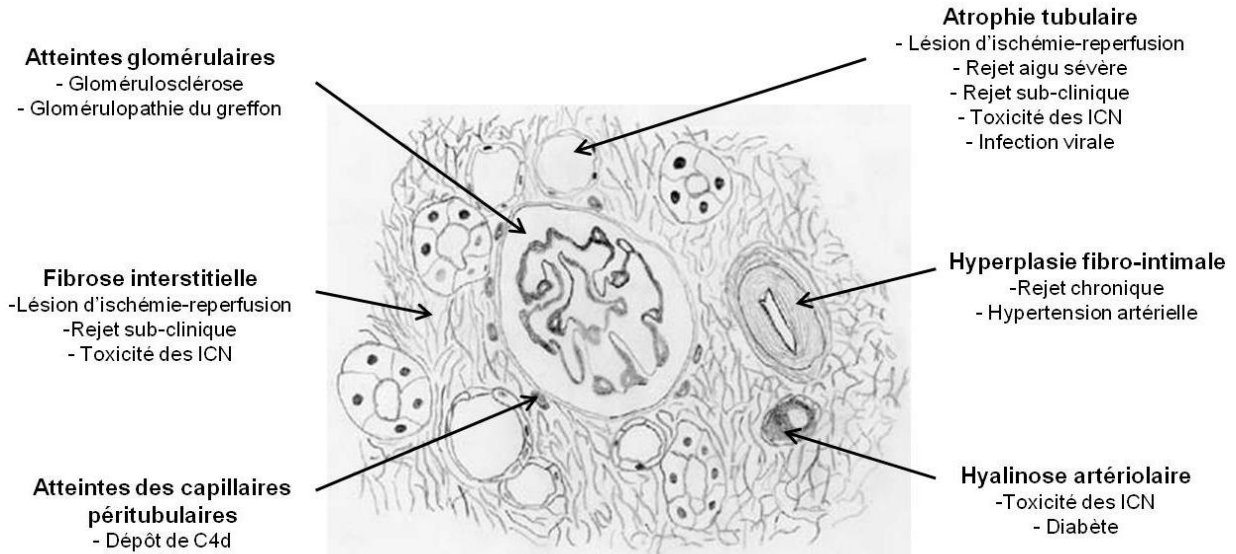


Figure 7: Schéma d'une biopsie rénale représentant les différentes lésions histologiques de la dysfonction chronique du greffon ainsi que les facteurs favorisant leur apparition.

(D'après Alexander et coll., 2007) (107)

Artériolopathie hyaline

Elle débute la plupart du temps entre 3 et 12 mois post-transplantation et reste le marqueur principal de la néphrotoxicité chronique des ICN. Elle est fréquemment associée à une concentration résiduelle de CsA élevée (>200ng/ml) et touche principalement les patients ayant reçu de fortes doses de CsA (5mg/kg/j) dans les 5 premières années post-transplantation. Histologiquement cette lésion se traduit par une atteinte des artéoles afférentes des artères interlobulaires. Les myocytes vacuolisés présents pendant la phase de toxicité aiguë se nécrosent et sont progressivement remplacés par des dépôts protéiques hyalins. Dans les stades les plus avancés, ces dépôts protéiques peuvent être tellement abondants qu'ils entraînent une obstruction totale de la lumière. Habituellement considérée comme étant irréversible, une réduction de posologie ou un arrêt complet du traitement aux ICN pourrait faire régresser totalement les lésions observées (108,109).

Fibrose interstitielle et atrophie tubulaire

L'exposition chronique aux ICN induit des lésions de l'interstitium avec apparition d'une fibrose associée à une atrophie tubulaire. Celles-ci résultent de l'hypoxie secondaire à la vasoconstriction et due elle-même à l'artériolopathie (104,105). Dans un premier temps les lésions sont localisées au niveau des rayons médullaires et présentent un aspect typique en bandes. Ces lésions apparaissent entre 3 et 12 mois post-transplantation et se retrouvent chez 94% des patients un an après greffe (86). Par la suite, ces lésions progressent et deviennent diffuses, avec apparition d'un infiltrat lymphoïde (105). L'aspect en bandes des lésions de fibroses est caractéristique, mais pas spécifique de la toxicité des ICN puisqu'une hypertension rénale provoque des lésions similaires. L'atrophie tubulaire se caractérise par une augmentation de la taille de la lumière des tubules.

Atteintes glomérulaires

L'exposition répétée des cellules rénales aux ICN conduit à l'apparition de diverses atteintes glomérulaires, qui ne sont cependant pas spécifiques de la dysfonction chronique du greffon. La persistance de l'artériolopathie hyaline induite par les ICN conduit au développement d'une glomérulosclérose ischémique (110). D'autres lésions glomérulaires moins spécifiques sont également présentes lors d'une néphrotoxicité des ICN : lésions de sclérose segmentale et focale, hypertrophie glomérulaire compensatrice, collapsus capillaire ou encore apparition de glomérules atubulaires. Les lésions de sclérose segmentaire et focale semblent résulter d'une hyperfiltration glomérulaire en réponse à une perte du nombre de néphrons fonctionnels plus que d'un effet toxique direct sur les cellules (105,111). Les glomérules atubulaires se développent suite aux dommages tubulaires et sont déconnectés de leur tubule proximal. Ils sont plus petits et présentes souvent une fibrose périglomérulaire (capsule fibrotique) (112,113).

II.1. Principaux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la toxicité des inhibiteurs de la calcineurine

L'ensemble des mécanismes moléculaires et cellulaires induits par les ICN et conduisant à une néphrotoxicité, aiguë ou chronique, est encore mal connu. Cependant, on distingue des effets toxiques directs et indirects sur les cellules rénales (114). Des travaux réalisés aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ont permis de mieux comprendre certains mécanismes liés à cette toxicité. De plus ces travaux suggèrent que la néphrotoxicité des ICN, et notamment de la CsA pourrait passer par d'autres voies indépendantes de l'inhibition de la calcineurine (103,115,116).

II.1.1. Prolifération cellulaire et apoptose

II.1.1.a. Effets de la CsA sur la prolifération cellulaire

De nombreux travaux ont mis en évidence un effet dose-dépendant de la CsA sur la prolifération cellulaire, et ce dans différents types cellulaires tels que des cellules mésangiales, des cellules endothéliales ou encore des cellules rénales (117–119). Les travaux réalisés par Jennings et *coll.* ont montrés une diminution de la prolifération de lignées tubulaires rénale (HK-2) et de culture primaire de cellules tubulaires proximales. Cet arrêt de la prolifération est secondaire à une augmentation de l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire, une diminution de la synthèse d'ADN et un arrêt de la croissance en phase GO/G1. Les effets de la CsA sur la prolifération semblent associés à une augmentation de la sénescence cellulaire favorisée par l'activation des protéines p53 et p16 (120)

II.1.1.b. Effets de la CsA sur l'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique complexe impliquant de nombreux acteurs ayant un rôle physiologique prépondérant dans le maintien de l'homéostasie. Cependant, ce processus peut devenir excessif et induire alors une perte anormale de cellules et un remaniement du tissu rénal (121,122).

L'étude de biopsies rénales de patients transplantés présentant des signes de néphropathie chronique induite par les ICN a permis de mettre en évidence une perte progressive de cellules due à des phénomènes d'apoptose. Il a été mis en évidence que cette apoptose était corrélée à l'apparition de certaines lésions spécifiques comme le développement de la fibrose interstitielle dans un modèle de néphropathie chronique chez le rat (123). Ces résultats ont depuis été confirmés aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, sur des cellules tubulaires proximales murines et porcines (124–126). Les mécanismes par lesquels la CsA induit une augmentation de la mort cellulaire par apoptose semblent nombreux. Les travaux menés par Shihab et *coll.* en 1999 et de Yang et *coll.* en 2002 ont porté sur l'étude des gènes régulant l'apoptose et ont clairement montré une augmentation de la transcription et de l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que Fas/Fas-L, p53, bax/bcl-2, p16 ou encore la caspase-3 (127,128).

L'ensemble des travaux menés *in vitro* ou sur des modèles animaux a permis de mettre en évidence que l'apoptose induite par les ICN passait principalement par la voie « mitochondriale » ou « intrinsèque ». En effet, l'exposition à la CsA entraîne une diminution de l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que bcl-2 associée à une augmentation de la production de protéines pro-apoptotiques telles que Bax (129). Bax est alors transloqué à la mitochondrie et induit la libération de facteurs pro-apoptotiques (Smac/Diablo, cytochrome c) entraînant l'activation de la cascade des caspases spécifique de la voie apoptotique mitochondriale (caspases -2, -3 et -9) (130). Cependant, la CsA est également considérée comme un facteur anti-apoptotique puisqu'il a été montré qu'elle inhibe le pore de transition mitochondrial (131)

II.1.2. Vasoconstriction induite par les ICN

Les phénomènes de vasoconstriction sont principalement localisés au niveau pré-glomérulaire et résultent d'un déséquilibre entre facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs. Ce déséquilibre provoque alors une diminution du débit plasmatique rénal et

du coefficient d'ultrafiltration aboutissant à une baisse du débit de filtration glomérulaire. (96). Cette vasoconstriction prolongée a pour conséquences une hypoxie participant et aggravant l'apparition des lésions histologiques due aux ICN.

II.1.2.a. Activation du système rénine-angiotensine-aldostérone

La CsA est connue pour induire une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Cet effet passe par une action directe sur les cellules juxta-glomérulaires, en stimulant la production et la sécrétion de rénine (132). L'activation de la renine conduit à la synthèse locale d'angiotensine II qui a un rôle prépondérant dans le développement de lésions de néphrotoxicité. De plus, son effet vasoconstricteur aggrave les troubles hémodynamiques causés par les ICN. La quasi-totalité des effets physiologiques ou pathologiques de l'Ang II tels que la vasoconstriction, la production d'aldostérone, la stimulation du transport tubulaire ainsi que ses effets pro-fibrogéniques passent par son récepteur AT-1 (133). Il a été montré dans des modèles de rats que l'administration d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion ACE (responsable de la production d'Ang II) ou d'un antagoniste du récepteurs AT-1 permettait de prévenir l'apparition de lésions rénales induites par la CsA (134).

II.1.2.b. Modification de la production de facteurs vasoactifs

La toxicité induite par la CsA pourrait être augmentée à travers une perturbation de l'équilibre des substances vasoactives, allant dans le sens d'une prédominance des facteurs vasoconstricteurs.

Parmi les facteurs vasoconstricteurs, la CsA est à l'origine de l'augmentation de l'endothéline, du thromboxane ou encore de l'angiotensine II décrite précédemment. Concernant l'endothéline, son rôle a pu être mis en évidence lors de travaux menés chez le rat, montrant que l'utilisation d'anticorps bloquant l'endothéline diminuait la vasoconstriction due à la CsA (135). Ces résultats ont été précisés lors de travaux démontrant que le blocage des récepteurs de l'endothéline prévenait les effets de la CsA sur la vasoconstriction des

artérioles afférentes (136,137). Chez l'homme, il a été montré que les concentrations plasmatiques d'endothéline et de ECE (endothelin-converting enzyme) était plus élevées chez les patients transplantés ayant reçu un traitement immunosuppresseur à base de CsA ou de Tac (138). Le thromboxane A2 a également été mis en cause dans les processus de vasoconstriction induits par les ICN puisque le blocage de son récepteur, limite les effets vasoconstricteurs dus à la CsA (139)

Au niveau rénal, le principal facteur vasodilatateur est le monoxyde d'azote (NO), qui joue un rôle essentiel dans le maintien du tonus vasculaire. Il est produit par l'action de la NO-synthase (NOS), présente sous 3 formes différentes, la nNOS (neuronale), la iNOS (inductible) et la eNOS (endothéliale). Ces 3 isoformes se retrouvent dans le rein : nNOS est principalement exprimée par les cellules de la *macula densa*, iNOS par les cellules mésangiales et tubulaires proximales et eNOS par les cellules endothéliales des artérioles et des capillaires (140,141). Des modèles de rats exposés chroniquement à la CsA ont permis de déterminer la capacité de la CsA à modifier l'expression des différentes isoformes de NOS (142,143). Des travaux ultérieurs ont également montrés une diminution de la production de NO par les ICN, aussi bien sur des cultures de cellules tubulaires proximales (144) que chez des patients transplantés (145). Les ICN ont la capacité de réduire l'activité de la NO synthase endothéliale (eNOS) par différents mécanismes, en particulier en empêchant la déphosphorylation calcineurine-dépendante de la eNOS normalement induite par certains facteurs de croissance comme le VEGF (146). De plus, la CsA est connue pour induire la formation de radicaux libres, eux même responsables d'une diminution de la biodisponibilité du NO (147,148). Cette diminution de la biodisponibilité et de la synthèse de NO entrainerait une diminution de la vasodilatation qui est un des principaux mécanismes conduisant à l'hypertension et à la chute du débit de filtration glomérulaire(149).

Enfin, il a été montré que la CsA induisait un déséquilibre entre les métabolites vasoconstricteurs et vasodilatateurs de l'acide arachidonique (eicosanoïdes). Ainsi, il a été montré une régulation de la cyclooxygénase-2 (COX-2) dont le promoteur contient un site de

liaison pour le facteur de transcription NFAT (150). Les travaux réalisés par Höcherl et *coll.* ont mis en évidence une inhibition de l'expression rénale de COX-2 chez les rats traités à la CsA et au Tac (151). De plus, de nombreuses similarités ont été mises en évidence entre les effets des ICN et des inhibiteurs de COX-2 telles que la vasoconstriction des artérioles afférentes, la réduction du débit de filtration glomérulaire ou encore la rétention potassique et sodique (152,153).

II.1.3. Stress oxydant

Il a été mis en évidence que la CsA possède la capacité de générer un stress oxydant aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (154,155). Ce stress résulte d'un déséquilibre de la balance entre la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) et les mécanismes antioxydants. Au niveau du rein, la production de ROS serait impliquée dans l'apparition de lésions de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire suite à une exposition chronique à la CsA (156). Ces ROS sont produites au niveau tubulo-interstitiel suite aux phénomènes hypoxiques provoqués par la vasoconstriction induite par les ICN. Plusieurs études ont mis en évidence des augmentations de différentes ROS au niveau rénal, et plus particulièrement dans les cellules tubulaires proximales de rats traités à la CsA et présentant des lésions de FI-AT (157). La toxicité de la CsA pourrait en partie être expliquée par la production de radicaux libres qui à leur tour activeraient des voies de signalisation comme la voie de la PI3K (phosphoinositide-3-kinase) ou la voie des MAP kinases (158). Très récemment, il a été démontré dans des cellules mésangiales que l'inhibition de la voie ERK1/2 diminuait la production de ROS induite par la CsA suggérant un rôle important de cette voie dans la médiation du signal de stress (155). L'inhibition de la voie ERK1/2 atténue également les altérations de la barrière épithéliale rénale due à la CsA (159).

II.1.4. Effets sur le TGF- β

Le TGF- β est un facteur clé dans le développement de différentes pathologies rénales caractérisées par une fibrose interstitielle. Plus de 70% des biopsies rénales de patients transplantés et présentant des signes de FI-AT ont une expression élevée de TGF- β (160). Son expression dans les cellules tubulaires proximales ainsi que dans les fibroblastes est directement stimulée par la CsA mais aussi par le Tac (161–163). Son action pro-fibrogène s'exerce, au moins en partie, via sa capacité à diminuer la dégradation et à augmenter la production de protéines de la matrice extra-cellulaire (MEC) (164). Le TGF- β stimule directement la transcription de gènes codant des protéines de la MEC, aussi bien par les cellules mésangiales, endothéliales et tubulaires comme la fibronectine, le collagène ou les métalloprotéinases (163). Les effets pro-fibrotiques du TGF- β passent également par l'induction du CTGF (connective tissue growth factor) qui stimule la prolifération des fibroblastes et la synthèse de MEC (165).

II.1.5. Transition épithélio-mésenchymateuse

La TEM est un processus déclenché par de nombreux stimuli extracellulaires dont le principal acteur reste le TGF- β . Les travaux réalisés par Slattery et *coll.* ont montré que l'exposition de cellules tubulaires proximales humaines à la CsA pouvait induire une TEM, et que ce phénomène était lié à la production de TGF- β et à son action autocrine. En effet, la CsA entraîne une désorganisation des jonctions cellulaires, une expression *de novo* d' α -SMA ainsi qu'une augmentation de la motilité cellulaire qui sont des signes caractéristiques de la TEM (166). De plus, ces résultats indiquent que la CsA induit une modification de l'expression de nombreux gènes dont le gène E2A codant pour les facteurs de transcription E2 et E47. Ces facteurs ont été impliqués dans l'induction de la TEM aussi bien *in vitro* sur des cellules MDCK, qu'*in vivo*, où il a été montré qu'ils étaient capables d'inhiber l'expression de la E-cadhérine et d'induire celle de l' α -SMA (167). D'autres travaux ont également permis de mettre en évidence une augmentation du CTGF, une des cibles du TGF- β , dans des

cellules traitées à la CsA confirmant que la TEM induite par la CsA résulte bien d'une action sur le TGF- β (168). Enfin, des données récentes obtenues par l'étude de biopsies de patients transplantés montrent que les patients ayant reçus de la CsA présentent des signes de TEM avec une progression de lésions de FI-AT et une diminution du DFG plus importante à 12 mois que les patients ayant reçu un traitement sans CsA (169).

La TEM est un processus complexe, impliquant de nombreux acteurs et ayant un rôle central dans l'apparition de la fibrose. La figure 8 récapitule, de manière non-exhaustive les principales voies responsables de la TEM.

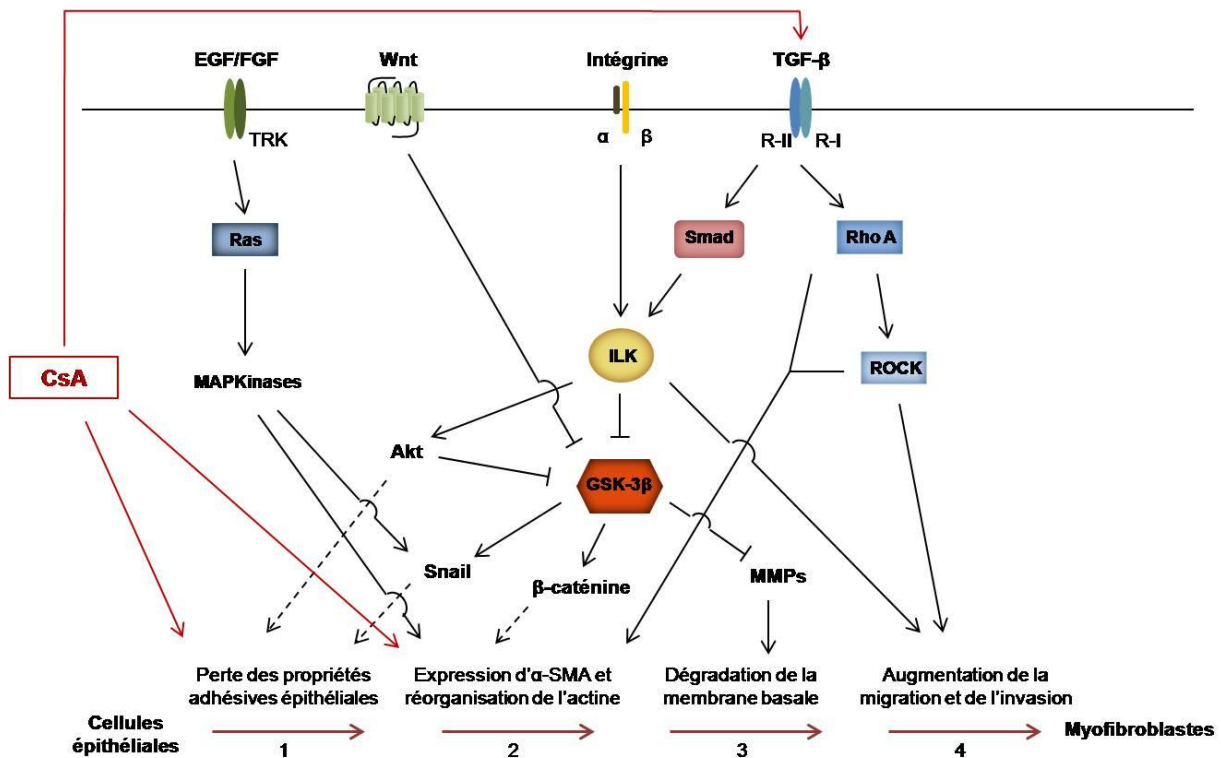


Figure 8 : Schéma récapitulatif des différents acteurs moléculaires participant à la TEM et implication de la CsA.

Les voies de signalisation impliquées vont exercer leurs effets à différents niveaux du processus de TEM et participent ainsi à la transformation de cellules épithéliales en cellules fibroblastiques, responsables de la fibrose rénale. D'après Liu Y. 2004 (170).

II.1.6. Stress du réticulum endoplasmique et autophagie

II.1.6.a. Stress du réticulum et réponse adaptative

Les protéines sécrétées, membranaires ou retrouvées dans les organites intracellulaires, sont pour leur majorité synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) où elles sont repliées et assemblées en complexes multi-protéiques de façon à acquérir une conformation efficace avant leur transport vers leur site d'action (171). Le repliement de ces protéines est réalisé au niveau de la lumière du RE et nécessite l'intervention de protéines chaperonnes résidentes du RE, telles que la calnexine, la protéine BiP (ou GRP78 : Glucose- Regulated Protein 78kDa), les protéines-disulfide isomérases ou encore la GRP94, qui préviennent d'éventuelles erreurs de repliement (172). A l'issue de ce processus, les protéines dont la conformation demeure inappropriée peuvent être retenues dans le RE, afin de subir une nouvelle action des protéines chaperonnes visant à acquérir une conformation adéquate, ou peuvent également être transloquées au niveau cytoplasmique où elles seront dégradées par le protéasome ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation).

