

THESE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE ED446
UNIVERSITE LILLE 2

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE
Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par
Cynthia VAN DER HAUWAERT

Le 15 Septembre 2014

**DETERMINANTS MOLECULAIRES DE LA NEPHROTOXICITE INDUITE
PAR LE TACROLIMUS APRES TRANSPLANTATION RENALE**

JURY :

Monsieur le Professeur Dany ANGLICHEAU
Monsieur le Professeur Maarten NAESENS
Monsieur le Professeur Jean-Charles CAILLIEZ
Monsieur le Professeur Alexandre HERTIG
Monsieur le Professeur Christian NOEL
Madame le Docteur Christelle CAUFFIEZ

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse

Ces travaux de recherche ont été menés au sein de l'EA4483 « Impact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine », sous la direction scientifique du Docteur Jean-Marc Lo-Guidice.

Cette thèse a été financée par l'Université Lille 2.

Remerciements

Je souhaite, tout d'abord, exprimer mes remerciements aux membres du jury :

Aux Professeurs Dany Anglicheau et Maarten Naesens pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse,

Aux Professeurs Jean-Charles Cailliez, Alexandre Hertig et Christian Noël pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse, Christelle Cauffiez, pour m'avoir encadrée durant quatre années maintenant. Ton aide, tes conseils, tes encouragements et ton soutien m'ont beaucoup aidée dans ce travail. Je te remercie, Christelle, pour ta confiance, ta bonne humeur, ta gentillesse et ta compréhension.

Je remercie les membres de mon Comité de Suivi de Thèse, le Professeur Alexandre Hertig et le Docteur Bruno Lefebvre, qui ont contribué par leurs conseils à l'élaboration de ce travail.

Je tiens à remercier

Le Professeur Franck Broly de m'avoir accueillie dans son équipe au cours de mon Master 2,

Les Docteurs Jean-Marc Lo-Guidice, François Glowacki, Anne Garat, André Klein, Nicolas Pottier et le Professeur Delphine Allorge pour leur collaboration, leur disponibilité, et leurs conseils,

Grégoire Savary, Marie-Flore Hennino et Julie Bloch. Merci pour votre aide, votre bonne humeur et surtout merci pour votre sympathie,

Edmone Dewaeles et Stéphanie Quarré ainsi que les Docteurs Michaël Perrais, Viviane Gnemmi, le Professeur Sébastien Aubert et Brigitte Hemon pour leur aide et leur constante disponibilité,

Sans oublier tous les membres de la salle 31 : le Professeur Guillaume Garçon, le Docteur Sébastien Anthérieu, Bérénice Leclercq et Mélanie Hapillon.

Je remercie mes parents qui ont cru en moi et qui m'ont soutenu durant toutes ces années, mes sœurs pour tous ces moments de partage, de fou rire. Enfin je te remercie, Xavier, pour ton soutien, je te remercie pour tout.

Résumé

Bien que le Tacrolimus soit un immunosuppresseur largement prescrit en transplantation rénale, ses effets néphrotoxiques limitent son utilisation. En effet, le Tacrolimus contribue au développement de lésions de fibrose interstitielle rénale et d'atrophie tubulaire à plus ou moins brève échéance. Parmi les mécanismes qui interviennent dans le processus de fibrogenèse, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) a été évoquée. Ainsi, afin d'identifier des déterminants moléculaires de la néphrotoxicité induite par le Tacrolimus et d'évaluer la contribution du processus de TEM, plusieurs approches *in vitro* et *in vivo* ont été combinées. Tout d'abord, un modèle de culture primaire de cellules tubulaires proximales rénales (CTP), cibles privilégiées des xénobiotiques au niveau rénal, a été développé à partir de pièces opératoires. Ce modèle a été caractérisé sur sa pureté, sa stabilité et sa fonctionnalité. De plus, la comparaison de la capacité métabolique des échantillons de tissu rénal sain à différents modèles cellulaires (HEK293, HK2, CTP) nous a permis de montrer que les CTP est le modèle le plus pertinent. L'exposition de cellules rénales au Tacrolimus induit une modification du phénotype des cellules, suggérant un stimulus pro-fibrosant. Par ailleurs, le développement d'un modèle murin de néphrotoxicité induite par le Tacrolimus a été réalisé. Les données histologiques et d'expression génique montrent que les reins de souris traitées par Tacrolimus présentent des zones localisées d'expression des marqueurs mésenchymateux (vimentine) et de fibrose (collagène, α -SMA, miR-21). Enfin, la variabilité interindividuelle des effets néphrotoxiques du Tacrolimus est potentiellement associée à la présence de polymorphismes génétiques (SNP). Nos résultats montrent que deux SNP affectant le donneur (*CYP3A5* 6986A>G et *ABCB1* 3435C>T) sont significativement associés à une plus faible expression des marqueurs de TEM et à un nombre moins important de lésions de fibrose rénale sur les biopsies de greffons à 3 mois post-greffe. Enfin, les patients porteurs d'un greffon de génotype *CAV1* rs4730751AA ont une perte de fonction rénale plus rapide. Dans le cadre de la transplantation rénale, ces résultats suggèrent que certains SNP du donneur influencent la néphrotoxicité du Tacrolimus et que son métabolisme *in situ* est un élément clé dans la compréhension de la fibrogenèse du greffon. Au total, les résultats obtenus nous ont permis d'identifier des facteurs individuels de vulnérabilité à la toxicité du Tacrolimus. De telles données, utilisées comme outil prédictif d'une néphrotoxicité plus ou moins importante, permettrait d'améliorer la prise en charge de la néphrotoxicité des immunosuppresseurs.

Table des matières

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	7
AVANT PROPOS	8
PUBLICATIONS	10
COMMUNICATIONS	11
PARTIE 1 : REVUE GENERALE	12
Chapitre I. Prise en charge des xénobiotiques par le tissu rénal	13
I. Biotransformation et transport des xénobiotiques	13
1. Enzymes de phase I.....	13
2. Enzymes de phase II.....	14
3. Protéines de phase III.....	14
4. Récepteurs nucléaires.....	15
II. Prise en charge des xénobiotiques par le tissu rénal	16
1. Exposition du rein aux xénobiotiques.....	16
2. Capacité métabolique du tissu rénal.....	17
III. Variabilité inter-individuelle de prise en charge des xénobiotiques	17
1. Facteurs physiopathologiques.....	17
2. Facteurs environnementaux.....	18
3. Facteurs génétiques.....	18
4. Facteurs épigénétiques.....	19
a. Les microARN.....	19
b. Méthylation de l'ADN.....	20
c. Modification des histones.....	21
Chapitre II. Néphrotoxicité du Tacrolimus	23
I. Le Tacrolimus	23
1. Généralités.....	23
2. Mode d'action du Tacrolimus.....	23
3. Prise en charge cellulaire du Tacrolimus.....	24
II. Néphrotoxicité du Tacrolimus	25
1. Toxicité aiguë des ACN.....	26
a. Effets hémodynamiques.....	26
b. Effets tubulaires.....	27
c. Microangiopathies thrombotiques.....	27
2. Toxicité chronique des ACN.....	27
a. Atteintes vasculaires et glomérulaires.....	27
b. Atteintes tubulo-interstitielles.....	28
III. Fibrose rénale	29
1. Mécanismes de la fibrose rénale.....	29
2. Rôle du TGF- β	30
a. Synthèse et voie de signalisation du TGF- β	30
b. TGF- β et fibrose rénale.....	31
c. TGF- β et cavéoline.....	31
3. Les myofibroblastes.....	33
a. Rôle des myofibroblastes.....	33
b. Origine des myofibroblastes.....	33

Chapitre III. Déterminants moléculaires de la néphrotoxicité induite par le Tacrolimus.....	36
I. Susceptibilité des effets néphrotoxiques du Tacrolimus	36
II. Implication de polymorphismes génétiques	36
1. Protéines impliquées dans la prise en charge du Tacrolimus	36
<i>a. Polymorphismes génétiques du CYP3A5</i>	<i>37</i>
<i>b. Polymorphismes génétiques du CYP3A4</i>	<i>38</i>
<i>c. Polymorphismes génétiques de ABCB1</i>	<i>39</i>
<i>d. Polymorphismes génétiques de PXR</i>	<i>40</i>
2. Polymorphismes génétiques des gènes impliqués dans la fibrose	40
<i>a. Polymorphismes génétiques de CAV1</i>	<i>41</i>
<i>b. Polymorphismes génétiques de TGFB</i>	<i>41</i>
III. Implication des microARN	41
1. MicroARN et gènes impliqués dans le métabolisme et le transport du Tacrolimus	41
2. MicroARN et fibrose rénale	42
3. MicroARN en transplantation rénale	42
OBJECTIF GLOBAL DU PROJET	44
PARTIE 2 : TRAVAUX.....	45
Axe I. Modèle in vitro de toxicité induite par le Tacrolimus	46
I. Modèle de cultures primaires de cellules épithéliales tubulaires proximales	46
1. Développement du modèle de cultures primaires de cellules épithéliales tubulaires proximales (CTP)	46
2. Capacité métabolique du modèle de cultures primaires de CTP	46
Article 1	48
Article 2	60
II. Exposition au Tacrolimus : résultats préliminaires non publiés	87
1. Contexte.....	87
2. Matériels & Méthodes	87
<i>a. Cultures primaires de cellules tubulaires proximales (CTP).....</i>	<i>87</i>
<i>b. Culture de la lignée HK2.....</i>	<i>88</i>
<i>c. Viabilité cellulaire</i>	<i>88</i>
<i>d. Exposition au Tacrolimus</i>	<i>88</i>
<i>e. Extraction des ARN totaux</i>	<i>88</i>
<i>f. Rétro-transcription des miARN</i>	<i>88</i>
<i>g. PCR en temps réel des miARN</i>	<i>89</i>
<i>h. Rétro-transcription des ARNm</i>	<i>89</i>
<i>i. PCR en temps réel des ARNm</i>	<i>89</i>
<i>j. Statistiques.....</i>	<i>89</i>
3. Résultats.....	90
Axe II. Modèle murin de néphrotoxicité induite par le Tacrolimus.....	91
I. Contexte	91
II. Matériels & Méthodes	91
1. Modèle d'exposition	91

2. Créatininémie.....	92
3. Colorations histologiques.....	92
4. Immunohistochimie	92
5. Hybridation <i>in situ</i>	92
6. Extraction des ARN totaux	93
7. Rétro-transcription des miARN	93
8. PCR en temps réel des miARN	93
9. Rétro-transcription des ARNm	94
10. PCR en temps réel des ARNm	94
11. Statistiques.....	94
III. Résultats et discussion	94
<i>Axe III. Etude clinique de la néphrotoxicité induite par le Tacrolimus</i>	<i>97</i>
I. Implication des polymorphismes génétiques de <i>CYP3A5</i> et de <i>ABCB1</i> sur la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	97
Article 3	98
II. Implication du SNP rs4730751 de <i>CAV1</i> sur la survie du greffon	121
Article 4	122
<i>DISCUSSION GENERALE.....</i>	<i>137</i>
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	<i>145</i>

Liste des principales abréviations

α -SMA	α -Smooth Muscle Actine
ABC	ATP-Binding Protein
ACN	Anticalcineurine
BMP7	Bone Morphogenic Protein 7
CAV	Cavéoline
CNV	Copy Number Variant
CTP	Cellules Tubulaires Proximales
CYP	Cytochrome P450 ou P450
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire
EMX	Enzyme du Métabolisme des Xénobiotiques
FI/AT	Fibrose Interstitielle / Atrophie Tubulaire
FKBP12	FK506 Binding Protein 12
IL-2	Interleukine-2
IRC	Insuffisance Rénale Chronique
MEC	Matrice Extracellulaire
MiARN	MicroARN
MMP	Métalloprotéase
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
OUU	Obstruction Urétérale Unilatérale
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
P-gp	P-Glycoprotéine
PXR	Pregnane X Receptor
SLC	Solute Carrier
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF- β	Transforming Growth Factor- β

Avant-propos

L'insuffisance rénale chronique (IRC), quelle qu'en soit l'étiologie, est la conséquence fonctionnelle ultime de la plupart des néphropathies. Elle se définit comme une perte progressive de la fonction rénale liée à des lésions anatomiques progressives et irréversibles des structures du parenchyme rénal. Les patients atteints des formes les plus sévères d'IRC (dites terminales) nécessitent une prise en charge en épuration extra-rénale par hémodialyse ou par dialyse péritonéale, ou une transplantation rénale. Comparée à la dialyse, la transplantation rénale offre actuellement la meilleure durée de survie et la meilleure qualité de vie. Depuis les années 1980, de nombreux progrès ont permis d'améliorer le pronostic de la transplantation rénale avec une survie du greffon supérieure à 90% durant la première année. Néanmoins, à long terme, il a été décrit une perte de 4% de greffons par an (Galichon *et al.*, 2013a ; Nankivell & Kuypers, 2011) et après 10 ans de greffe, environ 40% des patients retournent en dialyse ou entament une nouvelle procédure de transplantation (www.agence-biomédecine.fr).

Différents mécanismes sont à l'origine de la perte progressive de fonction du greffon rénal (dysfonction chronique du greffon). Il peut s'agir de causes immunologiques telles que des rejets aigus tardifs survenant durant la première année de greffe (Shishido *et al.*, 2003), ou de causes non allo-immunes. Les multiples mécanismes non immunologiques de perte de greffon impliquent la récurrence de la néphropathie initiale, les lésions vasculaires secondaires à l'hypertension artérielle, l'âge du donneur et une durée d'ischémie froide importante (de plus de 24h) (Salahudeen *et al.*, 2004 ; Naesens *et al.*, 2009a ; Veroux *et al.*, 2012). Enfin, les immunosuppresseurs de la famille des anticalcineurines (ACN) sont responsables d'effets néphrotoxiques et contribuent ainsi au processus de dysfonction chronique du greffon (Nankivell *et al.*, 2003). D'un point de vue histologique, la dysfonction chronique du greffon est associée à une destruction progressive et irréversible du parenchyme rénal avec, notamment, des lésions de fibrose interstitielle (Snanoudj *et al.*, 2011).

L'étude de la néphrotoxicité du Tacrolimus s'inscrit dans le programme de recherche de l'Equipe d'Accueil 4483 dont la thématique concerne l' « Impact de l'environnement chimique sur la santé humaine » et qui s'appuie sur deux axes. Le premier axe porte sur l' « Etude de marqueurs d'exposition, d'imprégnation et d'effets de xénobiotiques d'intérêt en population » et le deuxième axe sur l' « Analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires associés à la pathogénicité de xénobiotiques d'intérêt ». C'est dans ce deuxième axe que s'inscrivent mes travaux de recherche. Au

cours de ma thèse, je me suis intéressée à la néphrotoxicité induite par le Tacrolimus après transplantation rénale. Pour cela, plusieurs approches expérimentales ont été menées. Tout d'abord, un modèle de cultures primaires de cellules épithéliales tubulaires proximales rénales a été développé et caractérisé en termes de pureté, stabilité, propriété fonctionnelle, phénotype et capacité métabolique (**Article 1 et 2**). Dans une approche complémentaire *in vivo*, l'expression de certains gènes et microARN impliqués dans la fibrose ont été étudiés dans un modèle murin d'exposition au Tacrolimus (**Résultats non publiés**). Enfin, dans une approche clinique, des polymorphismes génétiques affectant les gènes *ABCB1* et *CYP3A5*, impliqués dans la prise en charge cellulaire du Tacrolimus (**Article 3**), et affectant le gène et *CAV1* (**Article 4**), impliqués dans la fibrose, ont été étudiés dans une cohorte de patients transplantés rénaux sous Tacrolimus afin d'évaluer leur impact sur les lésions de fibrose et la fonction rénale des greffons rénaux.

Ce manuscrit s'organise en deux grandes parties. La première partie détaille, dans un premier temps, la capacité du tissu rénal à répondre à des agressions toxiques et, dans un deuxième temps, expose les déterminants moléculaires connus de la susceptibilité interindividuelle de la néphrotoxicité induite par le Tacrolimus. La deuxième partie présentera les résultats de nos travaux basés sur trois approches complémentaires (modèles cellulaires, modèle murin d'exposition au Tacrolimus et exploitation d'une cohorte de patients transplantés rénaux sous Tacrolimus).

Publications

1. **Van der Hauwaert C***, Savary G*, Gnemmi V, Glowacki F, Pottier N, Bouillez A, Zini L, Leroy X, Cauffiez C, Perrais M, Aubert S. (2013) Isolation and characterization of a primary proximal tubular epithelial cell model from human kidney by CD10/CD13 double labeling. *PLoS One*. **8**(6):e66750. doi: 10.1371/journal.pone.0066750.
*: contribution équivalente
2. **Van der Hauwaert C**, Savary G, Buob D, Leroy X, Aubert S, Flamand V, Hennino MF, Perrais M, Lo Guidice JM, Broly F, Cauffiez C, Glowacki F. (2014) Expression profiles of genes involved in xenobiotic metabolism and disposition in human renal tissues and renal cell models. *Toxicol Appl Pharmacol*. sous presse.
3. Bloch J, Hazzan M, **Van der Hauwaert C**, Buob D, Savary G, Hertig A, Gnemmi V, Frimat M, Perrais M, Copin MC, Broly F, Noel C, Pottier N, Cauffiez C, Glowacki F. Donor CYP3A5 and ABCB1 genetic polymorphisms influence epithelial-to-mesenchyme transition in Tacrolimus-treated kidney recipients, soumis.
4. **Van der Hauwaert C**, Savary G, Pinçon C, Gnemmi V, Frimat M, Noël C, Broly F, Labalette M, Perrais M, Pottier N, Glowacki F, Cauffiez C. Donor CAV1 genetic polymorphism influences graft function after renal transplantation. Manuscrit en preparation.
5. Glowacki F, Savary G, Gnemmi V, Buob D, **Van der Hauwaert C**, Lo-Guidice JM, Hazzan M, Pottier N, Perrais M, Aubert S, Cauffiez C. (2013) Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis. *PLoS One*. **8**(2):e58014. doi: 10.1371/journal.pone.0058014.

Communications

Communications orales

1. Glowacki F, Gnemmi V, Savary G, Lionet A, Buob D, **Van der Hauwaert C**, Hazzan M, Broly F, Noel C, Cauffiez C. Impact du polymorphisme du gène de la Cavéoline-1 sur la fonction du greffon après transplantation rénale. Société Française Néphrologie /Société Francophone de Dialyse - 13ème réunion commune, France - Bordeaux, Octobre 2011.
2. Bloch J, Glowacki F, Cauffiez C, Buob D, Noel C, **Van der Hauwaert C**, Hazzan M. Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Tacrolimus Toxicity in Renal Transplant Recipients. 13th ATC (American Transplant Congress), United-States - Seattle, Mai 2013.
3. **Van der Hauwaert C**, Aubert S, Lo-Guidice JM, Glowacki F, Cauffiez C. Tacrolimus-induced nephrotoxicity after renal transplantation. Journée André Verbert, France - Lille, Septembre 2013.
4. Bloch J, **Van der Hauwaert C**, Hazzan M, Buob D, Hertig A, Gnemmi V, Noel C, Broly F, Cauffiez C, Glowacki F. Des polymorphismes génétiques de CYP3A5 et d'ABCB1 du donneur affectent le processus de transition épithélio-mésenchymateuse des patients transplantés rénaux traités par Tacrolimus. Société Française Néphrologie /Société Francophone de Dialyse - 15ème réunion commune, France - Nantes, Octobre 2013.
5. **Van der Hauwaert C**, Savary G, Glowacki F, Gnemmi V, Cauffiez C, Perrais M, Aubert S. Etablissement et caractérisation d'un modèle de culture primaire de cellules épithéliales tubulaires proximales à partir de parenchyme rénal humain à l'aide d'un double marquage CD10/CD13. Carrefour Pathologie, France - Paris, Novembre 2013
6. Hennino MF, Jomaa Z, **Van der Hauwaert C**, Savary G, Buob D, Gnemmi V, Cauffiez C, Glowacki F. miR21 is involved in renal fibrosis in IgA nephropathy. 51st ERA-EDTA (European Renal Association-European Dialysis and Transplantation Association) congress, Netherlands – Amsterdam, June 2014.

Communications affichées

1. Bloch J, Glowacki F, Cauffiez C, Buob D, Noel C, **Van der Hauwaert C**, Hazzan M. Transition épithélio-mésenchymateuse et exposition au Tacrolimus en transplantation. 12ème congrès de la Société Francophone de Transplantation, France – Nantes, Decembre 2012.
2. Glowacki F, Jomaa Z, Hennino MF, **Van der Hauwaert C**, Gnemmi V, Cauffiez C, Noel C, Copin MC, Buob D. Intérêt pratique du score d'Oxford dans la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA? Néphrologie & Thérapeutique, 2013, 9(5), 334.

Partie 1 : Revue Générale

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre » - Marie Curie

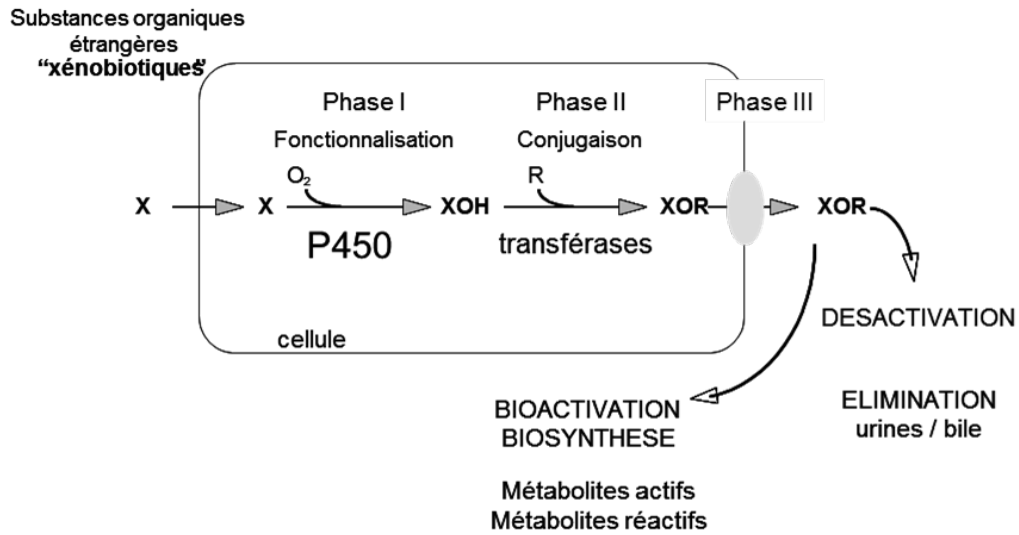


Figure 1. Schématisation de la prise en charge cellulaire des xénobiotiques. Les xénobiotiques (X) sont des composés hydrophobes qui pénètrent dans la cellule par diffusion. Ils peuvent être métabolisés par des réactions de fonctionnalisation (phase I) (XOH) et/ou par des réactions de conjugaison en composés plus hydrophiles (XOX et XOR) (phase II) ou expulsés par des protéines comme la glycoprotéine-P. Leur élimination est directe ou effectuée par l'intermédiaire de protéines de phase III (d'après Beaune & Lorient, 2000).

Chapitre I. Prise en charge des xénobiotiques par le tissu rénal

I. Biotransformation et transport des xénobiotiques

De par leur environnement, les organismes vivants sont constamment exposés à un grand nombre de composés chimiques exogènes de petits poids moléculaires (xénobiotiques). Les xénobiotiques peuvent être d'origine naturelle ou de synthèse, tels que des toxines naturelles, des composés industriels, des polluants atmosphériques, des pesticides, des médicaments...

Les xénobiotiques sont généralement hydrophobes et en s'accumulant dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires, peuvent entraîner la mort cellulaire (Parkinson *et al.*, 1996). Des systèmes enzymatiques puissants se sont développés, au cours de l'évolution, afin de réaliser la détoxification d'une partie de ces molécules. Le processus général de détoxification des xénobiotiques se déroule en trois phases et met en jeu des enzymes de biotransformation, regroupées sous le terme d'Enzyme du Métabolisme des Xénobiotiques (EMX) : les enzymes de phase I, dites de fonctionnalisation, les enzymes de phases II, dites de conjugaison, mais également des protéines de phase III, représentées par des transporteurs (**Figure 1**). Enfin, l'expression de l'ensemble de ces protéines est coordonnée par des facteurs nucléaires (Omiecinski *et al.*, 2011).

1. Enzymes de phase I

Les enzymes de phase I sont principalement représentées par la superfamille des cytochromes P450 (P450 ou CYP), mais également des alcool déshydrogénases (ADH), des aldéhyde déshydrogénases (ALDH), des mono-amine oxydases (MAO) et des flavin-containing monooxygenase (FMO) (Strolin Benedetti *et al.*, 2006). Les P450 réalisent à eux seuls environ 90% des réactions de phase I. Les P450, répartis en familles et sous-familles, sont répertoriés et classés selon une nomenclature basée sur le pourcentage d'homologie de séquence en acides aminés. Ainsi, chez l'Homme, il existe 18 familles et 44 sous-familles de P450, comportant 57 gènes et 58 pseudogènes. Les P450 sont exprimés de manière abondante dans le foie, le tractus gastro-intestinal, les poumons et les reins (Rushmore & Kong, 2002, Zanger & Schwab, 2013). Ils catalysent des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse de la molécule mère. Ces réactions, par l'introduction d'une fonction chimique supplémentaire, permettent de produire des métabolites de polarité supérieure,

Tableau 1. Principales réactions de biotransformation.

Réaction	Enzyme	Type de substrats
Réactions de phase I		
<i>Oxydation</i>	Cytochrome P450	Xénobiotiques, composés endogènes
	Alcool déshydrogénase	Alcools
	Aldéhyde déshydrogénase	Aldéhydes
	Flavine monooxygénase	Amines tertiaires
	Monoamine oxydase	Amines
<i>Réduction</i>	Cytochrome P450	Xénobiotiques, composés endogènes
	Alcool déshydrogénase	Aldéhydes, cétones
	Carbonyl réductase	Aldéhydes, cétones
<i>Hydrolyse</i>	Estérase	Esters
	Peptidase	Peptides
Réactions de phase II		
	Epoxyde hydrolase	Epoxydes
	UDP glucuronyl transférase	Phénols, thiols, amines, acides
	Sulfotransférase	Phénols, thiols, amines
	Glutathion S transférase	Tout substrat électrophile
	Méthyl transférase (O, N, S)	Phénols, amines, thiols
	N-acétyl transférase	Amines
	Aminoacyl transférase	Acides carboxyliques

Tableau 2. Membres de la famille des transporteurs ABC.

Famille	Gènes (Protéines)	Implication
ABCA	<i>ABCA1</i> (ABC1)	Transport du cholestérol
	<i>ABCA2</i> (ABC2)	Résistance aux médicaments
ABCB	<i>ABCB1</i> (MDR1)	Résistance aux médicaments, Efflux de médicaments et xénobiotiques
ABCC	<i>ABCC1, 3</i> (MRP1, 3)	Résistance aux médicaments
	<i>ABCC2</i> (MRP2)	Efflux hépatique d'anions organiques conjugués
	<i>ABCC4, 5</i> (MRP4, 5)	Transport de nucléosides
	<i>ABCC7</i> (CFTR)	Transport des chlorures
ABCG	<i>ABCG2</i> (ABCP, MXR, BCRP)	Résistance aux médicaments, Efflux de toxines et xénobiotiques
	<i>ABCG8</i>	Transport des stérols

c'est-à-dire plus hydrophiles qui peuvent être soit éliminés directement dans la bile ou les urines, soit transformés par les enzymes de phase II (**Tableau 1**) (Beaune & Lorient, 2000 ; Rendic, 2002 ; Josephy *et al.*, 2005 ; Guengerich & Rendic, 2010).

2. Enzymes de phase II

Les enzymes de phases II, dites de conjugaison, catalysent des réactions de transfert d'un radical hydrophile endogène (acide glucuronique, glutathion, acétate, groupement méthyl, sulfate ou acétate) sur le xénobiotique afin de produire des composés plus hydrosolubles pouvant être excrétés par voie biliaire et/ou rénale. Les enzymes de phase II sont représentées par des transférases tels que des UDP-glucuronosyltransférases (UGT), sulfotransférases (SULT), N-acétyltransférases (NAT), glutathion S-transférases (GST) et d'autres méthyl transférases (principalement représentés par les thiopurine S-méthyl transférases ou TPMT) (**Tableau 1**) (Rushmore & Kong, 2002 ; Jancova *et al.*, 2010, Omiecinski *et al.*, 2011).

3. Protéines de phase III

Les protéines de phase III assurent le transport actif des xénobiotiques hydrophiles et des conjugués de phase II hors de la cellule (Szakács *et al.*, 2008). Les transporteurs membranaires sont localisés au pôle apical ou sur la face basolatérale des cellules, permettant ainsi d'éliminer les produits conjugués dans le sang, la bile, la lumière intestinale ou l'urine (Ho & Kim, 2005 ; Morrissey *et al.*, 2013). Les transporteurs membranaires des xénobiotiques, représentés par les superfamilles des Solute Carrier (SLC) et des ATP-Binding Protein (ABC), appartiennent à une classe de protéines extrêmement nombreuses dont le rôle est de réguler l'entrée (influx) ou la sortie (efflux) de nombreuses substances endogènes et/ou exogènes à travers la membrane plasmique *via* différents mode de transport. La superfamille des SLC compte plus de 350 membres regroupés en 43 sous-familles (SLC1 à SLC43). Les transporteurs SLC utilisent le gradient électrochimique de solutés inorganiques ou organiques pour effectuer le transport des molécules. La superfamille des ABC regroupe 7 sous-familles (ABCA à ABCG) qui comprennent plus d'une cinquantaine de membres (**Tableau 2**). Ces transporteurs utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour fonctionner. Parmi-eux, ABCB1 ou P-glycoprotéine (P-gp), codée par le gène *ABCB1* (ou *MDR1* dans l'ancienne nomenclature), est le transporteur le mieux connu et semble être le plus important dans la disponibilité des xénobiotiques chez l'Homme. La P-gp, spécialisée uniquement dans l'efflux, possède, en effet, un large spectre de substrats qui ont des structures très diversifiées, le plus souvent de nature hydrophobe et amphotère (Gerloff, 2004 ; Funk, 2008 ; He *et al.*, 2009 ; Ueda,

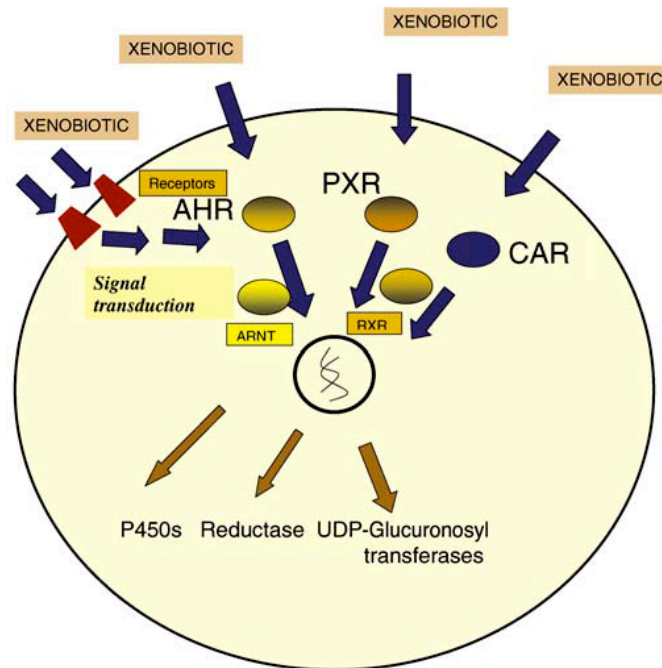


Figure 2. Régulation de l'expression des EMX par les xenosensors. Les xenosensors (AHR, PXR, CAR), après détection des xénobiotiques, coordonnent l'expression des gènes impliqués dans la biotransformation de ces composés (d'après Ingelman-Sundberg, 2004).

2011). Par ailleurs, les transporteurs suscitent un intérêt croissant. En effet, en diminuant la quantité de médicament présente dans les cellules, ils peuvent être responsables de résistances multiples (Sharom, 2008).

Au total, les réactions métaboliques aboutissent la plupart du temps à une désactivation du xénobiotique mais peuvent également conduire à la formation d'un métabolite plus actif, voire plus toxique que le composé initial. Les métabolites « bioactivés » peuvent être très réactifs vis-à-vis des macromolécules cellulaires, tel que l'ADN, comme l'illustre l'exemple représentatif de l'activation du benzo-(a)-pyrène. Son métabolite ultime, le benzopyrène-7,8-diol-9,10-époxyde, se lie de manière covalente à l'ADN pour former des adduits. S'ils ne sont pas réparés, les adduits à l'ADN peuvent provoquer des mutations, et de ce fait, initier des processus de cancérogenèse (Castell *et al.*, 2005).

4. Récepteurs nucléaires

L'équilibre entre les trois phases de détoxification joue un rôle majeur dans la stratégie globale de défense de l'organisme face aux agressions toxiques des xénobiotiques. Cet équilibre est essentiellement assuré par un groupe de récepteurs nucléaires (NR), qui comprend l'Ahr (Aryl hydrocarbon Receptor), le PXR (Pregnane X Receptor) ou encore le CAR (Constitutive Androstane Receptor). Le rôle des NR, souvent désignés sous le terme de « xenosensors », est de détecter les xénobiotiques dans la cellule et de coordonner l'expression des gènes codant pour les EMX et les transporteurs les plus appropriés afin d'activer et/ou d'éliminer ces composés (**Figure 2**) (Nakata *et al.*, 2006 ; Köhle & Bock, 2009). Contrairement à la majorité des NR dits « classiques », les xenosensors présentent une faible affinité et une faible spécificité pour leurs ligands. Ils semblent ainsi être dédiés à la reconnaissance de nombreux xénobiotiques de structure et d'origine diverses en vue de leur détoxification. De plus, les xenosensors, une fois activés, peuvent également établir des interactions avec d'autres NR ou facteurs de transcription participant à la régulation de voies de signalisation endogènes comme l'homéostasie des fonctions biliaires et du glucose, le métabolisme des lipides ou encore l'inflammation. Ainsi, les xénobiotiques influeraient, de manière positive ou négative, d'autres fonctions physiologiques (Moreau *et al.*, 2008 ; Chai *et al.*, 2013).

II. Prise en charge des xénobiotiques par le tissu rénal

Les protéines de biotransformation et de transport des xénobiotiques sont exprimées dans presque tous les tissus. Néanmoins, leur distribution tissulaire peut varier de manière quantitative et/ou de manière qualitative.

1. Exposition du rein aux xénobiotiques

Les reins interviennent dans de nombreuses fonctions vitales telles que la régulation de la pression sanguine, la synthèse d'hormones et l'excrétion des déchets azotés ou de xénobiotiques. Les effets néphrotoxiques de certains composés peuvent s'expliquer par leur fonction physiologique (Park *et al.*, 1995). Les reins représentent 0,4 à 0,5% du poids corporel et sont hautement perfusés puisqu'ils reçoivent 25% du débit cardiaque (Smith *et al.*, 2006). Alors que les reins sont exposés à tout xénobiotique (ou métabolite) présent dans la circulation sanguine, leur pouvoir de concentration, leur fonction de sécrétion et leur capacité de réabsorption tubulaire peuvent entraîner des conséquences toxiques lorsqu'un composé présent à une concentration non toxique dans le plasma s'accumule dans l'interstitium rénal et atteint une concentration toxique dans le parenchyme rénal. De plus, les surfaces de contact et d'échanges entre les différentes structures du néphron et les xénobiotiques sont très importantes, qu'il s'agisse de la surface de l'endothélium glomérulaire ou de l'épithélium tubulaire. Plus particulièrement, le tubule proximal possède une large surface de contact de par l'existence d'une bordure en brosse. Par conséquent, la situation anatomo-fonctionnelle du rein est l'un des facteurs expliquant la fréquence particulièrement élevée des phénomènes de néphrotoxicité. Tous les éléments structurels et constitutifs du parenchyme rénal (glomérulaires, tubulaires, interstitiels et vasculaires) peuvent être touchés et être à l'origine des atteintes rénales. Enfin, les cellules épithéliales tubulaires proximales (CTP) représentent une cible privilégiée des xénobiotiques. En effet, les CTP présentent une forte capacité métabolique, un système de transport actif et de longs microvilli de la bordure en brosse qui augmentent ainsi la surface de contact avec les xénobiotiques (Bach *et al.*, 1993 ; Li *et al.*, 2003).

De nombreux xénobiotiques sont connus ou suspectés d'être des agents néphrotoxiques. Il peut s'agir de (i) composés chimiques tels que l'éthylène glycol, de solvants organiques (hydrocarbures), d'herbicides (paraquat), (ii) de mycotoxines : ochratoxine A, citrinine, orellanine, (iii) de métaux : arsenic, bismuth, cadmium, chrome, germanium, plomb, mercure..., (iv) de médicaments tels que les analgésiques (AINS, paracétamol), antibiotiques (aminoglycosides, céphalosporines, amphotéricine B, tétracyclines...), lithium, produits de contraste, anticancéreux (cisplatine...) ou

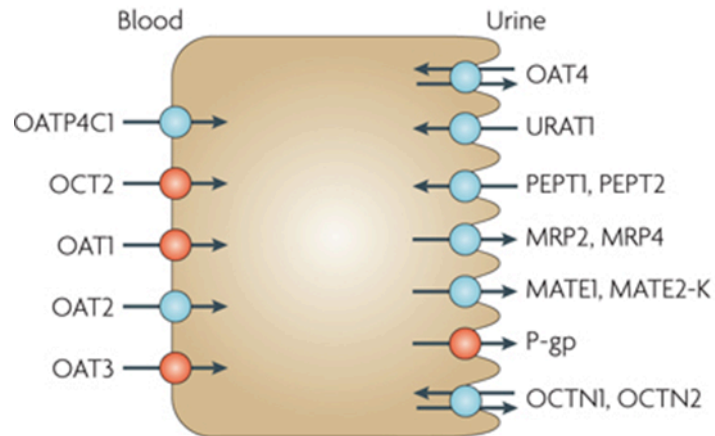


Figure 3. Localisations des transporteurs d'influx et d'efflux dans les cellules tubulaires proximales. Les noms des transporteurs (OAT, OATP, OCT) correspondent à l'ancienne nomenclature (<http://www.genenames.org/genefamilies/SLC>) (d'après International Transporter Consortium *et al.*, 2010).

encore certains immunosuppresseurs comme la Cyclosporine A et le Tacrolimus (Pfaller & Gstraunthaler, 1998 ; Van Vleet & Schnellmann, 2003 ; Skinner, 2011).

2. Capacité métabolique du tissu rénal

Comme tous les tissus, le rein possède un profil d'expression tissulaire spécifique pour les différents groupes de protéines impliquées dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques. Cependant, les données de la littérature concernant les protéines impliquées dans la biotransformation et la disposition des xénobiotiques dans le tissu rénal restent parcellaires. Parmi les enzymes de phase I, on retrouve des P450 dont les CYP2B6, 2J2, 3A5, 4A11 et 4F2 et des époxydes hydrolases (Park *et al.*, 1995 ; Satarug *et al.*, 2006). Le rein possède également des enzymes de phase II et plus majoritairement les GST et les UGT (Krishna & Klotz, 1994 ; Simic *et al.*, 2009). Par ailleurs, le rein présente une distribution particulière des enzymes impliquées dans le métabolisme des substrats endogènes et exogènes. En effet, le cortex rénal exprime principalement les P450 et les GST. Ces enzymes sont également exprimées, de manière décroissante, de la médulla externe à la médulla interne (Davis *et al.*, 1981 ; Nusing *et al.*, 1990 ; Lash, 1994). Les transporteurs, quant à eux, sont retrouvés abondamment et sont localisés de manière hétérogène dans les différentes populations de cellules rénales (Guder & Morel, 1992 ; Terada & Inui, 2007). Plus précisément, les CTP expriment de nombreux transporteurs localisés au pôle apical ou basal (**Figure 3**). Enfin, concernant les xénosensors, PXR, PPARa, PPARb, RXRa et RXRb sont exprimés par le tissu rénal (Xu *et al.*, 2005).

III. Variabilité inter-individuelle de prise en charge des xénobiotiques

L'activité des protéines impliquées dans la prise en charge des xénobiotiques peut être influencée par de nombreux facteurs, que ce soit des facteurs physiopathologiques, génétiques ou environnementaux, responsables de la variabilité interindividuelle de réponse aux composés chimiques.

1. Facteurs physiopathologiques

De manière physiologique, le métabolisme des xénobiotiques évolue au cours de la vie. Ainsi, l'embryon, le nouveau-né et l'adolescent expriment des EMX différentes et en quantités variables. A titre d'exemple, alors que le CYP3A4 est le P450 le plus exprimé au niveau hépatique chez l'adulte, il n'est pas exprimé dans le fœtus (Kacevska *et al.*, 2012). Par ailleurs, les états pathologiques, tels que

Tableau 3. Principaux substrats, inhibiteurs et inducteurs des P450, majoritairement impliqués dans le métabolisme des médicaments (d'après Livret des interactions médicamenteuses, www.vidal.fr).

CYP	Principes Actifs	Inhibiteurs	Inducteurs
1A2	- clozapine - tacrine - théophylline	- énoxacine - fluvoxamine	
2C9, 2C19	- anticoagulants oraux (acénocoumarol, warfirine) - phénytoïne		
2D6	- antiarythmiques (flecainide, propafénone) - thioridazine	- inhibiteurs du recaptage de la sérotonine (fluoxétine, paroxétine) - quinidine	- alcool (prise en charge chronique) - tabac - millepertuis
3A4	- alcaloïdes de l'ergot de seigle - antiarythmiques (amiodarone, disopyramide) - benzodiazépines : midazolam, triazolam, zolpidem) - cisapride - ifosfamide - immunosuppresseurs (cyclosporine, tacrolimus) - opioïdes (alfentanil, fentanyl, méthadone) - pimozide - sildénafil - statines (simvastatine, atorvastatine, cérivastatine)	- jus de pamplemousse - amiodarone - antagonistes du calcium (diltiazem, vérapamil) - antifongiques azolés (kétoconazole, itraconazole, fluconazole, miconazole) - antiprotéases (ritononavir, nelfinavir, amprénavir, indinavir) - macrolides (érythromycine, clarithromycine, josamycine)	- antiépileptiques (carbamazépine, phénobarbital, phénytoïne) - anti-infectieux (rifampicine, rifabutine, éfavirenz, névirapine, griséofulvine)

l'insuffisance rénale ou hépatique, les infections ou l'inflammation, sont susceptibles d'altérer de manière globale l'expression de certains gènes impliqués dans la prise en charge des xénobiotiques (Tamasi *et al.*, 2003).

2. Facteurs environnementaux

L'expression et l'activité des systèmes de biotransformation des xénobiotiques sont influencées par de nombreux facteurs environnementaux (alimentation, médicaments, tabac...) (**Tableau 3**).

Parmi les facteurs alimentaires, à titre d'exemple, le jus de pamplemousse est un inhibiteur connu du CYP3A4, mais également du transporteur SLCO2B1 (Tapaninen *et al.*, 2010). L'inhibition du CYP3A4 est très rapide puisque chez des sujets sains, quatre heures après ingestion de jus de pamplemousse, les individus présentent un niveau d'expression du CYP3A4 diminué de 47% (Schmiedlin-Ren *et al.*, 1997). De même, des substances naturelles induisent également l'expression des protéines impliquées dans la prise en charge des xénobiotiques. Il a été ainsi montré que le millepertuis (herbe de la Saint Jean) induit l'expression du CYP3A4 et de ABCB1 (Ernst, 2002).

Les médicaments peuvent être responsables de modifications du métabolisme et du transport des xénobiotiques, soit en induisant l'expression de nombreux P450, soit en inhibant leur activité, à l'origine d'interactions médicamenteuses (Palleria *et al.*, 2013).

3. Facteurs génétiques

Les facteurs d'origine génétique sont principalement responsables de différences interindividuelles au niveau de l'expression et/ou de l'activité des protéines prenant en charge les xénobiotiques. En effet, les gènes codant pour ces protéines sont hautement polymorphes (Ingelman-Sundberg, 2004 ; Okey *et al.*, 2005 ; Ieri *et al.*, 2006). A titre d'exemple, plus de 400 allèles pour les P450 ayant un impact fonctionnel ont été décrits (www.cypalleles.ki.se). La présence d'anomalies génétiques peut entraîner la synthèse d'une protéine ayant une activité augmentée, réduite ou nulle. D'une part, ces mutations peuvent être le résultat de macrolésions telles qu'une délétion partielle ou totale du gène ou bien la présence de plusieurs copies de gènes fonctionnels sur un même allèle, regroupées sous le terme de CNV (Copy Number Variant). Plusieurs CNV touchant des gènes impliqués dans la prise en charge cellulaire des xénobiotiques ont été décrits dans la littérature, comme les *CYP2A6*, *GSTM1*, *SULT1A1*, *SULT1A3*, *UGT2B17* ou encore le *CYP2D6* pour lequel jusqu'à 13 copies sur un même allèle ont été identifiées (McIlwain *et al.*, 2006 ; Ingelman-

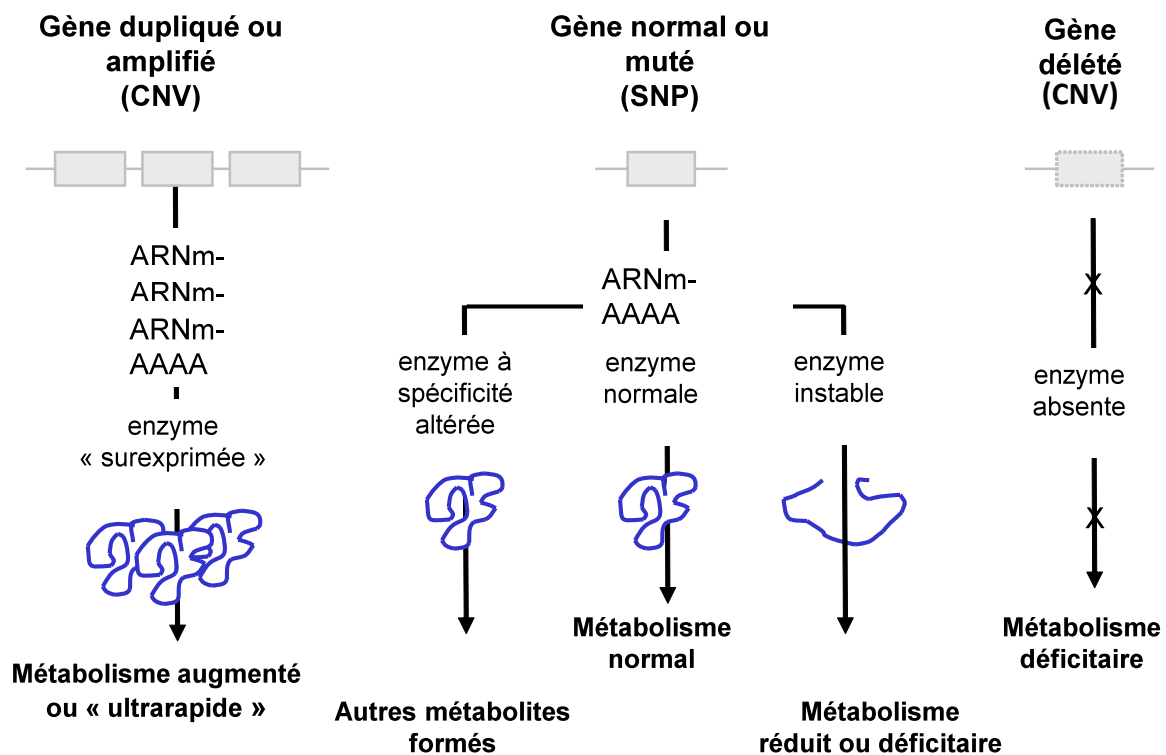


Figure 4. Mécanismes moléculaires à l'origine de variations de l'expression et de l'activité des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. CNV : Copy Number Variant ; SNP : Single Nucleotide Polymorphism (d'après Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999).

Sundberg *et al.*, 2007 ; Hebring *et al.*, 2009). D'autre part, des microlésions participent aux variations d'expression et/ou d'activité. Il s'agit de mutations ponctuelles ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism) qui peuvent induire un décalage du cadre de lecture (frameshift), l'introduction d'un codon STOP prématuré ou un défaut d'épissage. Des mutations faux-sens peuvent avoir pour conséquence une altération structurelle de la protéine et de son site actif ou une modification de sa spécificité de substrat, entraînant ainsi une diminution ou une modification de l'activité fonctionnelle (**Figure 4**) (Allorge & Lorient, 2004).

4. Facteurs épigénétiques

Des phénomènes épigénétiques sont susceptibles de moduler l'expression des gènes impliqués dans la prise en charge des xénobiotiques. Ces facteurs épigénétiques pourraient expliquer en particulier les variations interindividuelles de l'expression de gènes pour lesquels aucun polymorphisme génétique n'a été identifié, que ce soit dans les régions codantes, les promoteurs ou encore dans les sites consensus d'épissage. L'épigénétique fait, en effet, référence à une modification de l'expression de gènes modulée par des mécanismes autres que l'altération de la séquence nucléotidique des gènes. Les mécanismes épigénétiques regroupent les ARN interférence tels que les microARN, la méthylation de l'ADN ou encore les modifications des histones (Dwivedi *et al.*, 2011).

a. Les microARN

Les microARN (miARN) sont de petits ARN non codants d'environ 22 nucléotides et sont impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que l'embryogenèse, la prolifération et la différenciation cellulaire. Ainsi leur dérégulation pourrait être à l'origine de nombreuses pathologies (Zhao & Srivastava, 2007 ; Sayed & Abdellatif, 2011). Environ 2600 miARN matures ont été identifiés chez l'homme (www.mirbase.org, version 20) et ils réguleraient près de 60% des transcrits (Esteller, 2011).

a.1 Biogenèse des microARN

Chez l'homme, 40% des gènes de miARN sont localisés dans des introns de gènes codant pour des protéines (Baskerville & Bartel, 2005). D'autres miARN sont codés par des gènes uniques situés dans des régions intergéniques (Woods *et al.*, 2007 ; Ofir *et al.*, 2010).

Les miARN sont transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II) en longs transcrits primaires (pri-miARN) d'une centaine de nucléotides, en forme de tige-boucle, avec une coiffe m⁷G en 5' et une

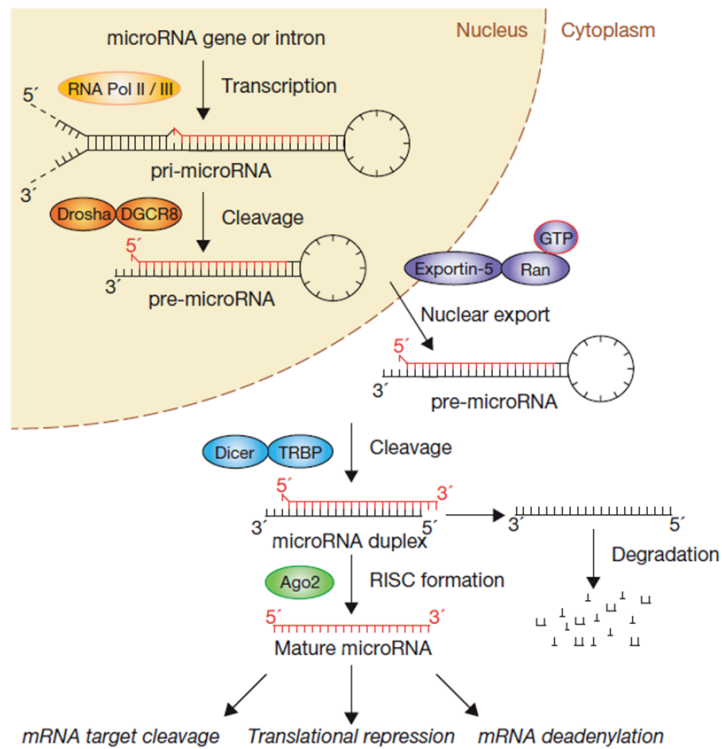


Figure 5. Biogenèse des microARN. Dans la voie canonique de maturation, le pri-microARN est clivé dans le noyau par le complexe Drosha/DGCR8, puis exporté dans le cytoplasme grâce à l'Exportine-5. Le complexe Dicer/TRBP clive le pre-microARN. Le microARN, pris en charge par le complexe RISC, inhibe la traduction de l'ARNm ou induit sa dégradation (d'après Winter *et al.*, 2009).

queue polyA en 3'. Le pri-miARN est clivé par un complexe multiprotéique, appelé microprocessor, composé de l'endonucléase de type RNase III, Drosha, et de la protéine de liaison à l'ARN, DGCR8 (DiGeorge Critical Region 8). Ce clivage permet de générer un pré-miARN d'environ 70 nucléotides en tige-boucle avec une extrémité 3' sortante (2 nucléotides dépassant, dit *2-nt 3' overhang*), qui sera ensuite exporté dans le cytoplasme par EXP5 (Exportine 5)-Ran-GTP. La dernière étape de maturation est catalysée par une autre RNase de type III, Dicer, associée à la protéine TRBP (TAR RNA Binding Protein). Ce dernier clivage permet la formation d'un duplex de miARN, d'environ 22 nucléotides avec deux extrémités 3' sortantes. Un premier brin dit « guide », à l'extrémité 5' la moins stable d'un point de vue thermodynamique, est intégré au complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) comprenant une des quatre protéines Argonautes (généralement Ago2), Dicer et TRBP. Le second brin dit « passager » sera exclu du complexe RISC puis dégradé (**Figure 5**). Le miARN mature associé au complexe RISC sert de guide afin de cibler les ARNm. Le miARN se fixe préférentiellement au niveau de séquences spécifiques, dites « seed », situées principalement dans la région 3'UTR (Untranslated Region) des ARNm. Si la complémentarité entre le miARN et l'ARNm cible est parfaite, le complexe RISC induit le clivage et donc la dégradation de l'ARNm. Une complémentarité partielle induit le blocage de la traduction et/ou la déadénylation (Kim, 2005 ; Ghildiyal & Zamore, 2009 ; Winter *et al.*, 2009 ; Blahna & Hata, 2013). Chaque miARN aurait la capacité de réguler la stabilité d'un large spectre d'ARNm distincts.

[a.2 MicroARN et prise en charge des xénobiotiques](#)

Plusieurs études ont démontré l'implication de miARN dans la régulation de gènes impliqués dans la prise en charge cellulaire des xénobiotiques. En effet, des travaux ont montré que miR-27b et miR-378 inhibent, respectivement, l'expression du CYP1B1 et du CYP2E1 de manière directe (Tsuchiya *et al.*, 2006 ; Mohri *et al.*, 2010). Plus récemment, Lamba *et al.* (2014) ont montré que miR-34 est impliqué dans la régulation d'EMX et transporteurs tels que les CYP3A4, CYP2C19, AKR1D1, SLC10A1 ou de facteurs de transcription comme NR1I2, NR1I3 et HNF4 α . De manière globale, les miARN sont impliqués dans l'expression des EMX et transporteurs et leur dérégulation pourrait moduler la réponse cellulaire dans la prise en charge des xénobiotiques (Pogribny & Beland, 2013).

b. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN se définit par l'addition d'un groupement méthyle sur une cytosine, dans les îlots CpG situés essentiellement au niveau des régions promotrices des gènes, générant ainsi une 5-méthylcytosine (**Figure 6**). La méthylation de l'ADN est un moyen de régulation négative de

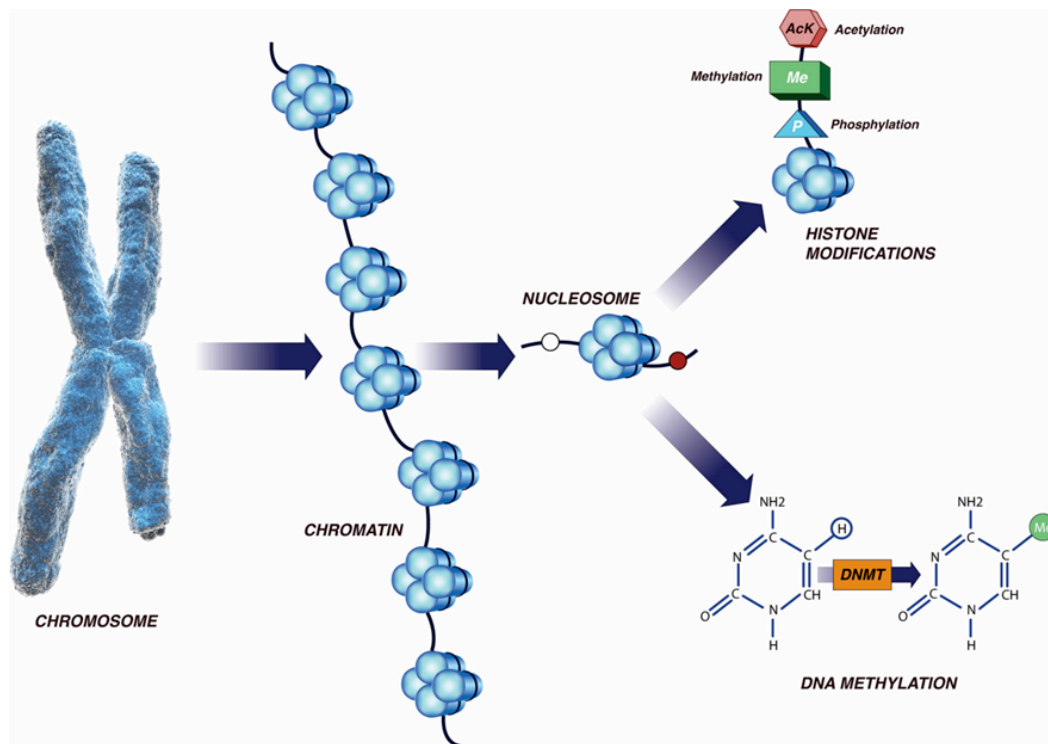


Figure 6. Modifications épigénétiques de la structure de la chromatine. La modification des histones peut se réaliser sur plusieurs sites et consiste en des réactions d'acétylation, de méthylation et de phosphorylation. La méthylation de l'ADN se fait par l'addition d'un groupement méthyle sur une cytosine générant une 5-méthylcytosine. DNMT : DNA Methyltransferase (d'après Dwivedi *et al.*, 2011).

l'expression des gènes en empêchant la fixation de facteurs de transcription ou en faisant intervenir des changements de conformation de la chromatine (Bird, 2002 ; Lande-Diner & Cedar, 2005).

Des variations interindividuelles de méthylation peuvent être à l'origine de la variabilité de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la prise en charge des xénobiotiques. Par exemple, des travaux ont démontré que des variations interindividuelles modulent l'expression du CYP1B1 par méthylation des îlots CpG du promoteur à l'origine du développement de certains cas de cancer colorectal (Habano *et al.*, 2009). De plus, Habano *et al.* (2011) ont montré que l'expression du CYP3A4 et de PXR est contrôlée par la méthylation du promoteur de *PXR*, pouvant ainsi expliquer la variabilité interindividuelle de réponse clinique aux anticancéreux observée chez les patients atteints d'un cancer du côlon. Des anomalies de méthylation pourraient alors jouer un rôle dans les résistances médicamenteuses telles que les traitements anti-cancéreux (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2013).

c. Modification des histones

Le nucléosome, unité fondamentale de la chromatine, est constitué d'un octamère d'histones en deux copies (H2A, H2B, H3 et H4) autour duquel s'enroulent 147 paires de base de l'ADN (**Figure 6**). Les histones possèdent un domaine C-terminal globulaire et une extrémité N-terminale non structurée. De manière générale, la queue N-terminale étant plus accessible, la plupart des modifications sont localisées dans cette partie. Huit types de modifications des histones ont été décrits (**Tableau 4 ; Figure 7**) et les modifications les mieux connus sont l'acétylation, la méthylation et la phosphorylation (Lacoste & Côté, 2003 ; Kouzarides, 2007).

c.1 Acétylation des histones

Les HAT (Histone acétyltransférase) sont responsables de l'acétylation des histones. Au niveau de sites spécifiques, l'acétylation permet la neutralisation de la charge positive de certaines lysines et ainsi la diminution des contacts entre l'histone et l'ADN nucléosomal, ou bien la diminution entre les histones voisines afin de libérer la machinerie transcriptionnelle. L'acétylation est alors associée à une activation de la transcription, et est réversible grâce à l'action des HDAC (histone déacétylase) (Marks *et al.*, 2001 ; Zentner & Henikoff, 2013).

c.2 Méthylation des histones

La mono-, di- ou tri-méthylation des résidus de lysine sur les histones par les HMT (histone methyltransferase) n'affecte pas la charge positive de la lysine et donc les effets de la méthylation

Tableau 4. Principales modifications des histones (d'après Kouzarides, 2007).

Modifications des histones	Résidus modifiés	Fonctions
Acétylation	K-ac	Transcription, Réparation, Réplication, Condensation
Méthylation	K-me1, K-me2, K-me3	Transcription, Réparation
Méthylation	R-me1, R-me2a, R-me2s	Transcription
Phosphorylation	S-ph, T-ph	Transcription, Réparation, Condensation
Ubiquitinylation	K-ub	Transcription, Réparation
Sumoylation	K-su	Transcription
ADP ribosylation	E-ar	Transcription
Déimination	R > Cit	Transcription
Isomérisation	P-cis > P-trans	Transcription

Note. Cit : Citrulline

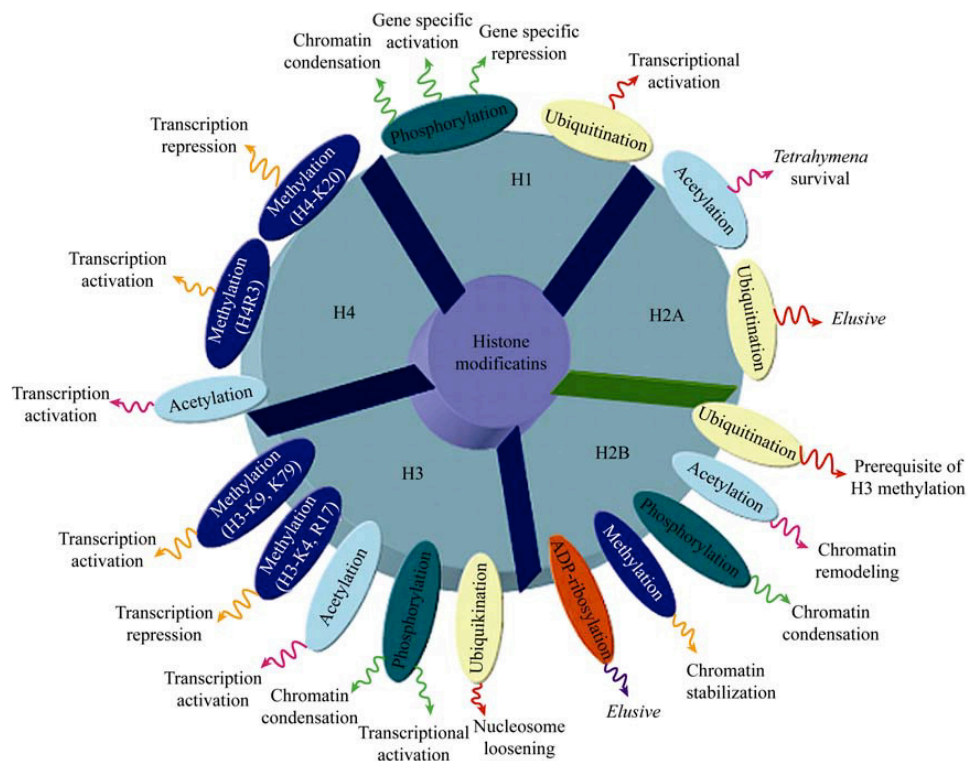


Figure 7. Représentation schématique des principales modifications des histones et de leurs effets biologiques (d'après Munshi *et al.*, 2009).

sur les dynamiques du nucléosome sont moins directs que ceux de l'acétylation (Zentner & Henikoff, 2013). Les histones peuvent également être mono- ou di-méthylées sur des arginines, de manière symétrique ou asymétrique. La méthylation des lysines peut induire l'activation de la transcription ou, à l'inverse, sa répression selon le site de méthylation. A titre d'exemple, les sites H3K4 et H3K36 sont, une fois méthylés, impliqués dans l'élongation transcriptionnelle alors que la méthylation de H3K9 induit l'inactivation de gènes (Kouzarides, 2007).

c.3 Phosphorylation des histones

La phosphorylation des histones peut s'effectuer sur des sérines, des thréonines ou des tyrosines, de manière prédominante mais non exclusive sur la queue N-terminale des histones. Ces modifications sont sous le contrôle de kinases ou de phosphatases qui, respectivement, ajoutent ou enlèvent un groupement phosphate. L'addition d'un groupement phosphate par les kinases à partir de l'ATP sur un groupement hydroxyle de l'acide aminé cible induit une charge négative qui module la structure de la chromatine (Bannister & Touzarides, 2011).

c.4 Modification des histones et prise en charge des xénobiotiques

La modification des histones peut être impliquée dans l'expression des gènes de la prise en charge des xénobiotiques. Par exemple, l'acétylation jouerait un rôle clé dans l'expression du gène *ABCB1* (Hirota *et al.*, 2008). Le FK228, un substrat de la Pg-P, induit l'expression d'*ABCB1* par l'inhibition de HDAC et par conséquent l'hyperacétylation des histones au niveau du promoteur de *ABCB1* (Xiao *et al.*, 2005). De plus, l'activation transcriptionnelle du gène *ABCB1* a été associée avec un remodelage de la chromatine caractérisé par une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 dans la région en amont du promoteur de *ABCB1* (Chen *et al.*, 2005).

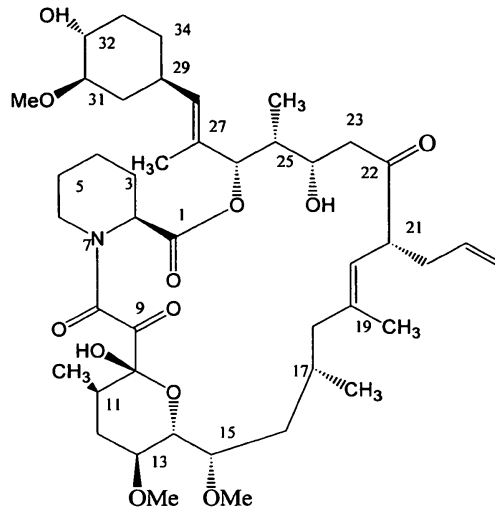


Figure 8. Structure du Tacrolimus.

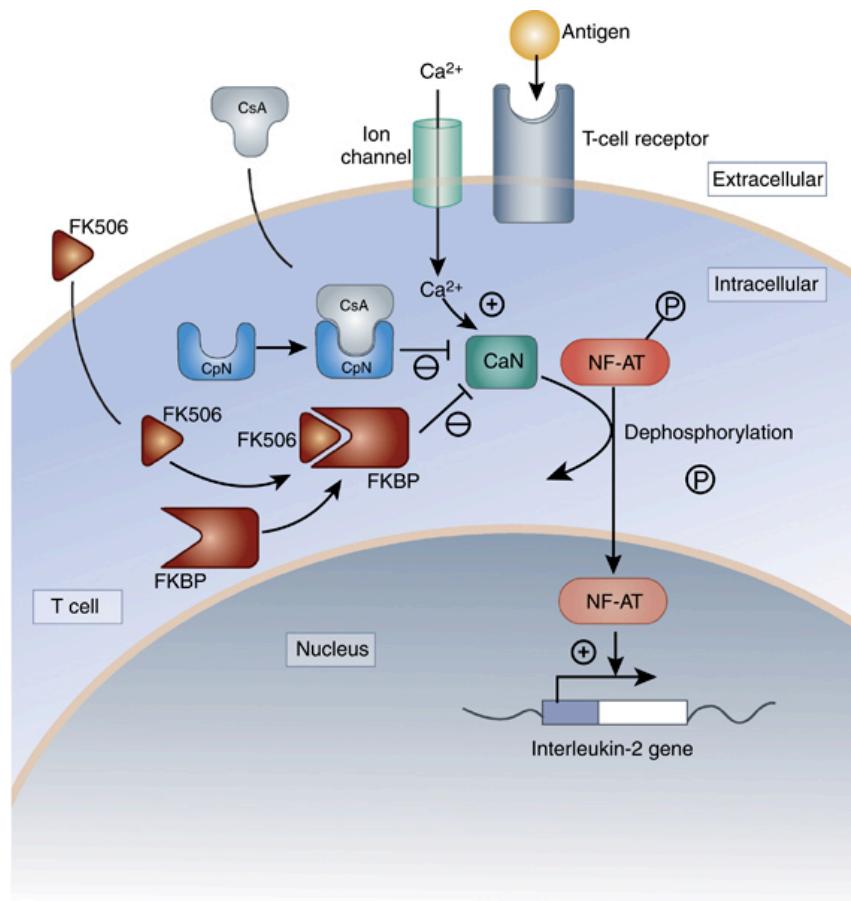


Figure 9. Mécanisme d'action du Tacrolimus et de la Cyclosporine. La Cyclosporine (CsA) et le Tacrolimus (FK506), en se complexant à la cyclophiline (CpN) et à la FKBP12, inhibent l'activité phosphatase de la calcineurine (CaN) et ainsi bloquent la transcription de l'Interleukine-2 par le facteur de transcription NFAT (d'après Becknell *et al.*, 2012).

Chapitre II. Néphrotoxicité du Tacrolimus

I. Le Tacrolimus

1. Généralités

Le Tacrolimus, appelé également FK506 (Fujimycine), est un macrolide de 804 kDa (**Figure 8**) hautement lipophile. Découvert en 1987, le Tacrolimus a été isolé à partir du champignon *Streptomyces tsukubaensis*. Le Tacrolimus est disponible sur le marché français depuis 1994 sous deux formulations galéniques : le Prograf® (deux prises quotidiennes) et l'Advagraf® (une seule prise quotidienne).

En 2011, aux Etats-Unis, 90% des patients transplantés rénaux ont reçu en traitement initial le Tacrolimus, en association avec d'autres immunosuppresseurs (www.usrds.org). En termes de survie du greffon et de prévention de rejet, le Tacrolimus serait plus efficace que la Cyclosporine (Pirsch *et al.*, 1997 ; Ojo *et al.*, 2003). Par ailleurs, plusieurs auteurs ont suggéré que le Tacrolimus posséderait un potentiel néphrotoxique moins important que la Cyclosporine (Martins *et al.*, 2004 ; Schmitz *et al.*, 2008). Néanmoins, ces données restent actuellement controversées (Fioretto *et al.*, 2011).

2. Mode d'action du Tacrolimus

Le rôle principal des ACN est de supprimer l'activation des lymphocytes T par l'inhibition du facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) (**Figure 9**).

La calcineurine, également appelée phosphatase 2B (PP2B), est une phosphatase sérine/thréonine dépendante du complexe calcium-calmoduline. Elle est constituée de deux sous-unités ; une sous-unité A catalytique et une sous-unité B régulatrice. En condition physiologique, l'engagement du récepteur TCR (T Cell Receptor) dans les lymphocytes induit l'augmentation intracellulaire d'ions calciques. En réponse à cette augmentation de la concentration de Ca^{2+} , la calcineurine, activée grâce au complexe calcium-calmoduline, déphosphoryle NFAT (Crabtree & Olsen, 2002 ; Medyouf & Ghysdael, 2008). La déphosphorylation de NFAT est nécessaire pour sa translocation dans le noyau et ainsi sa fixation à l'ADN. La famille NFAT comprend 5 membres (NFAT1 à NFAT5), qui possèdent tous un domaine de fixation à l'ADN très conservé, et qui sont, à l'exception de NFAT5, spécifiquement activés par la calcineurine (Rao *et al.*, 1997 ; Hogan *et al.*, 2003). Parmi les

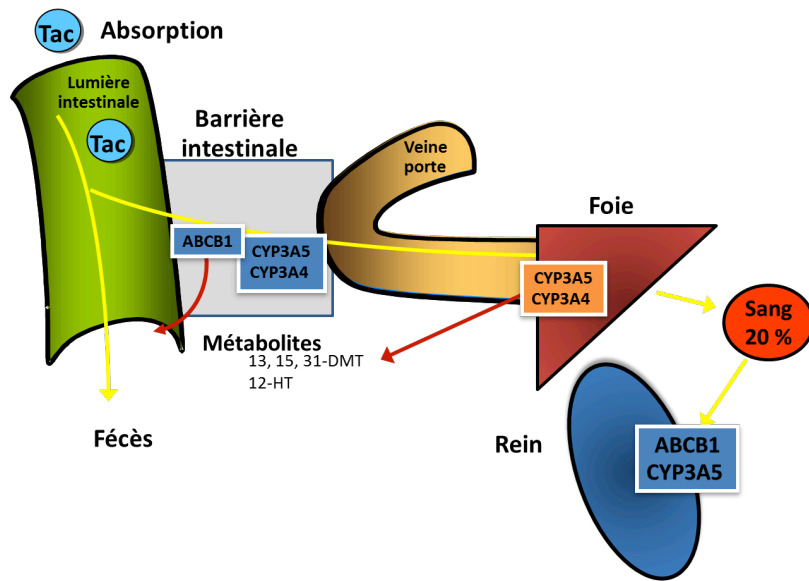


Figure 10. Schéma de la prise en charge du Tacrolimus. Le Tacrolimus est pris en charge par les CYP3A4 (excepté pour le rein), CYP3A5 et ABCB1 au niveau hépatique, intestinal et rénal, et a une biodisponibilité moyenne de 20%. Tac : Tacrolimus.

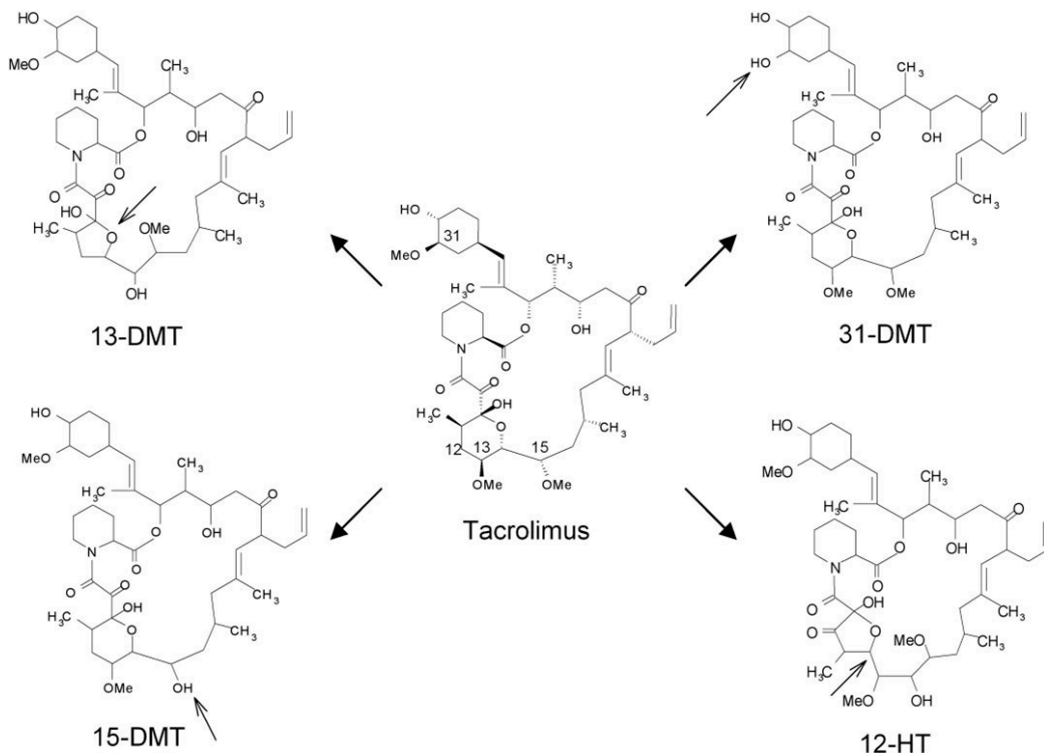


Figure 11. Principaux métabolites primaires du Tacrolimus. DMT : desmethyl Tacrolimus ; HT : Hydroxy Tacrolimus (d'après Dai *et al.*, 2006).

membres de la famille NFAT régulés par la calcineurine, NFAT1, NFAT2 et NFAT4 sont exprimés dans les cellules immunitaires et sont impliqués dans la régulation génique de cytokines dont IL-2 (Interleukine-2). Plus particulièrement, IL-2 est impliquée dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes T (Lee & Park, 2006 ; Azzi *et al.*, 2013). Le Tacrolimus, en se complexant avec l'immunophiline FKBP12 (FK506 binding protein 12), se lie à l'interface des deux sous-unités de la calcineurine afin de bloquer le site actif de la calcineurine et ainsi d'inhiber son activité phosphatase. La Cyclosporine, quant à elle, forme un complexe avec la cyclophiline, une autre immunophiline, et inhibe également l'activité de la calcineurine (Halloran, 2004 ; Lee & Park, 2006).

La calcineurine et les isoformes de NFAT ne sont pas exprimées spécifiquement dans les lymphocytes T (Kung *et al.*, 2001). Ainsi, l'inhibition de la voie Calcineurine/NFAT, au-delà de l'effet immunosuppresseur qu'elle génère, peut, néanmoins, induire des phénomènes de néphrotoxicité, une hypercholestérolémie, du diabète ou de l'hypertension (Liu *et al.*, 2007).

3. *Prise en charge cellulaire du Tacrolimus*

Comme tous les composés exogènes, le Tacrolimus est pris en charge par des protéines impliquées dans l'absorption, le métabolisme et l'excrétion des xénobiotiques. Le Tacrolimus est fortement métabolisé puisque seul 0,5% de la dose administrée est excrété dans les urines ou les fèces sous forme inchangée. La **Figure 10** reprend, de manière schématique, les grandes étapes de la prise en charge du Tacrolimus.