Au cours de certaines conditions, l'accumulation de protéines mal ou insuffisamment repliées dans le RE peut être à l'origine d'une saturation des systèmes de repliement et/ou de dégradation de ces protéines et activer une réponse du réticulum endoplasmique. Les cellules soumises à un stress de ce type développent une réponse adaptative, appelée réponse UPR (Unfolded Protein Response) ayant pour but d'augmenter les capacités cellulaires de repliement et de dégradation des protéines. Cette réponse est donc un phénomène physiologique d'adaptation caractérisé d'une part, par l'activation de la transcription de gènes codant pour les chaperonnes, les protéines du système de dégradation ERAD et d'autre part, par une répression rapide et intense de la synthèse protéique limitant l'afflux de protéines néo-synthétisées dans le RE déjà saturé (173,174).

En cas de stress du RE intense et/ou prolongé, la réponse UPR peut s'avérer insuffisante et orienter la cellule vers un processus de mort cellulaire par apoptose, initiée par l'activation du

gène codant pour le facteur de transcription CHOP/GADD153 (173,175). D'une façon générale, les mutations ainsi que les erreurs transcriptionnelles ou traductionnelles peuvent altérer la conformation ou l'oligomérisation protéique et être à l'origine d'un stress du RE. Expérimentalement, le stress du RE est inductible par différentes substances chimiques telles que la tunicamycine (inhibiteur de la N-glycosylation), le dithiothréitol qui rompt les ponts disulfures, la bréfédine A qui bloque le transport protéique du RE vers l'appareil de Golgi ou encore la thapsigargine qui inhibe l'entrée de calcium dans le RE (176,177).

II.1.6.b. Autophagie induite par la cyclosporine

Des données récentes ont mis en évidence la capacité du stress du RE à induire l'autophagie sur des cellules rénales tubulaires proximales de rat (178). L'autophagie est un mécanisme physiologique cytoprotecteur par lequel la cellule tente de limiter les effets délétères liés au stress du RE en activant l'autodigestion de protéines et de certains organites intracellulaires (179,180). En situation de stress, l'autophagie permet donc d'augmenter la viabilité cellulaire en diminuant le niveau de protéines ayant une conformation incorrecte dans le RE et en les recyclant de manière à apporter des nutriments nécessaires aux fonctions cellulaires vitales, ainsi qu'en éliminant les organites cellulaires atteints (180). La capacité de la CsA à activer l'autophagie suite au stress du RE a été mise en évidence par Pallet et *coll.* en 2008, par analyse du marqueur de l'autophagie LC3II, sur des cultures primaires de cellules tubulaires humaines et *in vivo* par analyse immunohistochimique de coupes rénales chez le rat (181). Ce travail suggère que l'augmentation d'expression du marqueur LC3II est rapide, intense et corrélée à celle de BiP. De plus, l'augmentation de LC3II est associée à une augmentation du nombre d'autophagosomes au niveau des cellules tubulaires proximales. Enfin, l'inhibition par siRNA, de l'autophagie induite par la CsA conduit à une augmentation significative de la mortalité des cellules tubulaires rénales *in vitro* (181). L'ensemble de ces travaux suggère donc qu'une détection précoce de l'autophagie induite par la CsA, par une mesure du niveau d'expression de LC3II dans les prélèvements biopsiques de patients transplantés rénaux,

pourrait constituer une approche intéressante pour dépister la néphrotoxicité induite par la CsA et permettre d'anticiper l'apparition de lésions irréversibles induites par la CsA (réduction de posologie ou proposition d'une alternative thérapeutique par exemple).

II.2. Résumé des principaux mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité des ICN

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la néphrotoxicité des ICN, ainsi que la nature des lésions histologiques associées, apparaissent donc très complexes et variés. La figure 9 est un résumé des principaux effets, directs et indirects, des ICN et leurs conséquences sur la physiologie, l'histologie et la fonction rénale (114). Cette figure illustre la complexité des mécanismes et voies de signalisation intervenant dans la pathogénèse de la néphrotoxicité induite par les ICN, qu'elle soit aiguë ou chronique, et qui touche différentes parties du tissu rénal. Par ailleurs, aux mécanismes figurant sur cette figure s'ajoutent également des mécanismes récemment décrits tels que le stress du réticulum endoplasmique et l'autophagie. La figure 9 montre que des lésions induites par les ICN, observables sur différents compartiments du rein, sont intimement liées par des relations de causes à effets et qu'il existe un lien entre certains mécanismes impliqués dans les néphrotoxicités, aiguë et chronique, des ICN.

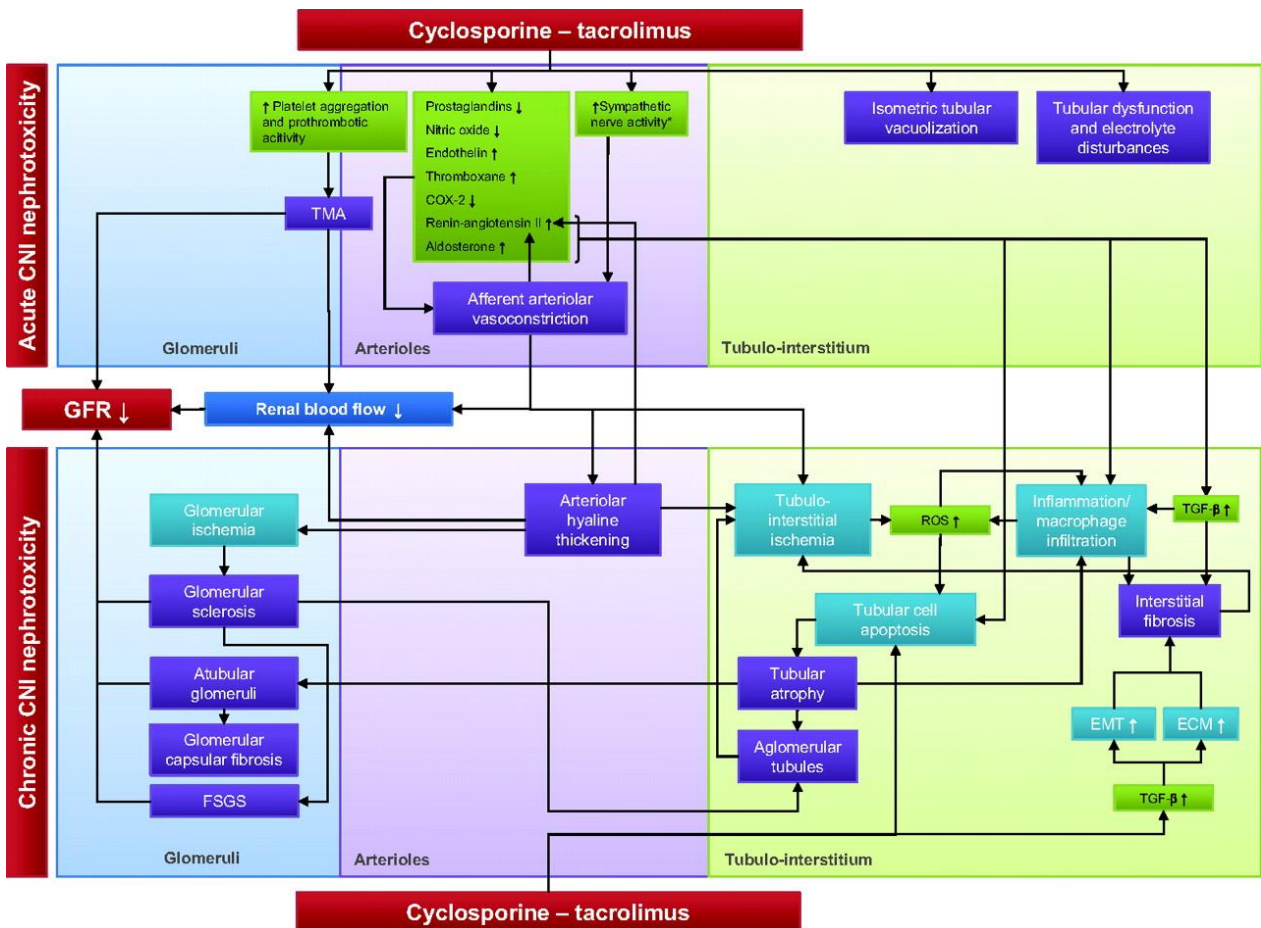


Figure 9 : Représentation schématique récapitulant les principaux mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité aiguë ou chronique des ICN et leurs conséquences.

Les mécanismes moléculaires de toxicité des inhibiteurs de la calcineurine sont reliés par des flèches aux conséquences histologiques et fonctionnelles observées au niveau rénal (compartiments glomérulaires, artériolaires et tubulo-interstitiels). CNI, Inhibiteurs de la calcineurine; TMA, microangiopathie thrombotique; EMT, transition épithélio-mésenchymateuse; ECM, matrice extracellulaire; GFR, débit de filtration glomérulaire; FSGS, glomérulosclérose focale segmentaire; ROS, substances réactives de l'oxygène. (D'après Naesens et coll. (114)).

III. Le Cytosquelette

III.1. Structure générale

Le cytosquelette est un réseau complexe, formé de réseau de filament et de tubules protéiques qui s'étendent à travers tout le cytoplasme, assurant ainsi l'architecture cellulaire. C'est une structure tridimensionnelle très dynamique qui se réorganise continuellement en réponse aux contraintes intra- et extracellulaires. Il est impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que la migration, la division cellulaire, les phénomènes d'endo/exocytose, mais également le transport et l'ancrage d'organites jusqu'à des sites définis au sein de la cellule. Parallèlement, le cytosquelette joue un rôle essentiel dans la polarisation des cellules et dans leur adaptation aux contraintes mécaniques (tension, pression).

Le cytosquelette est un réseau protéique complexe constitués de filaments protéiques, qui en interagissant vont conférer aux cellules des propriétés physiques particulières (élasticité, résistance...) favorisant l'adaptation aux contraintes mécaniques. Tous les éléments du cytosquelette sont des structures protéiques allongées résultant de la polymérisation d'éléments monomériques. Il existe trois types de filaments composant le cytosquelette : les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules.

III.1.1. Les microfilaments d'actine

Dans de nombreuses cellules animales, l'actine est la protéine la plus abondante, pouvant représenter de 5 à 15 % de la masse protéique totale. L'actine est codée par au moins 6 gènes, et se répartit en 3 classes : α (cellules musculaires), β et γ qui présentent une homologie de séquence de 90%.

Les microfilaments forment des structures dynamiques, d'environ 5 à 9 nm de diamètre, composées de sous-unités globuleuse, l'actine G. Ces filaments sont polarisés, ils possèdent une extrémité + au niveau de laquelle la polymérisation est rapide et une extrémité – où la

polymérisation est lente. L'actine G liée à l'ATP est incorporée au niveau de l'extrémité du filament pour former un filament d'actine F, puis l'ATP est hydrolysé en ADP ce qui a pour conséquence de diminuer l'affinité de liaison des molécules d'actine et ainsi d'induire la dépolymérisation. La vitesse d'assemblage de l'actine filamenteuse (actine F) est dépendante de la concentration en Ca^{+} , en actine G et en ATP.

III.1.1.a. Les protéines ABP (Actin Binding Protein)

L'actine est capable de lier de nombreuses protéines collectivement appelées ABP, qui en se liant à l'actine vont pouvoir coopérer de manière positive ou négative avec cette dernière. Ces protéines vont participer activement à la dynamique du réseau de microfilaments en régulant l'assemblage/désassemblage des filaments, l'organisation et la stabilisation ainsi que la fonction de ce réseau comme par exemple le déplacement de vésicules d'endocytose/exocytose et la contraction musculaire.

Protéines de la famille ADF/Cofiline

Les protéines essentielles de cette famille sont exprimées chez tous les eucaryotes, on retrouve trois formes chez les Mammifères : l'ADF (Actin-depolymerising factor), la cofiline-1 (forme majeure des tissus non musculaires) et la cofiline-2 (forme majeure dans les muscles). La cofiline est distribuée de manière diffuse à travers le cytoplasme des cellules quiescentes. Cependant, dans les cellules activées, elle est localisée à la membrane, dans les régions où le cytosquelette d'actine est hautement dynamique. Elle dirige ainsi l'organisation des membranes des cellules mobiles, le clivage du sillon des cellules en division, l'avancée des cônes de croissance neuronaux et la myofibrillogenèse (182–184). L'ADF et la cofiline ne sont pas exprimés de la même façon selon les tissus. Chez l'adulte, l'ADF est exprimé de manière assez importante dans les nerfs, l'intestin, les reins ou les testicules, alors que les niveaux élevés de cofiline sont principalement retrouvés dans le tissu hématopoïétique, les ostéoclastes et les fibroblastes (182,185).

La famille ADF/Cofiline est bien connue pour intervenir en tant que régulateur de l'équilibre existant entre l'assemblage et le désassemblage des microfilaments d'actine. Cette action dépend de la concentration relative de cofiline par rapport à l'actine et de la concentration des autres protéines ABP (186). Des études *in vitro* ont montrées qu'un faible ratio cofiline/actine favorise le sectionnement des filaments d'actine alors que des ratios élevés favorise la nucléation de l'actine (187). De plus, si la concentration de cofiline devient trop importante dans la cellule, les complexes actine-cofiline forment des « paquets » dont le rôle est de séquestrer la cofiline excédentaire la rendant alors incapable d'exercer son action (188).

La cofiline est connue pour être à la base des mécanismes d'assemblage/désassemblage rapides de longs filaments d'actine non ramifiés au niveau des lamellipodes des cellules mobiles. Ce rôle dérive de sa capacité récemment découverte à rentrer en compétition avec le complexe Arp2/3 et de réduire son affinité pour les microfilaments (189). Ce complexe Arp2/3 est responsable de la nucléation et de la croissance de nouveaux filaments d'actine à partir de filaments pré-existants, générant ainsi un réseau ramifié typique des lamellipodes (190). Des travaux réalisés *in vitro* ont montré que la cofiline induit un changement de la structure des filaments d'actine, empêchant ainsi l'action de Arp2/3 et provoquant la disparition des branches (189). L'apparition et la disparition cyclique des branches d'actine de ces réseaux ramifiés pourraient s'expliquer en partie par une coordination spatiale et temporelle de l'activation de la cofiline et de son interaction avec Arp2/3.

Le passage de la cofiline d'une forme inactive à active est principalement régulé par les mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation. La cofiline est inactivée par la phosphorylation de sa sérine 3. Cette modification conduit à l'inhibition de sa liaison à l'actine G et F et au clivage des filaments (191). Cette phosphorylation est réalisée par deux familles de kinases que sont les LIM kinases (LIMK) et les Tes kinases (TESK) (186). Les LIMK sont elles mêmes activées par différentes voies de signalisation telles que les protéines Rho GTPases, et les TESK peuvent être activées via les adhésions cellulaires et

particulièrement les intégrines (192,193). A l'inverse, la déphosphorylation de la cofiline est réalisée par la chronophine, spécifique de la cofiline, et les protéines slingshots (SSH) capables de reconnaître également les LIMK. Chacune de ces protéines est régulées par différentes voies de signalisation, dont la calcineurine qui une fois activée déphosphoryle SSH conduisant à l'activation de la cofiline (194–197). Ces données ont permis une meilleure compréhension des acteurs impliqués en amont dans les mécanismes d'activation/désactivation de la cofiline (figure 10).

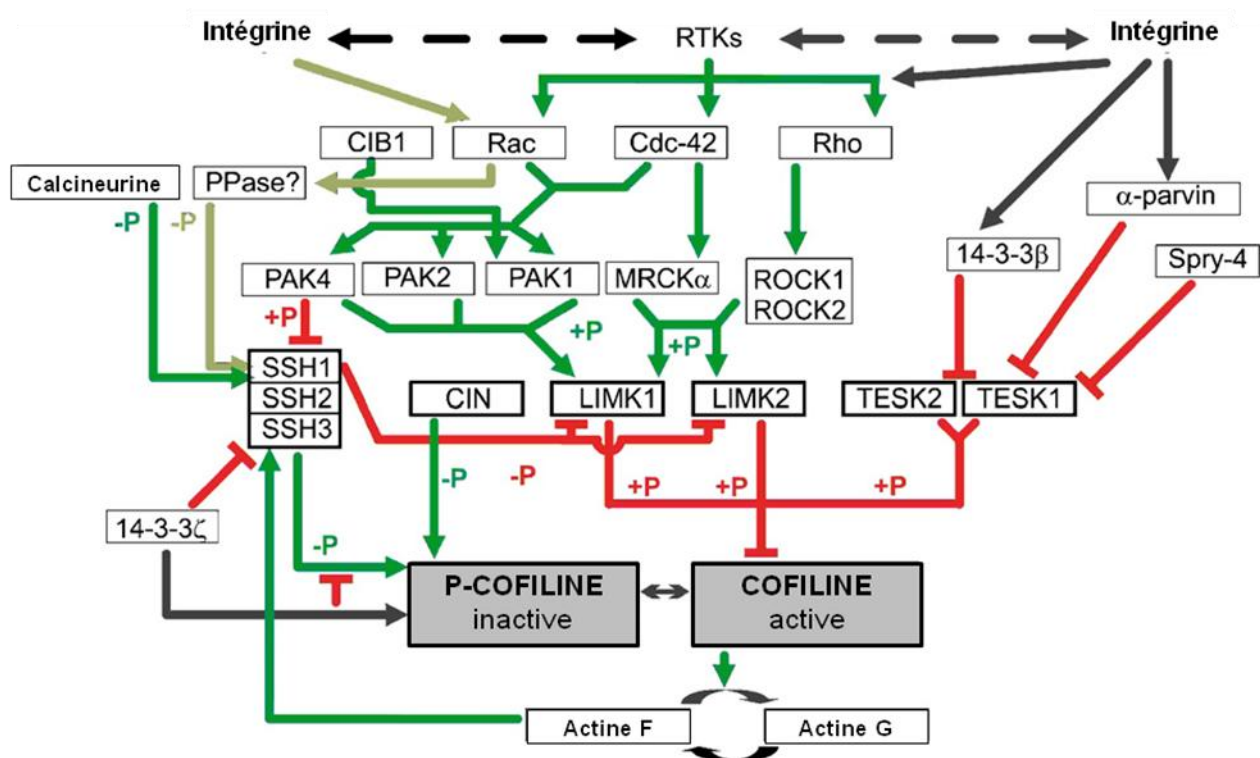


Figure 10 : Signaux contrôlant la phosphorylation et la déphosphorylation de la cofiline.

Vue d'ensemble des kinases et phosphatases connus pour réguler cette voie. Les protéines Rho GTPases jouent un rôle central dans le contrôle des kinases et des phosphatases. Les lignes et flèches vertes indiquent une activation, les rouges une inhibition et les grises ou noires une interaction sans effet ou ayant des effets inconnus sur l'activité. +P et -P indiquent respectivement une phosphorylation ou une déphosphorylation (D'après Van Troys et coll., 2008 (186))

Autres familles d'ABP

La profiline est connue pour faciliter l'échange des nucléotides des monomères d'actine libérés des filaments dans le sens d'un échange d'ADP pour de l'ATP (198). De plus, la profiline augmente le renouvellement des filaments d'actine en présence de cofiline puisque ces deux protéines agissent simultanément aux extrémités opposées d'un filament. La profiline ajoute des monomères d'ATP-actine à l'extrémité + et la cofiline dissocie l'ADP-actine de l'extrémité – (199).

La gelsoline est une autre protéine appartenant à la super-famille des ABP et qui tire son nom de sa capacité à dissoudre des gels d'actine *in vitro* en sectionnant, en coiffant et en induisant la nucléation des filaments d'actine (200). Cette protéine présente une forte affinité pour l'actine et exerce son action en attaquant l'extrémité + des filaments. Après le clivage de l'extrémité +, la gelsoline reste fixée au filament et joue un rôle de protéine de coiffe prévenant ainsi la repolymérisation rapide de l'actine (201). La dissociation de la gelsoline des filaments génère de nombreuses extrémités où débutent de nouveaux filaments. Ainsi le cytosquelette peut être reconstruit dans une nouvelle direction permettant un mouvement cellulaire redirigé (202). Des souris invalidées pour la gelsoline présentent une diminution de la migration des neutrophiles et des fibroblastes (203). A l'inverse, la surexpression de la gelsoline dans des fibroblastes augmente leur taux de migration via un mécanisme d'assemblage/désassemblage dépendant de la gelsoline (204).

Le complexe ERM (Ezrine/Radixin/Moesin) participe également à la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine, particulièrement au niveau apical. Dans les cellules épithéliales, ce complexe est localisé dans le cytoplasme et au niveau de la bordure en brosse où il participe à l'organisation des domaines membranaires spécifiques. Cette action passe par sa capacité à interagir avec des protéines transmembranaires, les phospholipides, des protéines cytoplasmiques associées à la membrane et le cytosquelette d'actine, faisant du complexe ERM un régulateur central de l'organisation du cortex cellulaire et de différentes voies de signalisation (205–207). Il a ainsi été mis en évidence que des souris

déficientes pour l'ezrine présentent un défaut d'interaction entre la membrane et le cytosquelette conduisant à une morphologie anormale de la membrane apicale (malformation des microvillosités) et des jonctions apicales, empêchant ainsi la polarisation complète de l'épithélium (208)

D'autres protéines de cette super-famille des ABP interviennent dans la régulation de l'actine telles que les thymosines, et particulièrement la thymosine $\beta 4$ qui interagit avec l'actine et inhibe la polymérisation de l'actine et l'échange de nucléotide des monomères d'actine (209). On retrouve aussi la DNase I qui, comme la thymosine pourrait empêcher l'incorporation des monomères d'actine dans les filaments (210) ou encore des protéines de coiffe telle que Cap Z présente dans les muscles squelettiques et qui régule l'assemblage des filaments en se fixant à l'extrémité + (202,211).

III.1.1.a. De la dynamique de l'actine à la transcription génique

L'équilibre permanent qui existe entre les mécanismes de polymérisation/dépolymérisation de l'actine induit un changement dans le ratio de l'actine G et de l'actine F. Les protéines Rho GTPases, activées par différents stimuli jouent un rôle central dans cet équilibre. De plus, cette famille de protéine est connue pour être un des médiateurs principaux du complexe SRF/MRTF (Serum Response Factor/Myocardin-Related Transcription Factor) (212).