Le métabolisme du Tacrolimus est majoritairement hépatique (Möller *et al.*, 1999). Plus précisément, par leurs fonctions d'hydroxylation et de déméthylation, les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 sont principalement responsables de la biotransformation du Tacrolimus. Quatre métabolites primaires et 4 métabolites secondaires ont été identifiés après incubation de microsomes hépatiques de rat avec du Tacrolimus (Iwasaki *et al.*, 1993, 1995). Les métabolites primaires sont le 13-*O*-déméthyl tacrolimus (13-DMT ou M-I ; métabolite majoritaire), le 31-*O*-déméthyl tacrolimus (31-DMT ou M-II), le 15-*O*-déméthyl tacrolimus (15-DMT ou M-III) et le 12-hydroxy tacrolimus (12-HT ou M-IV) (**Figure 11**) (Dai *et al.*, 2006). Parmi eux, seul le 31-DMT présente une activité immunosuppressive (Iwasaki *et al.*, 1993). Les CYP3A4 et CYP3A5 sont exprimés au niveau intestinal, hépatique et rénal. Au niveau rénal, contrairement au foie ou l'intestin, le CYP3A5 est majoritaire en termes d'expression et d'activité chez les personnes exprimant au moins un allèle fonctionnel du gène *CYP3A5* (Haehner *et al.*, 1996 ; Koch *et al.*, 2002). Dans le rein, le CYP3A5 est

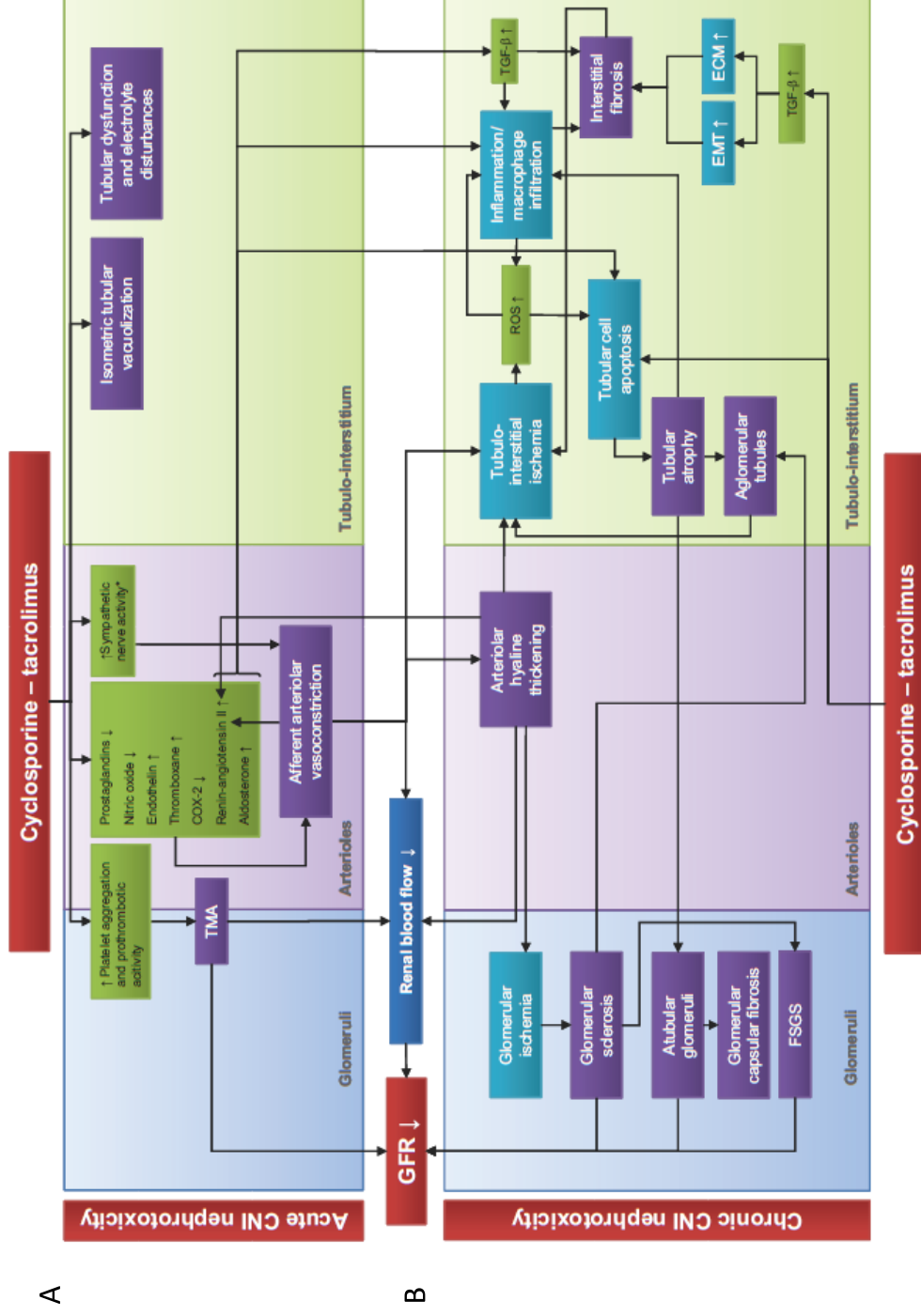


Figure 12 : Représentation schématique des atteintes rénales glomérulaires, vasculaires et tubulo-interstitielles dans la néphrotoxicité aiguë (A) et chronique (B) des anticalcineurines. CNI : Calcineurin Inhibitor, TMA : Thrombotic Microangiopathy, EMT : Epithelial Mesenchymal Transition, ECM : Extracellular Matrix, GFR : Glomerular Filtration Rate, FSGS : Focal Segmental Glomerulosclerosis, ROS : Reactive Oxygen Species (d'après Naesens et al., 2009b).

fortement exprimé dans les cellules épithéliales tubulaires proximales (Murray *et al.*, 1999 ; Joy *et al.*, 2007).

De plus, le Tacrolimus est pris en charge, mais de manière très minoritaire, par des protéines de phase II (Firdaous *et al.*, 1997). Le transfert d'un acide glucuronique permet de produire des composés plus hydrophiles. Les enzymes impliquées dans les réactions de conjugaison sont, bien que les données soient controversées, les UGT1A4, UGT2B7, UGT1A1, UGT1A3 et UGT1A10 (Strassburg *et al.*, 2001 ; Laverdière *et al.*, 2011).

Le transport actif hors de la cellule du Tacrolimus et de ses métabolites est assuré par la pompe d'efflux ABCB1 (Utecht *et al.*, 2006). De par son expression dans divers organes tels que l'intestin, le foie, le rein, ABCB1 agit comme une barrière protectrice vis à vis de la toxicité du Tacrolimus. De plus, dans le rein, ABCB1 est exprimé au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales tubulaires proximales, mais également dans les cellules mésangiales glomérulaires, au pôle apical de la branche ascendante de l'anse de Henle et des tubes collecteurs, ce qui explique son rôle central dans l'élimination rénale du Tacrolimus (Joy *et al.*, 2005 ; Huls *et al.*, 2007 ; Hesselink *et al.*, 2010).

Enfin, PXR (ou NR1I2) fait partie des régulateurs transcriptionnels du CYP3A4, du CYP3A5 et de ABCB1. Par conséquent, son niveau d'expression pourrait alors influencer la prise en charge cellulaire du Tacrolimus (Tirona *et al.*, 2003 ; Burk *et al.*, 2004 ; Jiang *et al.*, 2011).

II. Néphrotoxicité du Tacrolimus

L'utilisation des ACN est limitée du fait de leur index thérapeutique étroit ; une sous-exposition pouvant être responsable d'un rejet de greffe et une surexposition entraînant des effets indésirables principalement de type néphrotoxique (Nankivell *et al.*, 2003). Une étude randomisée (ELITE-Symphony), chez des patients transplantés rénaux, a montré que des posologies réduites de Tacrolimus étaient associées à une meilleure survie du greffon à 1 an et 3 ans (Ekberg *et al.*, 2007). Ce résultat a été confirmé dans une autre étude, mais chez des patients transplantés hépatiques (Boudjema *et al.*, 2011). Cependant, malgré les efforts réalisés pour individualiser les posologies des ACN, en diminuant progressivement les doses prescrites, un large nombre de patients développe des phénomènes de toxicité rénale de type aigu ou chronique (**Figure 12**) (Dai *et al.*, 2006, Naesens *et al.*, 2009b).

1. Toxicité aiguë des ACN

a. Effets hémodynamiques

Les atteintes vasculaires ont, dans un premier temps, été observées après utilisation de la Cyclosporine puis retrouvées sous Tacrolimus, ce qui suggère que les effets hémodynamiques sont la conséquence d'une action directe sur la voie calcineurine/NFAT (Naesens *et al.*, 2009b). Les effets hémodynamiques se caractérisent par une vasoconstriction des artérioles afférentes, induite par l'augmentation de facteurs vasoconstricteurs et la diminution de facteurs vasodilatateurs, conduisant ainsi à un phénomène d'ischémie rénale (Naesens *et al.*, 2009b). Différents facteurs sont impliqués dans l'équilibre vasoconstriction / vasodilatation (**Figure 12A**):

- L'expression de l'endothéline, un puissant vasoconstricteur, est augmentée dans des cellules endothéliales et des cellules tubulaires proximales après exposition aux ACN dans des modèles *in vitro* (Takeda *et al.*, 1993 ; Haug *et al.*, 1998). L'endothéline joue un rôle central dans les phénomènes de vasoconstriction associée à la toxicité aiguë. En effet, un blocage de l'endothéline, par des anticorps, prévient, chez le rat, les effets hémodynamiques causés par les ACN (Perico *et al.*, 1990).
- La Cyclosporine induit l'activation du système rénine-angiotensine (SRA) (Naesens *et al.*, 2009b), par un effet direct des ACN sur les cellules juxta-glomérulaires (Kurtz *et al.*, 1988). L'activation du SRA diminue le flux sanguin rénal à travers l'action vasoconstrictrice de l'angiotensine II. Des études ont montré que la Cyclosporine augmentait, chez le rat, les concentrations sérique et rénale de l'angiotensine II (Nishiyama *et al.*, 2003). De plus, la Cyclosporine augmente l'effet contractile de l'angiotensine II dans des cellules musculaires lisses, probablement en modifiant les flux calciques (Lassila, 2002).
- Les ACN diminuent l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) associée à une diminution des prostanoïdes comme la prostaglandine E2 (Höcherl *et al.*, 2002), composés intervenant dans la régulation du flux sanguin rénal. Ainsi, l'inhibition de COX-2, associée à la diminution de la sécrétion de la prostaglandine E2, pourrait jouer un rôle important dans la vasoconstriction liée aux ACN et ainsi dans la diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG) (Naesens *et al.*, 2009b).
- Le Tacrolimus inhibe la production de l'oxyde nitrique (NO), un vasodilatateur, par la phosphorylation de l'isoforme endothéliale de la NO synthétase (eNOS). La perte d'activité d'eNOS ne résulte pas de l'inhibition directe de la calcineurine mais d'une altération du

relargage intracellulaire de Ca^{2+} suite à la formation du complexe Tacrolimus-FKBP12 (Cook *et al.*, 2009).

b. Effets tubulaires

D'un point de vue histologique, la toxicité aiguë tubulaire se caractérise par une vacuolisation du cytoplasme tubulaire (**Figure 12A**) (Katari *et al.*, 1997 ; Randhawa *et al.*, 1999), conséquence de la dilatation du réticulum endoplasmique et de l'augmentation du nombre de lysosomes. Néanmoins, la vacuolisation isométrique tubulaire observée pourrait également être la conséquence de l'ischémie induite par la vasoconstriction des artérioles afférentes (Pallet *et al.*, 2008 ; Naesens *et al.*, 2009b).

c. Microangiopathies thrombotiques

Les microangiopathies thrombotiques (MAT) sont observées chez des patients transplantés rénaux (**Figure 12A**). Elles peuvent être la conséquence de nombreux facteurs environnementaux et probablement génétiques. De plus, les effets des ACN sur les cellules endothéliales peuvent faciliter et aggraver le développement de lésions de MAT (Ponticelli *et al.*, 2007).

2. Toxicité chronique des ACN

Alors que la néphrotoxicité aiguë est réversible avec la diminution des ACN, l'exposition prolongée aux ACN est responsable d'une néphrotoxicité chronique irréversible pouvant affecter tous les compartiments du parenchyme rénal (**Figure 12B**).

a. Atteintes vasculaires et glomérulaires

Au cours du temps se développent des lésions artériolaires irréversibles. Parmi celles-ci, la hyalinose artériolaire est la plus caractéristique des atteintes vasculaires causées par les ACN et correspond à des dépôts hyalins, sur la paroi vasculaire, qui remplacent les cellules musculaires lisses nécrosées (Liptak & Ivanyi, 2006). Bien que les mécanismes moléculaires conduisant au développement de la hyalinose artériolaire chez des patients transplantés rénaux restent encore inconnus, les lésions artériolaires pourraient être causées par une activation du récepteur au TGF- β (Transforming Growth Factor- β). En effet, la FKBP12, en se complexant au Tacrolimus, n'inhiberait plus le récepteur TGF- β . L'activation du récepteur au TGF- β conduirait à la sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) par les cellules endothéliales et ainsi à une atteinte des myocytes

(Chiasson *et al.*, 2012). Par ailleurs, la voie de la Calcineurine, en altérant l'intégrité des cellules musculaires lisses (Ohkawa *et al.*, 2003), participerait au développement des lésions artériolaires.

Enfin, la sclérose glomérulaire fait suite à l'ischémie induite par les lésions vasculaires de hyalinose artériolaire (Nankivell *et al.*, 2004).

b. Atteintes tubulo-interstitielles

Au niveau du compartiment tubulo-interstitiel, l'administration d'ACN induit des lésions de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire (FI/AT). En particulier, la néphrotoxicité des ACN s'exprime principalement au niveau des tubules proximaux et plus particulièrement au niveau des cellules épithéliales tubulaires proximales (Atcherson & Trifillis, 1994).

L'hypoxie, secondaire à des épisodes répétés de vasoconstriction et de retour à un tonus vasculaire normal en fonction des prises thérapeutiques des ACN, participe à la formation de radicaux libres ou d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Fine & Norman, 2008). Dans des études *in vitro*, la Cyclosporine induit une augmentation intracellulaire de ROS et génère des radicaux libres (Galletti *et al.*, 2005 ; Han *et al.*, 2006). De plus, dans un modèle expérimental de néphropathie chronique du greffon chez le rat, des marqueurs de stress oxydant, tels que l'eNOS, l'iNOS (inducible Nitric Oxyde Synthase), sont exprimés de manière importante au niveau des tubules (Djamali *et al.*, 2005). Le stress oxydant causé par les ROS et les radicaux libres induit l'apoptose des cellules (Sinha *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'inhibition de la calcineurine peut directement activer certains gènes impliqués dans l'apoptose des cellules tubulaires proximales et ainsi induire l'atrophie tubulaire caractéristique. Ainsi, des études ont montré, *in vitro* et *in vivo*, une activation des caspases 1, 3 et 7 dans des reins de souris sous Cyclosporine et dans des cellules rénales tubulaires proximales exposées à la Cyclosporine et au Tacrolimus (Hortelano *et al.*, 2000 ; Yang *et al.*, 2002). Enfin, l'hypoxie contribue à l'induction de facteurs pro-fibrosants. Les effets néphrotoxiques des ACN sont ainsi associés à une surexpression de protéines impliquées dans la fibrose interstitielle (Khanna *et al.*, 2002).

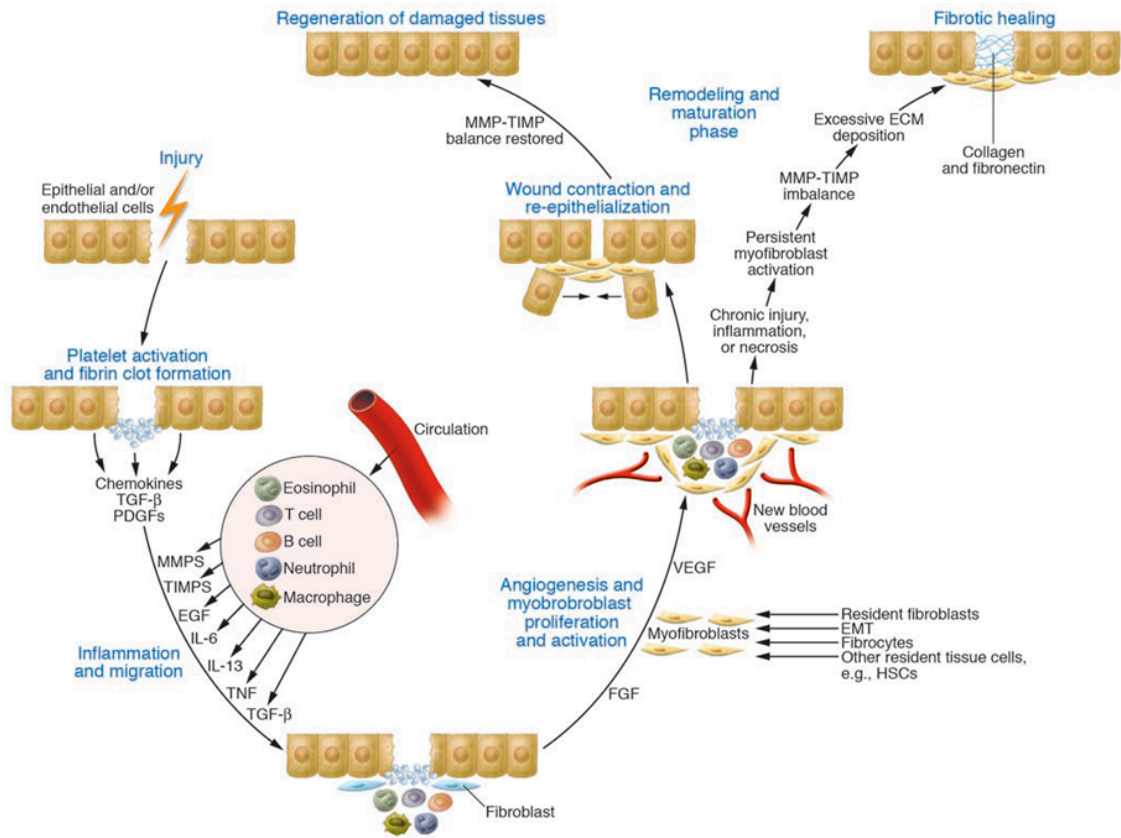


Figure 13. Mécanismes moléculaires et cellulaires de la fibrose. MMP : metalloprotease, ECM : extracellular matrix, EMT : epithelial mesenchymal transition, HSCs : Hepatic Stellate Cells (d'après Wynn, 2007).

III. Fibrose rénale

En transplantation rénale, le processus de fibrose, qu'il soit secondaire à la néphrotoxicité chronique des ACN ou à toute autre forme d'agression chronique du greffon rénale, occupe une place centrale dans le processus clinique de dysfonction chronique du greffon.

Lors d'une agression cellulaire, telle que l'hypoxie, un processus de réparation se met en place avec deux phases distinctes : une phase régénératrice, au cours de laquelle les cellules lésées sont remplacées par des cellules du même type, et une phase désignée sous le terme « fibroplasique » ou fibrose, dans laquelle du tissu conjonctif non fonctionnel remplace le parenchyme normal. Bien qu'initialement bénéfique, le processus de cicatrisation devient pathologique et évolue vers l'insuffisance rénale s'il se prolonge dans le temps, si l'agression rénale persiste ou si la réponse inflammatoire n'est pas contrôlée. Des modifications tissulaires sont alors observées, avec principalement l'accumulation excessive des constituants de la MEC, comme le collagène ou la fibronectine (Wynn, 2007 ; Zeisberg & Neilson, 2010).

1. Mécanismes de la fibrose rénale

La fibrose rénale est un mécanisme complexe mettant en jeu de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires qui ne sont pas encore entièrement définis (**Figure 13**). Lors d'une agression rénale, une réponse inflammatoire se met en place. Durant cette phase, les cellules inflammatoires recrutées et activées sécrètent des cytokines et des facteurs de croissance pro-inflammatoires et pro-fibrotiques. Parmi les cellules inflammatoires impliquées, on retrouve des cellules dendritiques (John & Nelson, 2007), des lymphocytes (Tapmeier *et al.*, 2010), des macrophages (Sean Eardley & Cockwell, 2005) et des mastocytes (Holdsworth & Summers, 2008). Plus précisément, l'afflux des lymphocytes T est précoce et particulièrement important dans la fibrose rénale. En effet, la déplétion de cellules T CD4⁺ chez des souris diminue considérablement la fibrose interstitielle (Tapmeier *et al.*, 2010). Par ailleurs, les macrophages produisant de nombreux facteurs de croissance pro-fibrosants, leur suppression dans des modèles expérimentaux atténue de manière importante la progression de la fibrose (Duffield *et al.*, 2005 ; Ko *et al.*, 2008).

Le processus de fibrogenèse est régulé par l'équilibre entre les cytokines pro-fibrosantes telles que le TGF- β , le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), le FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), le CTGF (Connective Tissue Growth Factor) ou l'angiotensine 2, et les cytokines anti-fibrosantes telles que le HGF (Hepatocyte Growth Factor) et le BMP7 (Bone Morphogenic Protein 7) (Liu, 2011). Parmi elles, le TGF- β joue un rôle central dans la fibrogenèse.

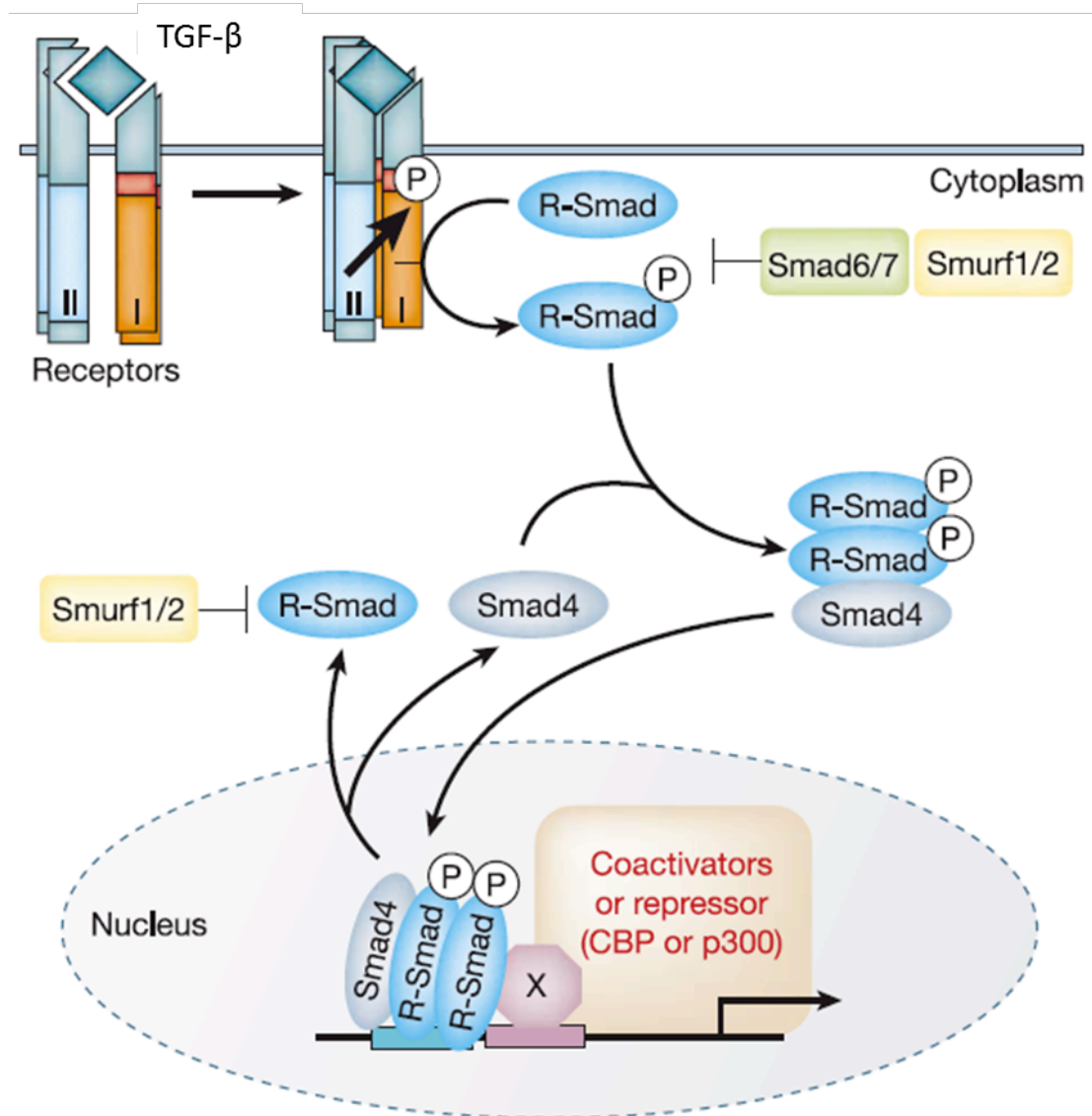


Figure 14. Voie canonique de signalisation du TGF-β. Après fixation du TGF-β, le récepteur s'active par hétérodimérisation et phosphorylation. R-Smad est ensuite phosphorylé par le récepteur et se complexe à Smad4 pour être ensuite transloqué dans le noyau. Smad6 et 7 sont des inhibiteurs de cette voie (d'après Derynck & Zhang, 2003).

2. Rôle du TGF- β

a. Synthèse et voie de signalisation du TGF- β

La superfamille du TGF- β est composée d'une trentaine de membres comprenant, entre autres, des Activines, des GDF (Growth and Differentiation Factor) et des BMP (Bone Morphogenic Protein). Trois isoformes du TGF- β , dont la synthèse dépend du type cellulaire, ont été identifiées chez l'homme : le TGF- β 1, qui représente la forme majoritaire, le TGF- β 2 et le TGF- β 3. Le TGF- β est impliqué dans de nombreux processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration, la cicatrisation tissulaire ou bien l'immunité. Ainsi, une dérégulation de la signalisation du TGF- β est associée à de nombreuses pathologies comme le cancer, l'inflammation et la fibrose tissulaire (Ghosh *et al.*, 2013).

Le TGF- β est synthétisé sous la forme d'un précurseur peptidique, comprenant un peptide signal, un pro-domaine dit LAP (Latency Associated Peptide) et un domaine bioactif constituant le TGF- β . La liaison entre le TGF- β mature et le LAP est clivée par une furine, mais le LAP reste associé au TGF- β de manière non covalente afin de donner naissance à un complexe latent, le LTGF- β (Latent TGF- β). Ce complexe est généralement lié au LTBP (Latent TGF- β Binding Protein), sous la forme d'un large complexe LLC (Large Latent Complex), qui interagit avec les protéines de la MEC (Verrecchia & Mauviel, 2007). L'activation du TGF- β , et ainsi sa libération du complexe latent, se fait par clivage par des protéines matricielles de type métalloprotéases (MMP) et plasmines et permet sa fixation sur les récepteurs transmembranaires spécifiques T β RI (récepteur de type I) ou T β RII (récepteur de type II) à activité sérine/thréonine kinase. En l'absence de ligand, T β RI et T β RII sont présents sous forme d'homodimères. En présence de ligand, T β RII recrute T β RI et l'active par phosphorylation. L'activation de T β RI induit la phosphorylation des protéines Smad2/3 ou R-Smad (Smads associés au récepteur). Smad2/3 interagit avec la co-Smad Smad4 puis après translocation nucléaire se fixe sur les séquences SBE (Smad Binding Element) présentes sur les promoteurs de gènes cibles (Verrecchia & Mauviel, 2002 ; Akhurst & Hata, 2012). Parallèlement, des inhibiteurs de Smad (ou I-Smads), tels que Smad6 ou Smad7, peuvent s'associer au T β RI phosphorylé, inhibant alors la phosphorylation des Smad2/3 et ainsi la transduction du signal (**Figure 14**). Smad7 peut également recruter Smurf1 et 2, deux ubiquitine-ligases, au niveau de T β RI, entraînant ainsi la dégradation du récepteur par le protéasome (Kavsak *et al.*, 2000 ; Ebisawa *et al.*, 2001). Etant donné que le TGF- β peut induire l'expression des I-Smads, leur induction représente une boucle de rétro-contrôle négative (Derynck & Zhang, 2003).

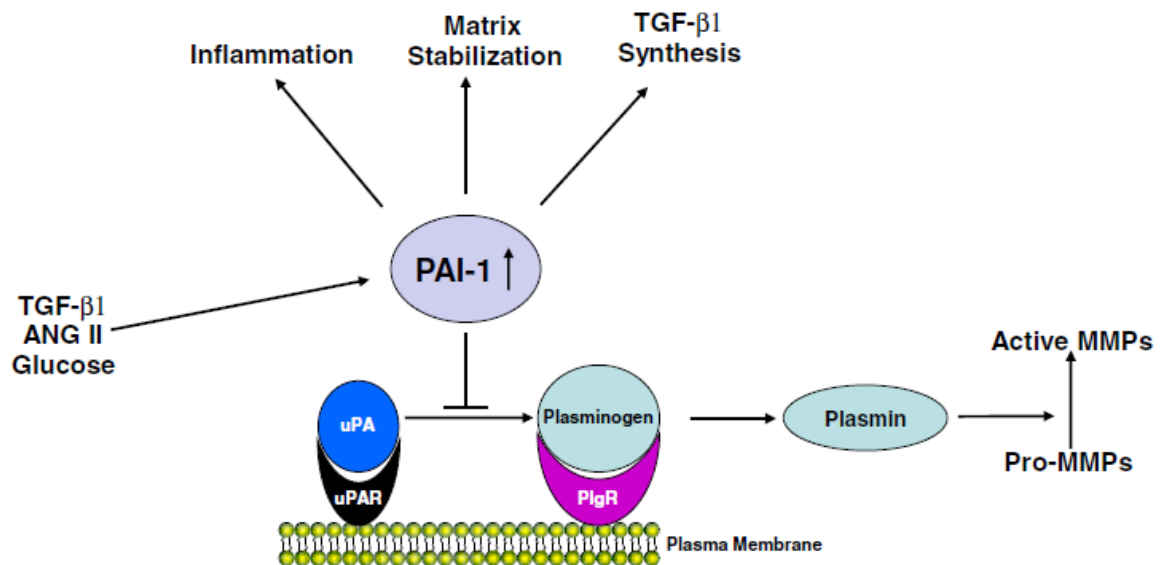


Figure 15. Rôle de PAI-1 dans le contrôle protéolytique péri-cellulaire. uPA en se fixant à son récepteur (uPAR) permet la conversion du plasminogène en plasmine. La plasmine intervient dans l'activation des MMP. Dans les tissus fibrosés, le TGF-β induit la surexpression de PAI-1 et donc la dérégulation de la balance protéolytique. PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1 ; uPA : urokinase Plasminogen Activator ; uPAR : uPA receptor ; PlgR : Plasminogen Receptor ; ANG II : Angiotensine II ; MMP : Metalloprotease (d'après Samarakoon *et al.*, 2013).

La voie Smad constitue la voie canonique du TGF- β , mais d'autres voies de signalisation, dites non canoniques, sont également induites par le TGF- β comme la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) avec ERK (Extracellular Regulated Kinase), p38 MAPK ou JNK (c-Jun N-terminal Kinase), la voie des Rho-like GTPase mais également la voie PI3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase)/AKT. Ces différentes voies alternatives peuvent interagir avec la voie Smad pour moduler son signal (Zhang, 2009).

b. TGF- β et fibrose rénale

L'expression du TGF- β est augmentée dans de nombreuses conditions pathologiques associées au développement de lésions de fibrose. Le rôle pro-fibrotique du TGF- β repose sur l'induction de protéines matricielles telles que le collagène et la fibronectine et de métalloprotéases matricielles (MMP). En participant à la dégradation de la MEC, les MMP jouent un rôle dans la migration cellulaire et les adhésions cellule-cellule ou cellule-matrice. Elles interviennent également dans la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines (Zhao H *et al.*, 2013). De plus, dans des modèles cellulaires et *in vivo*, dans un modèle murin de fibrose rénale d'Obstruction Urétérale Unilatérale (OUU), le TGF- β induit l'expression de PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1 ou serpine), l'inhibiteur majoritaire des sérines protéases uPA (urokinase plasminogen activator) et tPA (tissue plasminogen activator) (Samarakoon *et al.*, 2012). Dans les tissus fibrosés, le niveau d'expression élevé de PAI-1 induit la diminution de l'activité protéolytique tissulaire et l'accumulation du collagène. De plus, l'inhibition de uPA/tPA empêche la conversion du plasminogène en plasmine et donc de l'activation des MMP dépendante de la plasmine (**Figure 15**) (Gosh & Vaughan, 2012).

c. TGF- β et cavéoline

Différents mécanismes interviennent dans la régulation du TGF- β et certains sont impliqués dans des processus ant-fibrotiques. Parmi eux, la cavéoline agit comme un régulateur négatif de la voie du TGF- β .

Les cavéoles sont des régions membranaires riches en cholestérol et en sphingolipides et appartiennent à la famille des « rafts lipidiques ». Ces radeaux membranaires, de 50 à 100 nm de diamètre, forment une structure invaginée particulière en Ω inversé (**Figure 16A**). Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que l'endocytose et l'exocytose (Schnitzer *et al.*, 1994 ; Razani & Lisanti, 2001), l'homéostasie du cholestérol (Smart *et al.*, 1996) ou encore la transduction de signaux intracellulaires (Razani *et al.*, 2001a ; Childow & Sessa, 2010). Les

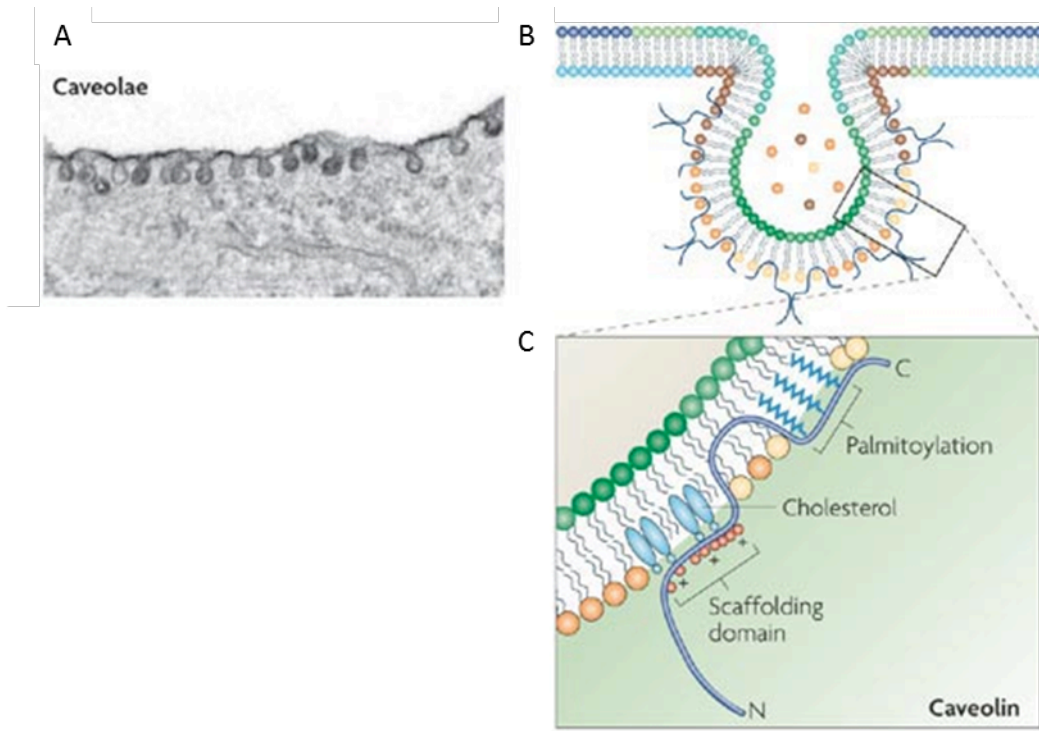


Figure 16. Structure des cavéoles. (A) Structure des cavéoles en microscopie électronique à transmission. (B) Représentation schématique des cavéoles. (C) Insertion des cavéolines dans la membrane au sein des cavéoles (d'après Parton & Simons, 2007).

cavéoles ont été identifiées dans la plupart des tissus et plus précisément dans les cellules endothéliales, les adipocytes, les cellules musculaires lisses et striées et les fibroblastes (Razani & Lisanti, 2001, Thomas & Smart, 2008). Les cavéoles, de nature principalement lipidique, sont constituées de protéines spécifiques dont celles appartenant à la famille des cavéolines.

La famille des cavéolines comprend trois membres : les cavéolines-1, 2 et 3 (CAV-1, CAV-2, CAV-3). Les cavéolines se situent dans la membrane plasmique des cavéoles (**Figure 16B et 16C**). CAV-1 et CAV-2 ont une expression ubiquitaire alors que CAV-3 est exprimée de manière exclusive dans le tissu musculaire (Thomas & Smart, 2008). Dans les cavéoles, les cavéolines sont présentes sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères ancrés dans la membrane (Sargiacomo *et al.*, 1995). Elles sont organisées selon une structure d'épingle à cheveux et comprennent 3 domaines. La partie C-terminale, hydrophile et cytosolique, est ancrée à la membrane par des groupements palmitoyls. Les deux autres domaines comprennent la partie trans-membranaire hydrophobe et la partie N-terminale hydrophile et cytosolique. CAV-1 contient deux domaines d'interaction. Un premier domaine, dans lequel la palmitoylation augmente la stabilisation de CAV-1, permet la dimérisation avec d'autres cavéolines. Le deuxième domaine d'interaction, dit « scaffolding » (SCD, Scaffolding Domain), interagit avec des molécules possédant un domaine CBD (Caveolin Binding Domain) telles que les protéines de la famille MAPK, les différentes isoformes de la PKC (Protéine Kinase C), Akt sérine/thréonine kinase, les protéines G, ainsi que les récepteurs de ces protéines (Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK), Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG), mais également des protéines structurales comme SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) ou VAMP-2 (Vesicle-associated membrane protein-2) (Schlegel *et al.*, 1999 ; Magga *et al.*, 2002 ; Razani *et al.*, 2002). Les interactions sont à l'origine de l'implication des cavéolines dans de nombreuses voies de signalisation ainsi que dans différents processus pathologiques comme le cancer (Carrion *et al.*, 2003) ou la fibrose, que ce soit la sclérodermie (Del Galdo *et al.*, 2008a, 2008b), la fibrose pulmonaire (Wang *et al.*, 2006 ; Tourkina *et al.*, 2008) ou la cirrhose hépatique (Yokomori *et al.*, 2002).

En particulier, CAV-1 est essentielle pour la formation des cavéoles. En effet, chez des souris KO (Knock Out) *Cav-1*^{-/-}, la déficience en CAV-1 inhibe à elle seule la formation des cavéoles (Razani *et al.*, 2001b) et entraîne une perturbation de l'endocytose des protéines sériques (Schubert *et al.*, 2001). Par ailleurs, au niveau pulmonaire, les souris *Cav-1*^{-/-} présentent une hyper-prolifération cellulaire et une augmentation des constituants de la MEC (Drab *et al.*, 2001). De même, CAV-1 semble être impliquée dans des processus anti-fibrotiques dans des cultures primaires de fibroblastes pulmonaires humains ainsi que dans des tissus fibrosés murins et humains (Tourkina *et*

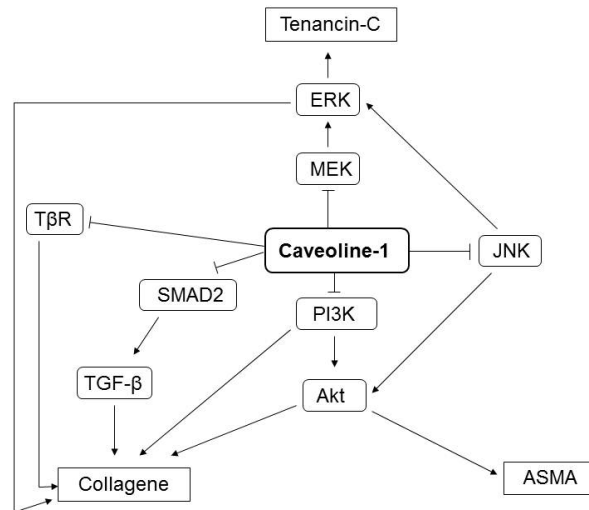


Figure 17. Mécanismes à l'origine des propriétés anti-fibrotiques de la cavéoline-1 (d'après Tourkina *et al.*, 2005)

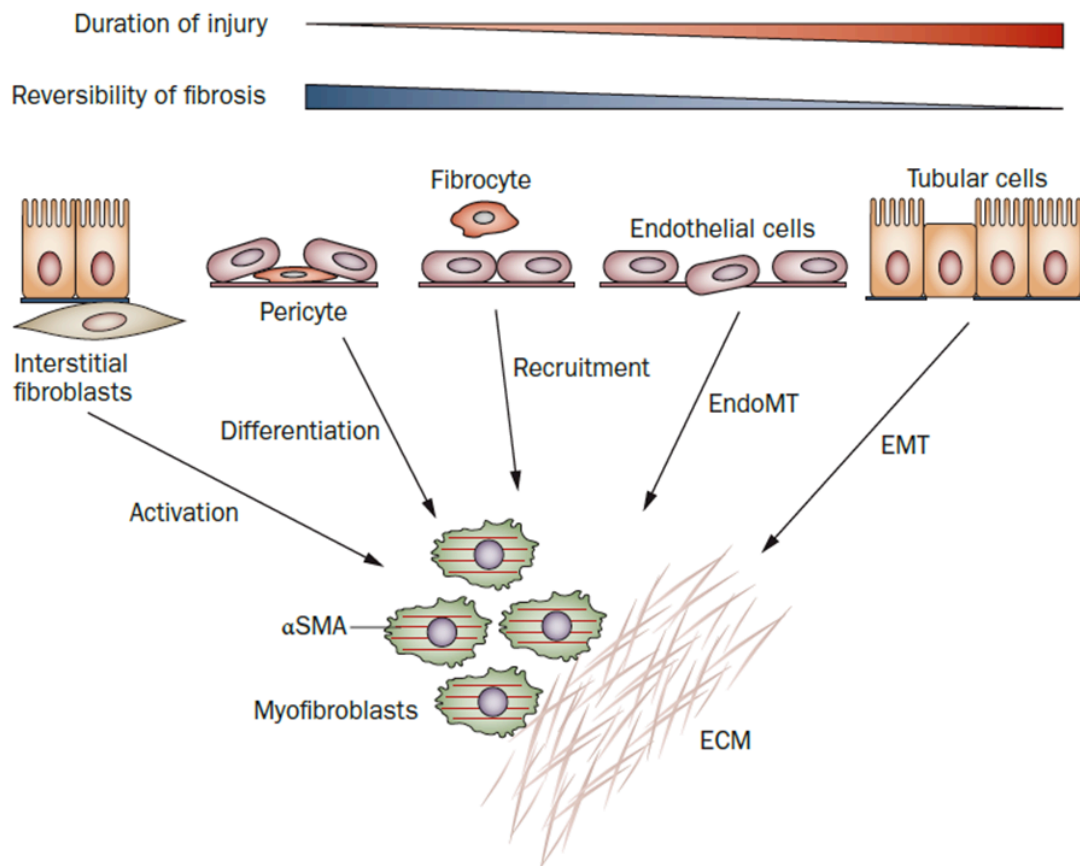


Figure 18. Différentes origines des myofibroblastes. α -SMA : α -Smooth Muscle Actine ; EndoMT : Endothelial-Mesenchymal Transition ; EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition ; ECM : Extracellular Matrix (d'après Liu, 2011).

al., 2005 ; 2008). De plus, dans un modèle d'OUU, les souris *Cav-1*^{-/-} présentent un degré de fibrose significativement plus élevé que les souris *Cav-1*^{+/+} (Park *et al.*, 2010). Ces différentes études ont mis en évidence que CAV-1 participe à l'inhibition de l'expression du collagène, de la tenacin-C et de l' α -SMA (α - Smooth Muscle Actin), par l'inhibition de facteurs de transcription tels que MEK/ERK, JNK et Akt (**Figure 17**). Enfin, CAV-1 est impliquée dans la voie du TGF- β en inhibant la phosphorylation de Smad2 (Del Galdo *et al.*, 2008a ; 2008b ; Lee *et al.*, 2007) et interagit directement avec les T β Rs en participant à leur internalisation et à leur dégradation (Del Galdo *et al.*, 2008a).

3. Les myofibroblastes

a. Rôle des myofibroblastes

Les myofibroblastes sont des cellules mésenchymateuses possédant un phénotype fibroblastique et des caractéristiques de cellules de muscle lisse. Ils possèdent une morphologie caractéristique en étoile et présentent des propriétés contractiles (fibres de stress, expression de l' α -SMA). Ils participent au processus de cicatrisation en condition normale. En conditions pathologiques, en tant que principaux producteurs des composants de la MEC, les myofibroblastes sont des acteurs centraux dans le développement de la fibrose (Liu, 2011 ; Grgic *et al.*, 2012).

b. Origine des myofibroblastes

Les myofibroblastes peuvent avoir diverses origines (**Figure 18**).

b.1 Fibroblastes

Les fibroblastes, cellules mésenchymateuses de morphologie fusiforme, contrôlent l'expansion de la MEC et son renouvellement, en sécrétant des composants de la MEC et des enzymes protéolytiques. L'activation des fibroblastes résidents en myofibroblastes est médiée par l'action de cytokines (Meran & Steadman, 2011).

b.2 Fibrocytes

Les fibrocytes sont des précurseurs de la moëlle osseuse qui expriment les marqueurs de cellule hématopoïétique CD34 et CD45 et qui ont la capacité de produire du collagène de type I. En réponse à une atteinte rénale, les fibrocytes infiltrent le parenchyme rénal et participent au processus de fibrogenèse (Wada *et al.*, 2011). La différenciation des fibrocytes en myofibroblastes est modulée par des facteurs pro-fibrotiques tels que le TGF- β (Bellini & Mattoli, 2007).

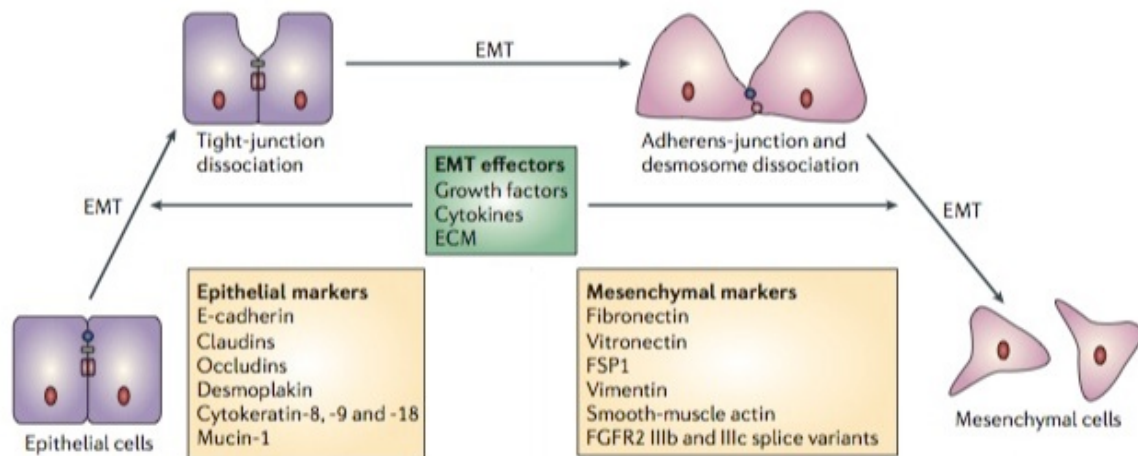


Figure 19. Schématisation du processus de Transition Epithélio-Mésenchymateuse. EMT : Epithelial Mesenchymal Transition ; ECM : Extracellular Matrix (d'après Thiery & Sleeman, 2006).

b.3 Péricytes

Les péricytes sont des cellules stromales localisées au niveau de la lame basale des cellules endothéliales, participant à la stabilisation de l'endothélium. Plus précisément, après une atteinte rénale, les péricytes migrent dans l'interstitium et se différencient en myofibroblastes (Stefanska et al., 2013).

b.4 Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

La TEM est un phénomène complexe et dynamique par lequel une cellule épithéliale polarisée, qui interagit avec sa membrane basale, subit de multiples modifications lui conférant un phénotype de cellule mésenchymateuse (Kalluri & Weinberg, 2009). Traditionnellement, on considère que la TEM se caractérise par (i) une perte d'expression des marqueurs épithéliaux tels que l'E-Cadhérine, la cytokératine, la β -caténine membranaire et la ZO-1 (Zonula Occludens 1), (ii) une expression de marqueurs mésenchymateux tels que l'expression *de novo* de la vimentine, l' α -SMA et la fibronectine, (iii) la perte de l'adhésion à la membrane basale tubulaire et (iv) l'acquisition de capacité de migration et d'invasion (**Figure 19**) (Burns *et al.*, 2007 ; Kalluri & Weinberg, 2009 ; Lamouille *et al.*, 2014). Au total, trois types de TEM ont été décrits. La TEM de type I est impliquée dans l'embryogénèse au cours de la gastrulation ou encore dans la migration des cellules de la crête neurale (Thiery *et al.*, 2009), alors que la TEM de type III intervient dans la progression tumorale. La TEM de type II est, elle, impliquée dans la réparation/régénération tissulaire et la fibrogenèse. Dans le cadre de la fibrose rénale, le TGF- β peut induire une TEM dans les cellules épithéliales (Thiery & Sleeman, 2006) et de nombreux facteurs de transcription tels que Twist, Zeb et Snail sont impliqués dans l'établissement de la TEM (Zeisberg & Neilson, 2010 ; Lamouille *et al.*, 2014). Enfin l'interstitium fibrosé étant un environnement hypoxique (Fine & Norman, 2008), il a été également démontré que l'hypoxie, *via* le facteur de transcription HIF1- α , contribue directement à la progression de la fibrose par stimulation de la TEM et par accumulation de MEC (Zeisberg & Neilson, 2010). Actuellement, la description des phénomènes de TEM au sein du parenchyme rénal reste cependant controversée. En effet, aucune étude *in vivo* chez l'animal n'a permis d'observer directement la migration d'une cellule épithéliale à travers la membrane basale tubulaire vers le compartiment interstitiel (Kriz *et al.*, 2011). De manière plus générale, il est admis qu'une pseudo-TEM (ou TEM partielle) participe au processus de fibrogenèse. En effet, la souffrance cellulaire tubulaire induirait un phénomène biologique, de type reprogrammation cellulaire, au cours duquel les cellules épithéliales exprimeraient des marqueurs mésenchymateux et subiraient des modifications phénotypiques (Xu-Dubois *et al.*, 2013a ; Galichon *et al.*, 2013b).

b.5 Transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT)

La transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT) se définit par la transformation d'une cellule endothéliale en une cellule mésenchymateuse de phénotype myofibroblastique. La part de l'EndoMT dans le processus de fibrogenèse est moins étudiée (Piera-Velazquez & Jimenez, 2012). Néanmoins, il a été montré, dans plusieurs modèles expérimentaux, que l'EndoMT participe à l'accumulation des myofibroblastes dans la fibrose rénale (Zeisberg *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2009 ; Li & Bertram, 2010).

Au total, l'origine des myofibroblastes reste controversée et la proportion de ces différents types cellulaires dans le contingent des myofibroblastes reste difficile à définir. En effet, Iwano *et al.* (2002) ont suggéré qu'environ 30% de fibroblastes auraient pour origine les cellules épithéliales grâce au processus de TEM. Cependant, ce résultat n'a pas été retrouvé dans d'autres études (Humphreys *et al.*, 2010). Enfin, alors que Lin *et al.* (2008) ont montré que les péricytes représentent la principale source de myofibroblastes interstitiels, LeBleu *et al.* (2013) suggèrent qu'environ 50% des myofibroblastes proviendraient de fibroblastes tissulaires résidants, 35% proviendraient des fibrocytes, 10% de l'EndoMT et 5% de l'EMT.

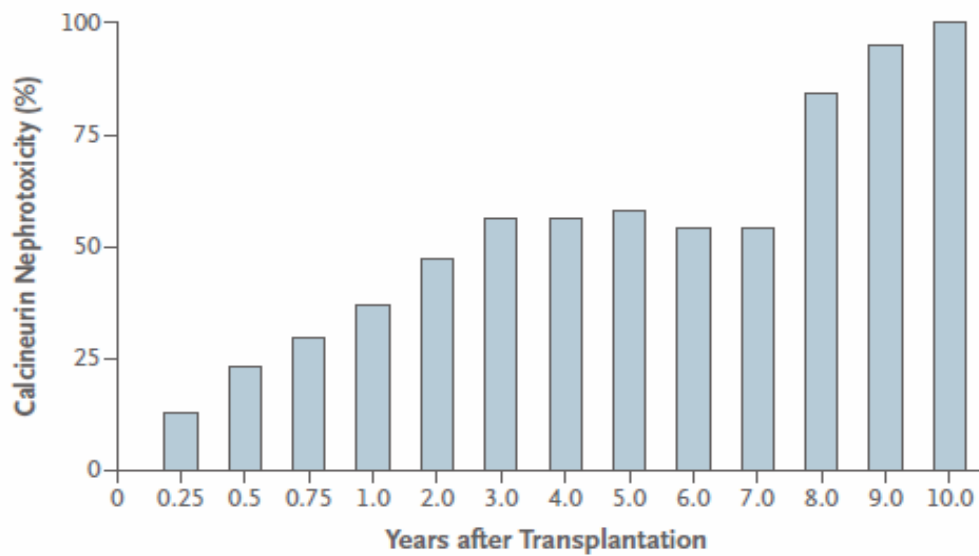


Figure 20. Prévalence des lésions de néphrotoxicité des ACN au cours du temps observées sur des biopsies systématiques périodiques du greffon rénal chez des patients transplantés rein-pancréas (d'après Nankivell *et al.*, 2003).

Chapitre III. Déterminants moléculaires de la néphrotoxicité induite par le Tacrolimus

I. Susceptibilité des effets néphrotoxiques du Tacrolimus

Nankivell *et al.* (2003) ont décrit, chez des patients ayant bénéficié d'une double transplantation rein-pancréas, traités par ACN et biopsiés systématiquement chaque année pendant 10 ans, la progression de la dysfonction chronique du greffon (ou néphropathie d'allogreffe). Les lésions observées peuvent être de deux types : d'une part, des lésions précoces, liées à la réaction alloimmune et, d'autre part, des lésions tardives (au-delà de 1 an) plutôt liées aux lésions de néphrotoxicité (hyalinose artériolaire, glomérulosclérose et FI/AT) et qui deviennent importantes au cours du temps. Dans cette étude, 10 ans après greffe, 100% des greffons rénaux présentent des signes de néphrotoxicité (**Figure 20**). Cependant, cette étude historique est limitée du fait de l'absence d'un bras contrôle sans ACN et du faible nombre de patients à 10 post-greffe (n=16). Plus récemment, Snanoudj *et al.* (2011) ont montré que 10 après greffe rénale, les patients sous Cyclosporine présentaient plus fréquemment des lésions histologiques (FI/AT, glomérulosclérose, hyalinose artériolaire) que les patients sans ACN. Si 10 ans après greffe, les patients présentent des signes de néphrotoxicité, leur délai d'apparition est observé à plus ou moins brève échéance, témoignant d'une susceptibilité individuelle importante dans le développement des lésions de toxicité. La susceptibilité du greffon rénal au Tacrolimus peut être en partie liée à différents mécanismes génétiques ou épigénétiques affectant des gènes intervenant dans la prise en charge cellulaire du Tacrolimus, mais également des gènes impliqués dans le processus de fibrogenèse.

II. Implication de polymorphismes génétiques

1. Protéines impliquées dans la prise en charge du Tacrolimus

Comme pour de nombreuses protéines impliquées dans la prise en charge des xénobiotiques, une grande variabilité interindividuelle d'expression affecte les principaux partenaires responsables du métabolisme et du transport du Tacrolimus (Coto & Tavira, 2009). Ainsi des polymorphismes génétiques affectant les gènes codant pour des protéines impliquées dans la prise en charge du Tacrolimus peuvent être à l'origine de la susceptibilité individuelle à la néphrotoxicité du Tacrolimus.

De plus, les différentes protéines de biotransformation et de transport des xénobiotiques contribuent à la formation de métabolites dont la production *in situ* peut être à l'origine d'une toxicité spécifique dans certains organes (Ding & Kaminsky, 2003). La néphrotoxicité du Tacrolimus serait ainsi conditionnée par la capacité du tissu rénal à prendre en charge cette molécule. Etant donné que l'expression et l'activité des protéines impliquées dans la prise en charge rénale du Tacrolimus sont déterminées par le patrimoine génétique du donneur et non du receveur, des mécanismes génétiques et épigénétiques affectant les gènes du donneur pourraient alors avoir un impact direct sur la susceptibilité individuelle observée dans les phénomènes de néphrotoxicité induite par le Tacrolimus.

a. Polymorphismes génétiques du CYP3A5

a.1 Polymorphismes génétiques du CYP3A5

Plus de 20 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ont été décrits pour le CYP3A5 (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a5.htm>). Parmi eux, le plus étudié est le SNP CYP3A5 6986A>G (rs776746) présent dans l'intron 3, qui altère l'épissage alternatif du gène et qui a pour conséquence l'insertion d'un codon STOP prématuré à l'origine d'une protéine tronquée non fonctionnelle (Kuehl *et al.*, 2001). L'allèle CYP3A5*1 (6986A), correspondant à la forme sauvage, est associé à une expression normale de la protéine lorsqu'il est présent à l'état homozygote ou hétérozygote, alors que l'allèle CYP3A5*3 (6986G) à l'état homozygote entraîne l'absence de l'expression tissulaire du CYP3A5 (Staatz *et al.*, 2010a). La fréquence de l'allèle CYP3A5*1 est dépendante de l'origine ethnique puisque chez les caucasiens, environ 5 à 15% des individus sont porteurs d'au moins un allèle fonctionnel, alors que cette fréquence s'élève à 45-75% chez les afro-américains (Lamba *et al.*, 2002 ; Sim *et al.*, 2013). Enfin, d'autres SNP affectant le gène CYP3A5 ont été décrits tel que le SNP CYP3A5 14690G>A (rs10264272, CYP3A5*6) qui est responsable d'une protéine tronquée et le SNP CYP3A5 27131_27132insT (rs41303343, CYP3A5*7) qui, en induisant un « frameshift » est responsable d'une protéine non fonctionnelle. Néanmoins, la fréquence des allèles CYP3A5*6 et CYP3A5*7 est relativement faible chez les caucasiens (Hustert *et al.*, 2001 ; Kuehl *et al.*, 2001).

a.2 Impact des SNP du CYP3A5 chez le receveur

Depuis plusieurs années, il a été clairement établi que le SNP CYP3A5 6986A>G influence la pharmacocinétique du Tacrolimus, les patients homozygotes pour le CYP3A5*1 nécessitant des posologies plus importantes de Tacrolimus. Cependant, malgré des doses plus élevées, le taux

résiduel (C_0) de Tacrolimus reste plus faible chez ces patients (Hesselink *et al.*, 2003 ; Thervet *et al.*, 2010 ; Glowacki *et al.*, 2011). Néanmoins si de nombreuses études ont pu confirmer un tel impact de ce SNP chez le receveur sur la pharmacocinétique du Tacrolimus, il n'existe actuellement que peu de données démontrant son influence sur la néphrotoxicité ou sur les événements cliniques survenant après transplantation rénale (Staatz *et al.*, 2010b). Une étude à court terme (90 jours) a permis de montrer que l'ajustement de la dose en fonction du génotype dès l'introduction du Tacrolimus n'a pas d'effet sur la fonction rénale ou la néphrotoxicité induite par le Tacrolimus (Thervet *et al.*, 2010).

a.3 Impact des SNP du CYP3A5 chez le donneur

Dans la littérature, il a été montré que le SNP CYP3A5 6986A>G, affectant le donneur, n'influence pas la survie ou la fonction rénale du greffon sous Cyclosporine et sous Tacrolimus (Naesens *et al.*, 2009a ; Woillard *et al.*, 2010).

b. Polymorphismes génétiques du CYP3A4

b.1 Polymorphismes génétiques du CYP3A4

Actuellement, une quarantaine de SNP ont été décrits pour le CYP3A4 (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm>). De manière historique, le polymorphisme génétique le plus étudié est le -392A>G (CYP3A4*1B, rs2740574) situé dans la région 5'-flanquante, au niveau de la séquence NFSE (Nifepidine-Specific Element). Les conséquences fonctionnelles de ce SNP demeurent controversées. Certaines études ont démontré *in vitro* une augmentation de l'activité transcriptionnelle du CYP3A4, alors que les études *in vivo* n'ont pas mis en évidence un impact sur le métabolisme de médicaments, telles que la nifédipine ou l'érythromycine (Ball *et al.*, 1999 ; Lamba *et al.*, 2002). Récemment, une étude a identifié un SNP 15389C>T au niveau de l'intron 6 du gène CYP3A4 (CYP3A4*22, rs35599367) associé à une diminution de l'expression et de l'activité de l'enzyme au niveau hépatique (Wang *et al.*, 2011).

b.2 Impact des SNP du CYP3A4 chez le receveur

Plusieurs études se sont intéressées à l'impact CYP3A4 15389C>T sur la pharmacocinétique du Tacrolimus. Cependant, les résultats obtenus dans la littérature étant contradictoires, d'autres travaux sont nécessaires afin d'évaluer les conséquences cliniques de ce SNP (Elens *et al.*, 2011 ; Gijzen *et al.*, 2013 ; Lunde *et al.*, 2014 ; Moes *et al.*, 2014).

b.3 Impact des SNP du CYP3A4 chez le donneur

Les résultats concernant l'impact de SNP affectant le gène *CYP3A4* chez le donneur restent parcellaires. Néanmoins, des études ont permis de montrer que l'allèle *CYP3A4*1B* ne semble pas être associé à la néphrotoxicité des ACN (Naesens *et al.*, 2009a ; Woillard *et al.*, 2010).

c. Polymorphismes génétiques de ABCB1

c.1 Polymorphismes génétiques de ABCB1

ABCB1 est un gène hautement polymorphe puisque plus de 60 SNP ont été décrits dans les séquences codantes (Wolf *et al.*, 2011). En particulier, les SNP localisés dans les exons 12 (1236C>T, rs1128503), 21 (2677G>T/A, rs2032582) et 26 (3435C>T, rs1045642) ont été largement étudiés. Les SNP 3435C>T (Ile1145Ile) et 1236C>T (Gly421Gly) sont silencieux alors que le SNP 2677G>T/A est responsable de la substitution Ala893Ser/Thr. Plusieurs études ont montré que le SNP 3435C>T entraîne une diminution de l'expression et de l'activité de ABCB1 *in vivo* liée à une diminution de la stabilité de l'ARNm (Hoffmeyer *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2005 ; Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007). L'impact de ce polymorphisme sur l'expression et l'activité de ABCB1 reste néanmoins controversé (Siegmond *et al.*, 2002 ; Owen *et al.*, 2005 ; Leschziner *et al.*, 2007). Ces trois SNP étant en déséquilibre de liaison, les conséquences biologiques de chacun des variants s'avèrent difficiles à étudier, et par conséquent les haplotypes devraient mieux refléter l'activité biologique de ABCB1 (Kroetz *et al.*, 2003). L'haplotype *ABCB1* 1236T-2677T-3435T est observé chez 32% des caucasiens, 31% des asiatiques et 13% des afro-américains (Benish *et al.*, 2010). Par ailleurs, d'autres SNP pourraient expliquer la variabilité d'expression et de fonction de ABCB1, en particulier, le SNP 1199G>A (rs2229109). Récemment, Dessily *et al.* (2014) ont émis l'hypothèse que l'effet de ce SNP semblait être substrat-dépendant car la substitution de l'acide aminé (Ser400Asn) se localise dans la boucle cytoplasmique impliquée dans la reconnaissance du substrat.

c.2 Impact des SNP de ABCB1 chez le receveur

Dans le cadre de la transplantation rénale, de manière générale, la majorité des études n'ont pas réussi à mettre en évidence un lien entre ces SNP affectant le gène *ABCB1* chez le receveur et la pharmacocinétique du Tacrolimus (Tada *et al.*, 2005 ; Op den Buijsh *et al.*, 2007 ; Staatz *et al.*, 2010a ; Picard & Marquet, 2011).

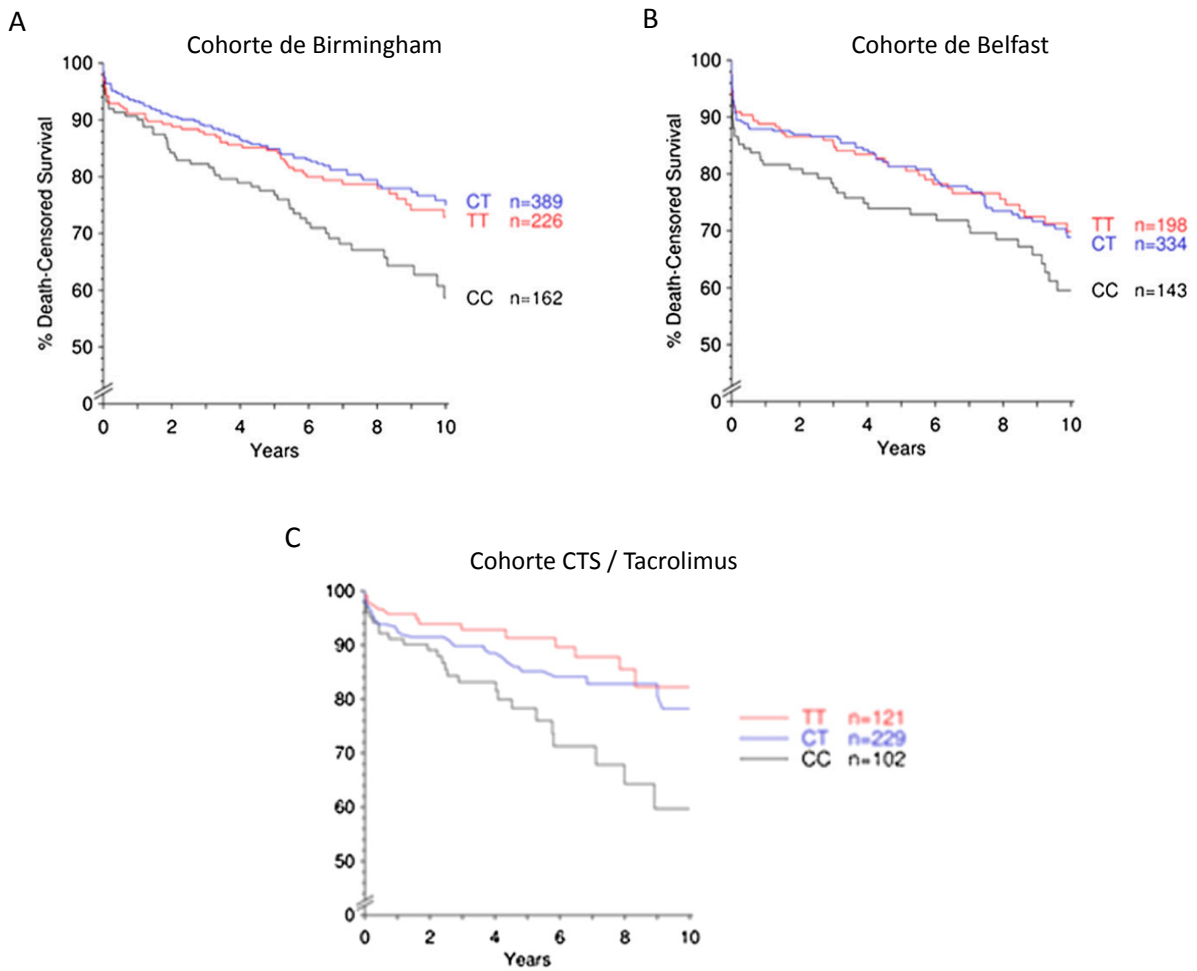


Figure 21. Association entre le polymorphisme génétique *ABCB1* 3435C>T (donneur) et la perte du greffon rénal. CTS : Collaborative Transplant Study (d'après Moore *et al.*, 2012).

b.3 Impact des SNP de *ABCB1* chez le donneur

Plusieurs études ont démontré l'impact des SNP affectant *ABCB1* chez le donneur sur la néphrotoxicité des ACN. En 2005, Hauser *et al.* ont montré que le génotype *ABCB1* 3435TT du donneur était associé à la néphrotoxicité de la Cyclosporine. De même, Woillard *et al.* (2010), sur une cohorte rétrospective de patients transplantés rénaux sous Cyclosporine, ont montré que les patients dont les greffons sont porteurs de l'haplotype *ABCB1* 3435T-2677T-1236T ont une moins bonne survie du greffon rénal, avec un risque relatif de 9,34 à l'état homozygote. Enfin, concernant la néphrotoxicité du Tacrolimus, la combinaison de l'allèle *ABCB1* 3435T à l'état homozygote, à la fois chez le receveur et chez le donneur, semble être associée aux lésions de FI/AT présentes sur le greffon rénal (Naesens *et al.*, 2009a). Plus récemment, Moore *et al.* (2012) ont montré que le génotype *ABCB1* 3435CC du donneur, dans deux cohortes de patients transplantés rénaux (Cohorte de Birmingham et de Belfast), est associé à une perte de greffon (**Figure 21A-B**). De plus, dans une large cohorte de réplication (Cohorte Collaborative Transplant Study), l'association entre le génotype du donneur *ABCB1* 3A45CC et la survie du greffon a été confirmée chez les patients traités au Tacrolimus par les mêmes auteurs (**Figure 21C**).

d. Polymorphismes génétiques de *PXR*

Plus de 30 SNP affectant *PXR* ont été identifiés (King *et al.*, 2007). *PXR* est un régulateur transcriptionnel du CYP3A4, du CYP3A5 et de *ABCB1*. Par conséquent, des polymorphismes génétiques affectant *PXR* pourraient avoir un impact sur la pharmacocinétique et sur la néphrotoxicité du Tacrolimus. Cependant, les données dans la littérature restent, à ce jour, parcellaires. Une étude récente a montré que, chez des patients transplantés rénaux, le SNP *PXR* 8055C>T des receveurs (rs2276707) module les paramètres pharmacocinétiques du Tacrolimus (Barraclough *et al.*, 2012). De plus, Press *et al.* (2010) n'ont pas réussi à montrer l'influence de cinq SNP affectant *PXR* (*PXR* -25385C>T ou rs3814055, -24381A>C ou rs1523127, -24113G>A ou rs2276706, 252A>G ou rs1464603, 7635A>G ou rs6785049) des receveurs sur la pharmacocinétique de la Cyclosporine dans une population de patients transplantés rénaux. Les cinq SNP étudiés, excepté le rs1464603, sont décrits pour affecter l'activité du CYP3A4 (Kotta-Loizou *et al.*, 2013).

2. Polymorphismes génétiques des gènes impliqués dans la fibrose

La susceptibilité interindividuelle des phénomènes de néphrotoxicité induite par le Tacrolimus pourrait être associée à une capacité plus ou moins importante à développer des lésions de fibrose après une agression tissulaire.

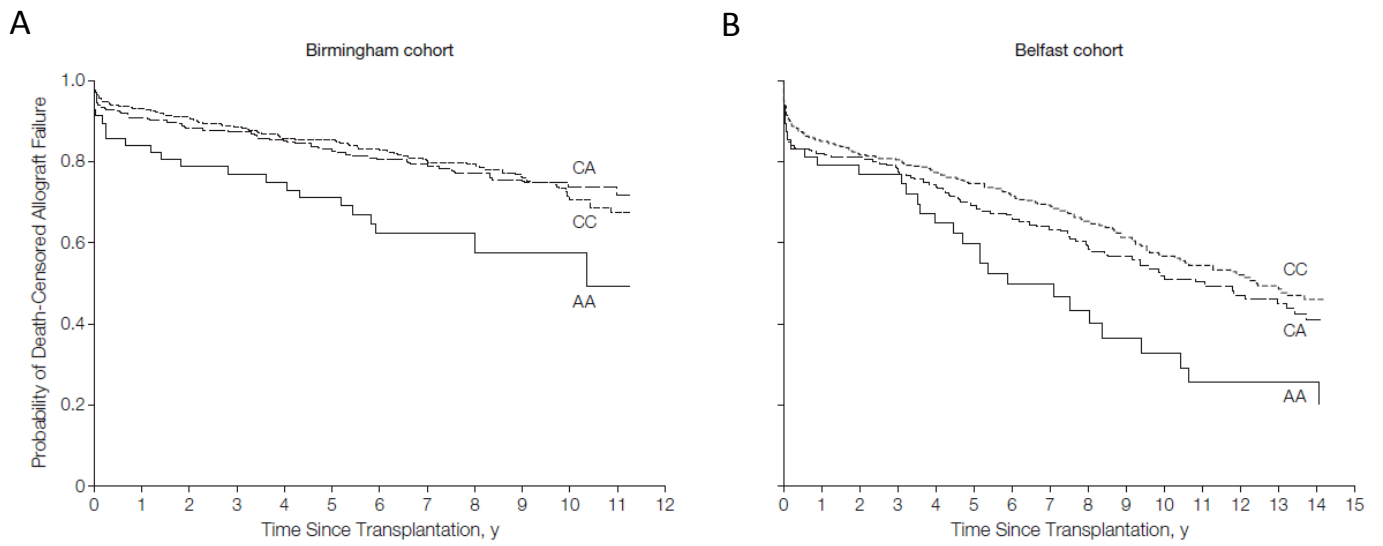


Figure 22. Association entre le polymorphisme génétique rs4730751 affectant *CAV1* (donneur) et la perte du greffon rénal (d'après Moore *et al.*, 2010).

a. Polymorphismes génétiques de *CAV1*

L'hypothèse de polymorphismes génétiques affectant le gène *CAV1* impliqués dans le processus de fibrogenèse a été testée par une équipe anglaise en 2010. Moore *et al.* (2010) ont ainsi étudié l'impact de 12 SNP de *CAV1* sur la survie du greffon rénal. Ce travail, réalisé sur l'ADN des donneurs de 785 transplantés rénaux (cohorte de Birmingham), indique que les patients dont le greffon est de génotype AA pour le SNP rs4730751 (C>A situé dans l'intron 2) présentent un risque élevé de développer des lésions de fibrose interstitielle (59,1% vs 25,9% pour les génotypes AC et CC). De plus, le génotype AA est associé à une perte de greffon plus fréquente (38,6% pour les génotypes AA vs 22,3 % et 22,2% pour les génotypes AC et CC respectivement, à 12 ans post-greffe) (**Figure 22A**). Ces résultats ont été validés dans une cohorte indépendante de 679 patients transplantés rénaux (Cohorte de Belfast) (**Figure 22B**). Les autres SNP affectant *CAV1* testés ne semblent pas être associés significativement à l'évolution du greffon rénal.

b. Polymorphismes génétiques de *TGFB*

Plusieurs études se sont intéressées aux SNP affectant le gène *TGFB1* dans le cadre de la transplantation rénale. Ainsi, dans une cohorte de 276 patients transplantés rénaux, le SNP *TGFB1* - 282C>G (rs1800471), chez les receveurs, est associé à la dysfonction chronique du greffon (Jiménez-Sousa *et al.*, 2012). De plus, chez les receveurs, deux SNP de *TGFB1*, -509C>T (rs1800469) et 869T>C (rs1982073) ont été étudiés et aucune association n'a été observée entre les SNP affectant *TGFB1* et la survie du greffon rénal dans une cohorte coréenne de patients transplantés rénaux (Cho *et al.*, 2008). Enfin, une large étude comprenant 4199 patients transplantés rénaux n'a pas trouvé de lien entre des variants du *TGFB1* et la survie du greffon (Mytilineos *et al.*, 2004). Cependant, les résultats négatifs des études pourraient s'expliquer par le fait que le génotype du donneur a probablement plus d'impact que le génotype du receveur.

III. Implication des microARN

1. *MicroARN et gènes impliqués dans le métabolisme et le transport du Tacrolimus*

Les miARN peuvent intervenir dans la susceptibilité inter-individuelle de la néphrotoxicité induite par le Tacrolimus en régulant l'expression de gènes impliqués dans sa prise en charge. Il a été montré que miR-148a et miR-34a régulent de manière post-transcriptionnelle l'expression de PXR

Tableau 5. Différents miARN impliqués dans la fibrose rénale.

miARN	Régulation	Effet	Cibles	Modèles	Références
miR-29	Sous-exprimé	Anti-fibrosant	Collagènes	<p>Modèle in vivo :</p> <ul style="list-style-type: none"> -OUU sur des souris KO Smad3^{-/-} -Induction de miR-29 chez des souris -Gavage à l'adénine de souris -Néphrectomie des 5/6 sur des rats -Néphropathie diabétique induite par streptozotocine chez des souris KO ApoE^{-/-}, chez des rats ± néphrectomie <p>Modèles in vitro</p> <p>Etude clinique :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Patients atteints de la maladie de Berger 	<p>Qin <i>et al.</i>, 2011 ;</p> <p>Wang <i>et al.</i>, 2012 ;</p> <p>Chung <i>et al.</i>, 2013 ;</p> <p>Fang <i>et al.</i>, 2013</p>
	Surexprimé	Pro-fibrosant	Sprouty-1	<p>Modèle in vivo :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Souris <i>db/db</i> ± Knockdown de miR-29 <p>Modèles in vitro</p>	<p>Long <i>et al.</i>, 2011</p>
miR-21	Surexprimé	Pro-fibrosant	Smad7, PPARα, Sprouty-1	<p>Modèles in vivo :</p> <ul style="list-style-type: none"> -OUU chez des souris KO miR21^{-/-} ou des souris sauvages -Souris <i>db/db</i> ± Knockdown de miR-21 <p>Modèles in vitro</p> <p>Etude clinique :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Patients détransplantés pour cause de greffon rénal non fonctionnel 	<p>Zarjou <i>et al.</i>, 2011 ;</p> <p>Chau <i>et al.</i>, 2012 ;</p> <p>Chung <i>et al.</i>, 2013 ;</p> <p>Glowacki <i>et al.</i>, 2013 ;</p> <p>Zhong <i>et al.</i>, 2013</p>
	Sous-exprimé	Anti-fibrosant	ZEB2	<p>Modèle in vivo :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Néphropathie diabétique induite par streptozotocine chez des souris KO ApoE^{-/-} <p>Modèles in vitro</p> <p>Etudes cliniques :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Patients atteints de néphropathie diabétique 	<p>Krupa <i>et al.</i>, 2010 ;</p> <p>Wang <i>et al.</i>, 2010</p>
miR-192					

(Takagi *et al.*, 2008 ; Lamba *et al.*, 2014). De plus, il a été montré que miR-27b régule l'expression de CYP3A4 (Pan *et al.*, 2009). Enfin, concernant ABCB1, plusieurs miARN sont corrélés de manière inverse à l'expression de ABCB1 tels que miR-385, miR-495 (Xu *et al.*, 2013). De plus, miR-223 (Yang *et al.*, 2013), miR-298 (Bao *et al.*, 2012), miR-145 (Ikemura *et al.*, 2013), miR-451 (Kovalchuk *et al.*, 2008) et miR-508-5p (Shang *et al.*, 2014) ciblent directement l'ARNm de ABCB1. A notre connaissance, il n'y a pas d'études sur l'implication de ces miARN dans les néphropathies chroniques.