Le facteur MRTF est, en condition quiescente, lié à l'actine G dans le cytoplasme ce qui le maintient sous forme inactive. L'activation des protéines Rho et des voies de signalisation en aval conduit en particulier à la polymérisation de l'actine et ainsi à une diminution du pool d'actine G. Cela conduit à la libération du facteur MRTF qui est alors transloqué au noyau où il interagit avec le facteur de transcription SRF. L'activation de ce complexe induit la transcription de gènes parmi lesquels on retrouve des protéines participant activement à la fonction des filaments d'actine : des protéines structurales et des protéines impliquées dans la dynamique de l'actine (actine et cofiline-1 par exemple) (213,214). Dans les cellules

rénales LLC-PK1, Fan et *coll.* ont mis en évidence que le complexe MRTF/SRF est activé par la polymerization de l'actine et participe à la differentiation d'un phenotype épithélial vers un phenotype mésenchymateux ainsi qu'à l'activation de l'expression d' α -SMA (215)

Etant donné l'importance du complexe MRTF/SRF dans l'expression de gènes codant pour des composants du cytosquelette d'actine, des cellules déficientes pour le facteur SRF présentent une structure et une dynamique du réseau d'actine altérées ainsi qu'une diminution des adhésions focales (216)

III.1.1.b. Résumé des mécanismes impliqués dans la régulation de l'actine

La dynamique du cytosquelette est un processus complexe mettant en jeu un grand nombre de protéines qui coopèrent dans le but de réguler finement l'équilibre entre polymérisation et dépolymérisation des filaments (figure 11). Cet équilibre implique les Rho GTPases qui tiennent un rôle central et participent activement à la dynamique du cytosquelette lors de l'adaptation cellulaire.

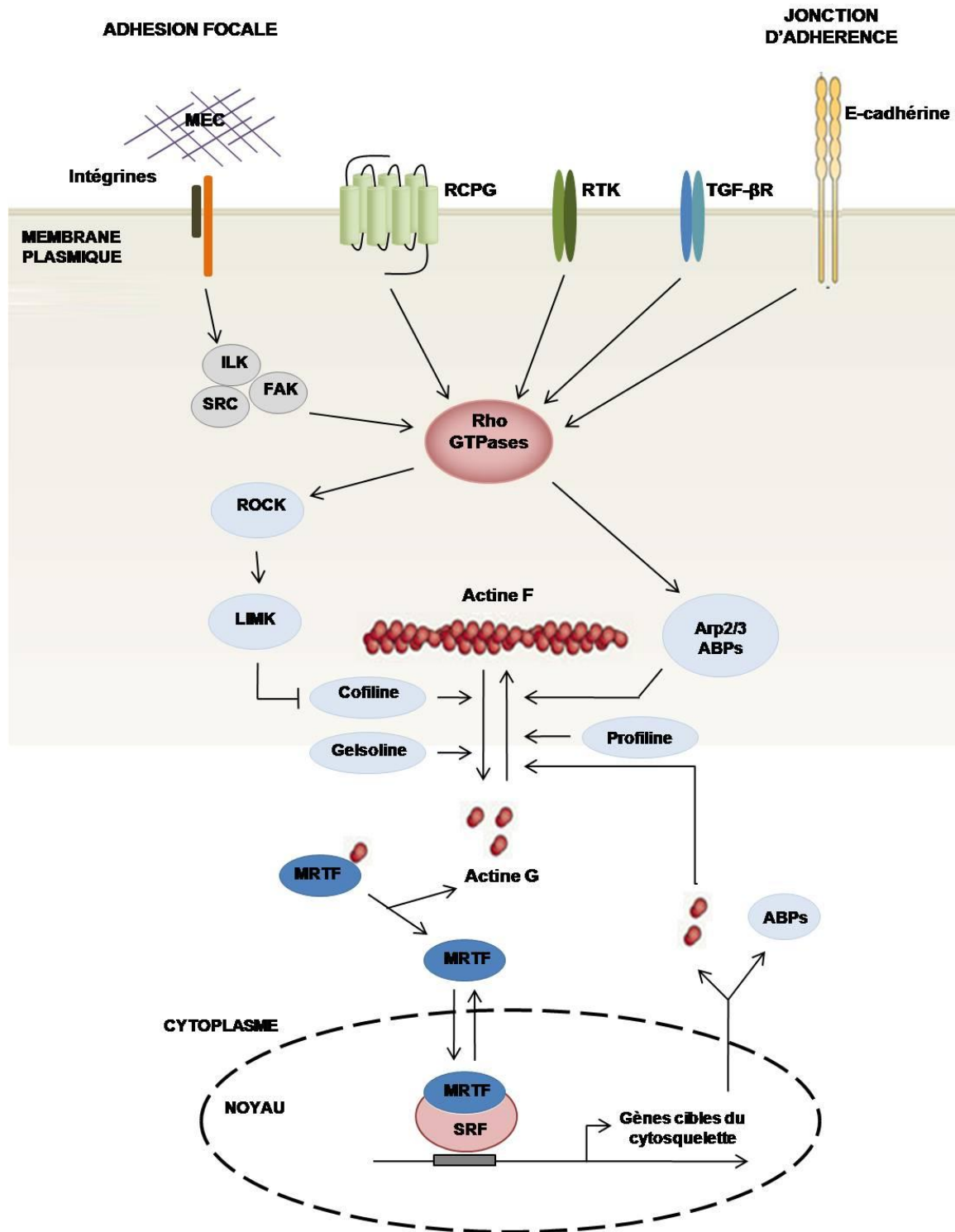


Figure 11 : Représentation schématique des protéines impliquées dans la régulation de la dynamique de l'actine.

Les principales ABPs et leurs différentes voies d'activation sont représentées, ainsi que le complexe MRTF/SRF qui fait le lien entre dynamique de l'actine et transcription génique (D'après Olson et Nordheim 2010 (213))

III.1.2. Les filaments intermédiaires

III.1.2.a. Structure

Les filaments intermédiaires sont les composants les plus stables du cytosquelette. Ils forment au sein de la cellule, un réseau constitué par des polymères de protéines fibreuses de type très variés mais possédant tous un domaine central en hélice α . Ce domaine central permet l'association de deux monomères et la formation de dimères, qui s'associent eux-mêmes pour former un tétramère. Ces derniers forment ensuite des protofilaments. Les filaments intermédiaires correspondent à l'association finale de 8 protofilaments, formant ainsi une structure rigide et résistante d'environ 8 à 10 nm de diamètre. Contrairement aux microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires ne sont pas polarisés et leur assemblage se fait de manière spontanée, sans intervention de molécule de GDP ou GTP.

III.1.2.b. Différentes classes de protéines

Les protéines composant ce réseau de filaments intermédiaires sont très variées et leurs propriétés varient selon le type cellulaire et la localisation intracellulaire. On retrouve 5 grandes classes de protéines entrant dans la composition des filaments intermédiaires.

Type	Unité protéique	Localisation
I	Kératines acides	Epithélium, cheveux, ongles
II	Kératines basiques et neutres	Epithélium, cheveux, ongles
III	Vimentine	Cellules mésoblastiques, fibroblastes
	Desmine	Muscles
	Gliial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Astrocytes
	Périphérine	Neurones périphériques
IV	Neurofilaments	Neurones
V	Laminines	Enveloppe nucléaire

Tableau 1 : Classification des différents types de protéines appartenant à la famille des filaments intermédiaires.

Les lamines sont retrouvés dans le noyau de la majorité des cellules de Mammifères, alors que les autres filaments intermédiaires (types I à IV) sont cytoplasmiques et exprimés de manière spécifique dans les différents tissus ou cellules. Les filaments intermédiaires représentatifs majeurs de chaque tissu sont représentés dans la figure 12.

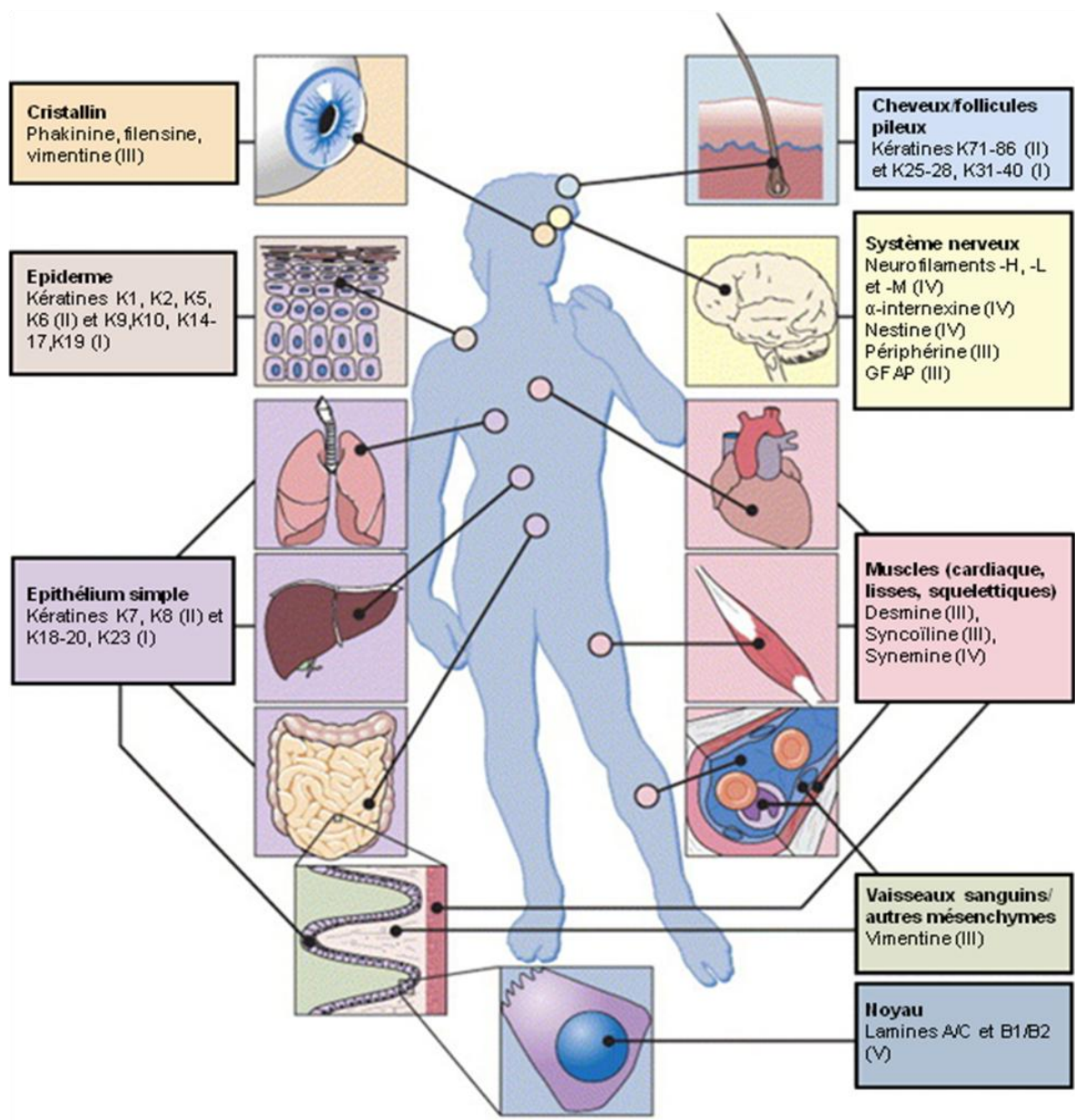


Figure 12 : Schéma de la distribution des protéines des filaments intermédiaires dans le corps humain.

Les 5 familles de protéines des FI sont représentées. Dans le but de simplifier le schéma, tous les tissus ne sont pas montrés et le profil d'expression complexe des FI dans certains tissus n'est pas listé de manière exhaustive. (D'après Toivola et coll, 2005 (217)).

III.1.2.c. Rôle des filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires forment un réseau macromoléculaire complexe qui s'étend de l'enveloppe nucléaire à la membrane plasmique des cellules. Tout comme les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'architecture cellulaire. Par exemple, les lamines assurent un rôle de soutien de l'enveloppe nucléaire, participent au processus de mitose et seraient également impliquées dans la réponse cellulaire au stress mécanique en participant à la transcription de gènes (218). De la même façon, la GFAP participe, avec les microtubules, à la structure du cytosquelette axonal des neurones. Au niveau épithélial, les kératines assurent la structure tridimensionnelle des cellules et participent aux jonctions cellulaires en interagissant avec les desmosomes et hémidesmosomes, conférant ainsi aux cellules une résistance aux forces mécaniques (219).

Une des caractéristiques propres aux FI et qui les distinguent des microfilaments d'actine et des microtubules est leur expression tissulaire spécifique ainsi que leur compartimentalisation cellulaire. Cette particularité leur permet de mieux s'adapter aux fonctions de types cellulaires spécifiques. De plus, leur profil d'expression peut varier au cours de la vie d'une cellule et selon l'état de différenciation. Par exemple, les cellules tubulaires proximales n'expriment normalement que des cytokératines et pas de vimentine. Cependant, il a été montré qu'en culture, des cellules tubulaires isolées à partir de tube proximal de rats co-expriment la cytokératine et la vimentine lorsqu'elles sont en phase de prolifération (220). D'autres travaux ont mis en évidence que des cellules épithéliales de la glande mammaire cultivées à partir de la même population mais dans des conditions hormonales différentes présentent une composition de leur cytosquelette différente (221). Enfin, des études menées sur des cellules épithéliales bovines (MDBK) révèlent des modifications de l'expression des cytokératines et de la vimentine dépendantes de l'état de confluence des cellules, indiquant une implication des contacts cellulaires dans l'expression des filaments intermédiaires (222).

III.1.3. Les microtubules

III.1.3.a. Structure

Les microtubules sont formés par la polymérisation d'une protéine globulaire, la tubuline. Il existe 2 sous unités, l' α et la β -tubuline, qui s'hétérodimérisent pour former l'unité de base des protofilaments. Les microtubules sont des tubes creux d'environ 25 nm de diamètre, formés par l'association de 13 protofilaments disposés en couronne (223). Tout comme les microfilaments d'actine, les microtubules sont des structures polarisées avec un pôle – ou la polymérisation et l'allongement sont rapides, et un pôle +, ou l'allongement est lent. Ces structures prennent généralement naissance au niveau des centrosomes (pôles -), situés dans la zone périnucléaire, et irradient vers la périphérie cellulaire (pôles +). Les microtubules sont des composants en instabilité dynamique, c'est-à-dire qu'il existe un réarrangement continu de ces structures au cours des différents processus physiologiques. Les processus de polymérisation/dépolymérisation nécessitent la présence d'énergie, présente sous forme de GTP, qui est hydrolysé en GDP (224).

III.1.3.b. Protéines associées et fonctions cellulaires

De nombreuses protéines régulatrices sont impliquées dans les diverses fonctions qu'assurent les microtubules. C'est le cas notamment des protéines associées aux microtubules, ou MAPs, qui jouent un rôle dans la stabilisation des microtubules mais également dans leur fonctionnement. Par exemple, au niveau neuronal, la MAP 2 assure la liaison entre deux microtubules voisins, et favorise l'orientation et la stabilisation des microtubules au sein des axones (225). La protéine Tau, impliquée dans la maladie d'Alzheimer, joue elle aussi un rôle essentiel dans l'organisation et l'orientation des microtubules en faisceaux parallèles (226).

En plus de ces protéines contrôlant l'organisation et l'assemblage du réseau de microtubules, d'autres protéines sont nécessaires au transport d'organites et/ou de vésicules le long des microtubules. Ces protéines, dites motrices, comme les kinésines et dynéines

sont des ATPases qui hydrolysent l'ATP et utilisent l'énergie libérée pour assurer le déplacement des organites ou des vésicules dans la cellule (227,228).

Les microtubules assurent de nombreuses fonctions au sein des cellules. En plus de celles citées précédemment, ils structurent certains organites tels que l'appareil de Golgi (229) ou le réticulum endoplasmique (230), le battement des cils (épithéliums bronchiques et intestinaux) ainsi que le déplacement cellulaire puisqu'ils sont responsables des mouvements générés au niveau du flagelle (231). Ils exercent aussi une fonction essentielle au cours de la division mitotique, en assurant la formation du fuseau mitotique et la migration des chromosomes aux pôles de la cellule (232).

III.1. Cytosquelette et cellules épithéliales

L'architecture particulière des cellules épithéliales est maintenue grâce à une organisation spécifique du cytosquelette, permettant aux cellules d'assurer leur rôle de barrière physiologique mais également leur activité de sécrétion et d'absorption de différents composés. Les cellules épithéliales, de manière générale, sont caractérisées par une polarité apicale-basolatérale qui compartimentalise la membrane en domaines distincts par leur composition et leur rôle.

Les cellules tubulaires proximales possèdent une bordure en brosse composée de nombreuses microvillosités. Celles-ci permettent une augmentation de la surface d'échange disponible entre épithélium et lumière du tubule proximal, ce qui favorise les nombreux échanges aux travers de la membrane. Les filaments d'actine participent à la structure interne des microvillosités, en association avec différentes protéines telles que la fimbrine et la villine. Ces protéines dictent l'organisation structurale des microfilaments d'actine au sein des microvillosités, assurant ainsi une efficacité fonctionnelle de ces structures. Une deuxième région, la ceinture d'actine, est située juste sous la membrane apicale des cellules, au niveau de la *zonula adherens* formée par les jonctions d'adhérence. Cette structure est formée de nombreux filaments d'actine interagissant entre eux via des

protéines de type myosine, tropomyosine et α -actinine. L'interaction entre la ceinture d'actine et ces jonctions d'adhérence assure une cohésion forte entre cellules adjacentes mais permet aussi de maintenir la polarité cellulaire. Certaines protéines, comme ZO-1, ZO-2 (Zonula Occludens -1 et -2) ou EPLIN (epithelial protein lost in neoplasm) participent à la formation et au maintien de l'intégrité de cette ceinture d'actine, en garantissant l'interaction actine-jonctions cellulaires (233,234).

Les microtubules sont eux, organisés à partir d'une zone périnucléaire appelée centrosome. C'est à partir de ce centre organisateur que se développent les microtubules. Les extrémités – sont orientées vers le centrosome, et les extrémités + se répartissent à travers le cytoplasme, en direction de la membrane cellulaire. Lors de la mitose, le centrosome se divise pour former les deux pôles du fuseau mitotique. Parallèlement, les microtubules jouent un rôle essentiel dans la formation du cil primaire. L'ensemble des cellules de l'épithélium rénal, à l'exception des cellules intercalaires du canal collecteur, présente à leur surface apicale un cil primaire unique non mobile, assurant un rôle chimio et mécanosensoriel (235). Ce cil primaire est formé d'une structure centrale, l'axonème, composée de neuf doublets de microtubules issus d'un corpuscule basal du centrosome.

Contrairement aux réseaux de microfilaments et de microtubules qui ont fait l'objet de nombreuses études, les filaments intermédiaires sont restés longtemps peu étudiés et leur fonction semble restreinte à un rôle structural. Cependant, il semblerait que ces filaments participent activement à la mise en place de la polarité cellulaire dans différents types d'épithéliums. Dans les cellules épithéliales polarisées, ces filaments sont localisés principalement au niveau apical. On retrouve également des filaments cytoplasmiques présents à proximité des membranes basolatérales, et qui interagissent avec les desmosomes et hémidesmosomes (236).

Les différents composants du cytosquelette des cellules épithéliales sont représentés schématiquement dans la figure 13.

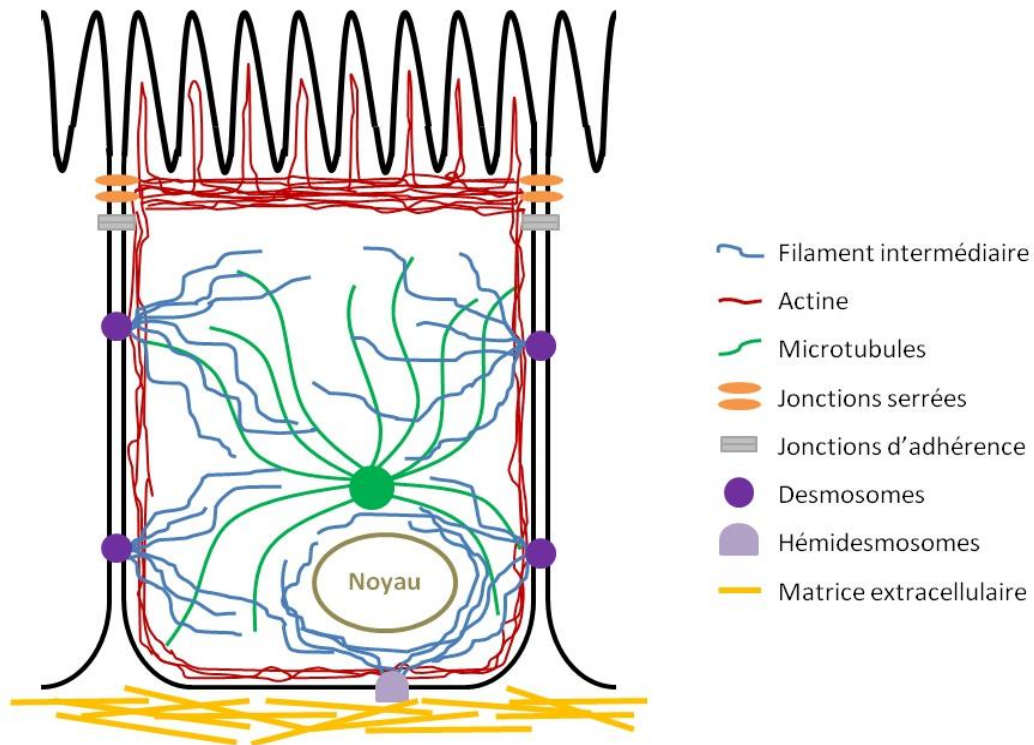


Figure 13 : Schéma du cytosquelette d'une cellule épithéliale.

Les 3 composants principaux, microfilaments d'actine, filaments intermédiaires et microtubules assurent la structure cellulaire et la cohésion cellule-cellule et cellule-matrice.

III.2. Rôle du cytosquelette et implication dans la physiopathologie

En plus d'assurer un rôle de soutien de l'architecture cellulaire, le cytosquelette est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques essentielles au bon fonctionnement des cellules. Le maintien de son intégrité est donc primordial et, de nombreuses pathologies résultent d'une altération de ses composants (mutations) ou des protéines qui lui sont associées.