2. MicroARN et fibrose rénale

L'implication de certains miARN dans le processus de fibrogenèse a été partiellement démontrée, en particulier celle de miR-21, des membres de la famille miR-200 ou encore de miR-29 (Patel & Noureddine, 2012). Plus précisément, miR-21 est dérégulé dans différents types de fibrose tissulaire, en particulier dans la fibrose cardiaque (Thum *et al.*, 2008), pulmonaire (Liu *et al.*, 2010) et rénale (Zarjou *et al.*, 2011 ; Chau *et al.*, 2010 ; Chung *et al.*, 2013 ; Glowacki *et al.*, 2013 ; Zhong *et al.*, 2013), dans des modèles *in vitro*, *in vivo* et chez l'homme. Dans le cadre de la fibrose rénale, plusieurs travaux, présentés dans le **Tableau 5**, ont étudié le rôle des miARN.

Parmi les miARN impliqués dans le phénomène de TEM, miR-382 est régulé positivement dans un modèle cellulaire de TEM (Kriegel *et al.*, 2010) et son expression tissulaire est augmentée dans un modèle murin de fibrose rénale après OUU (Kriegel *et al.*, 2012). De plus, miR-21 joue un rôle dans la TEM dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, en inhibant directement Smad7 et en induisant la surexpression de Smad3 du facteur de transcription HIF1- α (Luo *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2014).

Dans le cadre de la fibrose en transplantation rénale, Scian *et al.* (2011) ont établi un profil d'expression de miARN caractéristiques de lésions de FI/AT dans des biopsies de patients transplantés rénaux. Ainsi dans cette étude, sur les 56 miARN différentiellement exprimés, miR-143-3p et miR-32 sont surexprimés alors que miR204, miR-107 et miR-211 sont sous-exprimés. Ben-Dov *et al.* (2012) ont montré que miR-21, miR-142-3p et 5p et miR-223 sont surexprimés dans des biopsies de greffons rénaux présentant de la FI/AT et que les miARN de la famille miR-30 sont sous exprimés dans ces mêmes biopsies. Enfin, miR-21 est significativement associé aux lésions de fibrose sévère chez des patients transplantés rénaux sous Tacrolimus (Glowacki *et al.*, 2013).

3. MicroARN en transplantation rénale

Plusieurs études ont appréhendé le rôle des miARN en transplantation rénale en dehors du champ de la fibrose. Dans le rejet aigu, il a été montré que 17 miARN étaient différentiellement

miR-192	Surexprimé	Pro-fibrosant	ZEB2	<p>Modèles in vivo :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Néphropathie diabétique induite par streptozotocine chez des souris KO mir192^{-/-} -Souris <i>db/db</i> -OUU chez des souris KO Smad3^{-/-}, Smad7^{-/-} et KO conditionnel Smad2 -Néphrectomie des 5/6 chez des rats ± induction Smad7 	Kato <i>et al.</i> , 2007 ; Chung <i>et al.</i> , 2010 ;
	Surexprimé	Pro-fibrosant	ZEB2	<p>Modèles in vitro</p> <p>Etude clinique :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Patients atteints de néphropathie diabétique 	Deshpande <i>et al.</i> , 2013
miR-150	Surexprimé	Pro-fibrosant	SOCS1	<p>Modèles in vitro</p> <p>Etude clinique :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Patients atteints de néphropathie lupique 	Zhou <i>et al.</i> , 2013
miR-let7	Sous-exprimé	Anti-fibrosant	Collagènes, TβRI	<p>Modèles in vivo :</p> <ul style="list-style-type: none"> -OUU chez des rats 	Brennan <i>et al.</i> , 2013 ;
miR-324	Surexprimé	Pro-fibrosant	Prolyl endopeptidase	<p>Modèle in vivo :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Rats Munich Wistar Fromter qui développent, de manière spontanée, de la glomérulosclérose 	Macconi <i>et al.</i> , 2012
miR-200	Sous-exprimé	Anti-fibrosant	ZEB2, TGF-β2	<p>Modèles in vivo :</p> <ul style="list-style-type: none"> -OUU chez des souris ± induction de miR-200 <p>Modèle in vitro</p>	Oba <i>et al.</i> , 2010 ; Xiong <i>et al.</i> , 2012

exprimés dans des biopsies de greffons rénaux. Sur les 17, 10 miARN (let-7c, miR-10a, miR-10b, miR-125a, miR-200a, miR-30a-3p, miR-30b, miR-30c, miR30e-3p, miR-32) sont sous exprimés dans les biopsies de patients présentant un rejet aigu et 7 sont surexprimés (miR-142-5p, miR-142-3p, miR-155, miR-223, miR-146b, miR-146a, miR-342) (Anglicheau *et al.*, 2009). De plus, dans une autre étude, 12 miARN sont sous exprimés chez des patients ayant présenté un épisode de rejet aigu (miR-324-3p, miR-611, miR-654, miR-330, miR-524, miR-17-3p, miR-483, miR-663, miR-516-5p, miR-326, miR-197 et miR-346) et 8 miARN sont surexprimés (miR-658, miR-125a, miR-320, miR-381, miR-628, miR-602, miR-629, et miR-125a) (Sui *et al.*, 2008). L'identification de tels miARN pourrait aider au diagnostic et à la prévention du rejet aigu après transplantation rénale.

Objectif global du projet de recherche

Le Tacrolimus, traitement pivot en transplantation rénale, a permis de diminuer nettement le rejet aigu mais s'accompagne d'effets néphrotoxiques, associés au développement de lésions de fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (FI/AT), participant à la dysfonction chronique du greffon. Cependant, les lésions de toxicité se développent à plus ou moins long terme, suggérant une susceptibilité interindividuelle dans les phénomènes de néphrotoxicité. Comme nous l'avons décrit dans la revue générale de ce manuscrit, différents mécanismes impliqués dans la susceptibilité du greffon rénal ont été évoqués comme des polymorphismes génétiques ou des mécanismes épigénétiques, dont les miARN, qui peuvent affecter des gènes impliqués dans la prise en charge cellulaire du Tacrolimus, mais également des gènes impliqués dans le processus de fibrogenèse.

Afin d'améliorer la connaissance des déterminants moléculaires de la néphrotoxicité induite par le Tacrolimus, nous avons combiné plusieurs approches expérimentales. Le premier objectif de cette thèse a été de développer et de caractériser un modèle de cultures primaires de cellules épithéliales tubulaires proximales rénales humaines dans le but d'étudier *in vitro* la toxicité du Tacrolimus. Ensuite, nous avons développé un modèle murin d'exposition au Tacrolimus. Enfin, le dernier objectif a été d'évaluer l'impact de SNP affectant les gènes impliqués dans le métabolisme et le transport du Tacrolimus (*CYP3A5*, *ABCB1*) et un gène impliqué dans la fibrogenèse (*CAV1*) sur la fonction et les lésions histologiques du greffon.

Partie 2 : Travaux

Axe I. Modèle *in vitro* de toxicité induite par le Tacrolimus

I. Modèle de culture primaire de cellules épithéliales tubulaires proximales

Afin d'étudier les mécanismes de toxicité du Tacrolimus, nous avons choisi de développer un modèle *in vitro* de culture primaire de cellules épithéliales tubulaires proximales rénales (CTP). De par leur forte capacité métabolique, de l'expression de nombreux transporteurs et de leur bordure en brosse, les CTP représentent une cible privilégiée pour les xénobiotiques (Bach *et al.*, 1993 ; Li *et al.*, 2003). Plus précisément, les CTP sont particulièrement sensibles à la toxicité du Tacrolimus (Atcherson & Trifillis, 1994).

1. Développement du modèle de culture primaire de cellules épithéliales tubulaires proximales (CTP) (Article 1)

Les CTP sont obtenues après dissociation mécanique et enzymatique de tissus sains rénaux issus de pièces de néphrectomies. Les cellules épithéliales rénales obtenues ont été triées grâce à un co-marquage des CD10 et CD13, deux marqueurs tubulaires proximaux rénaux, par cytométrie en flux. Les cellules ont été caractérisées sur des paramètres phénotypiques (évaluation de l'expression de marqueurs de différenciation et de leur stabilité sur différents passages cellulaires), morphologiques (évaluation de la présence de microvillosités, jonctions serrées, desmosomes), fonctionnels (mesure de la résistance trans-épithéliale et de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline). Nos résultats démontrent que les cellules doubles positives CD10/CD13 constituent une population pure et stable présentant des caractéristiques épithéliales et exprimant des marqueurs tubulaires proximaux.

2. Capacité métabolique du modèle de culture primaire de CTP (Article 2)

Afin de déterminer le modèle expérimental cellulaire *in vitro* se rapprochant le plus du tissu rénal sain humain et de ses capacités à métaboliser les xénobiotiques, nous avons comparé les profils d'expression de 380 gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques de 8 tissus corticaux rénaux sains, de lignées cellulaires rénales (HEK293 et HK2), de cultures primaires de CTP établies au laboratoire et de cultures primaires commerciales (Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells, Human Renal Cortical Epithelial Cells, Human Renal Epithelial Cells ; ScienceCell) à l'aide d'une technique de PCR en temps réel sur microplaques TLDA (Taqman Low Density Array, Life

Technologies). D'une part, les lignées cellulaires HEK293 et HK2 ont les profils d'expression les plus éloignés des tissus sains ($0,49 < R < 0,56$; $p < 0,0001$). D'autre part, les cultures primaires de CTP présentent un niveau d'expression plus proche des tissus sains que les cultures primaires commerciales ($0,66 < R < 0,73$; $p < 0,0001$). Au vu du nombre important de gènes impliqués dans la prise en charge des xénobiotiques exprimés, les CTP présentent une capacité métabolique potentielle élevée et représentent ainsi un modèle pertinent pour l'étude de la toxicité rénale des xénobiotiques et, en particulier, du Tacrolimus.

Article 1.

Isolation and Characterization of a Primary Proximal Tubular Epithelial Cell Model from Human Kidney by CD10/CD13 Double Labeling

Cynthia Van der Hauwaert, Grégoire Savary, Viviane Gnemmi, François Glowacki, Nicolas Pottier, Audrey Bouillez, Patrice Maboudou, Laurent Zini, Xavier Leroy, Christelle Cauffiez, Michaël Perrais, Sébastien Aubert

PLoS ONE, 2013, 8(6): e66750.

Isolation and characterization of a primary proximal tubular epithelial cell model from human kidney by CD10/CD13 double labeling

C Van der Hauwaert^{1*}, G Savary^{1*}, V Gnemmi^{2,3,4**}, F Glowacki^{1,4,5**}, N Pottier^{1,4}, A Bouillez², P Maboudou⁶, L Zini^{2,4,7}, X Leroy^{2,3,4}, C Cauffiez^{1,4}, M Perrais^{2,4*}, S Aubert^{2,3,4*}

¹ EA4483, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine de Lille, Pôle Recherche, Lille, France

² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U837, Jean-Pierre Aubert Research Center, Equipe 5 «Mucines, Différentiation et Cancérogenèse Épithéliales», Lille, France

³ Service d'Anatomie Pathologique, Centre de Biologie et Pathologie, CHRU Lille, Lille, France

⁴ Faculté de Médecine de Lille, Université Lille 2, Lille, France

⁵ Service de Néphrologie, Hôpital Huriez, CHRU Lille, Lille, France

⁶ Service de Biochimie, Centre de Biologie et Pathologie, CHRU Lille, Lille, France

⁷ Service d'Urologie, Hôpital Huriez, CHRU Lille, Lille, France

^{*}, ^{**} contributed equally

Editorial correspondence should be addressed to:

Dr Aubert Sébastien, UMR 837 INSERM, JPARC, rue Michel Polonovski, 59045 Lille, France
sebastien.aubert@inserm.fr

Abstract

Renal proximal tubular epithelial cells play a central role in renal physiology and are among the cell types most sensitive to ischemia and xenobiotic nephrotoxicity. In order to investigate the molecular and cellular mechanisms underlying the pathophysiology of kidney injuries, a stable and well-characterized primary culture model of proximal tubular cells is required. An existing model of proximal tubular cells is hampered by the cellular heterogeneity of kidney; a method based on cell sorting for specific markers must therefore be developed. In this study, we present a primary culture model based on the mechanical and enzymatic dissociation of healthy tissue obtained from nephrectomy specimens. Renal epithelial cells were sorted using co-labeling for CD10 and CD13, two renal proximal tubular epithelial markers, by flow cytometry. Their purity, phenotypic stability and functional properties were evaluated over several passages. Our results demonstrate that CD10/CD13 double-positive cells constitute a pure, functional and stable proximal tubular epithelial cell population that displays proximal tubule markers and epithelial characteristics over the long term, whereas cells positive for either CD10 or CD13 alone appear to be heterogeneous. In conclusion, this study describes a method for establishing a robust renal proximal tubular epithelial cell model suitable for further experimentation.

Introduction

The kidney, a key organ of the urinary system, plays a pivotal role in many physiological processes such as the maintenance of homeostasis, the excretion of nitrogen catabolism waste and the secretion of endocrine factors. In renal

pathology and injury, all these processes are altered and accompanied by several symptoms: hypertension due to the alteration of the renin/angiotensin system and/or an imbalance of calcium and

phosphorus metabolism induced by the deficiency of calcitriol [1].

Studying these pathophysiological mechanisms requires the use of *in vitro* models such as renal cell cultures. This methodology is limited by the complexity of the nephron, which consists of the glomerulus and various tubular segments (the proximal and distal tubules and collecting duct) and by the cellular heterogeneity of these segments, which comprise 15 types of epithelial cells with different properties and functions [2]. Among the different cell types, proximal tubular epithelial cells (PT cells) play a major role in the reabsorption of substances such as glucose and amino acids and the control of acid-base balance by the excretion of almost all the bicarbonate and the synthesis of ammonia [3]. They are also involved in the excretion of metabolic end products [4]. Furthermore PT cells are particularly sensitive to ischemic injury, and represent a primary target for xenobiotics, such as nephrotoxins (and their metabolites), whose effects can extend up to the kidney failure [5,6].

To further elucidate the mechanisms of proximal tubular cell physiology and pathophysiology, as well as to study the potential mechanisms underlying nephrotoxins-induced renal toxicity, the primary culture of human proximal tubular cells represents a valuable tool [4,7,8].

Several techniques have been developed in order to establish such primary cultures: micro-dissection, enzymatic dissociation, the use of selective culture media, immunomagnetic cell sorting and isopycnic centrifugation [2,4,8-10]. However, only a few studies have verified the stability and differentiation status of these cells over time [2,11]. In fact, one study has shown the likely transdifferentiation, and the loss of specific markers, of primary renal tubule cells such as human distal tubular epithelial cells [12].

The main goal of this work was therefore to develop primary cultures of human renal proximal tubular epithelial cells and to ensure the stability and differentiation status of these cells over several passages.

Materials and methods

Ethics statement

This study was approved by the institutional scientific committee. All patients gave informed consent.

Cell isolation

The isolation of proximal tubular cells (PT cells) was performed as described by Helbert *et al.* (1997) [8] and Van der Biest *et al.* (1994) [13] with some modifications. Renal cortical tissue was collected from fresh nephrectomy specimens for renal or urinary tract cancer (n= 16). Mirror image samples of cortical tissue collected were analyzed by a pathologist to ensure the absence of cancer and significant parenchymal lesions. Cortical samples were decapsulated and dissected in order to obtain 1 mm³ fragments. The fragments were then digested in 6 mL of complete DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)/F12 1:1 medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) containing 10 ng/mL Epidermal Growth Factor (EGF, Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen), 1% L-glutamine (Invitrogen), 15 mM HEPES (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), 50 mM hydrocortisone (Sigma Aldrich), 5 µg/mL insulin (Invitrogen), 5 µg/mL transferrin (Sigma Aldrich) and 50 nM sodium selenite (Sigma Aldrich), with 2 mg/mL collagenase IV (enzymatic activity: 200 U/mL) (Invitrogen) and 20% dispase (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). This step was performed three times at 37°C for 30 minutes, and the suspension was filtered through filters with a mesh size of 70 µm after each digestion. The cell suspension was washed twice in PBS (Phosphate Buffered Saline) and centrifuged for 5 minutes at 300 g. Cells

were cultured in 75 cm² plastic flasks with complete culture medium at 37°C under 5% CO₂ in a humidified atmosphere. The culture medium was changed after 24 hours in order to eliminate non-adherent cells and residual cellular fragments.

PT cell separation

PT cells were sorted using FACS (Fluorescence Activating Cell Sorting). Antibodies to two proximal tubular epithelial markers, CD10 and CD13 antibodies (eBioscience, Paris, France) were used [2,8]. Confluent monolayers were washed twice with PBS and trypsinized for 5 minutes. One million cells were labeled with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD13 or with allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD10 or both in 100 µL of complete medium. Antibody concentrations used were those described by the supplier. The cell suspension was incubated for 30 minutes at 4°C with the antibodies and washed in PBS. Cells were resuspended into 2 mL complete medium without EGF and with 0.5 mM EDTA, sorted using an Epic Altra cell sorter (Beckman Coulter, Villepinte, France) and collected in complete culture medium. Positively labeled cells were identified by their fluorescence when compared with that of appropriate control samples labeled using nonspecific isotype antibodies.

Flow cytometry

CD10 and CD13 labeling of PT cells was performed on 0.5x10⁶ cells using the same conditions as for the FACS protocol, with a Cyan ADP analyzer (Beckman Coulter).

Western blotting

Cells were lysed using a 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate buffer containing protease inhibitors (Roche, Meylan, France) and were sonicated for 20 seconds.

Total proteins were separated by electrophoresis on a 4-12% BisTris NuPAGE gel (Invitrogen) and were

transferred onto nitrocellulose membrane using the iBlot system (Invitrogen). Western blotting was performed by incubating nitrocellulose membranes with specific primary antibodies overnight at 4°C. The following antibodies were used against: aquaporin-1 (clone B11; Santa Cruz, Heidelberg, Germany; 1:100), N-cadherin (clone 3B9; Invitrogen; 1:500), MUC1 (clone CT2; LabVison Corporation, Francheville, France; 1:500) and β-actin (clone 13E5; Cell Signaling Technology, Saint Quentin Yvelines, France; 1:1000). Membranes were incubated with secondary anti-rabbit, anti-Armenian hamster or anti-mouse antibodies coupled with horseradish peroxidase (Sigma Aldrich) for 45 minutes at room temperature. Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence using the Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Saclay, France) on a Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Immunofluorescence

Cells were plated on Lab-Tek Chamber Slides (Fisher Scientific, Illkirch, France). Sub-confluent monolayers were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes. Fixed cells were washed with Tris Buffered Saline, Triton-X 100 0.1% (TBST) and incubated for 30 minutes in TBST-Bovine Serum Albumin 1% at room temperature, before incubating with primary antibodies overnight at 4°C. The following antibodies were used against: pan-cytokeratin (clone PCK-26; AbCam, Paris, France; 1:200), β-catenin (clone 14 β-catenin; Beckton Dickinson; 1:100), aquaporin-1 (1:200), MUC1 (1:200), E-cadherin (clone 36 E-cadherin; Beckton Dickinson; 1:100) and vimentin (clone LN6; Millipore, Molsheim, France; 1:100). Cells were incubated with secondary anti-mouse or anti-Armenian hamster antibodies coupled with Texas Red (Jackson Immunoresearch, Marseille, France) for 45 minutes at room temperature. Actin was labeled by incubation for 40 minutes with a phalloidin-FITC solution (Sigma Aldrich). Slides were mounted in Vectashield® HardSet™

Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Les Ulis, France). Autofluorescence and non-specific fluorescence were measured on fixed control cells processed without antibodies and with the secondary antibody alone, respectively. Slides were examined under a fluorescence microscope (DM4000B, Leica, Germany).

Transmission electronic microscopy (TEM)

Cells were grown in Boyden® chambers (Becton Dickinson) coated with Matrigel® (Becton Dickinson) or collagen IV (1 µg/cm²) (Becton Dickinson) or without matrix. Ten days after confluency, cells were fixed in paraformaldehyde 0.5% - glutaraldehyde 2%. A post-fixation step with OsO₄ was performed. Membranes were dehydrated through an ethanol gradient and included overnight in Epon resin using the Epoxy Embedding Medium Kit (Sigma Aldrich). Ultra-thin sections were cut and stained with uranyl acetate and lead citrate to increase contrast. Sections were examined on an electronic microscope, Zeiss EM902 (Carl Zeiss S.A.S, Le Pecq, France).

Measurements of trans-epithelial electrical resistance (TEER)

Cells were seeded onto Boyden® chambers (Becton Dickinson) coated with Matrigel® (Becton Dickinson) or collagen IV (1 µg/cm²) (Becton Dickinson) or without matrix, at a density of 50 000 cells per well. At confluency, the TEER was measured for five days using a volt-ohmmeter Evom2™ (World Precisions Instruments, Stevenage, United Kingdom) as following the manufacturer's instructions. Measurements were performed every 24 hours. The Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cell line (ECACC, Salisbury, United Kingdom) was used as a positive control [14]. TEER readings from empty uncoated or coated (Matrigel® or collagen IV) Boyden® chambers were subtracted from TEER readings obtained from similar chambers

seeded with cells. TEER readings are expressed in Ω.cm².

Alkaline phosphatase assay

The expression of the proximal tubule brush border enzyme, alkaline phosphatase, was assessed spectrophotometrically using p-nitrophenylphosphatase as a substrate in agreement with the guidelines of the International Federation of Clinical Chemistry in the Cobas® 8000-2 robot (Roche). Enzyme activity was standardized to protein concentrations.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNAs were extracted from CD10/CD13 double-positive cells using MiRNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) in accordance with the protocol described by the manufacturer, and concentrations were determined using the BioSpec-nano spectrophotometer (Shimadzu, Champs sur Marne, France). RT was performed using the High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with manufacturer's instructions. Each amplification reaction was carried out in a total volume of 25 µL 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.4 containing 50 mM KCl, 0.2 mM of each dNTP, 2 µM MgCl₂, 0.4 µM of each primer (Table S1), 200 ng DNA and 0.6 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). After an initial denaturation step at 94°C for 3 minutes, 35 cycles of 1 minute at 94°C, 1 minute of hybridization at 60°C and 1 minute of extension at 72°C were carried out. A final extension period of 7 minutes was performed at 72°C. RT-PCR products were loaded onto 1% agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized under an UV-transilluminator.

Statistical analysis

Data are presented as means ± SD. Continuous data were analyzed using a Student's *t*-test and a *p*-value <0.05 was considered to indicate a significant difference.

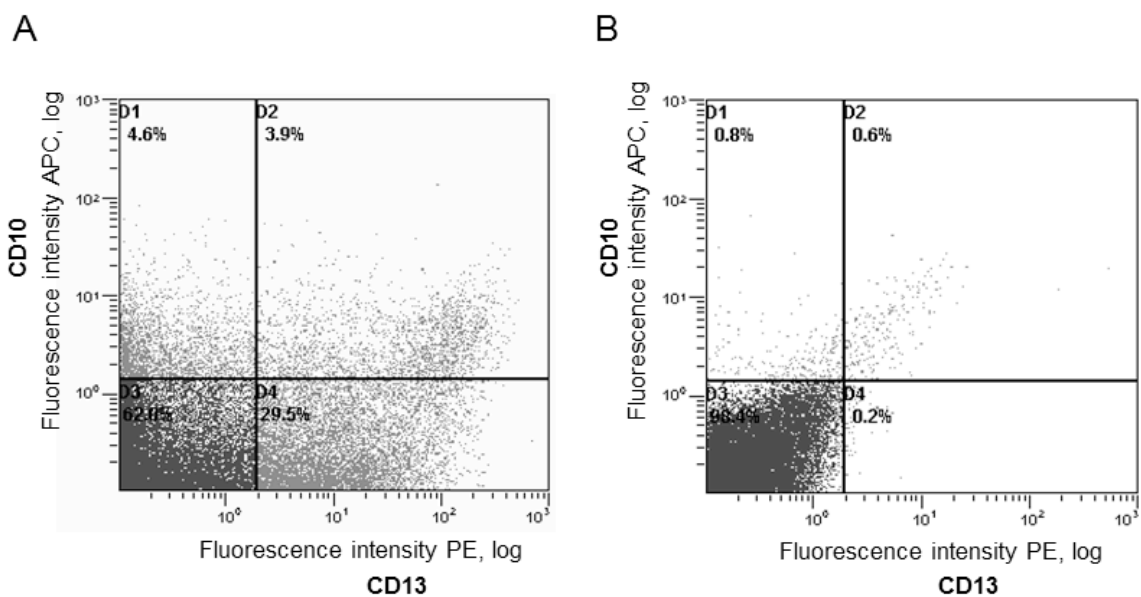


Figure 1. Sorting proximal tubular cells using specific antibodies. (A) Fluorescence plot showing cells labeled with antibodies against CD10 (APC: allophycocyanin) and CD13 (PE: phycoerythrin). FACS analysis revealed about 4% double-positive cells. (B) Fluorescence plot showing cells treated with isotypes to both antibodies to determine the upper threshold for non-specific fluorescence.

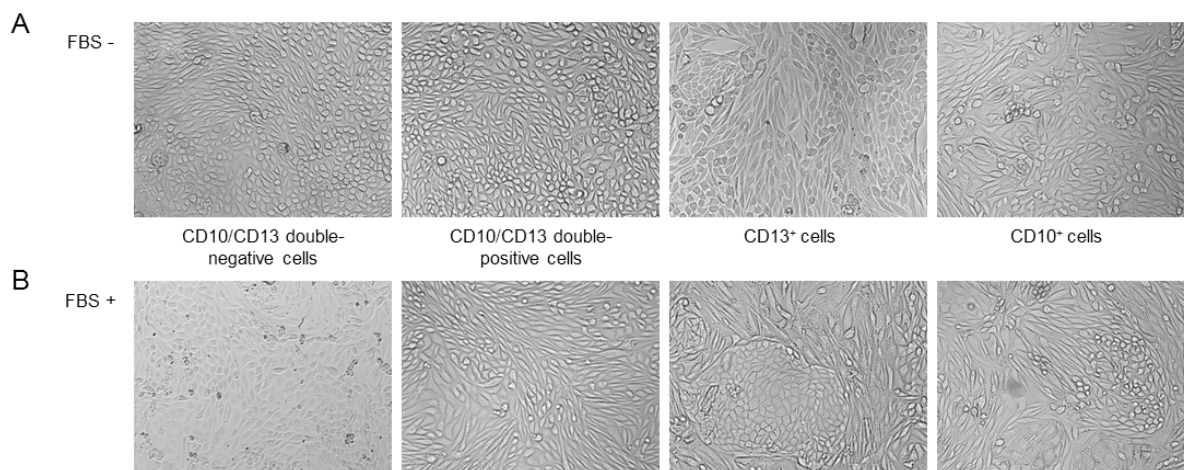


Figure 2. Representative morphology of primary CD10/CD13 double-negative cells, CD10/CD13 cells double-positive, CD13⁺ and CD10⁺ cells. (A) Primary cultures at passage 2 in serum-free medium. (B) Primary cultures at passage 2 in medium with 10% FBS. Magnification: x100.

Results

Isolation of PT cells

Primary cultures were successfully established from sixteen fresh nephrectomy specimens.

After 48 hours in culture, cultured renal cells exhibited the cobblestone-like appearance characteristic of epithelial cells (data not shown). Cells were isolated by FACS using antibodies to CD10 (neutral endopeptidase) and CD13 (aminopeptidase M), two markers previously described in PT cells [2,8]. After cells sorting, the average percentage of CD10⁺, CD13⁺ and CD10/CD13 double positive cells, was about 8%, 33% and 4%, respectively (Figure 1A). The specificity of these antibodies was shown by isotype labeling (Figure 1B).

When seeded onto plastic, cells formed monolayers and within two days, grew into small colonies. A few days after reaching confluency, the formation of domes characteristic of functional epithelial cells in culture was observed; these were more frequently noted in FBS-free EGF-supplemented medium [2] (Figure 2A).

The CD10⁺ and CD13⁺ cell populations appeared heterogeneous, with some cells exhibiting an epithelial morphology while others presented a more elongated appearance (Figure 2A).

In addition, different medium formulations were tested: hormonally defined serum-free medium (Figure 2A) with EGF (10 ng/mL) and hormonally defined medium with 10% FBS without EGF (Figure 2B). In serum-free medium, cells exhibited an epithelial morphology whereas in medium with FBS, cells exhibited an elongated fibroblast-like morphology (Figure 2B).

Phenotypic characterization

The initial characterization of sorted cells focused on detection of specific markers by western blotting. CD10/CD13 double-positive cells expressed the specific proximal tubule markers aquaporin-1 and

N-cadherin, but did not express MUC1 (also known as epithelial membrane antigen), a specific distal tubule and collecting duct marker. By contrast, CD10/CD13 double-negative cells expressed MUC1 but not aquaporin-1 or N-cadherin (Figure 3). Similarly, immunofluorescence labeling revealed that CD10/CD13 double-positive cells were positive for aquaporin-1 but negative for MUC1 and E-cadherin, another distal tubule marker, contrarily to CD10/CD13 double-negative cells (Figure 4). Western blotting and immunofluorescence labeling of CD10⁺ or CD13⁺ cells alone revealed mixed populations that expressed both proximal and distal markers (Figures 3 and 5). Both cell populations also expressed epithelial markers (pan-cytokeratin and β -catenin at the cell membrane) (Figures 4 and 5). Also they were both positive for the mesenchymal marker vimentin when cultured in FBS-supplemented medium (data not shown) but negative for vimentin in FBS-free EGF-supplemented medium. Only a few cells of the CD13⁺-population displayed vimentin in both either culture medium (Figure 5A).

In summary, CD10/CD13 double-positive cells appeared to display the phenotypic characteristics of PT cells while CD10/CD13 double-negative cells presented the phenotypic characteristics of distal tubule and collecting duct cells.

Morphological and functional characteristics

Since sorted cells presented a more epithelial phenotype in FBS-free EGF-supplemented medium than in FBS-supplemented medium, further characterization was carried out in serum-free medium. CD10/CD13 double-positive cells (PT cells) and CD10/CD13 double-negative cells were seeded onto Matrigel®, collagen IV or uncoated plastic membranes to evaluate the impact of the support on cell morphology and functional characteristics. Morphological and functional characteristics of single-labeled CD10⁺- and CD13⁺- cells were not

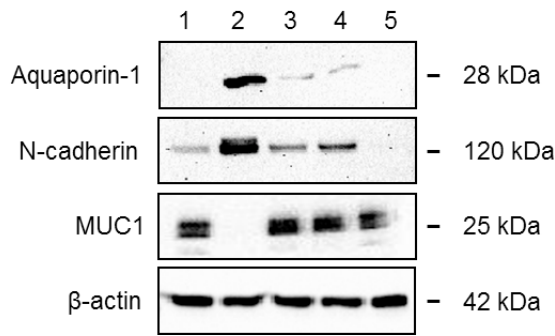


Figure 3. Expression of differentiation markers in different cell populations. Representative western blots for (1) unsorted cells, (2) CD10/CD13 double-positive cells, (3) CD10⁺ cells, (4) CD13⁺ cells and (5) CD10/CD13 double-negative cells. Blots were incubated with antibodies against aquaporin-1, N-cadherin, MUC1. The β -actin protein was used as an internal control. Proteins were extracted from cells at passage 2.

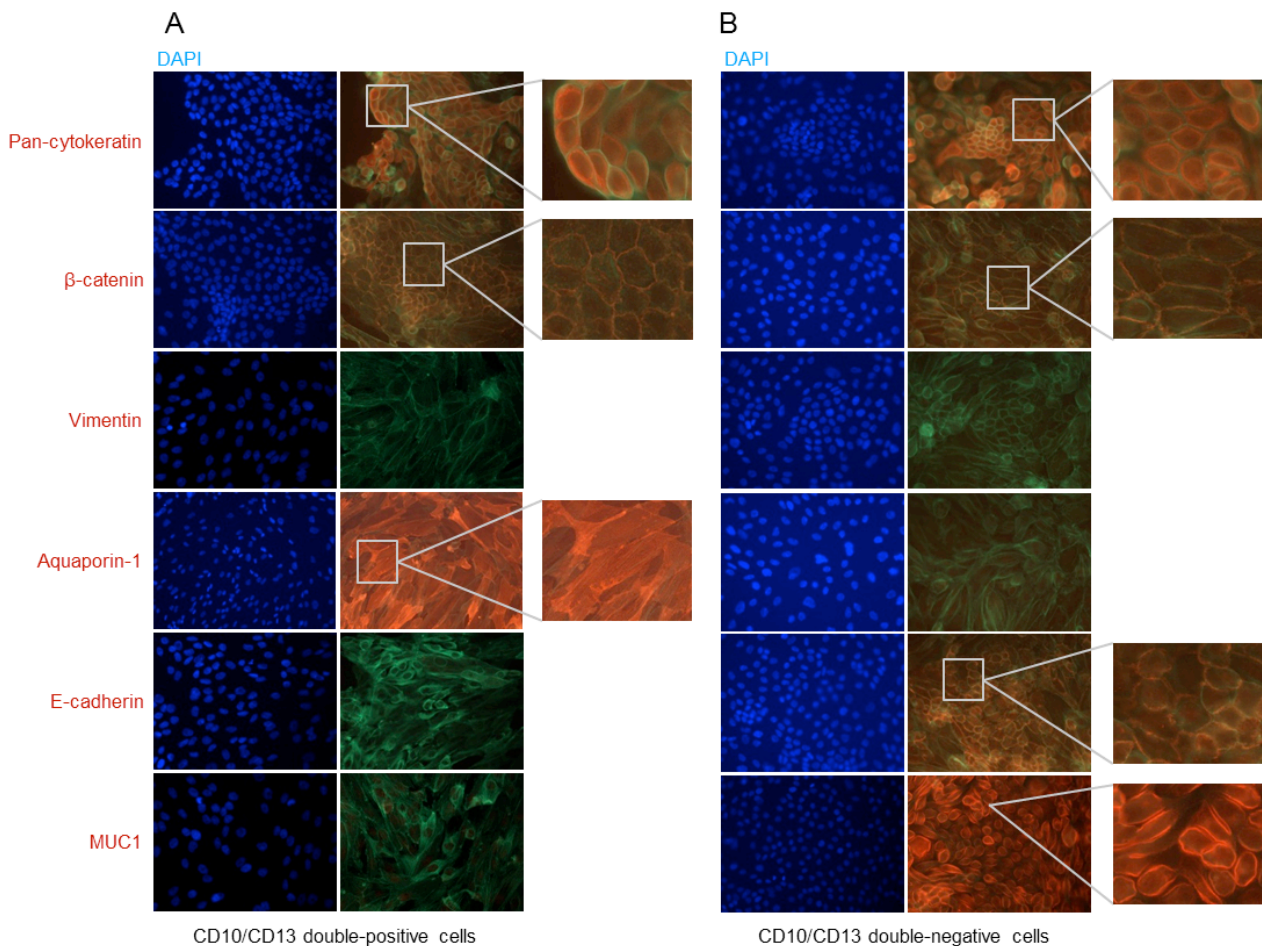


Figure 4. Immunofluorescence detection of specific markers in (A) CD10/CD13 double-positive cells and (B) CD10/CD13 double-negative cells. Actin was labeled by incubation with a phalloidin-FITC solution. Cells were labeled with antibodies to pan-cytokeratin, β -catenin, vimentin, aquaporin-1, E-cadherin and MUC1 (all Texas Red-conjugated). DAPI was used to counterstain nuclei. Magnification: x200. The grey squares in the left panel images indicate the region of high magnification shown in the right panel. Experiments were performed with cells at different passages.

evaluated since they expressed both proximal and distal markers.

Ultrastructural analysis by TEM revealed that both PT cells and double-negative cells exhibited a polarized morphology with the occurrence of some tight junctions (more numerous in CD10/CD13 double-negative cells) as well as desmosomes, which are characteristics of polarized cells (Figure 6) [15]. Moreover, PT cells displayed long microvilli at the apical pole, indicative of a brush border [15]. By contrast, CD10/CD13 double-negative cells exhibited short microvilli. The type of support did not seem to influence cell morphology. In an attempt to evaluate epithelial barrier functionality, we measured the TEER across the PT cell- and CD10/CD13 double-negative cell-monolayers over 5 days post-confluency (Figure 7A). TEER values increased in a time-dependent manner as in MDCK control cells (Figure 7B) and were higher in CD10/CD13 double-negative cells than in PT cells. PT cells and CD10/CD13 double-negative cells grown on uncoated or collagen IV-coated transwell filters exhibited similar TEER values. However, TEER values were about two times lower for cells grown on Matrigel®-coated transwell filter ($p < 0.001$ for PT cells and $p < 0.05$ for CD10/CD13 double-negative cells) (Figure 7A). These results indicate that both plastic alone and collagen IV allow PT cells and CD10/CD13 double-negative cells to form a highly functional epithelium. Alkaline phosphatase activity, a proximal tubule brush border enzyme, was significantly higher in PT cells than in CD10/CD13 double-negative cells ($p < 0.05$) (Figure 7C). In addition, RT-PCR showed that SLGT2, CA IV and SLGT1 mRNAs, specific of the S1, S2 and S3 segments respectively, were expressed in isolated PT cells (Figure 7D).

Phenotypic stability over time

To determine the phenotypic stability of cell over time, we evaluated the expression of CD10 and CD13 over several passages. On flow cytometric analysis, PT cells positive for both CD10

and CD13 consistently exceeded 80% at passages 2, 3, 4 and 5 indicating that these cells are phenotypically stable at least over five passages (Figure 8 A-B). In addition, over five passages, aquaporin-1 and N-cadherin expression was persistent, and MUC1 was not expressed (Figure 8C). By contrast, only about 15% of CD10/CD13 cells that were initially double negative remained negative for both markers from the second cell passage onward (Figure 8D). This *de novo* expression of proximal tubule markers suggests the dedifferentiation of primary distal tubular epithelial cells in culture (Figure 8D).

Discussion

Cell models such as renal cell lines and primary cultures are currently used for studies of renal physiology and nephrotoxicity. Because of their immortalized status, renal epithelial cell lines such as HK-2 and HKC (two human proximal tubular cell lines) tend to dedifferentiate, lose their specific functions and to acquire non-tubule-specific characteristics [16,17]. By contrast, primary cultured cells retain their phenotypic characteristics and specific functions such as hormonal responses, brush-border enzymatic activity and apical and basolateral transport systems, and are more representative of the *in vivo* human nephron at the physiological level [7,8,13,18].

Since PT cells are common targets for xenobiotics due to their high transport activity, the primary culture of PT cells is an essential tool for studying nephrotoxicity [4,19,20]. The use of primary cell cultures allows these nephrotoxic mechanisms to be studied without the modification of metabolic processes that sometimes occurs in the existing immortalized cell lines. Indeed, previous studies have shown that primary cultures of rat, porcine and human PT cells exhibit a large spectrum of proteins involved in xenobiotic cellular processing. These cells express numerous biotransformation enzymes and drug

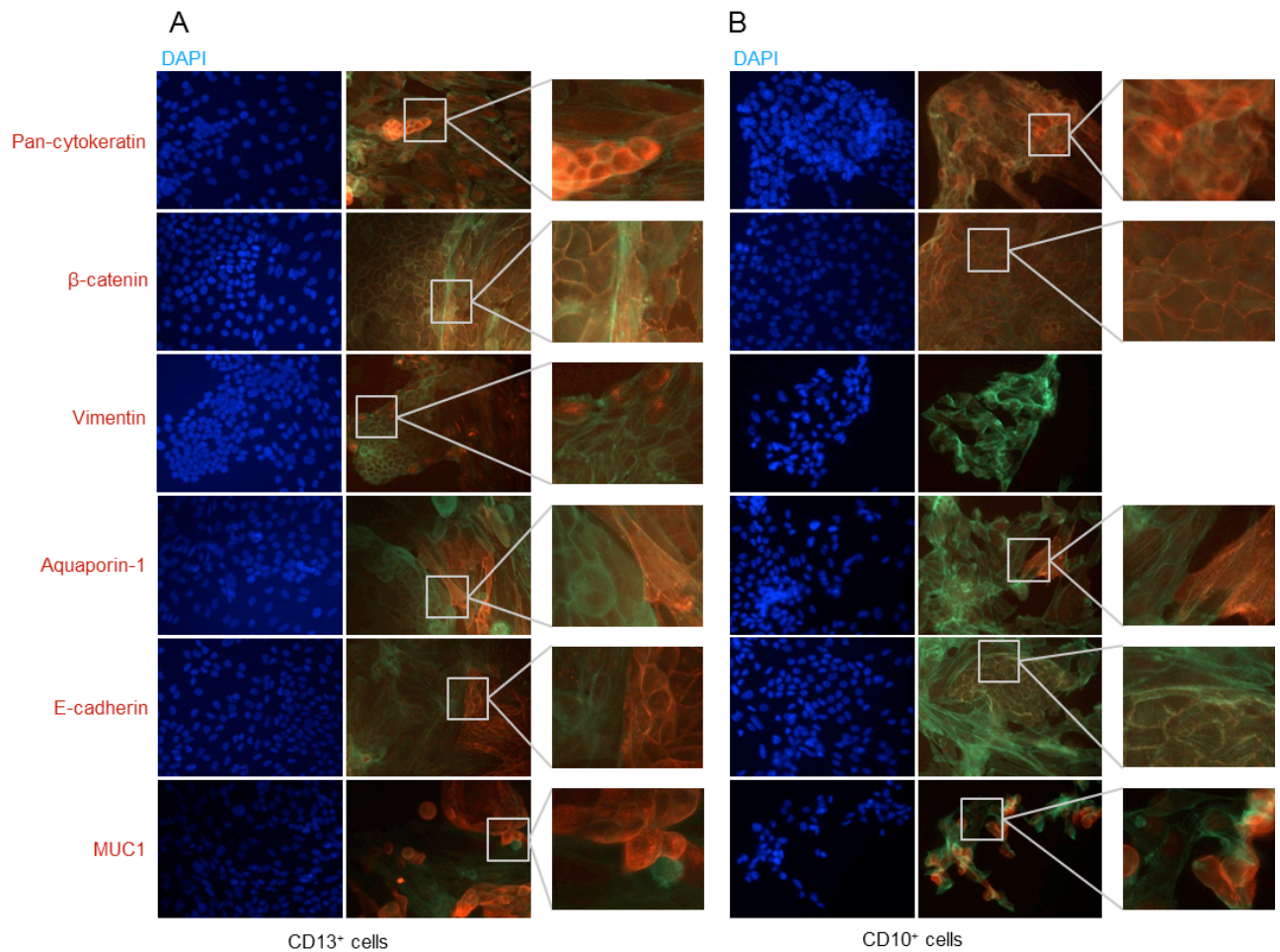


Figure 5. Immunofluorescence detection of specific markers in (A) CD13⁺ cells and (B) CD10⁺ cells. Actin was labeled by incubation with a phalloidin-FITC solution. Cells were labeled with antibodies to pan-cytokeratin, β -catenin, vimentin, aquaporin-1, E-cadherin and MUC1 (all Texas Red-conjugated). DAPI was used to counterstain nuclei. Magnification: x200. The grey squares in the left panel images indicate the region of high magnification shown in the right panel. Experiments were performed with cells at different passages.

transporters such as cytochromes P450, glutathione (GSH)-dependent enzymes, the ABC multidrug transporters and organic anion and cation transporters [4,19-22]. In addition, primary cultures of human PT cells from multiple donors allow the *in vitro* study inter-individual variations in cellular metabolic capacity. Primary human PT cell cultures are commercially available and have been used in several toxicological studies [5,23,24]. However, in spite of the interest of these models, they present several disadvantages, such as a unique donor for each lot. Moreover, when tested by flow cytometry, commercial PT cells displayed lower expression levels of both CD10 and CD13 in our hands (supplemental data S1), suggesting a heterogeneous renal epithelial population. In fact, the study of responses that are consistent across individuals could be hampered by the use of these commercial models.

Although several studies have previously described protocols for establishing PT cell primary cultures, these are hampered by frequent heterocellular contamination, cellular differentiation/dedifferentiation and poor viability [10]. The aim of our work was to establish and characterize a model of primary PT cells that would ensure their phenotypic purity and the stability, as well as verify its limitations. In our study, we used a FACS protocol for the isolation of a highly differentiated population of PT cells. Since previous studies have shown that surface markers can be used for flow cytometric selection [18], we used two specific proximal tubular epithelial cell surface markers CD10 and CD13 [2,8]. We demonstrate that populations that express either CD10 and CD13 alone are in fact mixed populations expressing both proximal and distal tubule markers, although several studies have based their models of primary human PT cell cultures on cell sorting for CD13 alone [2,25]. By contrast, CD10/CD13 double-positive cells express only proximal markers (aquaporin-1 and N-cadherin) while double-negative cells express only distal and collecting duct markers (MUC1 and E-cadherin). Moreover, we confirm the previous

demonstration by Sens *et al* (1999) [26] that renal cells exhibit an epithelial phenotype when cultured in FBS-free medium supplemented with EGF. Our results thus support the view that only CD10/CD13 double-positive sorted cells cultured in serum-free medium with EGF represent a pure population of proximal tubular epithelial cells.

About 4% of our sorted cells were double-positive for CD10 and CD13, and corresponded to PT cells. Even though this yield is rather low, the FACS method possesses the great advantage of being highly specific and allowing a highly purified cell population to be obtained [13,18]. Furthermore, in comparison with immunomagnetic separation, FACS allows double-labeled cells to be sorted directly.

To ensure that the sorted PT and double-negative cells were fully epithelial and functional, further characterization was carried out. As shown by TEM, whatever the matrix used (plastic, collagen IV or Matrigel®), PT cells and CD10/CD13 double-negative cells displayed a characteristic epithelial morphology with long and short microvilli respectively, as well as tight junctions and desmosomes. Tight junctions play a critical role not only in epithelial barrier function, but also in ion, protein and small molecule transport. Furthermore, tight junctions and desmosomes participate in the baso-apical polarity of cells [27]. The TEER also provides an assessment of the presence of tight junctions, and thus of monolayer integrity; as well as polarity [27]. Indeed, CD10/CD13 double-negative cells exhibit more tight junctions and a higher TEER than PT cells, as previously reported [28]. Since, to our knowledge, no study has as yet investigated the impact of the matrix on the TEER of renal cells. Matrigel® was used to mimic the basal lamina. Surprisingly, PT cells on Matrigel® did not display sufficient resistance, as though they were unable to form a completely tight layer on this matrix. This is quite similar to the findings of Delabarre *et al* (1997) using mammary cells [29]. To further characterize PT cells functionality,

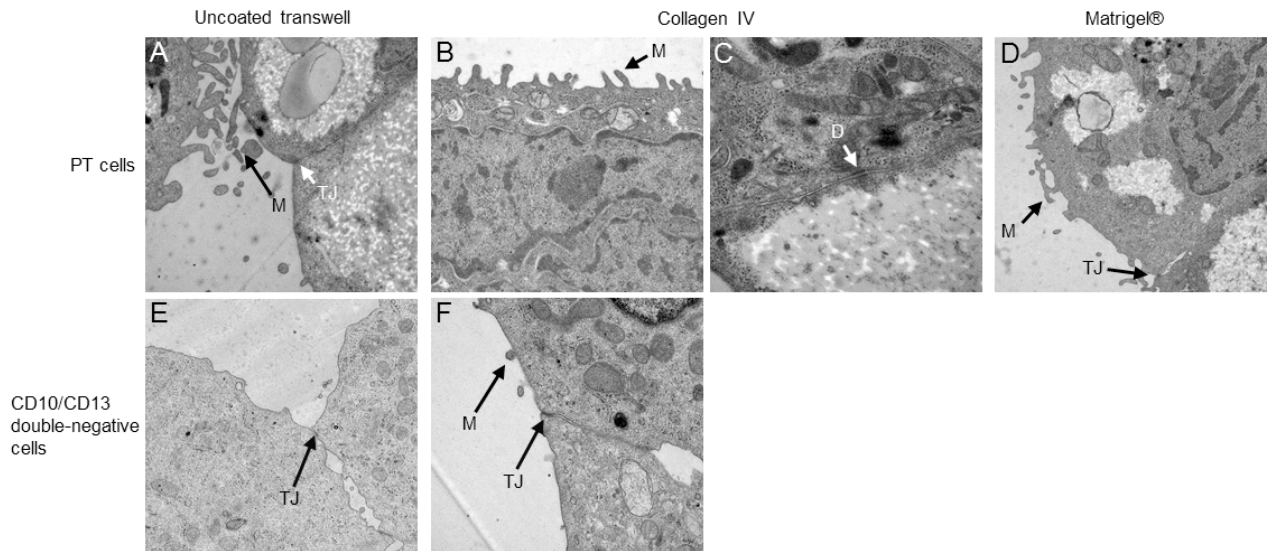


Figure 6. Ultrastructural morphology of cells. PT cells at passage 4 were seeded onto (A) uncoated transwell filters (x20 000), (B, C) collagen IV-coated filters (x20 000, x140 000) and (D) Matrigel®-coated filters (x12 000). CD10/CD13 double-negative cells at passage 4 were seeded onto (E) uncoated transwell filters (x12 000) and (F) collagen IV-coated filters (x20 000). PT cells displayed a polarized morphology and exhibited tight junctions (TJ), long microvilli (M) and desmosomes (D). CD10/CD13 double-negative cells displayed a polarized morphology and exhibited tight junctions and short microvilli.

phosphatase alkaline activity (a proximal tubule brush border enzyme [11,12]) was measured and was significantly higher in PT cells than in CD10/CD13 double-negative cells. These results, consistent with previous reports [2,4,28,30-32], support the view that monolayer of cells was functional. Structurally, the proximal tubule consists of three segments: S1 (the early convoluted tubule), S2 (the end of the convoluted tubule) and S3 (the straight proximal tubule) [33-35]. By evaluating expression of SLGT2, CA IV and SLGT1 at mRNA levels, specific markers of the S1, S2 and S3 segments respectively [25,32,36], our results indicated that CD10/CD13 double-positive cells express markers of all segments of the proximal tubule. To validate our model of PT cells, we ensured its phenotypic stability over time by flow cytometric assay and western blotting on five passages since at passage 6, PT cells lost their proliferation capacity. Indeed, the PT cell phenotype was preserved at least until the fifth cell passage, and their dedifferentiation rate was quite low when compared to CD10/CD13 double-negative cells, which displayed the *de novo* expression of CD10 and CD13. This phenomenon has been previously described [12], and highlights the difficulty of carrying out pathophysiological studies on primary renal distal tubular epithelial cells.

In conclusion, we have established a model of primary human PT cells using a FACS protocol based on CD10/CD13 double labeling. These highly purified primary cultured cells retained their specific characteristics in EGF-supplemented medium on plastic over several cell passages. Our model could be a useful tool for studies focusing on the pathophysiology of human renal proximal tubule.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Brigitte Hémon for her excellent technical assistance. The authors also thank Nathalie Jouy (IFR114-IMPRT) for her expertise with the flow cytometry studies,

Anne Loyens and Cécile Allet (IFR114-IMPRT) for their expertise with the ultrastructural studies. This study was supported by the ANR-09-JCJC-0002 grant (MP) and the Conseil Régional du Nord Pas de Calais (CC).

References

1. Agarwal R (2009) Vitamin D, proteinuria, diabetic nephropathy, and progression of CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 4: 1523-1528.
2. Baer PC, Nockher WA, Haase W, Scherberich JE (1997) Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation. Technical note. *Kidney Int* 52: 1321-1331.
3. Weiland C, Ahr HJ, Vohr HW, Ellinger-Ziegelbauer H (2007) Characterization of primary rat proximal tubular cells by gene expression analysis. *Toxicol In Vitro* 21: 466-491.
4. Brown CD, Sayer R, Windass AS, Haslam IS, De Broe ME, et al. (2008) Characterisation of human tubular cell monolayers as a model of proximal tubular xenobiotic handling. *Toxicol Appl Pharmacol* 233: 428-438.
5. Li W, Choy DF, Lam MS, Morgan T, Sullivan ME, et al. (2003) Use of cultured cells of kidney origin to assess specific cytotoxic effects of nephrotoxins. *Toxicol In Vitro* 17: 107-113.
6. Molitoris BA, Wagner MC (1996) Surface membrane polarity of proximal tubular cells: alterations as a basis for malfunction. *Kidney Int* 49: 1592-1597.
7. Elberg G, Guruswamy S, Logan CJ, Chen L, Turman MA (2008) Plasticity of epithelial cells derived from human normal and ADPKD kidneys in primary cultures. *Cell Tissue Res* 331: 495-508.
8. Helbert MJ, Dauwe SE, Van der Biest I, Nouwen EJ, De Broe ME (1997) Immunodissection of the human proximal nephron: flow sorting of S1S2S3, S1S2 and S3 proximal tubular cells. *Kidney Int* 52: 414-428.
9. Valente MJ, Henrique R, Costa VL, Jerónimo C, Carvalho F, et al. (2011)

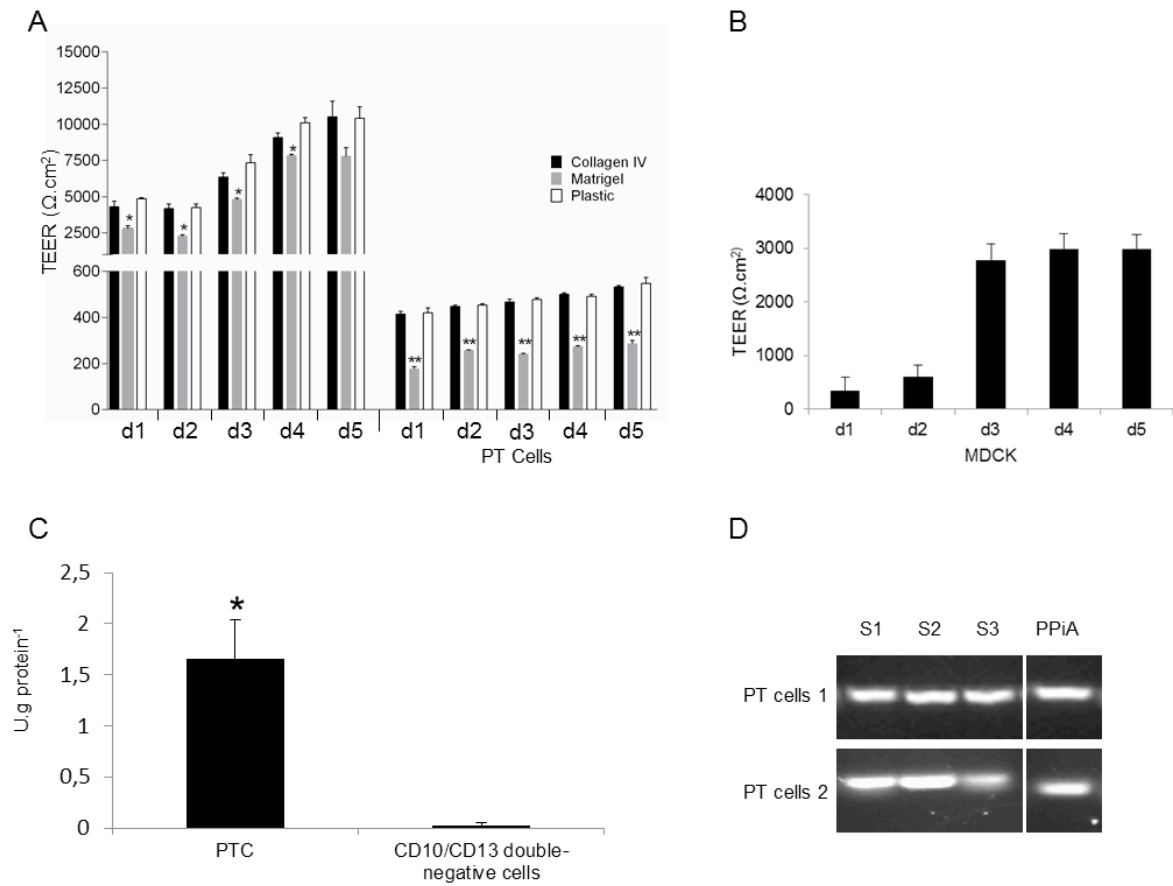


Figure 7. Functional characteristics of CD10/CD13 double-negative cells and PT cells. (A) Transepithelial electrical resistance (TEER) measurements were performed in CD10/CD13 double-negative cells and PT cells. Cells at passage 3 were seeded onto uncoated (plastic) transwell filters (white bar), collagen IV-coated filters (black bar) or Matrigel®-coated filters (grey bar). (B) The MDCK cell line was used as positive control, and cells were seeded onto uncoated transwell filters. The TEER was recorded at the points indicated (d: day). Means \pm SD of three experiments are reported. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.001$ compared with similar results for cells seeded on plastic. (C) Alkaline phosphatase activity measured in PT cells at passage 5 and in CD10/CD13 double-negative cells at passage 5. Means \pm SD of four experiments are reported. *: $p < 0.05$ compared with CD10/CD13 double-negative. (D) Amplification of SGLT2 (S1 segment marker), CA IV (S2 segment marker) and SGLT1 (S3 segment marker) fragments in 2 representative PT cells at passage 3. Cyclophilin A (PPIA) was used as a house-keeping gene.

- A rapid and simple procedure for the establishment of human normal and cancer renal primary cell cultures from surgical specimens. *PLoS One* 6: e19337.
10. Qi W, Johnson DW, Vesey DA, Pollock CA, Chen X (2007) Isolation, propagation and characterization of primary tubule cell culture from human kidney. *Nephrology (Carlton)* 12: 155-159.
 11. Terryn S, Jouret F, Vandenabeele F, Smolders I, Moreels M, et al. (2007) A primary culture of mouse proximal tubular cells, established on collagen-coated membranes. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F476-485.
 12. Baer PC, Tunn UW, Nunez G, Scherberich JE, Geiger H (1999) Transdifferentiation of distal but not proximal tubular epithelial cells from human kidney in culture. *Exp Nephrol* 7: 306-313.
 13. Van der Biest I, Nouwen EJ, Van Dromme SA, De Broe ME (1994) Characterization of pure proximal and heterogeneous distal human tubular cells in culture. *Kidney Int* 45: 85-94.
 14. Maria OM, Maria O, Liu Y, Komarova SV, Tran SD (2011) Matrigel improves functional properties of human submandibular salivary gland cell line. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 622-631.
 15. Courjault-Gautier F, Chevalier J, Abbou CC, Chopin DK, Toutain HJ (1995) Consecutive use of hormonally defined serum-free media to establish highly differentiated human renal proximal tubule cells in primary culture. *J Am Soc Nephrol* 5: 1949-1963.
 16. Bens M, Vandewalle A (2008) Cell models for studying renal physiology. *Pflugers Arch* 457: 1-15.
 17. Baer PC, Bereiter-Hahn J, Schubert R, Geiger H (2006) Differentiation status of human renal proximal and distal tubular epithelial cells in vitro: Differential expression of characteristic markers. *Cells Tissues Organs* 184: 16-22.
 18. Helbert MJ, Dauwe SE, De Broe ME (2001) Flow cytometric immunodissection of the human distal tubule and cortical collecting duct system. *Kidney Int* 59: 554-564.
 19. Schaaf GJ, de Groene EM, Maas RF, Commandeur JN, Fink-Gremmels J (2001) Characterization of biotransformation enzyme activities in primary rat proximal tubular cells. *Chem Biol Interact* 134: 167-190.
 20. Schlatter P, Gutmann H, Drewe J (2006) Primary porcine proximal tubular cells as a model for transepithelial drug transport in human kidney. *Eur J Pharm Sci* 28: 141-154.
 21. Lash LH, Tokarz JJ, Pegouske DM (1995) Susceptibility of primary cultures of proximal tubular and distal tubular cells from rat kidney to chemically induced toxicity. *Toxicology* 103: 85-103.
 22. Cummings BS, Lasker JM, Lash LH (2000) Expression of glutathione-dependent enzymes and cytochrome P450s in freshly isolated and primary cultures of proximal tubular cells from human kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 677-685.
 23. Li W, Lam M, Choy D, Birkeland A, Sullivan ME, et al. (2006) Human primary renal cells as a model for toxicity assessment of chemotherapeutic drugs. *Toxicol In Vitro* 20: 669-676.
 24. Königs M, Mulac D, Schwerdt G, Gekle M, Humpf H-U (2009) Metabolism and cytotoxic effects of T-2 toxin and its metabolites on human cells in primary culture. *Toxicology* 258: 106-115.
 25. Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, et al. (2005) Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 54: 3427-3434.
 26. Sens DA, Detrisac CJ, Sens MA, Rossi MR, Wenger SL, et al. (1999) Tissue culture of human renal epithelial cells using a defined serum-free growth formulation. *Exp Nephrol* 7: 344-352.
 27. Gonzalez-Mariscal L, Namorado MC, Martin D, Luna J, Alarcon L, et al. (2000) Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated

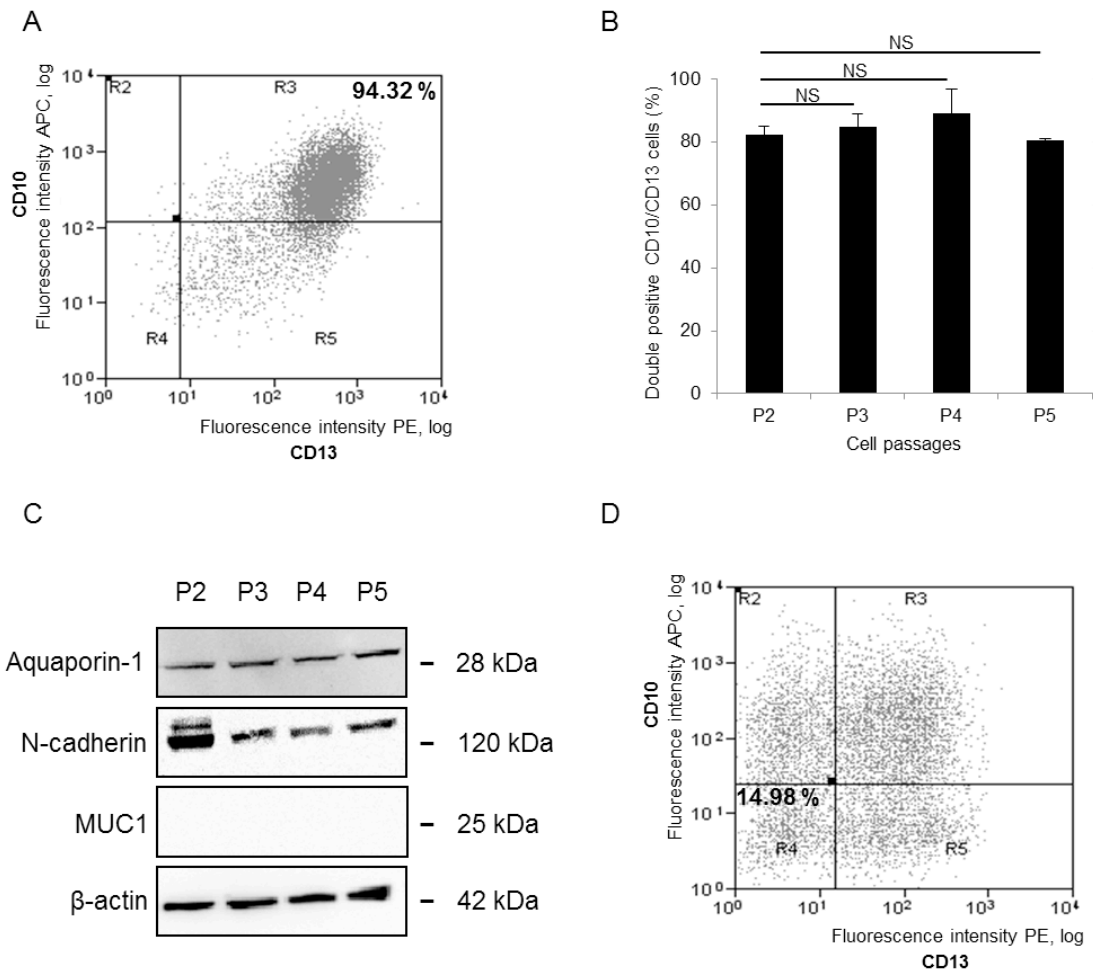
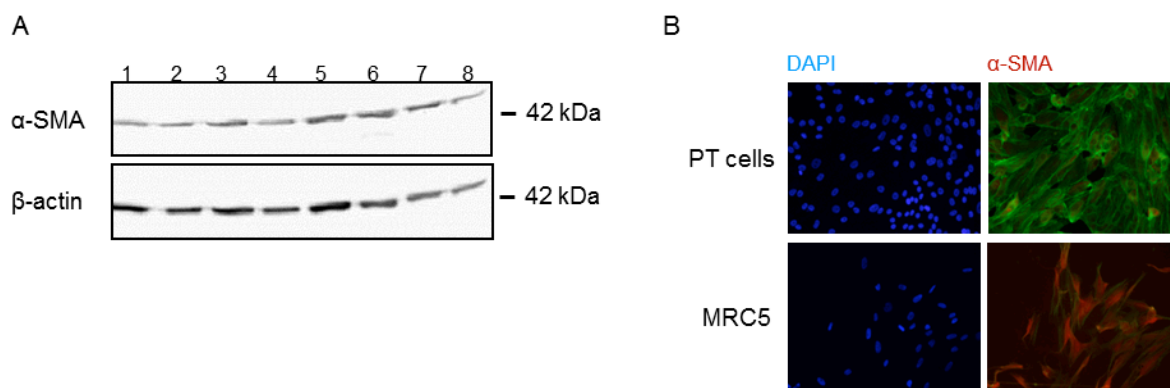


Figure 8. Evaluation of PT cells and CD10/CD13 double-negative cells phenotypic stability. (A) Fluorescence plot showing PT cells labeled with antibodies against CD10 (APC: allophycocyanin) and CD13 (PE: phycoerythrin) after four passages. Flow cytometry revealed about 94% double-positive cells. (B) Relative percentage of CD10/CD13 double-positive cells at passages 2, 3, 4 and 5 in the PT cells populations (n=4). NS: non-significant ($p > 0.05$). (C) Representative western blots for PT cells over 5 passages. Blots were incubated with antibodies against aquaporin-1, N-cadherin, MUC1. The β -actin protein was used as an internal control (D) Fluorescence plot showing the CD10/CD13 double-negative cell population labeled with antibodies against CD10 and CD13 after two passages. Flow cytometry revealed about 15% double-negative cells.

28. renal tubules. *Kidney Int* 57: 2386-2402.
29. Denker BM, Sabath E (2011) The biology of epithelial cell tight junctions in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 22: 622–625.
30. Delabarre S, Claudon C, Laurent F (1997) Influence of several extracellular matrix components in primary cultures of bovine mammary epithelial cells. *Tissue Cell* 29: 99-106.
31. Xia Y, Babitt JL, Bouley R, Zhang Y, Da Silva N, et al. (2010) Dragon enhances BMP signaling and increases transepithelial resistance in kidney epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 21: 666-677.
32. Prozialeck WC, Edwards JR, Lamar PC, Smith CS (2006) Epithelial barrier characteristics and expression of cell adhesion molecules in proximal tubule-derived cell lines commonly used for in vitro toxicity studies. *Toxicol In Vitro* 20: 942-953.
33. Kamiyama M, Garner MK, Farragut KM, Kobori H (2012) The establishment of a primary culture system of proximal tubule segments using specific markers from normal mouse kidneys. *Int J Mol Sci* 13: 5098-5111.
34. DeFronzo RA, Davidson JA, Del Prato S (2012) The role of the kidneys in glucose homeostasis: a new path towards normalizing glycaemia. *Diabetes Obes Metab* 14: 5-14.
35. Kamiyama M, Farragut KM, Garner MK, Navar LG, Kobori H (2012) Divergent localization of angiotensinogen mRNA and protein in proximal tubule segments of normal rat kidney. *J Hypertens* 30: 2365-2372.
36. Brown D, Zhu XL, Sly WS (1990) Localization of membrane-associated carbonic anhydrase type IV in kidney epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7457-7461.
37. Bakris GL, Fonseca VA, Sharma K, Wright EM (2009) Renal sodium-glucose transport: role in diabetes mellitus and potential clinical implications. *Kidney Int* 75: 12

Supplemental Data



S 1. Phenotypic analysis of commercial PT cells. Fluorescence plot showing PT cells labeled with antibodies against CD10 (APC: allophycocyanin) and CD13 (PE: phycoerythrin) after three passages. Flow cytometry revealed about 42% double-positive cells.

Table S1. Summary of forward and reverse primers used to generate PCR products.

Target	Primer (forward 5'-3')	Primer (reverse 5'-3')
PPiA	ATGCTGGCCCCAACACAA	CCCTCTTTCACCTTGCCAAA
SGLT1	CCTCTTCGCCATTTCTTTCATC	ATGCACATCCGGAATGGGT
SGLT2	TTCAGTCTCCGGCATAGCAA	CATCTCCATGGCACTCTCTGG
CA IV	CTTCATCCTCGTCGGCTATG	ATGGCAAAGTGTCTCC

Article 2.

Expression profiles of genes involved in xenobiotic metabolism and disposition in human renal tissues and renal cell models

Cynthia Van der Hauwaert, Grégoire Savary, David Buob, Xavier Leroy, Sébastien Aubert, Vincent Flamand, Marie-Flore Hennino, Michaël Perrais, Jean-Marc Lo Guidice, Franck Broly, Christelle Cauffiez, François Glowacki

Toxicology And Applied Pharmacology, 2014

Expression profiles of genes involved in xenobiotic metabolism and disposition in human renal tissues and renal cell models

Cynthia Van der Hauwaert¹, Grégoire Savary¹, David Buob², Xavier Leroy^{2,3}, Sébastien Aubert^{2,3}, Vincent Flamand⁴, Marie-Flore Hennino^{1,5}, Michaël Perrais³, Jean-Marc Lo Guidice¹, Franck Broly¹, Christelle Cauffiez^{1,*}, François Glowacki^{1,5,*}

¹ EA4483, Université de Lille 2, Faculté de Médecine de Lille, Pôle Recherche, 59045 Lille, France

² Institut de Pathologie, Centre de Biologie Pathologie Génétique, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, 59037 Lille, France

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR837, Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, Equipe 5, 59045 Lille, France

⁴ Service d'Urologie, Hôpital Huriez, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, 59037 Lille, France

⁵ Service de Néphrologie, Hôpital Huriez, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, 59037 Lille, France

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding author:

Christelle Cauffiez. EA4483 Faculté de Médecine, Pôle Recherche, 1 place de Verdun, 59045 Lille cedex, France. E-mail address: christelle.cauffiez@univ-lille2.fr. Tel.: +33 3 20 62 35 76. Fax.: +33 3 20 62 68 91.

Abstract

Numerous xenobiotics have been shown to be harmful for the kidney. Thus, to improve our knowledge of the cellular processing of these nephrotoxic compounds, we evaluated, by real-time PCR, the mRNA expression level of 377 genes encoding xenobiotic-metabolizing enzymes (XMEs), transporters, as well as nuclear receptors and transcription factors that coordinate their expression, in eight normal human renal cortical tissues. Additionally, since several renal *in vitro* models are commonly used in pharmacological and toxicological studies, we investigated their metabolic capacities and compared them with those of renal tissues. The same set of genes was thus investigated in HEK293 and HK2 immortalized cell lines, in commercial primary cultures of epithelial renal cells and in Proximal Tubular Cell primary cultures. Altogether, our data offers a comprehensive description of kidney ability to process xenobiotics. Moreover, by hierarchical clustering, we observed large variations in gene expression profiles between renal cell lines and renal tissues. Primary cultures of proximal tubular epithelial cells exhibited the highest similarities with renal tissue in terms of transcript profiling. Moreover, compared to other renal cell models, Tacrolimus dose dependent toxic effects were lower in Proximal Tubular Cell primary cultures that display the highest metabolism and disposition capacity. Therefore, primary cultures appear to be the most relevant *in vitro* model for investigating the metabolism and bioactivation of nephrotoxic compounds and for toxicological and pharmacological studies.

Keywords

Gene expression, xenobiotic processing, kidney, *in vitro* models

Highlights

Renal proximal tubular (PT) cells are highly sensitive to xenobiotics

Expression of genes involved in xenobiotic disposition was measured

PT cells exhibited the highest similarities with renal tissue

Introduction

The kidneys are involved in vital functions such as waste excretion, hydroelectric and blood pressure regulation or hormones synthesis. They also constitute the major excretion route of xenobiotics. The nephrotoxic effects of chemical compounds can be partly explained by kidneys physiological function. While kidneys are exposed to any xenobiotic (or metabolite) present in the bloodstream, their concentration power, tubular secretion and reabsorption functions may lead to the accumulation of a compound present at a non-toxic plasmatic concentration in the renal interstitium and then to harmful *in situ* effects. Therefore, a high frequency of nephrotoxic effects has been reported with all structural elements and constituents of the renal parenchyma being affected. Noteworthy, proximal tubule epithelial cells have been shown to be the main target of xenobiotics (Li *et al.*, 2003).

Many xenobiotics are already known or suspected to be nephrotoxic agents either directly or after bioactivation, causing reversible or irreversible cell damages. For example, these compounds are (i) drugs such as analgesics, lithium, contrast agents, anticancer drugs (cisplatin ...), immunosuppressive agents (cyclosporine A, Tacrolimus), antiviral therapy (cidofovir) or antibiotics (aminoside, glycopeptide) (ii) chemical compounds such as ethylene glycol, organic solvents (hydrocarbons), herbicides (paraquat), (iii) mycotoxins: ochratoxin A, citrinin, orellanine, (iv) metals: arsenic, bismuth, cadmium, chromium, germanium, lead, mercury ... (Pfaller and Gstraunthaler, 1998; Van Vleet and Schnellmann, 2003). Proteins involved in the metabolism and disposition of xenobiotics are usually categorized in three groups. Phase I Xenobiotic Metabolism Enzymes (XMEs), which comprise the cytochrome P450 (P450) enzyme superfamily, mainly catalyze oxidation reactions, and to a lesser extent reductions and hydrolyses (Guo *et al.*, 2011). Xenobiotics or their phase I metabolites are then conjugated by phase II enzymes with glutathione, sulfate, glucuronide or other endogenous molecules, resulting in highly hydrophilic metabolites (Nakata *et al.*, 2006). Finally, phase III proteins are membrane transporters, mainly represented by the Solute Carrier (SLC) and ATP-binding cassette (ABC) families, that mediate the influx (or efflux) of xenobiotics into (or out) the cells (Gerloff, 2004). The expression of XME and transporters genes is coordinated and modulated by nuclear receptors, such as Pregnane X Receptor (PXR), Constitutive Androstane Receptor (CAR) and Aryl hydrocarbon Receptor (AhR). These nuclear receptors are activated by xenobiotics and are therefore termed as “xenosensors” (Nakata *et al.*, 2006). Although XMEs, transporters and “xenosensors” are ubiquitously expressed, a large variability in their tissue distribution has been described. Therefore, these proteins are likely to affect the chemical compounds bioavailability and to contribute to the synthesis of metabolites whose *in situ* production may be the cause of organ-specific toxicities (Ding and Kaminsky, 2003). In particular, kidneys actively contribute to the metabolism of many xenobiotics including drugs. In some cases, the metabolism of compounds in the kidney largely exceeds that of the liver, as exemplified by the glycation of benzoic acid (Lohr *et al.*, 1998).

There is thus a need for reliable cell models reflecting accurately renal cellular absorption, metabolism, and excretion of nephrotoxic compounds. In particular, the use of *in vitro* models can provide a more detailed insight of potential mechanisms underlying renal toxicity (Li *et al.*, 2003, Sohn *et al.*, 2013). Established cell lines and primary cultures are now widely used for studying the impact of toxicants (Brown *et al.*, 2008; Garrett *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2011; Pfaller and Gstraunthaler, 1998; Schaaf *et al.*, 2001). Few studies have focused on the characterization of XMEs and transporters in human renal primary cells. Their metabolic capacities are not well defined and gene expression differences and/or similarities to human renal tissues has not been investigated so far (Brown *et al.*, 2008; Cummings *et al.*, 2000; Lash *et al.*, 2006; Lash *et al.*, 2008; Van der Hauwaert *et al.*, 2013).

To characterize the metabolic properties of several *in vitro* renal models, we investigated the expression profile of 377 genes involved in the metabolism and transport of xenobiotics, using a high throughput quantitative real-time PCR strategy based on TaqMan Low Density Arrays (TLDA), in various renal epithelial primary cultures and common immortalized renal epithelial cells compared to normal human renal tissues.

Material and Methods

Patients and samples

This study was approved by the scientific committee of our institutional biobank (Tumorothèque du Centre de Référence Régional en Cancérologie de Lille, approval n°CSTMT032). For this non-interventional study, which did not include any constitutional genetic evaluation, and according to the recommendations of the Haute Autorité de la Santé and the Code de la Santé Publique (Art L1211-2), a non-opposition to the use of tissue samples for research purpose was obtained from the patients. This consent was collected by the referring physician.

Eight patients undergoing radical nephrectomy for Renal Cell Carcinoma were included in this study. Macroscopically healthy cortical samples, collected afar the tumor, were collected and immediately processed or cryopreserved (-80°C). Before all experiments, all renal tissue specimens were assessed by a senior pathologist (microscopy). Tissue samples selected for further experiments were considered as normal, and free of cancer cells.

Cell culture

Cell lines and commercial primary cultures

HK2, a proximal tubular cell line derived from human normal kidney, and HEK293, human kidney embryonic cells, were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). HRCEpiC (Human Renal Cortical Epithelial Cells), HRPTEpiC (Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells) and HREpiC (Human Renal Epithelial Cells) primary cultures were purchased from ScienCell Research Laboratories and cultured according to the supplier.

The HEK293 cell line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies) supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Life Technologies), 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies) and 1% L-Glutamine (Life Technologies). HK2 cells were cultured in Keratinocyte Serum-Free Medium (K-SFM, Life Technologies) supplemented with 0.05 mg/mL Bovine Pituitary Extract (Life Technologies), 5 ng/mL EGF (Epidermal Growth Factor, Life Technologies), 1% L-Glutamine and 1% penicillin/streptomycin.