La présence de mutations dans les filaments composant le cytosquelette a un effet plus ou moins délétère, selon le type cellulaire et le tissu touché. Par exemple, les kératines présentes au niveau de l'épiderme jouent un rôle crucial dans l'intégrité de ce tissu et dans son rôle protecteur. Une mutation de celles-ci conduit à l'apparition de pathologies graves telles que l'épidermolyse bulleuse, caractérisées par une fragilité des cellules de la couche basale de l'épiderme due à une mutation de la kératine 5 ou 14 (237). De nombreuses autres mutations peuvent conduire à des pathologies de la peau telles que l'hyperkératose (kératine 1 et 9) et la dystrophie Meesma (kératine 3 et 12) (238). La variété des filaments intermédiaires ainsi que leur localisation dans des types cellulaires très variés permettent de comprendre la diversité des pathologies résultant de mutation sur ces composants. Ainsi, de nombreuses pathologies liées à des mutations de protéines du cytosquelette, provoquant souvent des agrégats de la protéine mutée ont été mise en évidence. C'est le cas des desminopathies, filaminopathies, laminopathies ou encore de l'AFAM (*Actin Filament Aggregate Myopathy*). Des études ont également montré des mutations de la périphérine au niveau neuronal, mutations pouvant être impliquées dans le développement de la sclérose latérale amyotrophique (239–241). Concernant les pathologies associées aux microtubules, la plus connue est la maladie d'Alzheimer. Elle ne résulte pas directement d'une mutation sur les microtubules, mais d'une altération de la protéine Tau (*Tubule associated unit*) dont la fonction physiologique est de stabiliser les microtubules dans les axones. En cas de mutation, cette protéine est hyperphosphorylée, se désolidarise des microtubules et forme des agrégats cytoplasmiques. D'autres mutations de cette protéine, conduisant principalement à des modifications de son état de phosphorylation ont été étudiées et semblent être, au moins partiellement impliquées dans diverses pathologies neurodégénératives telles que des démences frontotemporales. (242)

III.2.1. Modification du cytosquelette des cellules épithéliales rénales: exemple de la transition épithélio-mésenchymateuse

L'apparition de la fibrose rénale dans la néphropathie chronique met en jeu un mécanisme connu sous le nom de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Au cours de ce processus, les cellules épithéliales soumises à différents stimuli environnementaux seraient capables d'engager un programme génétique conduisant à un changement de phénotype, avec acquisition de caractéristiques de cellules mésenchymateuses. C'est un processus dynamique au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales et acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses, ce qui implique des modifications architecturales et fonctionnelles importantes. Les cellules épithéliales tubulaires et les myofibroblastes interstitiels diffèrent de manière importante aux niveaux morphologique et phénotypique et sont localisés dans des compartiments différents du rein, séparés par la membrane tubulaire basale. Les cellules épithéliales sont intimement jointes entre elles par des structures spécialisées telles les jonctions serrées, les jonctions d'adhérence ou encore les desmosomes, qui assurent une intégrité de l'épithélium et une organisation en couche organisée. Elles possèdent également une polarité apico-basale, une latéralisation des jonctions cellulaires ainsi qu'une polarisation des filaments d'actine (243).

Le processus dynamique de transition d'un phénotype épithélial vers un phénotype mésenchymateux est actuellement bien défini *in vivo* et *in vitro*. On distingue classiquement cinq grandes étapes (244,170) résumées dans la figure 14. La première correspond à la perte de marqueurs d'adhésion telle que la E-cadhérine ou la protéine ZO-1, protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium. Cela entraîne une déstabilisation du tissu épithélial et une perte des jonctions cellules-cellules ainsi qu'une perte de la polarité cellulaire. La perte de la E-cadhérine permet la libération de la β -caténine dans le cytoplasme, la formation d'un complexe transcriptionnel et l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la TEM. La deuxième étape est caractérisée par une réorganisation du cytosquelette d'actine, l'expression *de novo* d' α -SMA (α -smooth muscle actin) et de FSP-1,

ainsi que par la conversion des filaments intermédiaires d'un type épithélial (cytokératine) vers un type mésenchymateux (vimentine). L'acquisition de l' α -SMA confère aux cellules des propriétés contractiles et la capacité à migrer dans l'interstitium. Du fait que les cellules épithéliales tubulaires et les myofibroblastes sont séparés *in vivo* par la membrane basale tubulaire, sa destruction est nécessaire à la migration des cellules vers l'interstitium. Ceci a lieu grâce à l'intervention de protéases matricielles, les MMP-2 et 9 synthétisées par les cellules épithéliales endommagées, les cellules inflammatoires ou les myofibroblastes. Celles-ci digèrent alors les principaux composants de la membrane basale tubulaire, le collagène IV et la laminine (244,245). Enfin, les myofibroblastes migrent vers le compartiment interstitiel et produisent des protéines de la MEC comme les collagènes I et III ou la fibronectine (245–247).

La première description de la TEM tubulaire a été publiée en 1995 par Strutz et *coll.* qui a mis en évidence l'expression d'un marqueur spécifique des cellules mésenchymateuses, la FSP-1 (fibroblast specific peptide 1), par les cellules tubulaires dans un modèle de néphropathie chronique chez la souris (248). Depuis, ces résultats ont également été mis en évidence chez l'homme, sur des biopsies de greffons rénaux présentant des signes de néphropathie et dans lesquelles était observé une perte de marqueurs épithéliaux et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux (249,250).

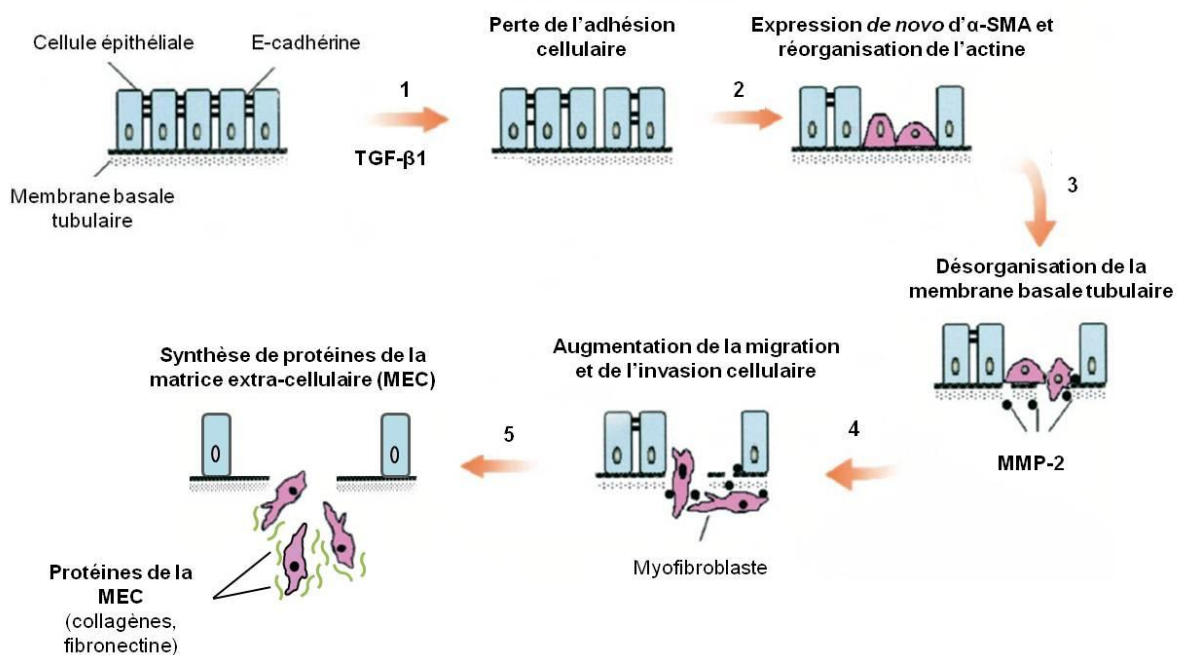


Figure 14 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la TEM.

Ce schéma illustre les 5 étapes essentielles à la réalisation complète de la TEM, incluant ; (1) perte des molécules d'adhésion, (2) expression *de novo* d'α-SMA et réorganisation du cytosquelette d'actine, (3) désorganisation de la membrane basale tubulaire sous l'action des MMP, (4) augmentation des capacités de migration et d'invasion des cellules et (5) synthèse de protéines de la matrice extracellulaire. Le TGF-β à lui seul peut induire les différentes étapes de la TEM. (D'après Liu Y. 2001, (244))

III.2.2. Implication du cytosquelette dans les maladies rénales

III.2.2.a. Les ciliopathies

Comme leur nom l'indique, les ciliopathies résultent d'un dysfonctionnement du cil primaire à la surface des cellules épithéliales, conduisant à des dysfonctionnements importants de la signalisation intracellulaire issue du cil primaire. Le cil est primaire est une structure présente au niveau de la membrane apicale des cellules endothéliales, non motile, constitué d'un axonème central assurant sa structure. Il a été pendant longtemps peu étudié, jusqu'à ce qu'il soit associé à plusieurs pathologies humaines. Il est maintenant clairement admis que ce cil primaire est comme une antenne biologique qui traduit les signaux

environnementaux en régulant différentes voies de signalisation mettant en jeu les polycystines (PC), Wnt, Hedgehog ou encore le PDGF (251).

Parmi les ciliopathies, on retrouve notamment les polykystoses rénales, ou PKR, caractérisées par un élargissement des reins due à la formation de kystes intra-rénaux qui désorganisent totalement l'architecture rénale. Cela aboutit à la destruction progressive du parenchyme. La forme la plus représentée de polykystose est une forme autosomique dominante, l'ADPKD (*Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*). Elle est le résultat de mutations sur les gènes codant les polycystines 1 et 2 (252), deux protéines localisées au niveau du cil primaire, et impliquées dans les signalisations calciques induites par le stress mécanique. Ces protéines, notamment la polycystine 2, participent également à la régulation des niveaux d'AMPc en interagissant avec la phosphodiesterase 4C formant ainsi un complexe AKAP150 (A-kinase anchoring protein 150). Des travaux ont montré que la diminution de l'expression de la polycystine 2 entraînait une dérégulation du complexe AKAP et une augmentation de l'AMPc favorisant la croissance des kystes. (253). De plus, d'autres études ont mis en évidence une altération de la polarisation cellulaire dans les cas d'ADPKD, ainsi qu'une altération du trafic via la membrane baso-latérale. Ceci résulterait d'une dérégulation de la E-cadhérine, qui ne serait plus correctement adressée à la membrane et ne pourrait plus jouer son rôle dans la mise en place et le maintien de l'organisation cellulaire (254).

III.2.2.b. Le syndrome d'ischémie-reperfusion

Une diminution de la perfusion rénale consécutive à une hémorragie, un infarctus ou encore à une transplantation provoque l'apparition de lésions rénales résultant des modifications subies par les cellules rénales lors d'une phase d'ischémie suivie d'une phase de reperfusion. Les lésions rénales qui en résultent sont caractérisées histologiquement par le développement d'une fibrose interstitielle et une atrophie tubulaire (FI-AT), augmentant le risque d'échec de la greffe. L'hypoxie initiale que subissent les cellules entraîne une inflammation et une modification du fonctionnement cellulaire, notamment au niveau du

tubule proximal. Cette inflammation induit la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) qui provoquent de graves lésions tubulaires et augmente la mort cellulaire apoptotique et nécrotique (255). Parallèlement surviennent des altérations de l'organisation cellulaire incluant une perte de polarité cellulaire et de la bordure en brosse, une perte de l'adhésion à la matrice extra-cellulaire ainsi qu'une désorganisation du cytosquelette. On retrouve également une redistribution des intégrines et des pompes d'échange Na^+/K^+ -ATPases.(256). Des études plus récentes ont permis de montrer que les altérations du cytosquelette et des adhésions focales dépendent partiellement de la voie de signalisation de ERK 1/2 (257,258). L'ensemble de ces lésions peut, en cas de durée d'ischémie limitée, disparaître lors du retour à une situation normale d'oxygénation (reperfusion). Cependant, de manière surprenante, un retour brutal de l'oxygène lors de la phase de reperfusion favorise l'aggravation des lésions. Pendant cette phase, les cellules endothéliales expriment des protéines de surfaces telles que l'ICAM, favorisant ainsi le recrutement de neutrophiles. De plus, pendant la phase de reperfusion, il y'a une augmentation de l'expression de protéines de la matrice, de la fibronectine ou encore de la laminine qui participent elles aussi au recrutement de leukocytes. Les neutrophiles recrutés ont un effet cytotoxique direct en générant la production de ROS et de cytokines (259). Les lésions observées lors du syndrome d'ischémie-reperfusion sont donc le résultat d'importantes modifications touchant des protéines impliquées dans la cohésion cellules-cellules ou dans des voies de signalisation de réponse au stress, parmi lesquelles on retrouve plusieurs protéines associées au cytosquelette.

IV. Cytosquelette et contraintes mécaniques

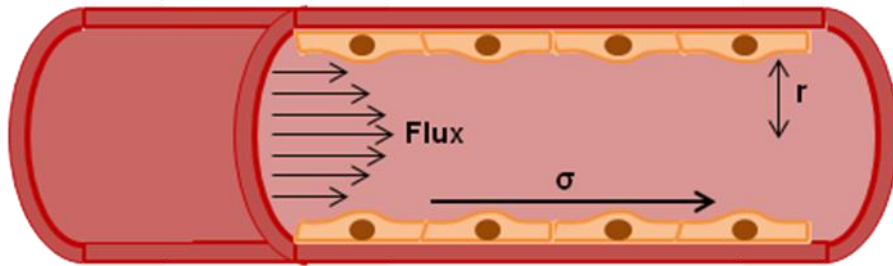
IV.1. Définition du « shear stress »

Le cytosquelette est une structure hautement dynamique assurant aux cellules leur structure mais permettant également une adaptation aux stimuli environnementaux, et particulièrement aux contraintes mécaniques exercées. C'est le cas des cellules vasculaires qui sont constamment exposées à des forces hémodynamiques de deux types : des forces d'étirement ou « stretch stress » et des forces de cisaillement ou « shear stress ». Les forces de cisaillement subies par les cellules endothéliales sont générées par les mouvements du flux sanguins à leur surface. Ce sont ces forces qui seront décrites dans les prochains paragraphes.

Le shear stress correspond à la force à laquelle sont soumises les cellules lors du passage d'un flux à leur surface apicale. Ces forces dépendent de la viscosité du liquide, du débit et du rayon de la structure que le flux traverse.

Le shear stress a essentiellement été étudié dans les cellules endothéliales soumises au flux sanguin mais plusieurs études ont montré son rôle dans le fonctionnement des cellules tubulaires rénales. Ainsi, plusieurs travaux ont mis en évidence une modulation par le flux tubulaire de la réabsorption sodique et hydrique ainsi que de la sécrétion d'ions H^+ et K^+ (260,261). A la fin des années 1960, Schernann et coll. ont montré un changement de la réabsorption de Na^+ et d' HCO_3^- proportionnel aux variations du débit de filtration glomérulaire (262). Cet influx de Na^+ et d' HCO_3^- est hautement régulé et dépend de l'adressage des protéines de transport telles que l'échangeur Na^+/H^+ (NHE3) et la pompe H^+ -ATPase à la membrane apicale (263,264). Ces données ont été complétées par des études *in vitro* sur des cellules tubulaires proximales soumises à une microperfusion, mettant en évidence une modulation de l'activité des transporteurs NHE3 et H^+ -ATPases par le flux.

Dans un cylindre uniforme et rigide, le shear stress subi par les cellules peut être déterminé à partir de la loi de Poiseuille (265).



$$\sigma = 4 Q \eta / \pi r^3$$

où σ = cisaillement, Q = flux, η = viscosité et r = rayon

L'importance du shear stress auquel sont exposées les cellules varie selon le type de vaisseaux, dans les artères il est de l'ordre de 10 à 20 dynes/cm² et de 2 à 4 dynes/cm² dans le système veineux. Il est à noter que le shear stress peut atteindre des valeurs élevées, de 60 à 80 dynes/cm² dans les artérioles, et 20 à 40 dynes dans les veinules, étant donné le flux élevé et le faible diamètre de ces vaisseaux (266). De plus, des études réalisées chez l'homme sur les bifurcations carotidiennes montrent des différences importantes du shear stress au sein d'un même vaisseau, avec des valeurs variant de moins de 1 dyne/cm² à plus de 600 dynes/cm², différences dues à la courbure et à la configuration du vaisseau (267). Dans le rein, les valeurs de shear stress sont beaucoup plus faibles et ont été estimées à 0,1 Pa à l'entrée du tube proximal.

IV.2. Réponse des cellules au shear stress

IV.2.1. Capteurs des contraintes mécaniques

IV.2.1.a. Protéines membranaires

Canaux ioniques

Différents types de canaux ioniques ont été listés comme capteurs potentiels du shear stress. Il a été montré que le shear stress provoque l'activation des canaux potassiques conduisant à une hyperpolarisation de la membrane plasmique, mais aussi l'activation de canaux chlorures conduisant à l'inverse à une dépolarisation de la membrane (268–270). Certains types de canaux calciques ont également été montrés comme répondant au shear stress en s'ouvrant, ce qui induit un influx de Ca^{2+} extracellulaire et active des voies de signalisation dépendante du Ca^{2+} impliquée dans la réponse au shear stress. C'est le cas des canaux TRP (transient receptor potential) (271) ou du récepteur aux purines P2X4 (272).

Récepteurs membranaires

Il a été mis en évidence que le shear stress induit l'activation de récepteur à activité tyrosine kinase (TRK) tels que le VEGFR2 ou le récepteur à l'angiopoïétine Tie-2. Cette activation est indépendante du ligand puisque elle a lieu même en absence de VEGF ou d'angiopoïétine (273,274). L'action du shear stress sur l'activation des TRK reste encore mal définie mais pourrait résulter d'une modification de leur localisation spatiale au sein de la membrane ou en modifiant leur conformation favorisant ainsi leur interaction avec des kinases comme Src capables de les phosphoryler. Leur activation conduit ensuite à l'activation de diverses protéines tels que ERK ou JNK (275).

Les récepteurs couplés aux protéines G ainsi que les protéines G jouent également un rôle dans la réponse cellulaire au shear stress. En effet, les protéines G sont activées de manière très précoce dans les cellules endothéliales soumises à un shear stress (276,277)). De plus, il a été démontré sur des cellules endothéliales aortiques bovines que le shear

stress provoque un changement conformationnel des récepteurs couplés aux protéines G, conduisant à leur activation (278)

Protéines d'adhésion

Il a été proposé que la transmission du signal induit par le shear stress s'effectue depuis la membrane apicale via le cytosquelette des cellules endothéliales, au niveau des points de contact cellules-cellules et cellules-MEC.

Les intégrines interagissent directement avec les protéines de la MEC par leur domaine extracellulaire, et avec de nombreuses protéines agrégées au niveau des contacts focaux telles que la protéine FAK (focal adhesion kinase), les kinases de la famille des Src, Fyn et p130, et des protéines du cytosquelette comme l' α -actinine, la vinculine, la taline, la tensine et la paxilline (279,280). Il a été montré que le shear stress active les intégrines, et que suite à cela, il y a une activation rapide de la FAK, la paxilline, c-Src, Fyn et p130. Ceci conduit à l'activation des voies de signalisation Ras-ERK (281,282). L'engagement des intégrines entraîne la phosphorylation de FAK et de la paxilline et le recrutement et l'activation des protéines Src (283,284). L'ensemble de cette cascade permet l'activation de protéine participant à la régulation du cytosquelette comme RhoA, cdc42, la PI3Kinase ou encore JNK (285,286).

Une autre protéine impliquée dans la réponse au shear stress est la protéine PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) qui est localisée au niveau des contacts cellules-cellules. Elle est rapidement phosphorylée lors d'une exposition à un shear stress, et il en résulte une activation de la voie Ras-ERK, suggérant un rôle de cette protéine en tant que mécanosenseur (287).

Enfin, les cadhérines ont également été identifiées comme jouant un rôle primordial dans la réponse au stress mécanique. Il a été montré que la VE-cadhérine (vascular endothelial cadherin), spécifique des cellules endothéliales, forme un complexe avec PECAM-1 et le

VEGFR2, complexe qui permet la transduction du signal induit par le shear stress. Dans ce complexe, PECAM-1 est responsable de la transmission des forces mécaniques, VEGFR2 active la PI3 kinase qui en retour module l'activation des intégrines et la VE-cadhérine fonctionne comme un adaptateur pour la formation du complexe. Des cellules invalidées pour la VE-cadhérine ou PECAM-1 ne répondent pas normalement au shear stress, il n'y a pas d'activation de PI3 Kinase, d'Akt ou des intégrines, ni d'alignement des filaments d'actine dans le sens du flux (288).

IV.2.1.b. Sous-structures membranaires spécifiques

L'ensemble des capteurs cités précédemment sont, au sein des cellules, réunis au niveau de sous-structures spécialisées que sont les cavéoles et le cil primaire.

Cavéoles

Les cavéoles sont des domaines membranaires qui apparaissent sous forme de flasque sous membranaire dont la cavité est reliée au milieu extracellulaire. Ce sont des invaginations de la membrane composées d'un radeau lipidique et de cavéoline, ainsi que de nombreuses molécules de signalisation incluant des récepteurs et des protéines kinases (289). Leur rôle dans la transduction du signal induit par le shear stress dans les cellules endothéliales a été clairement mis en évidence. Il a été observé que la réponse calcique au shear stress démarrait au niveau des cavéoles avant de se propager à la cellule entière sous forme de vague calcique (290–292). Le rôle des cavéoles, et particulièrement de la cavéoline-1 dans la réponse au stress mécanique a été démontré par l'utilisation de modèles de souris invalidées pour la cavéoline-1. Ces souris présentent une diminution des phénomènes de remodelage dépendants du flux sanguin (293).