Human renal proximal tubular epithelial primary cultures (PT cells)

Renal proximal tubular epithelial primary cells (PT cells) were isolated as previously described (Van der Hauwaert *et al.*, 2013). Briefly, renal cortical tissue was collected from fresh nephrectomy specimens for renal or urinary tract cancer. Cortical samples were decapsulated and dissected in order to obtain 1 mm³ fragments. Fragments were then digested with 2 mg/mL collagenase IV (enzymatic activity: 200 U/mL) (Life Technologies) and 20% dispase (Becton Dickinson), in 6 mL of complete DMEM/F12 1:1 medium (Life Technologies) containing 10 ng/mL EGF, 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, 15 mM HEPES (Sigma Aldrich), 50 nM hydrocortisone (Sigma Aldrich), 5 µg/mL insulin (Life Technologies), 5 µg/mL transferrin (Sigma Aldrich) and 50 nM sodium selenite (Sigma Aldrich). This step was performed three times at 37°C for 30 min, and the suspension was filtered through filters with a mesh size of 70 µm after each digestion. The cell suspension was washed twice in PBS (Phosphate Buffered Saline) and centrifuged for 5 min at 300 g. Cells were cultured in 75 cm² flasks with complete culture medium at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The culture medium was changed after 24 h in order to eliminate non-adherent cells and residual cellular fragments.

To obtain pure culture of PT cells, subconfluent cultures were trypsinized and purified by FACS (Fluorescence Activating Cell Sorting). Antibodies of two proximal tubular epithelial markers, CD10 and CD13 antibodies (eBioscience), were used. One million cells were labeled with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD13 or with allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD10 or both in 100 µL of complete medium. Antibody concentrations used were those described by suppliers. The cell

suspension was incubated for 30 min at 4°C with antibodies and washed in PBS. Cells were resuspended into 2 mL complete medium without EGF and with 0.5 mM EDTA, sorted using an Epic Altra cell sorter (Beckman Coulter) and collected in complete culture medium. Positively labeled cells were identified by their fluorescence when compared with that of appropriate control samples labeled using nonspecific isotype antibodies.

Cell-based cytotoxicity assays

HEK293, HK2 and PT cells were grown on 96-well-microplates. The cells were allowed to attach overnight at 37 °C and 5% CO₂. At the next day, the medium was removed. Cells were exposed to fresh medium containing Tacrolimus (0-200 μM) for 24h. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability (Promega) assay was performed as recommended by the supplier.

RNA extraction

Renal samples (50 mg) were homogenized in lysis buffer (Macherey Nagel) supplemented with 1% β-mercaptoethanol, using a rotor-stator homogenizer. For cell culture, the lysis buffer supplemented with 1% β-mercaptoethanol was directly added to the cell dishes. Total RNAs were extracted using the Triprep Mini Kit™ (Macherey Nagel), with a DNase digestion step, according to the manufacturer's instructions. Elution was performed with 60 μL nuclease free water. The yield of the extracted RNA was determined by measuring the optical density at 260 nm with the BioSpec-nano spectrophotometer (Shimadzu). The purity and quality of RNA were evaluated using the Experion automated electrophoresis station (Biorad). High quality RNAs with RQI (RNA Quality Indicator) greater than 8.0 were used for the study.

cDNA synthesis

Five hundred ng of total RNAs were retrotranscribed in single-stranded cDNAs using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit™ (Applied Biosystems), according to the manufacturer's recommendations.

Table 1. TaqMan™ gene expression assays used for quantitative real-time RT-PCR.

<i>Phase I enzymes</i>					
Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID
OXIDASES					
<u>Alcohol DHases</u>					
ADH1A	Hs00605167_g1	ALDH16A1	Hs00292269_m1	CYP4F3	Hs00168521_m1
ADH1B	Hs00605175_m1	ALDH18A1	Hs00913261_m1	CYP4F8	Hs01027814_m1
ADH1C	Hs00817827_m1	<u>Aldehyde oxidase 1</u>		CYP4F11	Hs01680107_m1
ADH4	Hs00923466_m1	AOX1	Hs00154079_m1	CYP4F12	Hs00430602_g1
ADH5	Hs00605185_m1	<u>Xanthine DHase</u>		CYP4F22	Hs00403446_m1
ADH6	Hs00167423_m1	XDH	Hs00166010_m1	CYP4V2	Hs01389878_m1
ADH7	Hs00609447_m1	<u>Cytochrome P450</u>		CYP4X1	Hs00380077_m1
ADHFE1	Hs00329084_m1	CYP1A1	Hs00153120_m1	CYP4Z1	Hs00419990_m1
<u>Alcohol DHases/reductases</u>					
DHRS2	Hs00195090_m1	CYP1A2	Hs00167927_m1	TBXAS1	Hs00233423_m1
DHRS4	Hs00949075_m1	CYP1B1	Hs00164383_m1	CYP7A1	Hs00167982_m1
DHRS9	Hs00608375_m1	CYP2A6	Hs00868409_s1	CYP7B1	Hs00191385_m1
<u>Hydroxysteroid DHase</u>					
HSD17B10	Hs00189576_m1	CYP2A7	Hs00751187_gH	PTGIS	Hs00919949_m1
<u>Aldehyde DHases</u>					
ALDH1A1	Hs00167445_m1	CYP2A13	Hs00426372_m1	CYP8B1	Hs00244754_s1
ALDH1A2	Hs00180254_m1	CYP2B6	Hs03044634_m1	CYP11A1	Hs00167984_m1
ALDH1A3	Hs00167476_m1	CYP2C8	Hs00258314_m1	CYP11B1	Hs01596404_m1
ALDH1B1	Hs00377718_m1	CYP2C9	Hs00426397_m1	CYP11B2	Hs01597732_m1
ALDH1L1	Hs00201836_m1	CYP2C18	Hs01595322_mH	CYP17A1	Hs00164375_m1
ALDH2	Hs00355914_m1	CYP2C19	Hs00426380_m1	CYP19A1	Hs00903413_m1
ALDH3A1	Hs00964880_m1	CYP2D6	Hs00164385_m1	CYP20A1	Hs00221087_m1
ALDH3A2	Hs00166066_m1	CYP2E1	Hs00559370_m1	CYP21A2	Hs00416901_g1
ALDH3B1	Hs00167488_m1	CYP2F1	Hs00167949_m1	CYP24A1	Hs00167999_m1
ALDH3B2	Hs00167496_m1	CYP2J2	Hs00951113_m1	CYP26A1	Hs00175627_m1
ALDH4A1	Hs00186689_m1	CYP2R1	Hs01379776_m1	CYP26B1	Hs00219866_m1
ALDH5A1	Hs00153566_m1	CYP2S1	Hs00258076_m1	CYP26C1	Hs01595346_m1
ALDH6A1	Hs00194421_m1	CYP2U1	Hs00766273_m1	CYP27A1	Hs01026016_m1
ALDH7A1	Hs00609622_m1	CYP2W1	Hs00214994_m1	CYP27B1	Hs00168017_m1
ALDH8A1	Hs00224021_m1	CYP3A4	Hs00430021_m1	CYP27C1	Hs01382794_m1
ALDH9A1	Hs00355924_m1	CYP3A5	Hs00241417_m1	CYP39A1	Hs00213201_m1
		CYP3A7	Hs00426361_m1	CYP46A1	Hs00198510_m1
		CYP3A43	Hs00256159_m1	CYP51A1	Hs00426415_m1
		CYP4A11/22	Hs00167961_m1	<u>Flavin monoxygenases</u>	
		CYP4B1	Hs00167970_m1	FMO1	Hs00266654_m1
		CYP4F2	Hs00426608_m1	FMO2	Hs00155158_m1
HYDROLASES					
<u>Arylacetylamine deacetylase</u>					
				AADAC	Hs00153677_m1
<u>Butyrylcholinesterase</u>					
				BCHH	Hs00163746_m1
<u>Carboxylesterases</u>					
				CES1	Hs00275607_m1
				CES2	Hs00187279_m1
				CES3	Hs00227775_m1
				CES4	Hs00750233_s1
				CES7	Hs00326937_m1
<u>Epoxide hydrolases</u>					
				EPHX1	Hs01116807_m1
				EPHX2	Hs00157403_m1
<u>Esterase D</u>					
				ESD	Hs00382667_m1
<u>Paraoxonases</u>					
				PON1	Hs00166557_m1
				PON2	Hs00165563_m1
				PON3	Hs00412993_m1
REDUCTASES					
<u>Aldo-keto reductases</u>					
				AKR1A1	Hs00195992_m1
				AKR1B1	Hs00739326_m1
				AKR1B10	Hs00252524_m1
				AKR1C1/2	Hs00413886_m1
				AKR1C3	Hs00366267_m1
				AKR1C4	Hs00559542_m1
				AKR1CL1	Hs01397413_m1
				AKR1E2	Hs00230170_m1
				AKR1D1	Hs00818881_m1
				KCNAB1	Hs00963155_m1
				KCNAB2	Hs00186308_m1
				KCNAB3	Hs00190986_m1
				AKR7A2	Hs00761005_s1
				AKR7A3	Hs00792041_gH
				AKR7L	Hs01651386_gH
<u>Carbonyl reductases</u>					
				CBR1	Hs00156323_m1
				CBR3	Hs00154295_m1
				CBR4	Hs00379036_m1
<u>Quinone DHases</u>					
				NQO1	Hs00168547_m1
				NQO2	Hs00168552_m1
<u>Sepiapterin reductase</u>					
				SPR	Hs00268403_m1
<i>Phase II enzymes</i>					
Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID
<i>N</i>-ACETYL-Tfases					
NAT1	Hs00377717_m1	UGT2B7	Hs00426592_m1	GSTM3	Hs00168307_m1
NAT2	Hs00605099_m1	UGT2B10	Hs02556282_s1	GSTM4	Hs00426432_m1
NAA20	Hs00211492_m1	UGT2B11	Hs01894900_gH	GSTM5	Hs00757076_m1
<u>Arylalkylamine N-acetyl-Tfase</u>					
AANAT	Hs00153690_m1	UGT2B15	Hs00870076_s1	GSTO1	Hs00818731_m1
		UGT2B17	Hs00854486_sH	GSTO2	Hs00826661_m1
		UGT2B28	Hs00852540_s1	GSTP1	Hs00168310_m1
		UGT3A1	Hs00329313_m1	GSTT1	Hs00184475_m1
		UGT3A2	Hs00697723_m1	GSTT2/2B	Hs00168315_m1
		UGT8	Hs00409961_m1	GSTZ1	Hs01041668_m1
				MGST1	Hs00220393_m1
				MGST2	Hs00182064_m1
				MGST3	Hs01058946_m1
UDP- GLYCOSYL-Tfases					
UGT1A1	Hs02511055_s1	GLUTATHIONE S-Tfases			
UGT1A4	Hs01655285_s1	GSTA1	Hs00275575_m1		
UGT1A5	Hs01374521_s1	GSTA2	Hs00747232_mH		
UGT1A6	Hs01592477_m1	GSTA3	Hs00374175_m1		
UGT1A7	Hs02517015_s1	GSTA4	Hs00155308_m1		
UGT1A8	Hs01592482_m1	GSTA5	Hs00604085_m1		
UGT1A9	Hs02516855_sH	GSTK1	Hs00210861_m1		
UGT1A10	Hs02516990_s1	GSTM1	Hs02341469_m1		
UGT2A1	Hs00792016_m1	GSTM2	Hs00265266_g1		
UGT2A3	Hs00226904_m1				
UGT2B4	Hs00607514_mH				
METHYL-Tfases (MT)					
				<u>Arsenic MT</u>	
				AS3MT	Hs00221125_m1
				<u>Catechol-O-MT</u>	
				COMT	Hs00241349_m1
<u>Glycine N-MT</u>					
				GNMT	Hs00219089_m1
<u>Histamine N-MT</u>					
				HNMT	Hs00199373_m1
<u>Indolethylamine N-MT</u>					
				INMT	Hs00198941_m1
<u>Nicotinamide N-MT</u>					
				NNMT	Hs00196287_m1
<u>Phenylethanolamine N-MT</u>					
				PNMT	Hs00160228_m1
<u>Thiopurine S-MT</u>					
				TPMT	Hs00740082_mH
SULFO-Tfases					
				SULT1A1	Hs00738644_m1
				SULT1A2	Hs02340929_g1
				SULT1A3/4	Hs00413970_m1
				SULT1B1	Hs00234899_m1
				SULT1C2	Hs00169044_m1
				SULT1C3	Hs01371045_m1
				SULT1C4	Hs00198159_m1
				SULT1E1	Hs00960941_m1
				SULT2A1	Hs00234219_m1
				SULT2B1	Hs00190268_m1
				SULT4A1	Hs00205005_m1
				SULT6B1	Hs01376028_m1
OTHER Tfases					
<u>Glycine N-choloyl-Tfase</u>					
				BAAT	Hs00156051_m1
<u>Gamma-glutamyl-Tfase 1</u>					
				GGT1	Hs00980756_m1
<u>Glycine-N-acetyl-Tfase</u>					
				GLYAT	Hs00973654_m1
<u>Mercaptopyrivate sulfur-Tfase</u>					
				MPST	Hs00560401_m1
<u>Thiosulfate sulfur-Tfase</u>					
				TST	Hs00361812_m1

Quantitative real-time PCR

Gene expression was quantified using custom TaqMan™ low-density arrays (TLDA). This real-time PCR-based technique consists in 384-well micro fluidic cards preloaded with sets of primers and 6-FAM labelled Taqman MGB probes (Taqman assays, Applied Biosystems).

TLDAs were configured with 377 assays for genes encoding proteins known or suspected to be involved in the metabolism of xenobiotics, to govern the cellular entry or efflux of these compounds and/or their metabolites, or to coordinate metabolism and transport processes (Leclerc *et al.*, 2011). This set of genes comprised 206 xenobiotic-metabolizing enzymes genes (137 phase I and 69 phase II enzymes), 102 transporter genes (including 28 ABC and 62 SLC transporters), 48 nuclear receptor and transcription factor genes (including nuclear receptor coactivators and corepressors), and 21 other genes (including 9 metallothioneins).

TLDAs were designed through an automated design process that takes into account high homology between closely related genes, alternative splicing within a single gene and the potential presence of transcribed pseudogenes, and enables creation of specific and robust quantitative assays for mRNA transcripts

(http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040599.pdf). Thus assays are gene specific (except for a few genes, i.e. *CYP4A11* and *CYP4A22*, *AKRIC1* and *AKRIC2*, *GSTT2* and *GSTT2B*, *SULT1A3* and *SULT1A4*, which share very high nucleotide sequence homology) and most span an exon-exon junction. All assays and their assay ID numbers are listed in **Table 1**.

Sixteen potential reference genes, namely *18S rRNA*, *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HMBS*, *HPRT1*, *IPO8*, *PGK1*, *POLR2A*, *PPIA*, *RPLPO*, *TBP*, *TFRC*, *UBC* and *YWHAZ*, have been previously tested on kidney tissue samples in our laboratory (data not shown). The choice for the housekeeping genes was based on the principle that reference genes should be unregulated in all samples and their amplification should be comparable to the genes of interest. As *PPIA* displayed the smallest variability between tissues, it was selected as the reference gene for normalization of target gene data.

TLDAs were loaded with cDNA templates mixed with 2X TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. After centrifugation (2x1 min at 300 g), each reaction well contained 1 µL reaction mixture corresponding to 1 ng of total RNA. The wells were immediately sealed with a TaqMan Low Density Array Sealer (Applied Biosystems) to prevent cross-contamination. The Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR System was used to perform the PCR amplification. Thermal cycling conditions were as follows: 2 min at 50°C to activate

Transporters

Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID
ABC TRANSPORTERS									
ABCA1	Hs01059122_m1	ABCC6	Hs00184566_m1	SLC7A6	Hs00938056_m1	SLC22A12	Hs00375985_m1	SLCO4A1	Hs00249583_m1
ABCA2	Hs00242232_m1	ABCC8	Hs01093761_m1	SLC7A7	Hs00909952_m1	SLC22A16	Hs00263925_m1	SLCO4C1	Hs00698884_m1
ABCA3	Hs00975530_m1	ABCC9	Hs00245832_m1	SLC7A8	Hs00794796_m1	SLC25A13	Hs00185185_m1	SLCO5A1	Hs00229597_m1
ABCA7	Hs01105117_m1	ABCC10	Hs00375716_m1	SLC7A11	Hs00204928_m1	SLC28A1	Hs00984403_m1	SLCO6A1	Hs00542846_m1
ABCA8	Hs00992371_m1	ABCC11	Hs01090768_m1	SLC10A1	Hs00161820_m1	SLC28A2	Hs00188407_m1	OTHER TRANSPORTERS	
ABCB1	Hs00184491_m1	ABCC12	Hs00264354_m1	SLC10A2	Hs00166561_m1	SLC28A3	Hs00223220_m1	<u>Aquaporins</u>	
TAP1	Hs00388682_m1	ABCD4	Hs00245340_m1	SLC15A1	Hs00192639_m1	SLC29A1	Hs01085706_m1	AQP1	Hs00166067_m1
TAP2	Hs00241060_m1	ABCG2	Hs01053787_m1	SLC15A2	Hs00221539_m1	SLC29A2	Hs00155426_m1	AQP7	Hs00357359_m1
ABCB4	Hs00240956_m1	ABCG8	Hs02880035_m1	SLC16A1	Hs00161826_m1	SLC29A3	Hs00983219_m1	AQP9	Hs00175573_m1
ABCB5	Hs00698751_m1	SOLUTE CARRIERS		SLC18A2	Hs00161858_m1	SLC29A4	Hs00542001_m1	<u>ATPase, H+ transporting, V0c</u>	
ABCB6	Hs00180568_m1	SLC1A1	Hs00188172_m1	SLC19A1	Hs00953345_m1	SLC31A1	Hs00977268_g1	<u>ATP6V0C</u>	
ABCB7	Hs00188776_m1	SLC1A2	Hs00188189_m1	SLC19A2	Hs00949693_m1	SLC38A1	Hs01562168_m1	<u>ATPases, Cu++ transporting</u>	
ABCB8	Hs00185159_m1	SLC1A3	Hs00188193_m1	SLC19A3	Hs00375596_m1	SLC38A2	Hs01089954_m1	<u>ATP7A</u>	
ABCB9	Hs00608640_m1	SLC1A6	Hs00192604_m1	SLC22A1	Hs00427554_m1	SLC38A5	Hs01012028_m1	<u>ATP7B</u>	
ABCB10	Hs01085315_m1	SLC1A7	Hs00198515_m1	SLC22A2	Hs00533907_m1	SLC47A1	Hs00217320_m1	<u>Potassium channel, K9</u>	
ABCB11	Hs00184824_m1	SLC2A1	Hs00197884_m1	SLC22A3	Hs00222691_m1	SLC47A2	Hs00945650_m1	<u>KCNK9</u>	
ABCC1	Hs00219905_m1	SLC3A1	Hs00165789_m1	SLC22A4	Hs00268200_m1	SLCO1A2	Hs00366488_m1	<u>Major vault protein</u>	
ABCC2	Hs00166123_m1	SLC3A2	Hs00374243_m1	SLC22A5	Hs00929869_m1	SLCO1B1	Hs00272374_m1	<u>MVP</u>	
ABCC3	Hs00358656_m1	SLC5A4	Hs00429527_m1	SLC22A6	Hs00537914_m1	SLCO1B3	Hs00251986_m1	<u>Voltage-dependent anion channels</u>	
ABCC4	Hs00195260_m1	SLC6A3	Hs00997364_m1	SLC22A7	Hs00198527_m1	SLCO1C1	Hs00213714_m1	VDAC2 Hs00748551_s1	
ABCC5	Hs00981089_m1	SLC6A4	Hs00169010_m1	SLC22A8	Hs01056647_m1	SLCO2A1	Hs00194554_m1	VDAC3 Hs00366592_m1	
		SLC7A5	Hs00185826_m1	SLC22A9	Hs00375768_m1	SLCO2B1	Hs00200670_m1		
				SLC22A11	Hs00218486_m1	SLCO3A1	Hs00203184_m1		

Nuclear receptors and Transcription Factors

Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID
<u>Aryl hydrocarbon receptor</u>		ESR2	Hs00230957_m1	NCOA2	Hs00896106_m1	NR3C1(GR)	Hs00353740_m1	<u>Retinoic acid receptors</u>	
AHR	Hs00169233_m1	<u>Forkhead boxes</u>		NCOA3	Hs00180722_m1	NR3C2(MR)	Hs01031809_m1	RARA	Hs00940446_m1
<u>AHR repressor</u>		FOXA2	Hs00232764_m1	<u>Nuclear receptor co-repressors</u>		NR5A2(FTF)	Hs00187067_m1	RARB	Hs00233407_m1
AHRR	Hs00324967_m1	FOXO1	Hs01054576_m1	NCOR1	Hs00196920_m1	<u>Peroxisome proliferator-activated receptors</u>		RARG	Hs01559234_m1
<u>AHR interacting protein</u>		<u>Hypoxia-inducible factors</u>		NCOR2	Hs00196955_m1	PPARA	Hs00231882_m1	<u>Retinoid X receptors</u>	
AIP	Hs00610222_m1	HIF1A	Hs00153153_m1	<u>Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</u>		PPARD	Hs00602622_m1	RXRA	Hs01067640_m1
<u>AHR nuclear translocators</u>		HIF3A	Hs00541709_m1	NFE2L2	Hs00232352_m1	PPARG	Hs01115513_m1	RXRβ	Hs00232774_m1
ARNT	Hs01121918_m1	<u>Hepatocyte nuclear factor 4α</u>		<u>Nuclear receptors</u>		PPARGC1A	Hs00173304_m1	RXRγ	Hs00199455_m1
ARNT2	Hs00208298_m1	HNF4A	Hs00604435_m1	NR0B2(SHP)	Hs00222677_m1	PPARGC1B	Hs00370186_m1	<u>Thyroid hormone receptors</u>	
<u>CREB binding protein</u>		<u>Heat shock protein 90α, A1</u>		NR1H2(LXRβ)	Hs00173195_m1	<u>PPARG coactivators</u>		THRA	Hs00268470_m1
CREBBP	Hs00231733_m1	HSP90AA1	Hs00743767_sH	NR1H3(LXRα)	Hs00172885_m1	PPARGC1B	Hs00370186_m1	THRB	Hs00230861_m1
<u>E1A binding protein p300</u>		<u>Kelch-like ech-associated protein</u>		NR1H4(FXR)	Hs00231968_m1	<u>PPARG coactivator-related 1</u>		THR interactor 11	
EP300	Hs00230938_m1	KEAP1	Hs00202227_m1	NR1I2(PXR)	Hs00243666_m1	PPRC1	Hs00209379_m1	TRIP11	Hs00188542_m1
<u>Estrogen receptors</u>		<u>Nuclear receptor coactivators</u>		NR1I3(CAR)	Hs00901571_m1	<u>Prostaglandin E synthase 3</u>		<u>Vitamin D receptor</u>	
ESR1	Hs01046818_m1	NCOA1	Hs00186661_m1			PTGES3	Hs00832847_gH	VDR	Hs01045840_m1

Other genes

Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID
METALLOTHIONEINES									
MT1A	Hs00831826_s1	MT3	Hs00359394_g1	<u>Cytochrome b5 type A</u>		<u>P450 oxidoreductase</u>		<u>Thioredoxins</u>	
		MT4	Hs00262914_m1	CYB5A	Hs00157217_m1	POR	Hs00287016_m1	TXN	Hs00828652_m1
MT1B	Hs00538861_m1	Divers		<u>Granzymes</u>		<u>Retinol binding proteins</u>		TXN2	Hs00429399_g1
MT1F	Hs00744661_sH	<u>Cellular retinoic acid binding proteins</u>		GZMA	Hs00196206_m1	RBP1	Hs00161252_m1		
MT1H	Hs00823168_g1	CRABP1	Hs00171635_m1	GZMB	Hs00188051_m1	RBP2	Hs00188160_m1		
MT1M	Hs00828387_g1	CRABP2	Hs00275636_m1	<u>Methylenetetrahydrofolate reductase</u>		<u>tumor protein p53</u>			
MT1X	Hs00745167_sH			MTHFR	Hs00293639_s1	TP53	Hs00153349_m1		
MT2A	Hs02379661_g1								

Note. DHases: dehydrogenases. Tfases: transferases

Uracil-DNA Glycosylase (UDG), 10 min at 94.5°C, followed by 40 cycles of denaturation at 97°C (30 s) and annealing-extension at 59.7°C (1 min).

Analysis of gene expression

The detection threshold was set at 0.25 for all genes. Threshold cycle (Ct) values, which correspond to the cycle number at which the fluorescence crosses the detection threshold, were determined with the RQ Manager 1.2 software (Applied Biosystems). Relative expression values were calculated based on the comparative threshold cycle method (Livak and Schmittgen, 2001). First of all, Ct values for target genes were normalized to Ct values of the reference gene, creating ΔCt values ($\text{Ct}_{\text{target gene}} - \text{Ct}_{\text{PPIA}}$). Then, $\Delta\Delta\text{Ct}$ values were calculated for each gene by subtracting the ΔCt of the sample used as a calibrator from the ΔCt value of another sample defined as the target sample. This enables calculation of the relative quantity (RQ) between the two samples with the formula: $\text{RQ} = 2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$. The median RQ was assessed for each target gene. Genes were assessed as being differentially expressed between two samples if they revealed at least a 4-fold difference in expression ($\text{median RQ} \geq 4$ or ≤ 0.25).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS Statistics 20 software from IBM. Pearson's correlation coefficients of all the Ct values were calculated between samples and represented as a heatmap correlation plot. After ΔCt computation, unsupervised hierarchical clustering was performed with the Euclidean distance as an input parameter in the clustering algorithm. In order to identify the significant differentially expressed genes between tissues, p-values were calculated using a paired t test.

Table 2. Number of non expressed genes and highly expressed genes in renal tissues (n=8), PT cells, commercial primary cultures of epithelial cells, HK2 and HEK293 cell lines.

	Renal tissues	PT cells	Commercial primary cultures	HK2	HEK293
<i>Non expressed genes</i>					
Total	17	66	65	127	88
Phase I XME	7	22	28	50	35
Phase II XME	3	11	11	29	15
Transporters	6	23	17	34	28
Others	1	10	9	14	10
<i>Highly expressed genes</i>					
Total	143	48	44	67	39
Phase I XME	52	11	9	15	11
Phase II XME	29	14	8	10	5
Transporters	30	13	12	16	7
Others	32	10	15	26	16

Note. PT cells: Proximal Tubular cells.

Results

Expression profiling in renal tissues

Gene expression profiles of eight non-pathological renal tissue specimens are presented in **Supplemental Table 1**. A gene was considered as non-expressed when its Ct value was higher than 35. With this criterion, of the 377 genes that we studied, only 17 genes were regarded as not expressed in all renal tissue samples (*ADH1A*, *ADH7*, *CYP11B1*, *CYP11B2*, *CYP2A13*, *CYP2F1*, *CYP4F8*, *GSTA5*, *SULT1C3*, *SULT2A1*, *ABCC12*, *SLC5A4*, *SLC10A1*, *SLCO1B1*, *SLCO1B3*, *SLCO6A1*, *MT4*) (**Table 2**).

143 genes displayed very high mRNA levels ($\Delta Ct < 6$) (**Table 2**), and the most expressed were *UGT2B7*, *AQP1*, *MT1F*, *ALDH6A1*, *MT1X*, *SLC22A6*, *CYP4A11/CYP4A22*, *GSTA1*, *GLYAT*, *HSP90AA*, *ATPV06C*, *GGT1* and *AKR1A1*. 41 genes were expressed with a $6 < \Delta Ct < 10$, and 11 genes displayed moderate mRNA levels ($10 < \Delta Ct < 14$).

To visualize directly the distances of gene expression patterns, a hierarchical clustering was performed with the Euclidian distance as an input parameter in the clustering algorithm. The global gene expression was homogeneous between the 8 renal tissues (**Figure 1A**). Nevertheless, an important inter-individual variability in mRNA expression was observed for 21 genes, as exemplified by the *GSTT1* expression: *GSTT1* was highly expressed in 5 tissues ($\Delta Ct = 3.7 \pm 0.9$) and was not detected in 3 renal tissues ($\Delta Ct > 16$).

To reveal similarities of expression patterns among the renal tissue samples, a similarity matrix was generated by a pairwise comparison of the samples, in which the Pearson's correlation coefficient (*r*) was calculated on the basis of the ΔCt obtained for each gene. The *r* values represent the strengths of the linear relationship between any two sets of comparative components (**Table 3**). The *r* values between renal tissues were comprised between 0.927 and 0.976 ($p < 0.0001$).

Expression profiling in Proximal Tubular cells, commercial primary renal cells and immortalized renal cell lines

66 genes (comprising 22 genes encoding phase I enzymes, 11 genes encoding phase II enzymes and 23 genes encoding transporters) were regarded as not expressed in PT cells. Similarly, 65 genes (28 genes encoding phase I enzymes, 11 genes encoding phase II enzymes and 17 genes encoding transporters) were undetectable in primary commercial cultures (**Table 2**). About 73% of these genes were common in both models. Additionally, 48 genes (including 11 genes of phase I, 14 genes of phase II and 13 transporter genes) displayed high levels of mRNA in PT cells, whereas 44 genes

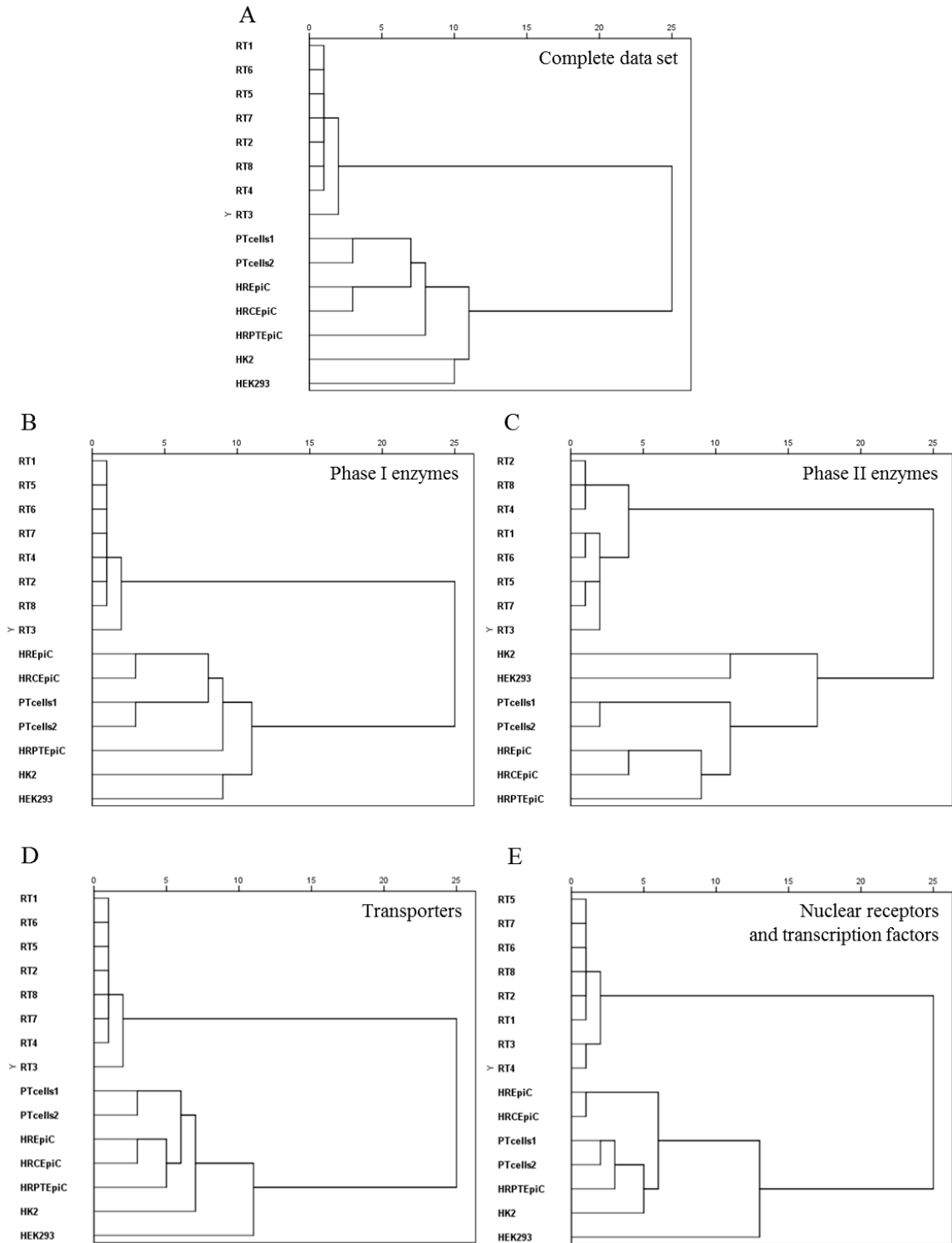


FIG. 1. Unsupervised hierarchical clustering. (A) Complete data set (377 genes); (B) phase I enzymes; (C) phase II enzymes; (D) transporters; (E) nuclear receptors and transcription factors. RT1 to RT8: renal tissue samples, PTcells: proximal tubular cells, HREpiC: human renal epithelial cells, HRCEpiC: human renal cortical epithelial cells, HRPTEpiC: human renal proximal tubular epithelial cells.

(including 9 genes of phase I, 8 genes of phase II and 12 genes encoding transporters) were highly expressed in primary commercial cultures (**Table 2**). Only about 45% of these genes were expressed in a similar extent (**Supplemental Table 1**).

In the HK2 cell line, 127 genes (including 50 genes encoding phase I enzymes, 29 genes encoding phase II enzymes and 34 genes encoding transporters) were regarded as not expressed and 67 genes (including 15 genes encoding phase I enzymes, 10 genes encoding phase II enzymes and 16 genes encoding transporters) displayed high levels of mRNA (**Table 2 and Supplemental Table 1**).

In HEK293, 88 genes (including 35 genes encoding phase I enzymes, 15 genes encoding phase II enzymes, 28 genes encoding transporters) were undetectable and 39 genes (including 11 genes of phase I, 5 genes of phase II, and 7 genes encoding transporters) were highly expressed (**Table 2 and Supplemental Table 1**).

Differential expression profiling between renal tissues, primary cultures of renal cells and renal cell lines

The highest r values between renal tissue and renal cell models were observed for PT cells ($0.691 < r < 0.752$; $p < 0.0001$). The commercial primary cultures of renal cells (HREpiC, HRCEpiC and HRPTEpiC) presented lower r values (mean r value of HRPTEpiC = 0.618 ± 0.022). The renal cell lines (HK2 and HEK293) presented the lowest r values (mean r value of HK2 = 0.596 ± 0.021 ; mean r value of HEK293 = 0.602 ± 0.021) (**Table 3**).

In the dendrogram, including the totality of the genes, several groups were observed. Renal cell models clustered in three major groups. When considering global expression, the highest similarities between renal tissues and renal cell models were observed for the PT cells (**Figure 1A**). When considering separately genes encoding phase I XMEs, phase II XMEs, transporters and nuclear receptors, among the different cell models, PT cells displayed the highest similarities to renal tissues. By contrast, dendrograms obtained showed HEK293 cell line was the more distant to the renal tissues, excepted for phase II XMEs (**Figure 1**).

Among the 15 most expressed genes in renal tissues (*UGT2B7*, *AQP1*, *MT1F*, *ALDH6A1*, *MT1X*, *SLC22A6*, *CYP4A11/CYP4A22*, *GSTA1*, *GLYAT*, *HSP90AA*, *ATPV06*, *UGT1A9*, *GGT1* and *AKR1A1*), only 7 (*MT1F*, *ALDH6A1*, *MT1X*, *HSP90AA*, *ATPV06*, *GGT1* and *AKR1A1*) were regarded as expressed in all renal cell models (**Table 4**). Three of these 15 genes displayed very low or undetectable mRNA levels in all renal cell models: *CYP4A11/CYP4A22*, *SLC22A6* and *SLC22A8*. Noteworthy, 4 of the 15 most expressed genes were not expressed in PT cells, namely *CYP4A11/4A22*,

Table 3. Pearson's correlation coefficient between renal tissues, renal primary cultures and renal cell lines.

	RT1	RT2	RT3	RT4	RT5	RT6	RT7	RT8	PTCells1	PTCells2	HREpiC	HRCEpiC	HRPTEpiC	HK2	HEK293
RT1	1	0.955	0.946	0.955	0.972	0.976	0.966	0.952	0.752	0.737	0.597	0.611	0.642	0.619	0.609
RT2		1	0.938	0.963	0.956	0.960	0.946	0.975	0.706	0.696	0.545	0.559	0.587	0.564	0.600
RT3			1	0.938	0.945	0.939	0.950	0.927	0.737	0.729	0.586	0.604	0.641	0.614	0.608
RT4				1	0.943	0.956	0.938	0.960	0.738	0.731	0.598	0.616	0.641	0.623	0.646
RT5					1	0.970	0.966	0.949	0.728	0.718	0.573	0.577	0.617	0.591	0.586
RT6						1	0.962	0.957	0.739	0.726	0.573	0.582	0.617	0.598	0.595
RT7							1	0.935	0.723	0.709	0.553	0.575	0.611	0.583	0.574
RT8								1	0.698	0.691	0.547	0.552	0.591	0.576	0.600
PTCells1									1	0.931	0.831	0.865	0.829	0.788	0.694
PTCells2										1	0.847	0.848	0.834	0.785	0.709
HREpiC											1	0.931	0.852	0.810	0.749
HRCEpiC												1	0.845	0.807	0.765
HRPTEpiC													1	0.854	0.757
HK2														1	0.809
HEK293															1

Note: The correlation matrix was calculated in the basis of ΔCt values. The numbers represent pairwise Pearson's correlation coefficient r value. $p < 0.0001$. RT: Renal Tissue; PTCells: Proximal Tubular cells; HREpiC: Human Renal Epithelial Cells; HRCEpiC: Human Renal Cortical Epithelial Cells; HRPTEpiC: Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells.

SLC22A6, *SLC22A8* and *GSTA1*. Concerning *UGT2B7*, *GLYAT* and *UGT1A9*, *UGT2B7* and *GLYAT* were only expressed in PT cells and HREpiC whereas *UGT1A9* mRNA was detected in PT cells and HRCEpiC. Interestingly, PT cells exhibited the highest expression level for *AQP1* and *UGT1A9* (**Table 4**).

Cytotoxic effect of Tacrolimus on HEK293, HK2 and PT cells

Cells were exposed to Tacrolimus for 24h before taking end-point measurements. The dose dependent effects are illustrated in **Figure 2A-C**. Tacrolimus was found to be more toxic for HK2 cells, followed by HEK293. By contrast, PT cells appeared to be the less sensitive to Tacrolimus toxicity. Interestingly, as shown in **Figure 2D**, we observed an association between the expression of genes involved in Tacrolimus disposition (*CYP3A4*; *CYP3A5*, *ABCB1* and *PXR*) and cell sensitivity.

Table 4. Most expressed genes ($\Delta Ct < 3$) in renal tissues compared to the different cell models.