Le cil primaire

En 1997, Schwartz et *coll.* sont les premiers à suggéré le rôle du cil primaire en tant que capteurs du flux dans des cellules épithéliales rénales, après avoir observé une courbure du cil en réponse à un flux (294). Ce rôle fonctionnel a été confirmé quatre ans plus tard par Praetorius and Spring qui ont mis en évidence dans des cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), canine que le mouvement de courbure du cil primaire induit par le flux entraînait une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (235). L'augmentation du Ca^{2+} induite par le flux dans les cellules endothéliales est similaire à celle dans les cellules épithéliales rénales, et met en jeu les polycystines 1 et 2. En effet, des cellules KO pour les polycystines 1 et 2 sont incapables de répondre normalement au FSS (295,296). De plus des travaux comparant des cellules endothéliales ciliées et non-ciliées ont mis en évidence une réponse plus importante des cellules ciliées au FSS, avec une plus forte expression du facteur de transcription KLF-2, marqueur exprimé en réponse à un flux (297). La réponse au FSS par l'intermédiaire du cil primaire est en fait un processus biphasique, avec une augmentation rapide du Ca^{2+} intracellulaire, et une réponse adaptative et prolongée modifiant l'expression de gènes, dépendante du cytosquelette

IV.2.2. Modifications intracellulaires et voies de signalisation

IV.2.2.a. Réorganisation du cytosquelette induite par le FSS

In vivo, les cellules endothéliales présentent une structure allongée orientée de façon parallèle au flux sanguin, et les filaments composants le cytosquelette suivent le même axe (298,299). Au contraire, des études menées sur des cellules présentes au niveau des bifurcations artérielles, zones où le flux est perturbé, présentent une organisation du cytosquelette plus aléatoire (300).

Les trois grands types de composants du cytosquelette adaptent leur structure et se réorientent de façon parallèle au flux (127). Lors d'une exposition de 24 h à un FSS

unidirectionnel, les faisceaux périphériques d'actine se désassemblent et des fibres de stress alignées apparaissent. Parallèlement, les faisceaux périnucléaires composés de filaments de vimentine deviennent plus visibles et le réseau de filaments intermédiaires s'allonge avec la structure cellulaire. Les microtubules sont également soumis à une modification de leur structure suivant l'axe majeur de l'élongation. Une réorganisation transitoire du centre organisateur des microtubules (MTOC) a été observée, suivie d'un retour à une structure basale. Cette réorganisation des microtubules dépend de l'état de confluence des cellules BAEC *in vitro* et ce positionnement orienté du MTOC est relié à l'établissement d'une polarité au sein du tapis cellulaire lors de l'adaptation au FSS (301).

Les effets du FSS sur le cytosquelette des cellules tubulaires proximales (PTC) restent moins bien définis que dans les cellules endothéliales. En 2001, Essig et *coll.* ont démontré sur des PTC de souris une modification phénotypique des cellules avec une redistribution marquée des filaments d'actine (F-actine). Ces travaux ont permis de mettre en évidence une réponse différente des cellules épithéliales tubulaires par rapport aux cellules endothéliales, avec un renforcement du réseau d'actine latéral et apical, et la disparition des fibres de stress (302). D'autres données obtenues sur des podocytes rénaux ont montré que le FSS induit la formation de lamellipodes et diminue la présence de fibres de stress (303). Récemment, les travaux de Duan et *coll.* sur des PTC ont confirmés cette réorganisation du cytosquelette d'actine dès 5h de flux (1dyne/cm^2). L'exposition des cellules au FSS entraîne une diminution des fibres de stress basales et un renforcement du réseau d'actine périphérique. De plus, l'étude des jonctions cellulaires a montrée une redistribution des protéines ZO-1 (jonctions serrées) et E-cadhérine (jonctions d'adhérence) à la membrane suggérant ainsi que le FSS induit la formation de ces jonctions (304).

Il existe très peu de données concernant les autres composants du cytosquelette que sont les filaments intermédiaires et les microtubules, et l'influence du shear stress sur ces derniers. Quelques travaux ont été réalisés sur des cellules épithéliales alvéolaires A549 et l'effet du FSS sur le réseau de kératine. Il en ressort que le FSS induit une diminution du

pool de kératine libre en faveur d'une augmentation de la kératine sous forme de filaments. De plus, en condition de FSS, ces filaments de kératines forment des structures plus épaisses (tonofibrilles) qu'en condition statique ou on observe des filaments individuels. L'état de phosphorylation de la K8 et K18 est également modifié par le FSS dans le sens d'une augmentation (305). La phosphorylation étant un mécanisme essentiel à la réorganisation du cytosquelette de filaments intermédiaires, les résultats observés pourrait suggérer que l'augmentation de ce processus dans les cellules exposées au shear stress permettrait l'incorporation des particules de kératines libres dans les filaments pré-existants et ainsi le renforcement du réseau pour mieux résister aux forces mécaniques externes. Ces données ont été confirmées par d'autres travaux réalisées sur le même type cellulaire qui ont permis d'identifier la PKC- ζ comme responsable de la phosphorylation de la K18 lors d'une exposition au FSS (306). L'expression dans ces cellules d'un mutant dominant négatif de cette protéine inhibe la réorganisation du réseau de filaments intermédiaires et augmente la mort cellulaire. Ces résultats indiquent que la phosphorylation de la K18 lors d'un FSS est nécessaire à la réorganisation du cytosquelette et au maintien de l'intégrité cellulaire.

Contrairement aux cellules endothéliales vasculaires, les effets du FSS sur les cellules épithéliales tubulaires rénales restent moins étudiés. Plusieurs travaux ont permis de mettre en évidence une modulation de la réabsorption sodique et hydrique ainsi que de la sécrétion d'ions H^+ et K^+ (260,261). A la fin des années 1960, Schernann et *coll.* ont montré un changement de la réabsorption de Na^+ et d' HCO_3^- proportionnel aux variations du débit de filtration glomérulaire (DFG) (262). Cet influx de Na^+ et d' HCO_3^- est hautement régulé et dépend de l'adressage des protéines de transport telles que l'échangeur Na^+/H^+ (NHE3) et la pompe H^+ -ATPase à la membrane apicale (263,264). Ces données ont été complétées par des études *in vitro* sur des cellules tubulaires proximales soumises à une microperfusion, mettant en évidence une modulation de l'activité des transporteurs NHE3 et H^+ -ATPases par le flux. De plus, la perturbation du cytosquelette d'actine par la cytochalasine D inhibe les modifications des transporteurs dépendantes du flux, suggérant un rôle essentiel du

cytosquelette d'actine dans la transmission des forces mécaniques dans les cellules PTC (261,307).

IV.2.2.b. Voies de signalisation via des protéines kinases

Les études réalisées sur les signalisations intracellulaires induites par le FSS dans les cellules endothéliales ont permis de mettre en évidence l'activation de plusieurs protéines telles que la protéine kinase C (PKC), la FAK, la PI3K, la voie des MAPK et la famille des Rho GTPases qui jouent un rôle central dans la réponse au FSS.

Famille des Rho GTPases

Les protéines de la famille Rho GTPases participent activement à la régulation du cytosquelette d'actine. RhoA participe à l'augmentation de la contractilité cellulaire et les adhésions focales et intervient dans la formation des fibres de stress d'actine, Cdc42 régule la formation des filopodes et Rac la formation des lamellipodes (308). L'activation de Cdc42 et de RhoA par le shear stress a été mise en évidence en mesurant leur translocation du cytosol à la membrane. De plus l'utilisation de dominant négatifs de RhoA inhibe l'alignement des fibres de stress d'actine dans le sens du flux (309). L'activation de Rac est également stimulée par le FSS. De manière intéressante, il a été montré que Rac et Cdc42 sont activés principalement du côté opposé à l'arrivée du flux et que cette activation nécessite une interaction intégrines-MEC. Cette polarisation dans l'activation des Rac et Cdc42 fournit une information spatiale pour la réorganisation du cytosquelette induite par le FSS (310,311).

Ces protéines font le lien entre le signal mécanique induit par le flux et l'activation des cascades de signalisation en aval (312). L'utilisation de mutants dominants négatifs pour Rac1, mais également pour la protéine PAK a permis de démontrer que la réorientation du cytosquelette était abolie (313). L'activation polarisée de la protéine Rac1 est donc nécessaire à l'alignement et à la migration des cellules dans la direction du flux. La protéine Rho, participant à la régulation des fibres de stress et des adhésions focales, est également

modifiée par le shear stress. En présence d'un FSS, Rho est transloquée à la membrane, indiquant sans doute une activation (309). Le FSS induit une inactivation transitoire de Rho, suivie par un pic d'activation à 60mn. Ces résultats, en plus des observations des microfilaments d'actine montrent que la faible activité initiale de Rho est associée à une diminution des fibres de stress, alors que la restauration de l'activité de Rho à 60 mn correspond à une augmentation des fibres de stress, et à un alignement de celles-ci dans la direction du flux (299,314). Enfin, la protéine Cdc42 joue également un rôle dans les modifications du cytosquelette induites par le FSS. Il a été démontré que l'activation localisée de Cdc42 du côté opposé au flux dirige la réorientation des microtubules (311). Les protéines de la famille Rho GTPases participent donc activement à l'intégration des stimuli mécaniques résultant d'un FSS et orchestrent les réponses cellulaires telles que le réarrangement du cytosquelette en étant activées de manière spatiale et temporelle (figure 15).

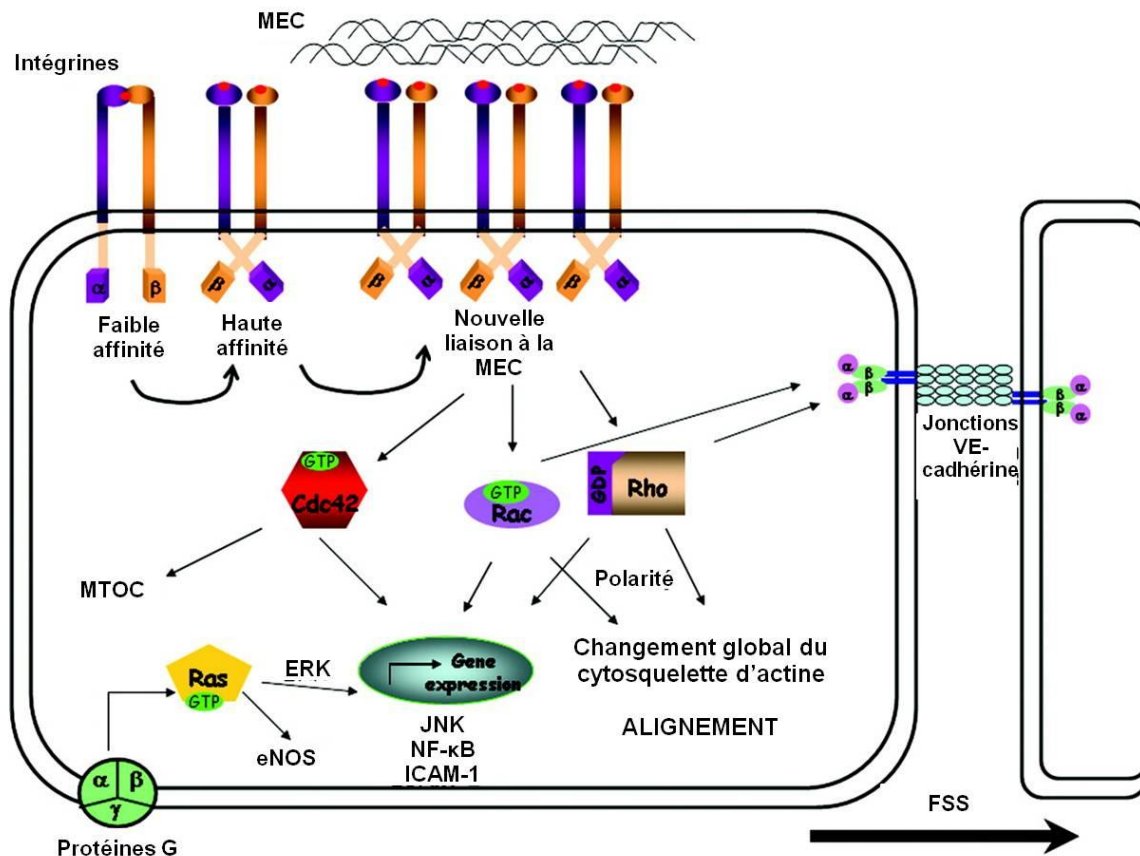


Figure 15 : Modèle de mécanotransduction et rôle des protéines Rho GTPases.

Le shear stress (FSS) active les intégrines qui se lient à la MEC. Cette liaison désactive transitoirement Rho et induit le désassemblage des fibres de stress, et active Rac facilitant l'alignement des fibres de stress nouvellement formées dans le sens du flux. L'activation polarisée de Cdc42 modulent la réorganisation du centre organisateur des microtubules (MTOC). Les GTPases contrôlent également l'expression génique et les jonctions endothéliales. (D'après Tzima, 2006 (315))

Autres voies de signalisation impliquant des kinases

Parmi les voies de signalisation qui complètent l'action centrale des protéines de la famille Rho, on retrouve notamment les protéines kinases C (PKCs), la protéine kinase FAK (Focal adhesion kinase), la voie PI3-Kinase et la voie des MAPKs

Les PKCs sont des enzymes multifonctionnelles impliquées dans l'interaction entre différentes voies de signalisation. Dans les cellules endothéliales, il a été montré que le FSS

induit l'activation de la PKC- β au niveau de la région corticale des cellules endothéliales (316). Il a également été mis en évidence un rôle de la PKC- ϵ dans l'activation de la protéine ERK induite par le FSS (317). Enfin, l'utilisation d'inhibiteur des PKCs atténue l'expression de gènes induite par le FSS, tels que les gènes codant l'endothéline-1 ou le PDGF (318,319).

Comme il a été précisé précédemment, la FAK est une protéine localisée au niveau des sites d'adhésion focale et interagissant avec les intégrines. Lors d'une exposition à un FSS, il y a une augmentation de la phosphorylation de FAK, de son activité kinase mais aussi de son interaction avec la protéine Grb2 (Growth factor receptor binding protein 2) qui participe en aval, à l'activation de la voie des MAPKs (281). Ce rôle de la protéine FAK dans l'activation des MAPKs induite par le FSS a été confirmé par l'utilisation de cellules BAEC exprimant une forme mutée non fonctionnelle de FAK et Grb/SOS, dans lesquelles il y avait une atténuation de l'activation de ERK et JNK dépendante du FSS (282).

La PI3K est une protéine activée en réponse à différents stimuli tels que le PDGF, le VEGF, l'EGF ou encore l'insuline. Son action passe principalement par la protéine Akt. Le FSS active la PI3K de manière rapide, dès la première minute d'exposition, et active également la protéine Akt à partir de 30mn d'exposition (320,321). Cette cascade aboutit *in fine* à la phosphorylation de eNOS et à la production de NO (322,323)

L'exposition des cellules endothéliales aortiques à un shear stress provoque une activation rapide et transitoire de ERK et JNK, via la voie Src-Ras-Raf-MEK, qui débute dès la cinquième minute et revient à la normale au bout de 10 mn pour ERK, et 30 mn pour JNK. La p38 est également activée par le FSS, avec un pic d'activation à 30 mn (324,325). L'activation de JNK par le shear stress a été montrée comme étant dépendante de la voie PI3K/Akt/NO alors que l'activation de ERK1/2 semble indépendante de cette voie et mettrait en jeu les protéines G (277). Ces résultats indiquent que le FSS active plusieurs voies de signalisation affectant différents membres de la famille des MAPKs.

IV.2.2.c. Facteurs de transcription

La régulation de la transcription induite par le FSS sur les cellules endothéliales met en jeu différents facteurs de transcription tels que AP-1, NFκB, Egr-1, SP-1 et le KLF2 (Kruppel-like factor 2) (282,326,327). Cependant, il a été montré que la plupart de ces facteurs de transcription n'étaient pas spécifiques de l'endothélium ni spécifiquement régulés par le FSS. L'utilisation de microarray sur des cellules HUVEC a révélé que la plupart des gènes dont l'expression est induite par un flux sont aussi induits par des agents tels que le TGF-β, le TNF-α, l'IL-1 ou le VEGF, indiquant un rôle plus général de ces facteurs dans la réponse au stress. Le KLF2 semble être un des seuls facteurs exclusivement présent dans les cellules soumises à un FSS (326).

L'ensemble de ces facteurs de transcription sont capables de se lier à des séquences spécifiques sur les promoteurs de différents gènes, les séquences SSRE (Shear stress-responsive elements). Il a été démontré que le FSS augmente les transcrits de différents facteurs de croissance comme le PDGF, le bFGF ou le TGF-β (328–330). Une diminution de l'expression de VCAM (Vascular cell adhesion molecule) a également été mise en évidence, alors que la protéine ICAM (intercellular adhesion molecule) est augmentée (331,332). D'autres travaux ont également permis de démontrer une augmentation de l'expression du tPA (tissu plasminogen activator) dans des cellules endothéliales humaines soumises à un FSS soutenu pendant 24h, suggérant ainsi une augmentation du potentiel fibrinolytique des cellules endothéliales (333). A l'inverse, l'exposition de cellules épithéliales tubulaires à un FSS entraîne une diminution de l'activité du système fibrinolytique (302).

L'intégration des signaux mécaniques et leur transduction jusqu'au compartiment nucléaire met en jeu de nombreux capteurs situés au niveau membranaire et qui induisent l'activation de voies de signalisation variées. Au final, ces signaux sont transmis jusqu'au noyau des cellules et favorise la transcription de gènes afin de répondre au mieux aux stimuli exercés par le « shear stress ». L'ensemble de ces mécanismes est résumé dans la figure

16

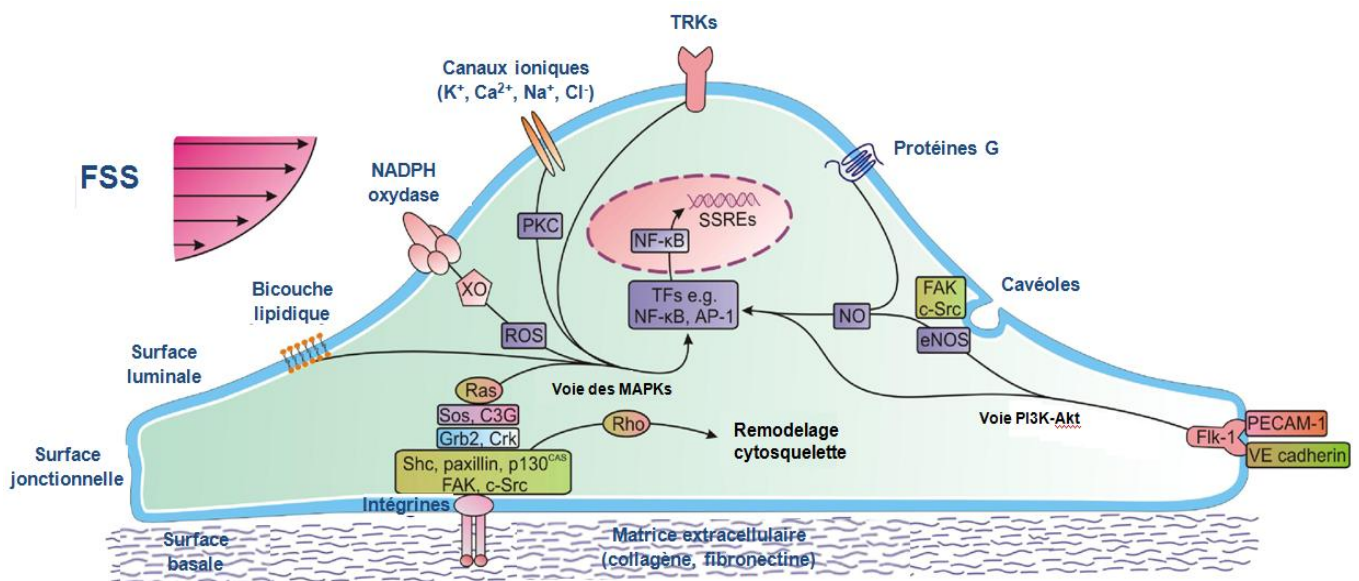


Figure 16 : Schéma récapitulatif des signaux activés par le shear stress (FSS).

Le FSS est capté des mécanorécepteurs situés dans la lumière. Le signal est transmis via le cytosquelette qui initie des différentes cascades de signalisation en aval. L'ensemble de ces voies de signalisation aboutit à l'activation de différents facteurs de transcription (TF) qui se lient aux séquences SSRE, régulant ainsi positivement ou négativement l'expression de gènes et modulant la fonction et la morphologie cellulaire (D'après Chatzizisis et coll., 2007 (334)).

V. Hypothèse de travail

Après avoir réalisé une synthèse de la littérature concernant d'une part les mécanismes moléculaires impliqués dans la néphrotoxicité de la CsA et d'autre part l'importance du cytosquelette dans le fonctionnement et l'adaptation cellulaire aux contraintes environnementales, et particulièrement aux contraintes mécaniques, nous avons émis l'hypothèse que la CsA, connue pour modifier le cytosquelette de différents types cellulaires (myocytes, neurones, podocytes) entraîneraient une modification phénotypique des cellules tubulaires proximales rénales et modifieraient ainsi leur capacité d'adaptation à des contraintes, pouvant conduire à l'apparition de situations pathologiques comme par exemple la dysfonction chronique du greffon.

Ce travail avait pour objectifs principaux :

i) d'étudier les modifications de l'organisation du cytosquelette des cellules tubulaires proximales exposées aux ICN en ciblant les 3 composants du cytosquelette (actine, filaments intermédiaires et tubuline), les protéines des jonctions cellulaires ainsi qu'en recherchant les voies de signalisation potentiellement impliquées dans ces modifications.

ii) d'étudier un éventuel effet synergique entre la réponse des cellules aux contraintes mécaniques (FSS) et aux ICN. Cette analyse a permis la mise en place d'une technique de protéomique au sein du laboratoire, l'iTRAQ dans le but d'étudier, sans hypothèse a priori, les perturbations protéiques induites par la CsA, le FSS ou l'association des deux.

Chapitre II: TRAVAUX PERSONNELS

**I. ETUDE DES MODIFICATIONS PHENOTYPIQUES INDUITES PAR
LES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE SUR LES CELLULES
TUBULAIRES PROXIMALES RENALES**

**Article 1 : Different effects of calcineurin inhibitors on the cytoskeleton of
renal tubular cells**

Elodie Mestre, Virginie Descazeaud, Fabien Lamoureux, Pierre Marquet, Marie Essig

II. INFLUENCE DE LA CYCLOSPORINE A SUR L'ADAPTATION CELLULAIRE AUX CONTRAINTES MECANIKUES

**ARTICLE 2 : Le « shear stress » et la CsA ont des effets différents sur
l'expression protéique intracellulaire**

Chapitre III : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Au cours de ce travail, qui s'inscrit depuis plusieurs années dans une nouvelle thématique de l'équipe, nous avons démontré dans une première partie que la cyclosporine A (CsA) modifie fortement le phénotype des cellules tubulaires proximales rénales en perturbant en particulier l'organisation du cytosquelette. Puis dans la deuxième partie de ce travail, nous avons pu mettre en évidence que l'exposition des cellules en culture à un « shear stress » a également une influence sur l'organisation du cytosquelette ainsi que sur l'expression de certaines protéines, identifiées grâce à l'utilisation d'une approche protéomique quantitative, l'iTRAQ.

L'introduction clinique des ICN, tels que la CsA et le Tac a permis d'augmenter considérablement la survie à court terme des greffons des patients transplantés rénaux. Cependant, leur utilisation est limitée par l'importance des effets secondaires qu'ils présentent, et particulièrement par leur néphrotoxicité. Leur action s'exerce à travers leur liaison à des immunophilines, les cyclophilines pour la CsA et la protéine FKBP12 pour le Tac. Une fois ces complexes formés, les ICN ont pour cible principale la calcineurine, protéine phosphatase impliquée dans l'activation du facteur de transcription NFAT. Les résultats obtenus dans notre première étude mettent en évidence la capacité de la CsA à modifier l'organisation du cytosquelette d'actine, résultats concordants avec les observations de Faul et coll qui ont démontré que la calcineurine joue un rôle dans l'organisation de l'actine dans des podocytes (67). Concernant les autres constituants majeurs du cytosquelette, nos résultats sont les premiers à montrer que la CsA modifie également le réseau de filaments intermédiaires, résultats visibles aussi bien sur le réseau de cytokératine que de vimentine. De plus, notre étude met en lumière une implication potentielle de la cofiline dans la régulation de l'actine puisque l'inhibition de cette voie supprime les effets de la CsA sur la réorganisation du cytosquelette d'actine. La cofiline est une protéine favorisant la dépolymérisation de l'actine et dont l'activation est induite par la phosphatase slingshot (SSH), elle-même activée par la calcineurine (197). L'inhibition de la calcineurine par la CsA empêcherait donc l'activation de la cofiline qui serait maintenue sous forme phosphorylée

inactive, et ne pourrait donc pas exercer son action sur l'actine, diminuant ainsi la dynamique du cytosquelette. L'analyse de la voie impliquant la protéine devra être réalisée afin de déterminer son implication éventuelle. De plus, nos résultats ont également mis en lumière que le blocage du remodelage de l'actine par l'utilisation de la cytochalasine D empêche également la réorganisation des filaments intermédiaires, indiquant un lien étroit entre les différents composants du cytosquelette. L'identification des acteurs à l'origine de ce lien semble donc un point important à développer afin de mieux comprendre la mécanique complexe du cytosquelette en présence de CsA.

Nos résultats soulignent également une différence d'effets entre la CsA et le Tac. En effet, le Tac, à la concentration utilisée dans notre étude n'induit aucune modification de l'organisation du cytosquelette. Ces deux immunosuppresseurs agissant sur la même protéine qu'est la calcineurine, ces différences de résultats pourraient provenir des complexes qu'ils forment avec leurs immunophilines respectives, les cyclophilines et le FKBP12. Il serait intéressant d'approfondir l'étude de cette voie afin de déterminer les effets cellulaires de la CsA et du Tac indépendants de leur action directe sur la calcineurine. De plus le rôle des cyclophilines, et particulièrement de la Cyp A a été impliqué dans le contrôle de l'organisation du cytosquelette d'actine de cellules rénales. En effet, l'inhibition de son activité peptidyl-prolyl cis-trans isomérase (PPIase) par la CsA ou par un autre inhibiteur dérivé de la CsA, empêche la différenciation terminale des cellules intercalées du tubule collecteur. Cet effet passe par l'inhibition de la polymérisation de l'hensine au niveau de la MEC, nécessaire à la différenciation épithéliale. De plus, ces travaux ont montré que l'action de la CsA passe bien par une inhibition de l'activité PPIase de la CypA et ne dépend pas de la calcineurine puisque le Tac ne reproduit pas ces effets (365). Même si il n'existe à ce jour aucune données sur le rôle des cyclophilines dans les effets délétères de la CsA, celles-ci pourrait jouer un rôle central dans les modifications observées sur les cellules tubulaires rénales. L'utilisation d'inhibiteur spécifique de l'activité PPIase des cyclophilines ou de shRNA ciblant ces immunophilines pourrait nous apporter des données essentielles sur leur

rôle dans les modifications observées. Des travaux dans ce sens sont actuellement en cours dans notre laboratoire.

Le cytosquelette est une structure cellulaire nécessaire des cellules tubulaires proximales puisqu'il participe au maintien d'une architecture cellulaire spécifique (polarité apico-basale, bordure en brosse) permettant ainsi la réalisation de nombreuses fonctions physiologiques ainsi que l'adaptation et la réponse des cellules aux contraintes environnementales. Les modifications résultant d'une exposition à la CsA pourrait altérer l'adaptation des cellules au FSS. Nos résultats mettent en évidence une réorganisation de l'actine et de la vimentine, avec un renforcement latéral de l'actine et une redistribution sous membranaire de la vimentine. Ces effets sont similaires entre les cellules exposées à la CsA et celles exposées à un FSS. Cependant il ne semble pas y avoir d'effets synergiques de la CsA et du FSS. Ces résultats pourraient être dus à un FSS trop élevé, déclenchant une adaptation cellulaire importante aux contraintes mécaniques et masquant ainsi les effets de la CsA. Des études supplémentaires utilisant des valeurs de flux plus faibles sont donc nécessaires afin clairement mettre en évidence l'influence de la CsA sur la réponse cellulaire induite par le flux. Des analyses visant à déterminer les modifications de marqueurs épithéliaux (cytokératine, desmine) ainsi que de marqueurs reflétant le fonctionnement cellulaire (NHE3, ATP1A1) en cas d'exposition à la CsA ou au flux sont actuellement en cours au sein de notre laboratoire.

L'étude approfondie des protéines modifiées en présence de CsA, suite à l'exposition à un FSS ou résultant de l'addition de ces deux facteurs, pourrait apporter de précieuses informations et permettre d'identifier des voies spécifiquement modifiées. C'est dans ce but que nous avons utilisé l'approche iTRAQ. La méthode iTRAQ présente de nombreux avantages. Le tag étant isobarique, c'est-à-dire la masse ajoutée au peptide étant la même quelque soit le tag iTRAQ utilisé, il évite la complexification du spectre MS et le risque de superposition des pics. Il augmente aussi la sensibilité de détection : chaque pic correspond à la somme du même peptide marqué pour chaque condition. Un autre avantage clé réside

dans sa capacité à réaliser des analyses multiplexes (jusqu'à 8-plex). Enfin, une quantification absolue est également possible par l'ajout d'un standard interne. Cependant, son inconvénient majeur réside dans le marquage tardif des échantillons qui augmente les risques d'erreur de quantification dus à des pertes inégales de protéines durant la préparation de l'échantillon (lyse cellulaire, extraction). Notre étude est la première à notre connaissance à mettre en application la méthodologie iTRAQ sur des cellules rénales porcines. Même si les analyses réalisées nécessitent d'être confirmées, cette approche innovante pour l'étude du protéome pourrait fournir des informations essentielles sur les effets d'un traitement à la CsA et sur l'impact de ce traitement sur l'adaptation des cellules aux contraintes environnementales, et particulièrement à celles induites par le FSS. L'amélioration des conditions d'analyse permettra d'augmenter sensiblement la quantité de peptides détectés ainsi que le nombre de protéines identifiées. Par ailleurs, l'identification d'un faible nombre de protéines lors de notre analyse est en partie due au nombre de protéines porcines clairement séquencées dans les bases de données utilisées (Swiss-Prot) beaucoup plus faible que les protéines humaines ou murines. Les résultats obtenus jusqu'à présents sont cependant encourageants, notamment du fait que parmi les protéines identifiées, on retrouve des acteurs connus pour participer à la régulation du cytosquelette. De plus, une fois la technique optimisée, l'étude du sécretome apportera sans doute des informations complémentaires à celles déjà obtenues, notamment concernant des protéines de la MEC. Des études réalisées précédemment dans l'équipe sur la lignée cellulaire HEK293, utilisant une approche protéomique appelée SILAC, ont déjà permis d'établir un profil des protéines intracellulaires et sécrétées de cellules exposées à la CsA (344,366). L'utilisation de l'approche iTRAQ pourrait donc compléter et/ou confirmer ces premières données sur l'effet d'une exposition à la CsA et permettrait également de déterminer les effets du FSS sur l'expression de certaines protéines, notamment celles composant le cytosquelette ou participant à sa régulation.

Enfin, il semble nécessaire à plus long terme, que ces études soient complétées *in vivo*, par l'utilisation de modèles animaux de réduction néphronique (uni-néphrécomie ou néphrécomie subtotale). Cela nous permettrait de confirmer notre hypothèse selon laquelle la CsA entraînerait une réponse inadaptée des cellules tubulaires à l'augmentation du flux inhérente à la transplantation rénale.

En conclusion, ce travail permet de formuler un certains nombres d'hypothèses sur les mécanismes physiopathologiques induit par les ICN, et particulièrement la CsA, et qui participent à la détérioration progressive de la structure des cellules tubulaires proximales et, par conséquent à une altération de leur fonctionnement. La poursuite des travaux engagés permettra à terme d'élaborer des stratégies thérapeutiques mieux adaptées limitant les effets délétères des traitements immunosuppresseurs actuels, et ainsi de prévenir la dysfonction chronique du greffon et l'échec de la transplantation rénale.

Chapitre IV : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. 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(1):120-6.
2. Huai Q, Kim H-Y, Liu Y, Zhao Y, Mondragon A, Liu JO, et al. Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99(19):12037-42.
3. Jiang H, Xiong F, Kong S, Ogawa T, Kobayashi M, Liu JO. Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin. *Mol. Immunol.* 1997;34(8-9):663-9.
4. Awumey EM, Moonga BS, Sodam BR, Koval AP, Adebajo OA, Kumegawa M, 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(1):248-52.
5. Papadopoulos V, Brown AS, Hall PF. Isolation and characterisation of calcineurin from adrenal cell cytoskeleton: identification of substrates for Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphatase activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1989;63(1-2):23-38.
6. Hanley RM, Dedman JR, Shenolikar S. Identification of high-affinity calmodulin-binding proteins in rat liver. *Am. J. Physiol.* 1987;252(3 Pt 1):C277-284.
7. Su Q, Zhao M, Weber E, Eugster HP, Ryffel B. Distribution and activity of calcineurin in rat tissues. Evidence for post-transcriptional regulation of testis-specific calcineurin B. *Eur. J. Biochem.* 1995;230(2):469-74.
8. Tumlin JA. Expression and function of calcineurin in the mammalian nephron: physiological roles, receptor signaling, and ion transport. *Am. J. Kidney Dis.* 1997;30(6):884-95.
9. Seitz DP, Pasha MK, Singh B, Chu A, Sharma RK. Localization and characterization of calcineurin in bovine eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002;43(1):15-21.
10. Wilkins BJ, Molkenkin JD. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;322(4):1178-91.
11. Wilkins BJ, Dai Y-S, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 2004;94(1):110-8.
12. Gooch JL, Gorin Y, Zhang B-X, Abboud HE. Involvement of calcineurin in transforming growth factor-beta-mediated regulation of extracellular matrix accumulation. *J. Biol. Chem.* 2004;279(15):15561-70.
13. Gooch JL. An emerging role for calcineurin Aalpha in the development and function of the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006;290(4):F769-776.
14. Stemmer PM, Klee CB. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry*. 1994;33(22):6859-66.
15. Feng B, Stemmer PM. Interactions of calcineurin A, calcineurin B, and Ca²⁺. *Biochemistry*. 1999;38(38):12481-9.
16. Feng B, Stemmer PM. Ca²⁺ binding site 2 in calcineurin-B modulates calmodulin-dependent calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry*. 2001;40(30):8808-14.
17. Yang SA, Klee CB. Low affinity Ca²⁺-binding sites of calcineurin B mediate conformational changes in calcineurin A. *Biochemistry*. 2000;39(51):16147-54.
18. Hilioti Z, Cunningham KW. The RCN family of calcineurin regulators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;311(4):1089-93.
19. Hilioti Z, Gallagher DA, Low-Nam ST, Ramaswamy P, Gajer P, Kingsbury TJ, et al. GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs. *Genes Dev.* 2004;18(1):35-47.
20. Dell'Acqua ML, Dodge KL, Tavalin SJ, Scott JD. Mapping the protein phosphatase-2B anchoring site on AKAP79. Binding and inhibition of phosphatase activity are mediated by residues 315-360. *J. Biol. Chem.* 2002;277(50):48796-802.
21. Oliveria SF, Gomez LL, Dell'Acqua ML. Imaging kinase--AKAP79--phosphatase scaffold complexes at the plasma membrane in living cells using FRET microscopy. *J. Cell Biol.* 2003;160(1):101-12.
22. Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*. 1989;337(6206):473-5.

23. Siekierka JJ, Hung SH, Poe M, Lin CS, Sigal NH. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature*. 1989;341(6244):755-7.
24. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*. 1992;357(6380):695-7.
25. Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, et al. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature*. 1993;365(6444):352-5.
26. Macián F, López-Rodríguez C, Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*. 2001;20(19):2476-89.
27. Chow CW, Rincón M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science*. 1997;278(5343):1638-41.
28. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;15:707-47.
29. Gwack Y, Feske S, Srikanth S, Hogan PG, Rao A. Signalling to transcription: store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium*. 2007;42(2):145-56.
30. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 2003;17(18):2205-32.
31. Shibasaki F, Price ER, Milan D, McKeon F. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature*. 1996;382(6589):370-3.
32. Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature*. 1996;383(6603):837-40.
33. Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science*. 1997;275(5308):1930-4.
34. Zhu J, Shibasaki F, Price R, Guillemot JC, Yano T, Dötsch V, et al. Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell*. 1998;93(5):851-61.
35. Porter CM, Havens MA, Clipstone NA. Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 2000;275(5):3543-51.
36. Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*. 1988;241(4862):202-5.
37. Legendre C, Zuber J, Anglicheau D, Le Quintrec M, Martinez F, Mamzer-Bruneel MF, et al. [Immunosuppression in kidney transplantation]. *Ann Urol (Paris)*. 2007;41(6):276-84.
38. Shibasaki F, Hallin U, Uchino H. Calcineurin as a multifunctional regulator. *J. Biochem.* 2002;131(1):1-15.
39. Goto S, Yamamoto H, Fukunaga K, Iwasa T, Matsukado Y, Miyamoto E. Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin by calcineurin. *J. Neurochem.* 1985;45(1):276-83.
40. 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(12):1225-38.
41. 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(2):219-30.
42. Fiumelli H, Riederer IM, Martin J-L, Riederer BM. 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(6):495-504.
43. Liu YC, Storm DR. Dephosphorylation of neuromodulin by calcineurin. *J. Biol. Chem.* 1989;264(22):12800-4.
44. Chang HY, Takei K, Sydor AM, Born T, Rusnak F, Jay DG. Asymmetric retraction of growth cone filopodia following focal inactivation of calcineurin. *Nature*. 1995;376(6542):686-90.
45. Silverman-Gavrila LB, Charlton MP. Calcineurin and cytoskeleton in low-frequency depression. *J. Neurochem.* 2009;109(3):716-32.
46. Foster TC, Sharrow KM, Masse JR, Norris CM, Kumar A. Calcineurin links Ca²⁺ dysregulation with brain aging. *J. Neurosci.* 2001;21(11):4066-73.

47. Wu H-Y, Tomizawa K, Oda Y, Wei F-Y, Lu Y-F, Matsushita M, et al. Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 2004;279(6):4929-40.
48. Luo J, Ma J, Yu D-Y, Bu F, Zhang W, Tu L-H, et al. Infusion of FK506, a specific inhibitor of calcineurin, induces potent tau hyperphosphorylation in mouse brain. *Brain Res. Bull.* 2008;76(5):464-8.
49. Lian Q, Ladner CJ, Magnuson D, Lee JM. Selective changes of calcineurin (protein phosphatase 2B) activity in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Exp. Neurol.* 2001;167(1):158-65.
50. Asai A, Qiu J h, Narita Y, Chi S, Saito N, Shinoura N, et al. High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1999;274(48):34450-8.
51. Liu YL, Fann CSJ, Liu CM, Chang CC, Yang WC, Hung SI, et al. More evidence supports the association of PPP3CC with schizophrenia. *Mol. Psychiatry.* 2007;12(10):966-74.
52. Schulz RA, Yutzey KE. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Dev. Biol.* 2004;266(1):1-16.
53. de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Samper E, et al. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature.* 1998;392(6672):182-6.
54. Tagawa H, Rozich JD, Tsutsui H, Narishige T, Kuppuswamy D, Sato H, et al. Basis for increased microtubules in pressure-hypertrophied cardiocytes. *Circulation.* 1996;93(6):1230-43.
55. Tsutsui H, Tagawa H, Kent RL, McCollam PL, Ishihara K, Nagatsu M, et al. Role of microtubules in contractile dysfunction of hypertrophied cardiocytes. *Circulation.* 1994;90(1):533-55.
56. Carlyle WC, Toher CA, Vandervelde JR, McDonald KM, Homans DC, Cohn JN. Changes in beta-actin mRNA expression in remodeling canine myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1996;28(1):53-63.
57. Collins JF, Pawloski-Dahm C, Davis MG, Ball N, Dorn GW 2nd, Walsh RA. The role of the cytoskeleton in left ventricular pressure overload hypertrophy and failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1996;28(7):1435-43.
58. Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, et al. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1991;83(2):504-14.
59. Saito T, Fukuzawa J, Osaki J, Sakuragi H, Yao N, Haneda T, et al. Roles of calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2003;35(9):1153-60.
60. Sussman MA, Lim HW, Gude N, Taigen T, Olson EN, Robbins J, et al. Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science.* 1998;281(5383):1690-3.
61. Lim HW, Molkenkin JD. Calcineurin and human heart failure. *Nat. Med.* 1999;5(3):246-7.
62. Ritter O, Hack S, Schuh K, Röthlein N, Perrot A, Osterziel KJ, et al. Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation.* 2002;105(19):2265-9.
63. Molkenkin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 1998;93(2):215-28.
64. Burn SF, Webb A, Berry RL, Davies JA, Ferrer-Vaquer A, Hadjantonakis AK, et al. Calcium/NFAT signalling promotes early nephrogenesis. *Dev. Biol.* 2011;352(2):288-98.
65. Gooch JL, Toro JJ, Guler RL, Barnes JL. Calcineurin A-alpha but not A-beta is required for normal kidney development and function. *Am. J. Pathol.* 2004;165(5):1755-65.
66. Gooch JL, Roberts BR, Cobbs SL, Tumlin JA. Loss of the alpha-isoform of calcineurin is sufficient to induce nephrotoxicity and altered expression of transforming growth factor-beta. *Transplantation.* 2007;83(4):439-47.
67. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, et al. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat. Med.* 2008;14(9):931-8.
68. Thoms K-M, Kuschal C, Oetjen E, Mori T, Kobayashi N, Laspe P, et al. Cyclosporin A, but not everolimus, inhibits DNA repair mediated by calcineurin: implications for tumorigenesis under immunosuppression. *Exp. Dermatol.* 2011;20(3):232-6.

69. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, et al. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*. 1999;284(5412):339-43.
70. Kurji K, Sharma RK. Potential role of calcineurin in pathogenic conditions. *Mol. Cell. Biochem*. 2010;338(1-2):133-41.
71. Stern PH. The calcineurin-NFAT pathway and bone: intriguing new findings. *Mol. Interv*. 2006;6(4):193-6.
72. Tash JS, Krinks M, Patel J, Means RL, Klee CB, Means AR. Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *J. Cell Biol*. 1988;106(5):1625-33.
73. Pandey D, Goyal P, Dwivedi S, Siess W. Unraveling a novel Rac1-mediated signaling pathway that regulates cofilin dephosphorylation and secretion in thrombin-stimulated platelets. *Blood*. 2009;114(2):415-24.
74. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*. 1976;6(4):468-75.
75. Goto T, Kino T, Hatanaka H, Nishiyama M, Okuhara M, Kohsaka M, et al. Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant. Proc*. 1987;19(5 Suppl 6):4-8.
76. Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataraman R, Jain A. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet*. 1989;2(8670):1000-4.
77. Fung JJ, Abu-Elmagd K, Todo S, Shapiro R, Tzakis A, Jordan M, et al. Overview of FK506 in transplantation. *Clin Transpl*. 1990;115-21.
78. Clardy J. The chemistry of signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995;92(1):56-61.
79. Swanson SK, Born T, Zydowsky LD, Cho H, Chang HY, Walsh CT, et al. Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(9):3741-5.
80. Price ER, Zydowsky LD, Jin MJ, Baker CH, McKeon FD, Walsh CT. Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991;88(5):1903-7.
81. LAMOUREUX F. Étude protéomique des modifications phénotypiques des cellules rénales exposées aux immunosuppresseurs inhibiteurs de la calcineurine : [Internet] [thesis]. Université de Limoges; 2011 [cité 2012]. Available de: <http://epublications.unilim.fr/theses/index.php?id=6974>
82. Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet*. 1978;2(8104-5):1323-7.
83. Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet*. 1979;2(8151):1033-6.
84. Homan WP, Fabre JW, Williams KA, Millard PR, Morris PJ. Studies on the immunosuppressive properties of cyclosporin a in rats receiving renal allografts. *Transplantation*. 1980;29(5):361-6.
85. Homan WP, French ME, Millard P, Denton TG, Fabre JW, Morris PJ. Studies on the effects of cyclosporin A upon renal allograft rejection in the dog. *Surgery*. 1980;88(1):168-73.
86. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N. Engl. J. Med*. 2003;349(24):2326-33.
87. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CLS, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RDM. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation*. 2004;78(4):557-65.
88. Liptak P, Ivanyi B. Primer: Histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006;2(7):398-404; quiz following 404.
89. Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harvie BR, Ichikawa I, Hoover RL. Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int*. 1990;37(6):1487-91.
90. Perico N, Benigni A, Zoja C, Delaini F, Remuzzi G. Functional significance of exaggerated renal thromboxane A₂ synthesis induced by cyclosporin A. *Am. J. Physiol*. 1986;251(4 Pt 2):F581-587.

91. Perico N, Benigni A, Bosco E, Rossini M, Orisio S, Ghilardi F, 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.
92. Thomson AW, McAuley FT, Whiting PH, Simpson JG. Angiotensin-converting enzyme inhibition or aldosterone antagonism reduces cyclosporine nephrotoxicity in the rat. *Transplant. Proc.* 1987;19(1 Pt 2):1242-3.
93. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr Opin Crit Care.* 2001;7(6):384-9.
94. Vaziri ND, Ni Z, Zhang YP, Ruzics EP, Maleki P, Ding Y. Depressed renal and vascular nitric oxide synthase expression in cyclosporine-induced hypertension. *Kidney Int.* 1998;54(2):482-91.
95. López-Ongil S, Saura M, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M, Lamas S. Regulation of endothelial NO synthase expression by cyclosporin A in bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1996;271(3 Pt 2):H1072-1078.
96. Barros EJ, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N. Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 1987;32(1):19-25.
97. Bobadilla NA, Tapia E, Franco M, López P, Mendoza S, García-Torres R, et al. Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int.* 1994;46(3):773-9.
98. Ponticelli C. De novo thrombotic microangiopathy. An underrated complication of renal transplantation. *Clin. Nephrol.* 2007;67(6):335-40.
99. Mihatsch MJ, Thiel G, Basler V, Ryffel B, Landmann J, von Overbeck J, et al. Morphological patterns in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplant. Proc.* 1985;17(4 Suppl 1):101-16.
100. Kim JY, Suh KS. Light microscopic and electron microscopic features of cyclosporine nephrotoxicity in rats. *J. Korean Med. Sci.* 1995;10(5):352-9.
101. Naesens M, Kambham N, Concepcion W, Salvatierra O Jr, Sarwal M. The evolution of nonimmune histological injury and its clinical relevance in adult-sized kidney grafts in pediatric recipients. *Am. J. Transplant.* 2007;7(11):2504-14.
102. Pallet N, Rabant M, Xu-Dubois Y-C, Lecorre D, Mucchielli M-H, Imbeaud S, et al. Response of human renal tubular cells to cyclosporine and sirolimus: a toxicogenomic study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008;229(2):184-96.
103. Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perlroth M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 1984;311(11):699-705.
104. Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickeleit V, Ryffel B. The side-effects of cyclosporine-A and tacrolimus. *Clin. Nephrol.* 1998;49(6):356-63.
105. Morozumi K, Takeda A, Uchida K, Mihatsch MJ. Cyclosporine nephrotoxicity: how does it affect renal allograft function and transplant morphology? *Transplant. Proc.* 2004;36(2 Suppl):251S-256S.
106. Randhawa PS, Shapiro R, Jordan ML, Starzl TE, Demetris AJ. The histopathological changes associated with allograft rejection and drug toxicity in renal transplant recipients maintained on FK506. Clinical significance and comparison with cyclosporine. *Am. J. Surg. Pathol.* 1993;17(1):60-8.
107. Alexander SI, Fletcher JT, Nankivell B. Chronic allograft nephropathy in paediatric renal transplantation. *Pediatr. Nephrol.* 2007;22(1):17-23.
108. Morozumi K, Thiel G, Albert FW, Banfi G, Gudat F, Mihatsch MJ. Studies on morphological outcome of cyclosporine-associated arteriopathy after discontinuation of cyclosporine in renal allografts. *Clin. Nephrol.* 1992;38(1):1-8.
109. Collins BS, Davis CL, Marsh CL, McVicar JP, Perkins JD, Alpers CE. Reversible cyclosporine arteriopathy. *Transplantation.* 1992;54(4):732-4.
110. Bosmans J-L, Ysebaert DK, Verpooten GA. Chronic allograft nephropathy: what have we learned from protocol biopsies? *Transplantation.* 2008;85(7 Suppl):S38-41.
111. Cosio FG, Frankel WL, Pelletier RP, Pesavento TE, Henry ML, Ferguson RM. Focal segmental glomerulosclerosis in renal allografts with chronic nephropathy: implications for graft survival. *Am. J. Kidney Dis.* 1999;34(4):731-8.

112. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CLS, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. Evolution and pathophysiology of renal-transplant glomerulosclerosis. *Transplantation*. 2004;78(3):461-8.
113. Chevalier RL, Forbes MS. Generation and evolution of atubular glomeruli in the progression of renal disorders. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008;19(2):197-206.
114. Naesens M, Kuypers DRJ, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(2):481-508.
115. Mihatsch MJ, Ryffel B, Hermle M, Brunner FP, Thiel G. Morphology of cyclosporine nephrotoxicity in the rat. *Clin. Nephrol.* 1986;25 Suppl 1:S2-8.
116. Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Andoh T, Bennett WM, Couser WG, et al. Cyclosporine A induced arteriopathy in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int.* 1995;48(2):431-8.
117. Sun J, Wang Y. Effects of cyclosporin A on proliferation of cultured rat mesangial cells. *J. Tongji Med. Univ.* 1997;17(2):115-7.
118. Lally C, Healy E, Ryan MP. Cyclosporine A-induced cell cycle arrest and cell death in renal epithelial cells. *Kidney Int.* 1999;56(4):1254-7.
119. Seki Y, Toba K, Fuse I, Sato N, Niwano H, Takahashi H, et al. In vitro effect of cyclosporin A, mitomycin C and prednisolone on cell kinetics in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Thromb. Res.* 2005;115(3):219-28.
120. Jennings P, Koppelstaetter C, Aydin S, Abberger T, Wolf AM, Mayer G, et al. Cyclosporine A induces senescence in renal tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2007;293(3):F831-838.
121. Ortiz A, Lorz C, Catalan MP, Justo P, Egido J. Role and regulation of apoptotic cell death in the kidney. Y2K update. *Front. Biosci.* 2000;5:D735-749.
122. Ortiz A. Renal cell loss through cell suicide. *Kidney Int.* 2000;58(5):2235-6.
123. Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, Shankland SJ, Couser WG, Bennett WM, et al. Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int.* 1998;53(4):897-908.
124. Ito H, Kasagi N, Shomori K, Osaki M, Adachi H. Apoptosis in the human allografted kidney. Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated DUTP-biotin nick end labeling. *Transplantation.* 1995;60(8):794-8.
125. Ortiz A, Lorz C, Catalán M, Ortiz A, Coca S, Egido J. Cyclosporine A induces apoptosis in murine tubular epithelial cells: role of caspases. *Kidney Int. Suppl.* 1998;68:S25-29.
126. Healy E, Dempsey M, Lally C, Ryan MP. Apoptosis and necrosis: mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. *Kidney Int.* 1998;54(6):1955-66.
127. Yang CW, Faulkner GR, Wahba IM, Christianson TA, Bagby GC, Jin DC, et al. Expression of apoptosis-related genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity in mice. *Am. J. Transplant.* 2002;2(5):391-9.
128. Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Yi H, Bennett WM. Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis. *Kidney Int.* 1999;56(6):2147-59.
129. Han SY, Chang EJ, Choi HJ, Kwak CS, Park SB, Kim HC, et al. Apoptosis by cyclosporine in mesangial cells. *Transplant. Proc.* 2006;38(7):2244-6.
130. Justo P, Lorz C, Sanz A, Egido J, Ortiz A. Intracellular mechanisms of cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003;14(12):3072-80.
131. Bernardi P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996;1275(1-2):5-9.
132. Kurtz A, Della Bruna R, Kühn K. Cyclosporine A enhances renin secretion and production in isolated juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* 1988;33(5):947-53.
133. Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO. The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol.* 2003;93(1):P3-13.
134. Lassila M, Finckenberg P, Pere AK, Krogerus L, Ahonen J, Vapaatalo H, 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(6):1339-47.
135. Perico N, Dadan J, Remuzzi G. Endothelin mediates the renal vasoconstriction induced by cyclosporine in the rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1990;1(1):76-83.

136. Lanese DM, Conger JD. Effects of endothelin receptor antagonist on cyclosporine-induced vasoconstriction in isolated rat renal arterioles. *J. Clin. Invest.* 1993;91(5):2144-9.
137. Cavarape A, Endlich K, Feletto F, Parekh N, Bartoli E, Steinhausen M. Contribution of endothelin receptors in renal microvessels in acute cyclosporine-mediated vasoconstriction in rats. *Kidney Int.* 1998;53(4):963-9.
138. Slowinski T, Subkowski T, Diehr P, Bachert D, Fritsche L, Neumayer H-H, et al. Interaction of the endothelin system and calcineurin inhibitors after kidney transplantation. *Clin. Sci.* 2002;103 Suppl 48:396S-398S.
139. Conger JD, Kim GE, Robinette JB. Effects of ANG II, ETA, and TxA2 receptor antagonists on cyclosporin A renal vasoconstriction. *Am. J. Physiol.* 1994;267(3 Pt 2):F443-449.
140. Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am. J. Physiol.* 1997;272(5 Pt 2):F561-578.
141. Kone BC. Nitric oxide in renal health and disease. *Am. J. Kidney Dis.* 1997;30(3):311-33.
142. Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, García-Torres R, Bolio A, López-Zetina P, et al. Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am. J. Physiol.* 1998;274(4 Pt 2):F791-798.
143. Diederich D, Yang Z, Lüscher TF. Chronic cyclosporine therapy impairs endothelium-dependent relaxation in the renal artery of the rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1992;2(8):1291-7.
144. Hortelano S, Castilla M, Torres AM, Tejedor A, Boscá L. Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000;11(12):2315-23.
145. Morris ST, McMurray JJ, Rodger RS, Farmer R, Jardine AG. Endothelial dysfunction in renal transplant recipients maintained on cyclosporine. *Kidney Int.* 2000;57(3):1100-6.
146. Kou R, Greif D, Michel T. Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* 2002;277(33):29669-73.
147. Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension.* 1994;23(6 Pt 2):957-61.
148. Navarro-Antolín J, López-Muñoz MJ, Klatt P, Soria J, Michel T, Lamas S. Formation of peroxynitrite in vascular endothelial cells exposed to cyclosporine A. *FASEB J.* 2001;15(7):1291-3.
149. Rouillet JB, Xue H, McCarron DA, Holcomb S, Bennett WM. Vascular mechanisms of cyclosporin-induced hypertension in the rat. *J. Clin. Invest.* 1994;93(5):2244-50.
150. Sugimoto T, Haneda M, Sawano H, Isshiki K, Maeda S, Koya D, et al. Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T-cell transcription factor in glomerular mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001;12(7):1359-68.
151. Höcherl K, Dreher F, Vitzthum H, Köhler J, Kurtz A. Cyclosporine A suppresses cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002;13(10):2427-36.
152. Höcherl K, Kees F, Krämer BK, Kurtz A. Cyclosporine A attenuates the natriuretic action of loop diuretics by inhibition of renal COX-2 expression. *Kidney Int.* 2004;65(6):2071-80.
153. Komers R, Anderson S, Epstein M. Renal and cardiovascular effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Am. J. Kidney Dis.* 2001;38(6):1145-57.
154. Wolf A, Trendelenburg CF, Diez-Fernandez C, Prieto P, Houy S, Trommer WE, et al. Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997;280(3):1328-34.
155. O'Connell S, Tuite N, Slattery C, Ryan MP, McMorrow T. Cyclosporine A--induced oxidative stress in human renal mesangial cells: a role for ERK 1/2 MAPK signaling. *Toxicol. Sci.* 2012;126(1):101-13.
156. Djamali A. Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allografts. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2007;293(2):F445-455.
157. Galletti P, Di Gennaro CI, Migliardi V, Indaco S, Della Ragione F, Manna C, et al. Diverse effects of natural antioxidants on cyclosporin cytotoxicity in rat renal tubular cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005;20(8):1551-8.
158. Sarró E, Tornavaca O, Plana M, Meseguer A, Itarte E. Phosphoinositide 3-kinase inhibitors protect mouse kidney cells from cyclosporine-induced cell death. *Kidney Int.* 2008;73(1):77-85.

159. Feldman G, Kiely B, Martin N, Ryan G, McMorro T, Ryan MP. Role for TGF-beta in cyclosporine-induced modulation of renal epithelial barrier function. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007;18(6):1662-71.
160. Islam M, Burke JF Jr, McGowan TA, Zhu Y, Dunn SR, McCue P, et al. Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney Int.* 2001;59(2):498-506.
161. Prashar Y, Khanna A, Sehajpal P, Sharma VK, Suthanthiran M. Stimulation of transforming growth factor-beta 1 transcription by cyclosporine. *FEBS Lett.* 1995;358(2):109-12.
162. Johnson DW, Saunders HJ, Johnson FJ, Huq SO, Field MJ, Pollock CA. Cyclosporin exerts a direct fibrogenic effect on human tubulointerstitial cells: roles of insulin-like growth factor I, transforming growth factor beta1, and platelet-derived growth factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999;289(1):535-42.
163. Khanna A, Plummer M, Bromberek C, Bresnahan B, Hariharan S. Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2002;62(6):2257-63.
164. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 1994;331(19):1286-92.
165. Yokoi H, Sugawara A, Mukoyama M, Mori K, Makino H, Suganami T, et al. Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor-beta: a potential target for preventing renal fibrosis. *Am. J. Kidney Dis.* 2001;38(4 Suppl 1):S134-138.
166. Slattery C, Campbell E, McMorro T, Ryan MP. Cyclosporine A-Induced Renal Fibrosis. *Am J Pathol.* 2005;167(2):395-407.
167. Kumar MS, Hendrix JA, Johnson AD, Owens GK. Smooth muscle alpha-actin gene requires two E-boxes for proper expression in vivo and is a target of class I basic helix-loop-helix proteins. *Circ. Res.* 2003;92(8):840-7.
168. McMorro T, Gaffney MM, Slattery C, Campbell E, Ryan MP. Cyclosporine A induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005;20(10):2215-25.
169. Hazzan M, Hertig A, Buob D, Copin M-C, Noël C, Rondeau E, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition predicts cyclosporine nephrotoxicity in renal transplant recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2011;22(7):1375-81.
170. Garlatti M, Barouki R. Le stress du réticulum endoplasmique : adaptation et toxicité. *MS. Médecine sciences.* 18(5):585-94.
171. Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science.* 1999;286(5446):1888-93.
172. Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell.* 2000;101(5):451-4.
173. Mori K, Ogawa N, Kawahara T, Yanagi H, Yura T. mRNA splicing-mediated C-terminal replacement of transcription factor Hac1p is required for efficient activation of the unfolded protein response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97(9):4660-5.
174. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 1998;12(7):982-95.
175. Pallet N, Bouvier N, Bendjallah A, Rabant M, Flinois JP, Hertig A, et al. Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am. J. Transplant.* 2008;8(11):2283-96.
176. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 1999;13(10):1211-33.
177. Kawakami T, Inagi R, Takano H, Sato S, Ingelfinger JR, Fujita T, et al. Endoplasmic reticulum stress induces autophagy in renal proximal tubular cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009;24(9):2665-72.
178. Høyer-Hansen M, Jäättelä M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.* 2007;14(9):1576-82.

179. Ding W-X, Ni H-M, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, et al. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am. J. Pathol.* 2007;171(2):513-24.
180. Pallet N, Bouvier N, Legendre C, Gilleron J, Codogno P, Beaune P, et al. Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity. *Autophagy.* 2008;4(6):783-91.
181. Bamburg JR, Bray D. Distribution and cellular localization of actin depolymerizing factor. *J. Cell Biol.* 1987;105(6 Pt 1):2817-25.
182. Nagaoka R, Abe H, Kusano K, Obinata T. Concentration of cofilin, a small actin-binding protein, at the cleavage furrow during cytokinesis. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 1995;30(1):1-7.
183. Obinata T, Nagaoka-Yasuda R, Ono S, Kusano K, Mohri K, Ohtaka Y, et al. Low molecular-weight G-actin binding proteins involved in the regulation of actin assembly during myofibrillogenesis. *Cell Struct. Funct.* 1997;22(1):181-9.
184. Yonezawa N, Nishida E, Iida K, Yahara I, Sakai H. Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 1990;265(15):8382-6.
185. Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerckhove J, Ampe C. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur. J. Cell Biol.* 2008;87(8-9):649-67.
186. Andrianantoandro E, Pollard TD. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell.* 2006;24(1):13-23.
187. Minamide LS, Striegl AM, Boyle JA, Meberg PJ, Bamburg JR. Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function. *Nat. Cell Biol.* 2000;2(9):628-36.
188. Chan C, Beltzner CC, Pollard TD. Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr. Biol.* 2009;19(7):537-45.
189. Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA, Marchand JB, Higgs HN, Choe S, et al. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science.* 2001;294(5547):1679-84.
190. Bamburg JR, Wiggan OP. ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol.* 2002;12(12):598-605.
191. Bernard O. Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007;39(6):1071-6.
192. LaLonde DP, Brown MC, Bouverat BP, Turner CE. Actopaxin interacts with TESK1 to regulate cell spreading on fibronectin. *J. Biol. Chem.* 2005;280(22):21680-8.
193. Huang TY, DerMardirossian C, Bokoch GM. Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2006;18(1):26-31.
194. Kim J-S, Huang TY, Bokoch GM. Reactive oxygen species regulate a slingshot-cofilin activation pathway. *Mol. Biol. Cell.* 2009;20(11):2650-60.
195. Eiseler T, Döppler H, Yan IK, Kitatani K, Mizuno K, Storz P. Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through slingshot. *Nat. Cell Biol.* 2009;11(5):545-56.
196. Wang Y, Shibasaki F, Mizuno K. Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J. Biol. Chem.* 2005;280(13):12683-9.
197. Goldschmidt-Clermont PJ, Machesky LM, Doberstein SK, Pollard TD. Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin. *J. Cell Biol.* 1991;113(5):1081-9.
198. Didry D, Carlier MF, Pantaloni D. Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover. *J. Biol. Chem.* 1998;273(40):25602-11.
199. Selden LA, Kinoshita H, Newman J, Lincoln B, Hurwitz C, Gershman LC, et al. Severing of F-actin by the amino-terminal half of gelsolin suggests internal cooperativity in gelsolin. *Biophys. J.* 1998;75(6):3092-100.
200. Gremm D, Wegner A. Gelsolin as a calcium-regulated actin filament-capping protein. *Eur. J. Biochem.* 2000;267(14):4339-45.
201. Cooper JA, Schafer DA. Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000;12(1):97-103.

202. Witke W, Sharpe AH, Hartwig JH, Azuma T, Stossel TP, Kwiatkowski DJ. Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin. *Cell*. 1995;81(1):41-51.
203. Cunningham CC, Stossel TP, Kwiatkowski DJ. Enhanced motility in NIH 3T3 fibroblasts that overexpress gelsolin. *Science*. 1991;251(4998):1233-6.
204. Neisch AL, Fehon RG. Ezrin, Radixin and Moesin: key regulators of membrane-cortex interactions and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2011;23(4):377-82.
205. Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. Organizing the Cell Cortex: The role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(4):276-87.
206. Fiévet B, Louvard D, Arpin M. ERM proteins in epithelial cell organization and functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007;1773(5):653-60.
207. McClatchey AI, Fehon RG. Merlin and the ERM proteins--regulators of receptor distribution and signaling at the cell cortex. *Trends Cell Biol.* 2009;19(5):198-206.
208. Goldschmidt-Clermont PJ, Furman MI, Wachsstock D, Safer D, Nachmias VT, Pollard TD. The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol. Biol. Cell.* 1992;3(9):1015-24.
209. Chhabra D, Bao S, dos Remedios CG. The distribution of cofilin and DNase I in vivo. *Cell Res.* 2002;12(3-4):207-14.
210. Sept D, Xu J, Pollard TD, McCammon JA. Annealing accounts for the length of actin filaments formed by spontaneous polymerization. *Biophys. J.* 1999;77(6):2911-9.
211. Small EM. The Actin-MRTF-SRF Gene Regulatory Axis and Myofibroblast Differentiation. *J Cardiovasc Transl Res* [Internet]. 2012 [cité 2012]; Available de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22898751>
212. Olson EN, Nordheim A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010;11(5):353-65.
213. Posern G, Treisman R. Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol.* 2006;16(11):588-96.
214. Fan L, Sebe A, Péterfi Z, Masszi A, Thirone ACP, Rotstein OD, et al. Cell contact-dependent regulation of epithelial-myofibroblast transition via the rho-rho kinase-phospho-myosin pathway. *Mol. Biol. Cell.* 2007;18(3):1083-97.
215. Schrott G, Philippar U, Berger J, Schwarz H, Heidenreich O, Nordheim A. Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 2002;156(4):737-50.
216. Toivola DM, Tao G-Z, Habtezion A, Liao J, Omary MB. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol.* 2005;15(11):608-17.
217. Houben F, Ramaekers FCS, Snoeckx LHEH, Broers JLV. Role of nuclear lamina-cytoskeleton interactions in the maintenance of cellular strength. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007;1773(5):675-86.
218. Qin Z, Buehler MJ, Kreplak L. A multi-scale approach to understand the mechanobiology of intermediate filaments. *J Biomech.* 2010;43(1):15-22.
219. Hatzinger PB, Chen Q, Dong LQ, Stevens JL. Alterations in intermediate filament proteins in rat kidney proximal tubule epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988;157(3):1316-22.
220. Schmid E, Schiller DL, Grund C, Stadler J, Franke WW. Tissue type-specific expression of intermediate filament proteins in a cultured epithelial cell line from bovine mammary gland. *J. Cell Biol.* 1983;96(1):37-50.
221. Ben-Ze'ev A. Differential control of cytokeratins and vimentin synthesis by cell-cell contact and cell spreading in cultured epithelial cells. *J. Cell Biol.* 1984;99(4 Pt 1):1424-33.
222. Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, Downing KH. High-resolution model of the microtubule. *Cell.* 1999;96(1):79-88.
223. Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997;13:83-117.
224. Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J. Cell Biol.* 2002;157(7):1187-96.

225. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1975;72(5):1858-62.
226. Vale RD. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell.* 2003;112(4):467-80.
227. Vallee RB, Williams JC, Varma D, Barnhart LE. Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J. Neurobiol.* 2004;58(2):189-200.
228. Burkhardt JK. The role of microtubule-based motor proteins in maintaining the structure and function of the Golgi complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998;1404(1-2):113-26.
229. Terasaki M, Chen LB, Fujiwara K. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J. Cell Biol.* 1986;103(4):1557-68.
230. Lindemann CB, Lesich KA. Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *J. Cell. Sci.* 2010;123(Pt 4):519-28.
231. Walczak CE, Heald R. Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *Int. Rev. Cytol.* 2008;265:111-58.
232. Abe K, Takeichi M. EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(1):13-9.
233. Ikenouchi J, Umeda K, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J Cell Biol.* 2007;176(6):779-86.
234. Praetorius HA, Spring KR. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J. Membr. Biol.* 2001;184(1):71-9.
235. Oriolo AS, Wald FA, Ramsauer VP, Salas PJI. Intermediate filaments: a role in epithelial polarity. *Exp. Cell Res.* 2007;313(10):2255-64.
236. Coulombe PA, Kerns ML, Fuchs E. Epidermolysis bullosa simplex: a paradigm for disorders of tissue fragility. *J. Clin. Invest.* 2009;119(7):1784-93.
237. Smith F. The molecular genetics of keratin disorders. *Am J Clin Dermatol.* 2003;4(5):347-64.
238. Goebel HH, Laing NG. Actinopathies and Myosinopathies. *Brain Pathology.* 2009;19(3):516-22.
239. Goebel HH, Müller HD. Protein Aggregate Myopathies. *Seminars in Pediatric Neurology.* 2006;13(2):96-103.
240. Paulin D, Diguët N, Xue Z, Li Z. [Intermediate-filament-associated diseases]. *Biol Aujourd'hui.* 2011;205(3):139-46.
241. Brandt R, Hundelt M, Shahani N. Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005;1739(2-3):331-54.
242. Pallet N, Anglicheau D. Transition épithélio-mésenchymateuse: aspects fondamentaux. *Actualité néphrologiques 2008.* 2008.
243. Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am. J. Pathol.* 2001;159(4):1465-75.
244. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004;15(1):1-12.
245. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2003;112(12):1776-84.
246. Guarino M. Epithelial-to-mesenchymal change of differentiation. From embryogenetic mechanism to pathological patterns. *Histol. Histopathol.* 1995;10(1):171-84.
247. Guarino M, Micheli P, Pallotti F, Giordano F. Pathological relevance of epithelial and mesenchymal phenotype plasticity. *Pathol. Res. Pract.* 1999;195(6):379-89.
248. Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J. Cell Biol.* 1995;130(2):393-405.
249. Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, Dell'Antonio G, Grillo C, Grillo P, et al. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int.* 2002;62(1):137-46.
250. Hertig A, Verine J, Mougnot B, Jouanneau C, Ouali N, Sebe P, et al. Risk factors for early epithelial to mesenchymal transition in renal grafts. *Am. J. Transplant.* 2006;6(12):2937-46.
251. Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat. Rev. Genet.* 2010;11(5):331-44.

252. Gallagher AR, Germino GG, Somlo S. Molecular advances in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010;17(2):118-30.
253. Choi Y-H, Suzuki A, Hajarnis S, Ma Z, Chapin HC, Caplan MJ, et al. Polycystin-2 and phosphodiesterase 4C are components of a ciliary A-kinase anchoring protein complex that is disrupted in cystic kidney diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(26):10679-84.
254. Wilson PD. Apico-basal polarity in polycystic kidney disease epithelia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2011;1812(10):1239-48.
255. Snoeijis MGJ, van Bijnen A, Swennen E, Haenen GRMM, Roberts LJ, Christiaans MHL, et al. Tubular Epithelial Injury and Inflammation After Ischemia and Reperfusion in Human Kidney Transplantation. *Annals of Surgery.* 2011;253(3):598-604.
256. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J. Clin. Invest.* 2004;114(1):5-14.
257. Sáenz-Morales D, Conde E, Escribese MM, García-Martos M, Alegre L, Blanco-Sánchez I, et al. ERK1/2 mediates cytoskeleton and focal adhesion impairment in proximal epithelial cells after renal ischemia. *Cell. Physiol. Biochem.* 2009;23(4-6):285-94.
258. Alderliesten M, de Graauw M, Oldenampsen J, Qin Y, Pont C, van Buren L, et al. Extracellular signal-regulated kinase activation during renal ischemia/reperfusion mediates focal adhesion dissolution and renal injury. *Am. J. Pathol.* 2007;171(2):452-62.
259. Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant. Proc.* 2008;40(10):3279-88.
260. Giebish G, Windhager EE. Characterization of renal tubular transport of sodium chloride and water as studied in single nephrons. *Am. J. Med.* 1963;34:1-6.
261. Du Z, Yan Q, Duan Y, Weinbaum S, Weinstein AM, Wang T. Axial flow modulates proximal tubule NHE3 and H-ATPase activities by changing microvillus bending moments. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006;290(2):F289-296.
262. Schnermann J, Wahl M, Liebau G, Fischbach H. Balance between tubular flow rate and net fluid reabsorption in the proximal convolution of the rat kidney. I. Dependency of reabsorptive net fluid flux upon proximal tubular surface area at spontaneous variations of filtration rate. *Pflugers Arch.* 1968;304(1):90-103.
263. Maddox DA, Fortin SM, Tartini A, Barnes WD, Gennari FJ. Effect of acute changes in glomerular filtration rate on Na⁺/H⁺ exchange in rat renal cortex. *J. Clin. Invest.* 1992;89(4):1296-303.
264. Preisig PA. Luminal flow rate regulates proximal tubule H-HCO₃ transporters. *Am. J. Physiol.* 1992;262(1 Pt 2):F47-54.
265. Milnor W. Principles of hemodynamics. *Medical Physiology.* Mountcastle VB; 1974. p. p 914.
266. Lipowsky HH, Kovalcheck S, Zweifach BW. The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. *Circ. Res.* 1978;43(5):738-49.
267. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ. Res.* 1983;53(4):502-14.
268. Olesen SP, Clapham DE, Davies PF. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;331(6152):168-70.
269. Gautam M, Shen Y, Thirkill TL, Douglas GC, Barakat AI. Flow-activated chloride channels in vascular endothelium. Shear stress sensitivity, desensitization dynamics, and physiological implications. *J. Biol. Chem.* 2006;281(48):36492-500.
270. Gautam M, Gojova A, Barakat AI. Flow-activated ion channels in vascular endothelium. *Cell Biochem. Biophys.* 2006;46(3):277-84.
271. O'Neil RG, Heller S. The mechanosensitive nature of TRPV channels. *Pflugers Arch.* 2005;451(1):193-203.
272. Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Ando J. Fluid shear stress activates Ca²⁺ influx into human endothelial cells via P2X₄ purinoceptors. *Circ. Res.* 2000;87(5):385-91.
273. Shay-Salit A, Shushy M, Wolfovitz E, Yahav H, Breviario F, Dejana E, et al. VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99(14):9462-7.

274. Lee HJ, Koh GY. Shear stress activates Tie2 receptor tyrosine kinase in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;304(2):399-404.
275. Tseng H, Peterson TE, Berk BC. Fluid shear stress stimulates mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. *Circ. Res.* 1995;77(5):869-78.
276. Gudi SR, Clark CB, Frangos JA. Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction. *Circ. Res.* 1996;79(4):834-9.
277. Jo H, Sipos K, Go YM, Law R, Rong J, McDonald JM. Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase in endothelial cells. Gi2- and Gbeta/gamma-dependent signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 1997;272(2):1395-401.
278. Chachisvilis M, Zhang Y-L, Frangos JA. G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(42):15463-8.
279. Ruoslahti E. Integrins. *J. Clin. Invest.* 1991;87(1):1-5.
280. Burridge K, Chrzanoska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996;12:463-518.
281. Ishida T, Peterson TE, Kovach NL, Berk BC. MAP kinase activation by flow in endothelial cells. Role of beta 1 integrins and tyrosine kinases. *Circ. Res.* 1996;79(2):310-6.
282. Li S, Kim M, Hu YL, Jalali S, Schlaepfer DD, Hunter T, et al. Fluid shear stress activation of focal adhesion kinase. Linking to mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 1997;272(48):30455-62.
283. Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell. Biol.* 1994;14(3):1680-8.
284. Hildebrand JD, Schaller MD, Parsons JT. Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol. Biol. Cell.* 1995;6(6):637-47.
285. Hanks SK, Polte TR. Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays.* 1997;19(2):137-45.
286. Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science.* 1995;269(5228):1270-2.
287. Osawa M, Masuda M, Kusano K, Fujiwara K. Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule? *J. Cell Biol.* 2002;158(4):773-85.
288. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature.* 2005;437(7057):426-31.
289. Anderson RG. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90(23):10909-13.
290. Rizzo V, McIntosh DP, Oh P, Schnitzer JE. In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J. Biol. Chem.* 1998;273(52):34724-9.
291. Boyd NL, Park H, Yi H, Boo YC, Sorescu GP, Sykes M, et al. Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003;285(3):H1113-1122.
292. Rizzo V, Morton C, DePaola N, Schnitzer JE, Davies PF. Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003;285(4):H1720-1729.
293. Yu J, Bergaya S, Murata T, Alp IF, Bauer MP, Lin MI, et al. Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *J. Clin. Invest.* 2006;116(5):1284-91.
294. Schwartz EA, Leonard ML, Bizios R, Bowser SS. Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear. *Am. J. Physiol.* 1997;272(1 Pt 2):F132-138.
295. Nauli SM, Kawanabe Y, Kaminski JJ, Pearce WJ, Ingber DE, Zhou J. Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through polycystin-1. *Circulation.* 2008;117(9):1161-71.

296. AbouAlaiwi WA, Takahashi M, Mell BR, Jones TJ, Ratnam S, Kolb RJ, et al. Ciliary polycystin-2 is a mechanosensitive calcium channel involved in nitric oxide signaling cascades. *Circ. Res.* 2009;104(7):860-9.
297. Hierck BP, Van der Heiden K, Alkemade FE, Van de Pas S, Van Thienen JV, Groenendijk BCW, et al. Primary cilia sensitize endothelial cells for fluid shear stress. *Dev. Dyn.* 2008;237(3):725-35.
298. Dewey CF Jr, Bussolari SR, Gimbrone MA Jr, Davies PF. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng.* 1981;103(3):177-85.
299. Levesque MJ, Nerem RM. The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *J Biomech Eng.* 1985;107(4):341-7.
300. Gimbrone MA Jr, Resnick N, Nagel T, Khachigian LM, Collins T, Topper JN. Hemodynamics, endothelial gene expression, and atherogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997;811:1-10; discussion 10-11.
301. McCue S, Noria S, Langille BL. Shear-induced reorganization of endothelial cell cytoskeleton and adhesion complexes. *Trends Cardiovasc. Med.* 2004;14(4):143-51.
302. Essig M, Terzi F, Burtin M, Friedlander G. Mechanical strains induced by tubular flow affect the phenotype of proximal tubular cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001;281(4):F751-762.
303. Friedrich C, Endlich N, Kriz W, Endlich K. Podocytes are sensitive to fluid shear stress in vitro. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006;291(4):F856-865.
304. Duan Y, Gotoh N, Yan Q, Du Z, Weinstein AM, Wang T, 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(32):11418-23.
305. Flitney EW, Kuczmarski ER, Adam SA, Goldman RD. Insights into the mechanical properties of epithelial cells: the effects of shear stress on the assembly and remodeling of keratin intermediate filaments. *FASEB J.* 2009;23(7):2110-9.
306. Sivaramakrishnan S, Schneider JL, Sitikov A, Goldman RD, Ridge KM. Shear stress induced reorganization of the keratin intermediate filament network requires phosphorylation by protein kinase C zeta. *Mol. Biol. Cell.* 2009;20(11):2755-65.
307. Du Z, Duan Y, Yan Q, Weinstein AM, Weinbaum S, Wang T. Mechanosensory function of microvilli of the kidney proximal tubule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(35):13068-73.
308. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 1997;11(18):2295-322.
309. Li S, Chen BP, Azuma N, Hu YL, Wu SZ, Sumpio BE, et al. Distinct roles for the small GTPases Cdc42 and Rho in endothelial responses to shear stress. *J. Clin. Invest.* 1999;103(8):1141-50.
310. Tzima E, Del Pozo MA, Kiosses WB, Mohamed SA, Li S, Chien S, et al. Activation of Rac1 by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression. *EMBO J.* 2002;21(24):6791-800.
311. Tzima E, Kiosses WB, del Pozo MA, Schwartz MA. Localized cdc42 activation, detected using a novel assay, mediates microtubule organizing center positioning in endothelial cells in response to fluid shear stress. *J. Biol. Chem.* 2003;278(33):31020-3.
312. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol. Rev.* 1995;75(3):519-60.
313. Birukov KG, Birukova AA, Dudek SM, Verin AD, Crow MT, Zhan X, et al. Shear stress-mediated cytoskeletal remodeling and cortactin translocation in pulmonary endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002;26(4):453-64.
314. Tzima E, del Pozo MA, Shattil SJ, Chien S, Schwartz MA. Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *EMBO J.* 2001;20(17):4639-47.
315. Tzima E. Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response. *Circ. Res.* 2006;98(2):176-85.
316. Hu YL, Chien S. Effects of shear stress on protein kinase C distribution in endothelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* 1997;45(2):237-49.
317. Cheng JJ, Wung BS, Chao YJ, Wang DL. Sequential activation of protein kinase C (PKC)-alpha and PKC-epsilon contributes to sustained Raf/ERK1/2 activation in endothelial cells under mechanical strain. *J. Biol. Chem.* 2001;276(33):31368-75.

318. Morita T, Kurihara H, Maemura K, Yoshizumi M, Nagai R, Yazaki Y. Role of Ca²⁺ and protein kinase C in shear stress-induced actin depolymerization and endothelin 1 gene expression. *Circ. Res.* 1994;75(4):630-6.
319. Kuchan MJ, Frangos JA. Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1993;264(1 Pt 2):H150-156.
320. Go YM, Park H, Maland MC, Darley-Usmar VM, Stoyanov B, Wetzker R, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase gamma mediates shear stress-dependent activation of JNK in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1998;275(5 Pt 2):H1898-1904.
321. Boo YC, Hwang J, Sykes M, Michell BJ, Kemp BE, Lum H, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002;283(5):H1819-1828.
322. Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol. Scand.* 2000;168(1):81-8.
323. Go YM, Boo YC, Park H, Maland MC, Patel R, Pritchard KA Jr, et al. Protein kinase B/Akt activates c-Jun NH(2)-terminal kinase by increasing NO production in response to shear stress. *J. Appl. Physiol.* 2001;91(4):1574-81.
324. Jalali S, Li YS, Sotoudeh M, Yuan S, Li S, Chien S, et al. Shear stress activates p60src-Ras-MAPK signaling pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998;18(2):227-34.
325. Li YS, Shyy JY, Li S, Lee J, Su B, Karin M, et al. The Ras-JNK pathway is involved in shear-induced gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 1996;16(11):5947-54.
326. Dekker RJ, van Soest S, Fontijn RD, Salamanca S, de Groot PG, VanBavel E, et al. Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Krüppel-like factor (KLF2). *Blood.* 2002;100(5):1689-98.
327. Khachigian LM, Anderson KR, Halnon NJ, Gimbrone MA Jr, Resnick N, Collins T. Egr-1 is activated in endothelial cells exposed to fluid shear stress and interacts with a novel shear-stress-response element in the PDGF A-chain promoter. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17(10):2280-6.
328. Hsieh HJ, Li NQ, Frangos JA. Shear stress increases endothelial platelet-derived growth factor mRNA levels. *Am. J. Physiol.* 1991;260(2 Pt 2):H642-646.
329. Malek AM, Gibbons GH, Dzau VJ, Izumo S. Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium. *J. Clin. Invest.* 1993;92(4):2013-21.
330. Ohno M, Cooke JP, Dzau VJ, Gibbons GH. Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade. *J. Clin. Invest.* 1995;95(3):1363-9.
331. Ando J, Tsuboi H, Korenaga R, Takada Y, Toyama-Sorimachi N, Miyasaka M, et al. Shear stress inhibits adhesion of cultured mouse endothelial cells to lymphocytes by downregulating VCAM-1 expression. *Am. J. Physiol.* 1994;267(3 Pt 1):C679-687.
332. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1994;94(2):885-91.
333. Diamond SL, Sharefkin JB, Dieffenbach C, Frasier-Scott K, McIntire LV, Eskin SG. Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress. *J. Cell. Physiol.* 1990;143(2):364-71.
334. Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007;49(25):2379-93.
335. Molitoris BA, Leiser J, Wagner MC. Role of the actin cytoskeleton in ischemia-induced cell injury and repair. *Pediatr. Nephrol.* 1997;11(6):761-7.
336. Sutton TA, Molitoris BA. Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Semin. Nephrol.* 1998;18(5):490-7.

337. Aramburu J, Yaffe MB, López-Rodríguez C, Cantley LC, Hogan PG, Rao A. Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science*. 1999;285(5436):2129-33.
338. Hirayama A, Adachi R, Otani S, Kasahara T, Suzuki K. Cofilin plays a critical role in IL-8-dependent chemotaxis of neutrophilic HL-60 cells through changes in phosphorylation. *J. Leukoc. Biol.* 2007;81(3):720-8.
339. Slattery C, Campbell E, McMorro T, Ryan MP. Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *Am. J. Pathol.* 2005;167(2):395-407.
340. Chuman L, Fine LG, Cohen AH, Saier MH Jr. Continuous growth of proximal tubular kidney epithelial cells in hormone-supplemented serum-free medium. *J. Cell Biol.* 1982;94(3):506-10.
341. Prignano F, Domenici-Lombardo L, Gerlini G, Pimpinelli N, Romagnoli P. Cyclosporin-A affects the organization of cytoskeleton of normal human keratinocytes in culture. *Histol. Histopathol.* 1996;11(4):889-94.
342. Rezzani R, Rodella L, Bianchi R. Cyclosporine A affects the organization of cytoskeletal fibrillar proteins in rat thymus. *Acta Histochem.* 2000;102(1):57-67.
343. Kim H, Nakamura F, Lee W, Shifrin Y, Arora P, McCulloch CA. Filamin A is required for vimentin-mediated cell adhesion and spreading. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2010;298(2):C221-236.
344. Lamoureux F, Mestre E, Essig M, Sauvage FL, Marquet P, Gastinel LN. Quantitative proteomic analysis of cyclosporine-induced toxicity in a human kidney cell line and comparison with tacrolimus. *J. Proteomics.* 2011;75(2):677-94.
345. Graef IA, Wang F, Charron F, Chen L, Neilson J, Tessier-Lavigne M, et al. Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell.* 2003;113(5):657-70.
346. Molkentin JD. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc. Res.* 2004;63(3):467-75.
347. Kim Y, Sung JY, Ceglia I, Lee K-W, Ahn J-H, Halford JM, et al. Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature.* 2006;442(7104):814-7.
348. dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, et al. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 2003;83(2):433-73.
349. Hryciw DH, Wang Y, Devuyst O, Pollock CA, Poronnik P, Guggino WB. Cofilin interacts with CIC-5 and regulates albumin uptake in proximal tubule cell lines. *J. Biol. Chem.* 2003;278(41):40169-76.
350. Christensen EI, Verroust PJ, Nielsen R. Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflugers Arch.* 2009;458(6):1039-48.
351. Camara NO, Matos AC, Rodrigues DA, Pereira AB, Pacheco-Silva A. Urinary retinol binding protein is a good marker of progressive cyclosporine nephrotoxicity after heart transplant. *Transplant. Proc.* 2001;33(3):2129-31.
352. Runembert I, Queffeuilou G, Federici P, Vrtovsni F, Colucci-Guyon E, Babinet C, et al. Vimentin affects localization and activity of sodium-glucose cotransporter SGLT1 in membrane rafts. *J. Cell. Sci.* 2002;115(Pt 4):713-24.
353. Jiang L, Ding J, Tsai H, Li L, Feng Q, Miao J, et al. Over-expressing transient receptor potential cation channel 6 in podocytes induces cytoskeleton rearrangement through increases of intracellular Ca²⁺ and RhoA activation. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2011;236(2):184-93.
354. Janjic D, Wollheim CB. Islet cell metabolism is reflected by the MTT (tetrazolium) colorimetric assay. *Diabetologia.* 1992;35(5):482-5.
355. Descazeaud V, Mestre E, Marquet P, Essig M. Calcineurin regulation of cytoskeleton organization: a new paradigm to analyse the effects of calcineurin inhibitors on the kidney. *J. Cell. Mol. Med.* 2012;16(2):218-27.
356. Jang K-J, Cho HS, Kang DH, Bae WG, Kwon T-H, Suh K-Y. Fluid-shear-stress-induced translocation of aquaporin-2 and reorganization of actin cytoskeleton in renal tubular epithelial cells. *Integr Biol (Camb).* 2011;3(2):134-41.
357. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell Proteomics.* 2004;3(12):1154-69.

358. Galbraith CG, Skalak R, Chien S. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 1998;40(4):317-30.
359. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2001;33(7):637-68.
360. Thiel C, Osborn M, Gerke V. The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembranous cytoskeleton depends on intact p11- and Ca(2+)-binding sites. *J. Cell. Sci.* 1992;103 (Pt 3):733-42.
361. Jung MJ, Murzik U, Wehder L, Hemmerich P, Melle C. Regulation of cellular actin architecture by S100A10. *Exp. Cell Res.* 2010;316(7):1234-40.
362. Hoeflich KP, Ikura M. Radixin: cytoskeletal adopter and signaling protein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004;36(11):2131-6.
363. Freue GVC, Sasaki M, Meredith A, Günther OP, Bergman A, Takhar M, et al. Proteomic signatures in plasma during early acute renal allograft rejection. *Mol. Cell Proteomics.* 2010;9(9):1954-67.
364. Michel PE, Reymond F, Arnaud IL, Josserand J, Girault HH, Rossier JS. Protein fractionation in a multicompartement device using Off-Gel isoelectric focusing. *Electrophoresis.* 2003;24(1-2):3-11.
365. Peng H, Vijayakumar S, Schiene-Fischer C, Li H, Purkerson JM, Malesevic M, 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(10):6465-75.
366. Lamoureux F, Gastinel LN, Mestre E, Marquet P, Essig M. Mapping cyclosporine-induced changes in protein secretion by renal cells using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). *J Proteomics.* 2012;75(12):3674-87.

Chapitre V: ANNEXES