Genes	Renal tissues	PT cells		Commercial primary cultures			Immortalized renal cells	
		PT cells 1	PT cells 2	HREpiC	HRCEpiC	HRPTEpiC	HK2	HEK293
<i>UGT2B7</i>	+++	+	+	+	-	-	--	--
<i>AQP1</i>	+++	+++	+++	+	+	++	--	-
<i>MT1F</i>	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+
<i>ALDH6A1</i>	+++	++	++	++	++	++	+++	++
<i>MT1X</i>	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++
<i>SLC22A6</i>	+++	--	--	--	--	--	--	--
<i>CYP4A11/22</i>	+++	-	--	--	--	--	--	-
<i>GSTA1</i>	+++	--	-	--	--	--	+	+
<i>GLYAT</i>	+++	+	+	+	--	-	--	-
<i>HSP90AA1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>ATP6V0C</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>UGT1A9</i>	+++	+++	+++	--	+	--	--	-
<i>SLC22A8</i>	+++	--	--	--	--	--	--	--
<i>GGT1</i>	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++
<i>AKR1A1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>ALDH2</i>	+++	++	++	+++	+++	++	+	++
<i>MGST1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
<i>GSTP1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>SLC7A8</i>	+++	+	+	++	+	+++	+	++
<i>SLC22A2</i>	+++	+++	+++	-	--	+	--	--
<i>SLC22A12</i>	+++	--	--	--	--	--	-	--
<i>NFE2L2</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
<i>SLC3A1</i>	+++	+++	+++	-	-	++	++	--
<i>UGT1A8</i>	+++	+++	+++	+	+	--	--	--
<i>ALDH4A1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
<i>TXN</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>ALDH3A2</i>	+++	++	++	++	++	++	++	+++
<i>GSTA2</i>	+++	-	-	--	--	-	+	+
<i>HIF1A</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>SLC3A2</i>	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++
<i>AKR7A3</i>	+++	++	+	+	+	+	+	+
<i>MVP</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
<i>MGST3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>ALDH7A1</i>	+++	++	++	++	++	+++	++	+++
<i>MAOB</i>	+++	++	++	++	++	++	--	+
<i>SLC22A11</i>	+++	+	--	--	-	-	+	--
<i>MAOA</i>	+++	++	++	++	++	++	++	++
<i>SLC47A1</i>	+++	+	+	+	-	+	--	++
<i>HNF4A</i>	+++	+	--	--	--	+	--	--
<i>MT2A</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
<i>AOX1</i>	+++	+++	+++	++	++	++	-	+
<i>TPMT</i>	+++	++	++	++	++	+++	++	++
<i>GSTK1</i>	+++	+++	++	+++	++	+++	++	++
<i>HSD17B10</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>FMO1</i>	+++	+	+	--	--	--	--	--
<i>EPHX2</i>	+++	++	++	++	++	++	++	++
<i>ALDH1L1</i>	+++	++	++	--	-	+	--	+
<i>ALDH1A1</i>	+++	++	+++	-	-	+++	-	+
<i>NQO2</i>	+++	++	++	++	++	++	++	++
<i>DHRS4</i>	+++	++	++	++	++	++	++	++
<i>ABP1</i>	+++	++	+	--	-	-	-	-
<i>RXRA</i>	+++	+++	++	+++	++	++	+++	++

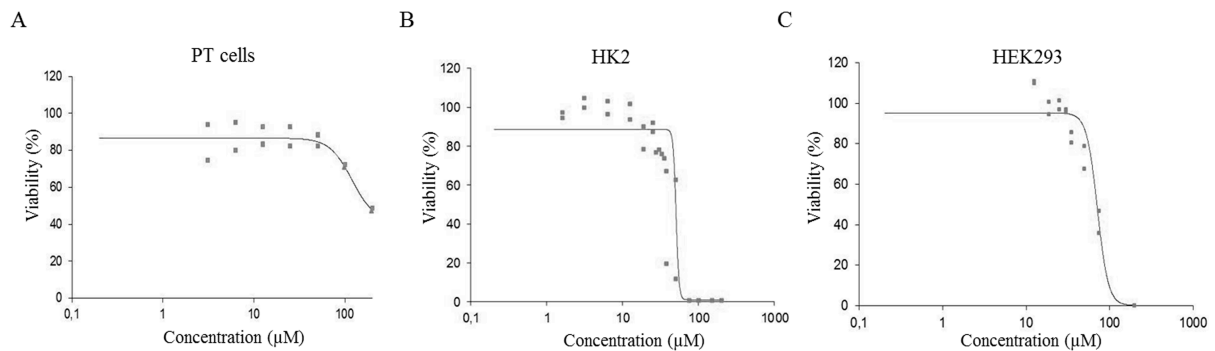
Note. Not detectable: -- ($\Delta Ct > 16$), low: - ($14 < \Delta Ct \leq 16$), moderate: + ($10 < \Delta Ct \leq 14$), high: ++ ($6 < \Delta Ct \leq 10$), very high: +++ ($\Delta Ct \leq 6$). The cut-off for mRNA levels was arbitrarily determined. Genes are listed in expression descending order. PT cells: Proximal Tubular cells; HREpiC: Human Renal Epithelia Cells; HRCEpiC: Human Renal Cortical Epithelial Cells; HRPTEpiC: Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells.

Discussion

Cell models are widely used for studying toxicity. Although these *in vitro* models cannot replicate the complex interactions of *in vivo* models (in particular, interactions of target cells with surrounding cells or extracellular matrix components), they offer the advantages to perform multiple and repeated experiments and to reduce the animal testing. *In vitro* renal cell models are likely to provide important predictive data either when evaluating xenobiotics direct nephrotoxicity or either following prior metabolism with liver S9 fraction.

In the present study, we assessed the metabolic capacity of different cell models by measuring the expression level of 377 genes implicated in the metabolism and transport of xenobiotics, and we compared the obtained results with those of the renal cortical tissue from 8 patients. Compared to enzyme activity or protein determination, this method allows the simultaneous measurement of multiple genes using little amount of sample. However, even if discrepancies between mRNA and protein expression may occur, mRNAs remain the first determinant of final intracellular protein levels.

Our data point out that the majority of the 377 target genes are expressed in the renal tissue, especially genes encoding phase I enzymes. Concerning the cytochromes P450, we confirmed the predominant expression of *CYP4A11/4A22* genes. Lasker *et al.* (2000) demonstrated, by immunocytochemistry, the *CYP4A11* expression in human renal proximal tubule S2 and S3 segments. The human *CYP4A11* and *CYP4A22* genes display 95% sequence homology (Bellamine *et al.*, 2003) and then were not discriminated by the probe and primers of the TaqMan assays. Proteins encoded by these genes are implicated in the metabolism of medium and long chain fatty acids; for example, arachidonic acid is catalyzed in 19- and 20- HydroxyEisocaTetraEnoic (HETE) acids, two vasoactive metabolites (Lasker *et al.*, 2000; Miyata and Roman, 2005). Among other XME phase I genes, we also identified those encoding *ALDH4A1*, *ALDH6A1* and *AKR1B1* as being highly expressed in the renal tissue. Alnouti and Klaassen (2008) reported the highest expression level of *ALDH4A1* and *ALDH6A1* in mice kidneys compared to other organs. Similarly, high expression of *AKR1B1* in kidneys has been previously described (Bondy *et al.*, 1989). *AKR1B1* is an aldo-keto reductase implicated in endogenous and exogenous molecule detoxification, and catalyzes, for example, conversion of glucose to sorbitol. Previous study has also reported that *AKR1B1*^{-/-} mice displayed a phenotype similar to diabetic nephropathy (Aida *et al.*, 2000). Concerning the XME phase II genes, several GSTs and UGTs are particularly expressed in the renal tissue. By deactivating a huge number of xenobiotics, GSTs are largely involved in cell protection. In some cases, this catalytic property leads to drug resistance, as exemplified by GSTs overexpression observed in renal tumors and associated with resistance to chemotherapeutic drugs (McIlwain *et al.*, 2006; Searchfiel *et al.*, 2011). In accordance



D

	PT cells 1	PT cells 2	HK2	HEK
Δ Ct ABCB1	6.4	7.02	10.45	7.27
Δ Ct CYP3A4	12.65	14.24	14.82	19.7
Δ Ct CYP3A5	7.11	8.32	15.36	12.65
Δ Ct PXR	12.81	14.88	19.01	19.7
Pearson's correlation coefficient	0.728	0.717	0.596	0.602
Lethal Dose 50% (μ M)	184 \pm 29	175 \pm 19	51 \pm 1	72 \pm 3

FIG.2. PT cells, HK2 and HEK293 exposure to Tacrolimus. Cell viability was determined using the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability (Promega) assay after 24h exposure to Tacrolimus (0-200 μ M): PT cells (A), HK2 (B) and HEK293 (C). Association between genes involved in Tacrolimus processing expression and cell viability. Pearson's correlation coefficient is related to renal tissue samples (D).

with previous reports (Ohno and Nakjin, 2008), we observed that three *UGT* isoforms are predominantly expressed in renal tissue, namely *UGT1A8*, *1A9* and *2B7*. Renal UGTs are implicated in the renal clearance of numerous xenobiotics including drugs (Knights and Miners, 2010), as exemplified with the mycophenolic acid glucuronidation catalyzed by the *UGT1A9* and *UGT2B7* isoenzymes (Picard *et al.*, 2005). Concerning transporters, among the SLC family, *SLC22A6* and *SLC22A8* were found as being the most expressed in renal tissue samples. These transporters are involved in the excretion of endogenous and exogenous compounds such as several drugs, in particular methotrexate, acyclovir and ganciclovir (Sweet, 2005). Concerning xenosensors, AhR signaling is activated by environmental hydrocarbons and dietary indole carbinols. In the kidney, this signaling pathway, by endogenous ligand or in a ligand-independent manner, plays a role in nephrogenesis (Falahatpisheh and Ramos, 2003). In our study, we found that *AHR* was highly expressed in renal tissue samples. Similarly, all *AhR* partners, namely *AIP*, *ARNT*, *HSP90AA*, *EP300*, *NCOA1*, *NCOA2*, *NCOA3*, *PTGES3* and *TRIP11* were also found highly expressed.

The second part of this study concerned the investigation of renal cell model metabolic capacities. Our results indicate significant differences in expression profile between immortalized renal cells, primary cultures and renal tissues. This can be explained by the kidney cell heterogeneity with for example at least 15 types of epithelial cells have been identified, with distinct morphology and physiological properties (Baer *et al.*, 1997). As renal cultures are representative of only one cell population, they display a larger part of non expressed genes compared to renal tissues. Nevertheless, culture models may be a valuable tool and have been proven to be useful for predicting xenobiotic-induced toxicity (Brown CD 2008, Lash *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2003). Our results indicated that, among the 15 most expressed genes in renal tissues, PT cells expressed 11 of them, *UGT2B7*, *AQP1*, *MT1F*, *ALDH6A1*, *MT1X*, *GLYAT*, *HSP90AA*, *ATP6V0C*, *UGT1A9*, *GGT1* and *AKR1A1* (**Table 4**). Globally, these data are consistent with the literature. Metallothioneins (MT), which are intracellular metal-binding proteins, are implicated in the protection of kidney by chelating some heavy metals, such as cadmium. Metallothioneins have also been shown to display antioxidant properties (Ogawa *et al.*, 2011; Somji *et al.*, 2004) and have been reported to be localized in proximal tubules (Mididoddi *et al.*, 1996). Furthermore, in PT cells, we noticed a high expression level of *UGT1A9*. In a previous report, UGT and GST activities have been reported to be stable in PT cells (Schaaf *et al.*, 2001). Not surprisingly, *AQP1* is highly expressed in PT cells and has been suggested to represent a marker of proximal tubular epithelial renal cells (Maunsbach *et al.*, 1997). Finally, although considered as a proximal tubular cell line, we were not able to detect mRNA level of *AQP1* in the immortalized HK2 cells. Although *CYP4A11* corresponds to the most abundant cytochrome P450 in renal tissues, we failed to detect it in any culture models. This result was confirmed at the protein level, with no expression in HK2, HEK293 and PT cells (Supplemental Material and Figure S1). Cummings *et al.* (2000)

demonstrated that expression of *CYP4A11* is lost after 4 days of culture but can be induced by specific xenobiotic exposures, as dexamethasone.

Previous works have led to the use of *in vitro* models for studying the renal capacity to process xenobiotic (Lash *et al.*, 2006, 2008). In our study, among all renal cell models, PT cells exhibited the closest expression profile to the renal tissue. In the different segments of the nephron, the proximal tubular cells are mainly exposed to xenobiotics and exhibit the highest transport activity (Schlatter *et al.*, 2006). In our study, the hierarchical cluster analyses indicate that primary cells cultures, either commercial or PT cells, share common expression patterns with renal tissues, especially when considering transporters. Interestingly, PT cells (compared to commercial cultures) display closer features to renal tissues. This difference may be explained by the purification method. Indeed, we have previously demonstrated that PT cells, sorted using a co-labeling for CD10 and CD13, two renal proximal tubular markers, constitute an homogenous population, whereas cells obtained with only either CD10 or CD13 express both distal and proximal markers. In addition, PT cells constitute a pure, functional and stable proximal tubular epithelial cell model (Van der Hauwaert *et al.*, 2013). By contrast, immortalized cell lines undergo dedifferentiation by losing their specific functions, such as their neo-glucogenic properties (Bens and Vandewalle, 2008). HEK293 cells appear to display the largest disparities in expression patterns with the renal tissue, compared to primary cultures or HK2 cells. This discrepancy is likely to be explained by the fact that although these cells were derived from human embryonic kidney, a previous report has shown that HEK293 cells express neurofilament proteins (Shaw *et al.*, 2002). Regarding commercial primary cultures, and especially HRPTEpiC, gene expression of these models differed considerably from that of the renal tissue. Nevertheless, these cultures display a less number of deregulated genes than immortalized cell lines. In addition, measurement of xenobiotic cytotoxic effect is likely to provide insight of renal cells injury, governed by both toxic and survival mechanisms and related to metabolism and cell disposition proteins. As exemplified with Tacrolimus disposition that depends on CYP3A4, CYP3A5, ABCB1 and PXR and that exerts *in situ* renal injury (Naesens *et al.*, 2009), PT cells were found to display the highest metabolism and disposition capacity as well as the highest viability. Thus, among the different cell model assessed in this study, PT cells appeared to be the most relevant *in vitro* model.

In conclusion, our study confirms that renal tissue exhibits a high ability to process xenobiotics by expressing a wide variety of genes involved in the metabolism and transport of xenobiotics. Secondly, among the different renal cell models tested, primary cultures of PT cells seem to be the most relevant experimental model since they exhibited the closest expression profile to the renal tissue. Therefore, this study suggests that PT cells could be used as a valuable tool for investigating the metabolism or bioactivation of drugs and toxicants.

Funding Information

This work was supported by the Conseil Régional du Nord Pas de Calais and the Institut de Recherche en Environnement Industriel.

Acknowledgements

We thank Julien DEROP and Anne ENGELS for their excellent technical contribution. We also acknowledge the Tumorothèque du Centre de Référence Régional en Cancérologie de Lille (Pr. COPIN).

References

- Aida, K., Ikegishi, Y., Chen, J., Tawata, M., Ito, S., Maeda, S., and Onaya, T. (2000). Disruption of aldose reductase gene (*Akr1b1*) causes defect in urinary concentrating ability and divalent cation homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 281-286.
- Alnouti, Y., and Klaassen, C.D. (2008). Tissue distribution, ontogeny, and regulation of aldehyde dehydrogenase (*Aldh*) enzymes mRNA by prototypical microsomal enzyme inducers in mice. *Toxicol. Sci.* **101**, 51-64.
- Baer, P.C., Nockher, W.A., Haase, W., and Scherberich, J.E. (1997). Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation. Technical note. *Kidney Int.* **52**, 1321-1331.
- Bellamine, A., Wang, Y., Waterman, M.R., Gainer, J.V. 3rd, Dawson, E.P., Brown, N.J., and Capdevila, J.H. (2003). Characterization of the CYP4A11 gene, a second CYP4A gene in humans. *Arch. Biochem. Biophys.* **409**, 221-227.
- Bens, M., and Vandewalle, A. (2008). Cell models for studying renal physiology. *Pflugers Arch.* **457**, 1-15.
- Bondy, C.A., Lightman, S.L., and Lightman, S.L. (1989). Developmental and physiological regulation of aldose reductase mRNA expression in renal medulla. *Mol. Endocrinol.* **3**, 1409-1416.
- Brown, C.D., Sayer, R., Windass, A.S., Haslam, I.S., De Broe, M.E., D'Haese, P.C., and Verhulst, A. (2008). Characterisation of human tubular cell monolayers as a model of proximal tubular xenobiotic handling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **233**, 428-438.
- Cummings, B.S., Lasker, J.M., and Lash, L.H. (2000). Expression of glutathione-dependent enzymes and cytochrome P450s in freshly isolated and primary cultures of proximal tubular cells from human kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**, 677-685.
- Ding, X., and Kaminsky, L.S. (2003) Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 149-173.
- Falahatpisheh, M.H., and Ramos, K.S. (2003). Ligand-activated Ahr signaling leads to disruption of nephrogenesis and altered Wilms' tumor suppressor mRNA splicing. *Oncogene.* **22**, 2160-2171.
- Garrett, S.H., Clarke, K., Sens, D.A., Deng, Y., Somji, S., and Zhang, K.K. (2013). Short and long term gene expression variation and networking in human proximal tubule cells when exposed to cadmium. *BMC Med. Genomics.* **6 Suppl 1**, S2.
- Gerloff, T. (2004). Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **369**, 69-77.
- Guo, L., Dial, S., Shi, L., Branham, W., Liu, J., Fang, J.L., Green, B., Deng, H., Kaput, J., and Ning, B. (2011). Similarities and Differences in the Expression of Drug-Metabolizing Enzymes between Human Hepatic Cell Lines and Primary Human Hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **39**, 528-538.
- Knights, K.M., and Miners, J.O. (2010). Renal UDP-glucuronosyltransferases and the glucuronidation of xenobiotics and endogenous mediators. *Drug Metab. Rev.* **42**, 63-73.
- Lash, L.H., Putt, D.A., and Cai, H. (2006). Membrane transport function in primary cultures of human proximal tubular cells. *Toxicology.* **228**, 200-218.

- Lash, L.H., Putt, D.A., and Cai, H. (2008). Drug metabolism enzyme expression and activity in primary cultures of human proximal tubular cells. *Toxicology*. **244**, 56-65.
- Lasker, J.M., Chen, W.B., Wolf, I., Blowski, B.P., Wilson, P.D., and Powell, P.K. (2000). Formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, a vasoactive and natriuretic eicosanoid, in human kidney. Role of Cyp4F2 and Cyp4A11. *J. Biol. Chem.* **275**, 4118-4126.
- Leclerc, J., Courcot-Ngoubo Ngangue, E., Cauffiez, C., Allorge, D., Pottier, N., Lafitte, J.J., Debaert, M., Jaillard, S., Broly, F., and Lo-Guidice, J.M. (2011). Xenobiotic metabolism and disposition in human lung: transcript profiling in non-tumoral and tumoral tissues. *Biochimie*. **93**, 1012-1027.
- Li, W., Choy, D.F., Lam, M.S., Morgan, T., Sullivan, M.E., and Post, J.M. (2003). Use of cultured cells of kidney origin to assess specific cytotoxic effects of nephrotoxins. *Toxicol. In Vitro*. **17**, 107-113.
- Livak, K., and Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. **25**, 402-408.
- Lohr, J.W., Willsky, G.R., and Acara, M.A. (1998). Renal drug metabolism. *Pharmacol. Rev.* **50**, 107-141.
- Maunsbach, A.B., Marples, D., Chin, E., Ning, G., Bondy, C., Agre, P., and Nielsen, S. (1997). Aquaporin-1 water channel expression in human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 1-14.
- McIlwain, C.C., Townsend, D.M., and Tew, K.D. (2006). Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene*. **25**, 1639-1648.
- Mididoddi, S., McGuirt, J.P., Sens, M.A., Todd, J.H., and Sens, D.A. (1996). Isoform-specific expression of metallothionein mRNA in the developing and adult human kidney. *Toxicol. Lett.* **85**, 17-27.
- Miyata, N., and Roman, R.J. (2005). Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in vascular system. *J. Smooth Muscle Res.* **41**, 175-193.
- Naesens, M., Kuypers, D.R., and Sarwal, M. (2009). Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2**, 481-508.
- Nakata, K., Tanaka, Y., Nakano, T., Adachi, T., Tanaka, H., Kaminuma, T., and Ishikawa, T. (2006). Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **21**, 437-457.
- Ogawa, D., Asanuma, M., Miyazaki, I., Tachibana, H., Wada, J., Sogawa, N., Sugaya, T., Kitamura, S., Maeshima, Y., Shikata, K., and Makino, H. (2011). High glucose increases metallothionein expression in renal proximal tubular epithelial cells. *Exp. Diabetes Res.* **2011**, 534872.
- Ohno, S., and Nakajin, S. (2008). Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab. Dispos.* **37**, 32-40.
- Perez, J.D., Colucci, J.A., Sakata, M.M., Cunha, T.S., Arita, D.Y., and Casarini, D.E. (2011). Proteomic approaches in understanding a detected relationship between chemotherapy-induced nephrotoxicity and cell respiration in HK-2 cells. *Nephron Physiol.* **119**, 1-10.
- Pfaller, W., and Gstraunthaler, G. (1998). Nephrotoxicity testing in vitro--what we know and what we need to know. *Environ. Health Perspect.* **106 Suppl 2**, 559-569.

- Picard, N., Ratanasavanh, D., Prémaud, A., Le Meur, Y., and Marquet, P. (2005). Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 139-146.
- Schaaf, G.J., de Groene, E.M., Maas, R.F., Commandeur, J.N., and Fink-Gremmels, J. (2001). Characterization of biotransformation enzyme activities in primary rat proximal tubular cells. *Chem. Biol. Interact.* **134**, 167-190.
- Schlatter, P., Gutmann, H., and Drewe, J. (2006). Primary porcine proximal tubular cells as a model for transepithelial drug transport in human kidney. *Eur. J. Pharm. Sci.* **28**, 141-154.
- Searchfield, L., Price, S.A., Betton, G., Jasani, B., Riccardi, D., and Griffiths, D.F. (2011). Glutathione S-transferases as molecular markers of tumour progression and prognosis in renal cell carcinoma. *Histopathology.* **58**, 180-190.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., and Graham, F.L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* **16**, 869-871.
- Sohn, S.J., Kim, S.Y., Kim, H.S., Chun, Y.J., Han, S.Y., Kim, S.H., and Moon, A. (2013). In vitro evaluation of biomarkers for cisplatin-induced nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells. *Toxicol. Lett.* **217**, 235-242.
- Somji, S., Garrett, S.H., Sens, M.A., Gurel, V., and Sens, D.A. (2004). Expression of metallothionein isoform 3 (MT-3) determines the choice between apoptotic or necrotic cell death in Cd²⁺-exposed human proximal tubule cells. *Toxicol. Sci.* **80**, 358-366.
- Sweet, D.H. (2005). Organic anion transporter (Slc22a) family members as mediators of toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **204**, 198-215.
- Van der Hauwaert, C., Savary, G., Gnemmi, V., Glowacki, F., Pottier, N., Bouillez, A., Maboudou, P., Zini, L., Leroy, X., Cauffiez, C., Perrais, M., and Aubert, S. (2013). Isolation and characterization of a primary proximal tubular epithelial cell model from human kidney by CD10/CD13 double labeling. *PLoS One.* **8**, e66750.
- Van Vleet, T.R., and Schnellmann, R.G. (2003). Toxic nephropathy: environmental chemicals. *Semin. Nephrol.* **23**, 500-508.

Supplemental Table 1. Expression levels of 377 genes involved in xenobiotic metabolism and disposition in renal tissues, renal primary cultures and renal cell lines.

Genes	Renal tissues										PT cells			Commercial primary cultures			Immortalized renal cells	
	RT1	RT2	RT3	RT4	RT5	RT6	RT7	RT8	PT cells 1	PT cells 2	HREpiC	HRCEpiC	HRPTEpiC	HK-2	HEK-293			
Phase I enzymes																		
<i>AADAC</i>	--	--	--	--	--	--	+	-	--	--	-	-	+	--	--			
<i>ABP1</i>	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+	--	-	-	-	-			
<i>ADH1A</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--			
<i>ADH1B</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	--	--	--	--	--			
<i>ADH1C</i>	++	++	+++	++	++	++	++	++	+	-	--	--	+	--	--			
<i>ADH4</i>	+	+	+	++	+	+	+	+	-	--	--	--	-	--	--			
<i>ADH5</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++			
<i>ADH6</i>	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	--	--	--	+	--	--			
<i>ADH7</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--			
<i>ADHFE1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	++	++	++	+	++			
<i>AKR1A1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
<i>AKR1B1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
<i>AKR1B10</i>	++	+	+	+	++	++	++	+	+	+	-	+	-	-	+			
<i>AKR1C1/2</i>	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+			
<i>AKR1C3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
<i>AKR1C4</i>	-	-	-	--	+	--	-	-	-	-	-	-	+	--	--			
<i>AKR1CL1</i>	++	++	++	+	++	++	+	+	-	-	--	--	--	--	--			
<i>AKR1D1</i>	--	--	--	--	--	-	--	--	-	-	-	-	-	-	-			
<i>AKR1E2</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	+	--	--			
<i>AKR7A2</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+++	+++			

Supplemental Figure S1

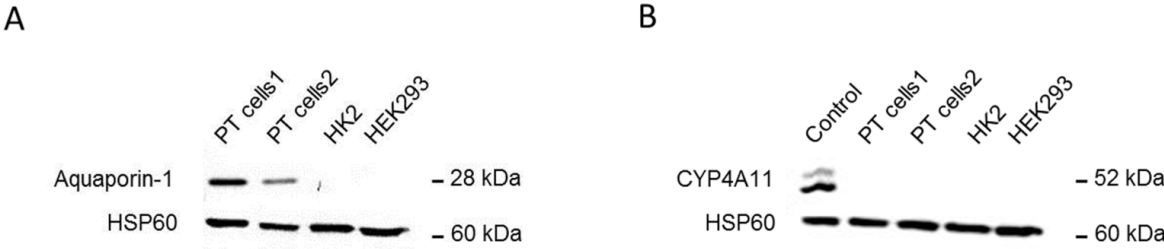


FIG S1. Expression of aquaporin-1 (AQP1) (A) and CYP4A11 (B) in PT cells, HK2 and HEK293 cells. Cortical renal tissue was used as positive control for CYP4A11.

Supplemental materials

Western blot

Cells were lysed using a 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate buffer containing protease inhibitors (Roche, Meylan, France) and were sonicated for 20 seconds.

Total proteins were separated by electrophoresis on a 4–12% BisTris NuPAGE gel (Invitrogen) and were transferred onto nitrocellulose membrane using the iBlot system (Invitrogen). Western blotting was performed by incubating nitrocellulose membranes with specific primary antibodies overnight at 4°C. The following antibodies were used against: aquaporin-1 (clone B11; Santa Cruz, 1:100), CYP4A11 (clone MP25-P2A10, Santa Cruz, 1:200) and Hsp60 (clone K19, Santa Cruz, 1:2000). Membranes were incubated with secondary anti-goat or anti-mouse antibodies coupled with horseradish peroxidase (Sigma Aldrich) for 45 minutes at room temperature. Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence using the Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) on a Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad).

II. Exposition au Tacrolimus : résultats préliminaires non publiés

1. Contexte

Les cultures cellulaires sont des modèles pertinents pour étudier des mécanismes toxicologiques. Ainsi, afin d'appréhender les effets néphrotoxiques du Tacrolimus, nous avons exposé au Tacrolimus des cultures primaires de CTP et des cellules HK2.

2. Matériel & Méthodes

a. Culture primaire de cellules tubulaires proximales (CTP)

Les échantillons utilisés proviennent de tissus non tumoraux prélevés sur des pièces opératoires de néphrectomie pour cancer du rein et des voies excrétrices. Dans le cadre de la Tumorothèque du CHRU de Lille (Pr. M.C. COPIN, Dr S. AUBERT), l'accord des patients a été obtenu afin d'utiliser les pièces opératoires dans le cadre de la recherche médicale. Les cellules ont été isolées comme décrit précédemment (Van der Hauwaert *et al.*, 2013). Les explants sont décapsulés et disséqués afin d'éliminer le maximum de vaisseaux sanguins et d'obtenir des fragments de 1 mm³. Les cellules sont ensuite isolées, par digestion enzymatique par la collagénase IV (Life Technologies) (2 mg/mL) et 20% de dispase (Becton Dickinson), dans 6 mL de milieu de culture complet : DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) / F12 (1:1) (Life Technologies) supplémenté avec 10 ng/mL d'EGF (Epidermal Growth Factor), 1% de Pénicilline / Streptomycine, 1% de L-Glutamine, 15 mM d'HEPES, 50 nM d'hydrocortisone, 5 µg/mL d'insuline, 5 µg/mL de transferrine et 50 nM de sodium sélénite. Les fragments sont incubés trois fois 30 min à 37°C sous agitation, avec une étape intermédiaire de filtration sur filtre de 70 µm entre chaque incubation. La suspension cellulaire obtenue est centrifugée 5 min à 300 g et est rincée deux fois avec du PBS (Phosphate Buffer Saline). Les cellules sont ensuite mises en culture en atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ à 37°C. Le milieu est changé après 24 heures de culture afin d'éliminer les débris cellulaires et les cellules non adhérentes.

Le tri cellulaire s'effectue par cytométrie en flux (FACS (Fluorescence Activating Cell Sorting)) sur le trieur Epic Altra (Beckman Coulter) (Plateforme de cytométrie et de tri cellulaire, IFR 114, IMPRT). Les cellules sont récupérées à confluence et décollées à la trypsine-EDTA (Trypsine 0,05%, EDTA 0,5 mM). 10⁶ cellules sont ensuite marquées avec des anticorps couplés à des fluorochromes : anticorps anti-CD10 humain (Souris IgG2b) couplé à l'allophycocyanine (excitation : 633 nm, émission : 660 nm) et anti-CD13 humain (Souris IgG1) couplé à la phycoérythrine (excitation : 488 nm, émission : 576 nm) (eBioscience), qui sont des marqueurs spécifiques des cellules épithéliales

tubulaires proximales rénales. Les cellules sont ensuite incubées 30 min à 4°C et à l'abri de la lumière dans 100 µL de milieu avec les anticorps selon les concentrations décrites par le fournisseur. Les témoins isotypiques et sans anticorps sont réalisés dans les mêmes conditions. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS et remises en suspension dans 2 mL de milieu complet sans EGF avec 0,5 mM d'EDTA. Suite au tri, les cellules doubles positives sont récupérées dans du milieu complet.

b. Culture de la lignée HK2

La lignée cellulaire HK2 de cellules tubulaires proximales (American Type Culture Collection) sont cultivées dans du milieu Keratinocyte Serum-Free (K-SFM, Life Technologies) supplémenté avec 0,05 mg/mL de BPE (Bovine Pituitary Extract), 5 ng/mL d'EGF, 1% de L-Glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine, en atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ à 37°C.

c. Viabilité cellulaire

Les cellules, à confluence, sont exposées, pendant 24 heures, à une gamme croissante de Tacrolimus (0 µM à 200 µM) (Sigma-Aldrich) dissout dans de l'éthanol. La viabilité des cellules est mesurée grâce au kit commercial CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability (Promega) suivant les recommandations du fournisseur.

d. Exposition au Tacrolimus

Les cellules, à confluence, sont exposées pendant 24 heures à une concentration de Tacrolimus correspondant à la DL10 (Dose Létale 10%).

e. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux (ARNt) des cellules sont extraits à l'aide du kit miRNeasy® Mini (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. La quantification des ARNt est réalisée par dosage spectrophotométrique à l'aide d'un BioSpecnano (Schimadzu).

f. Rétro-transcription des miARN

La rétro-transcription est réalisée sur un volume final de 15 µL, à partir de 5 ng d'ARN, à l'aide du kit TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) et la sonde spécifique TaqMan microRNA Assay miR-21 (Hsa-miR-21, Assay ID397) (Life Technologies). La sonde U6-sno RNA (U6-snrRNA, Assay ID1973) (Life Technologies) est utilisée comme référence.

g. PCR en temps réel des miARN

La PCR en temps réel est réalisée en chimie TaqMan avec 1,4 µL de produits de RT. Le mélange réactionnel est réalisé sur un volume final de 20 µL contenant du TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Life Technologies) et les amorces spécifiques des miARN. La réaction d'amplification est réalisée sur l'appareil StepOne Plus Real Time PCR System (Life Technologies). La quantification du nombre de copies d'ARN contenues dans les échantillons est basée sur la méthode comparative des Ct (Cycle Threshold, cycle seuil) ; le Ct correspondant au nombre de cycles nécessaires pour obtenir un signal de fluorescence significativement différent du bruit de fond. Le nombre de transcrits est normalisé par rapport au miARN de référence ($\Delta Ct = Ct_{\text{miARN intérêt}} - Ct_{\text{miARN de référence (SNO-251)}}$). La relation mathématique $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dans laquelle $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon cible}} - \Delta Ct_{\text{échantillon de référence}}$, permet d'exprimer le facteur d'expression relatif RQ (Relative Quantification) d'un échantillon (Livak & Schmittgen, 2001).

h. Rétro-transcription des ARNm

La rétro-transcription est réalisée sur 1 µg d'ARNt à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies) selon les recommandations du fournisseur dans un volume final de 15 µL.

i. PCR en temps réel des ARNm

La PCR en temps réel est réalisée en chimie TaqMan à partir de 1 µL de cDNA dans du tampon TaqMan Universal Master Mix, II no UNG avec les sondes TaqMan spécifiques de l' α -SMA (ACTA2, Hs00426835_g1), de la fibronectine (FN1, Hs00305052_m1), de PAI-1 (PAI1, Hs01126607_g1) et de la vimentine (VIM, Hs00185584_m1) (Life Technologies). Le gène de référence utilisé est la cyclophiline A (PPIA, Hs99999904_m1) (Life Technologies). Les niveaux d'expression sont exprimés en utilisant la méthode de quantification relative (RQ) et la relation mathématique $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

j. Statistiques

Les résultats expérimentaux sont exprimés en moyenne \pm SEM (Standard Error of the Mean). La significativité entre les différents groupes expérimentaux est évaluée à l'aide d'un test t de Student. Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel SPSS Statistics 20® (SPSS Inc.). Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme significative.

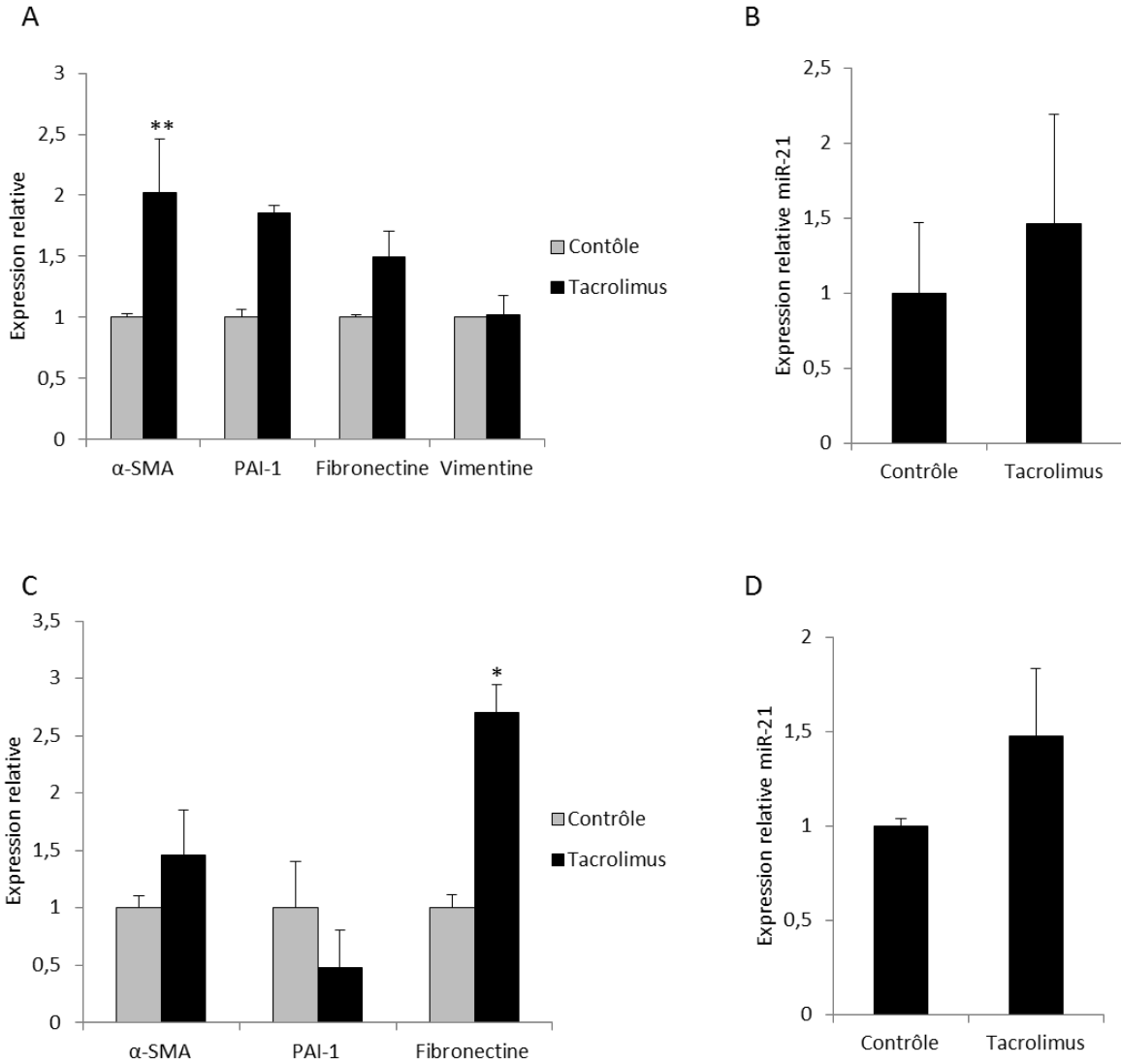


Figure 23. Expression de l' α -SMA, PAI-1, de la fibronectine et de la vimentine (A,C) et de miR-21 (B,D) après exposition pendant 24h au Tacrolimus des cellules HK2 (A,B) et des CTP (C,D). Le contrôle endogène utilisé est PPIA pour les ARNm et Sno-251 pour miR-21. Résultats exprimés en expression relative \pm SEM. ** : $p < 0,01$.

3. Résultats

La toxicité du Tacrolimus a été évaluée sur la lignée de cellules tubulaires proximales HK2 et sur des cultures primaires de CTP. La DL50 est de $184 \pm 29 \mu\text{M}$ pour les CTP et $51 \pm 1 \mu\text{M}$ pour les HK2 (**Article 2**).

Nous avons ensuite comparé les effets du Tacrolimus administré à la DL10 sur l'expression de protéines impliquées dans le processus de fibrose et du miARN profibrotique miR-21 dans les cellules HK2 et dans les CTP. Les cellules exposées au Tacrolimus perdent leur morphologie cubique et acquièrent une morphologie plus allongée, suggérant un changement phénotypique. De plus, nos résultats indiquent que l'exposition au Tacrolimus induit l'augmentation de l'expression de l' α -SMA dans les HK2 (**Figure 23A**) et de la fibronectine dans les CTP (**Figure 23C**). En revanche, nous n'observons pas de différence dans l'expression de miR-21 après exposition au Tacrolimus dans les HK2 et les CTP (**Figure 23B,D**). Ces résultats, bien que préliminaires, indiquent que le Tacrolimus semble induire un stimulus pro-fibrosant et une reconversion phénotypique des cellules épithéliales. De plus, après exposition au Tacrolimus, miR-21 semble être surexprimé, même si les résultats ne sont pas significatifs. Au total, ces résultats, obtenus dans un faible nombre d'expositions (n=2), devraient être confirmés.

Axe II. Modèle murin de néphrotoxicité induite par le Tacrolimus

I. Contexte

Les résultats préliminaires obtenus *in vitro* sur des cultures primaires de CTP et la lignée HK2 nous ont permis d'observer que l'exposition au Tacrolimus induit un changement morphologique des cellules ainsi que l'expression de marqueurs de fibrose et de TEM. Cependant, les modèles cellulaires ne permettent pas de refléter de manière exhaustive les phénomènes de toxicité *in situ*. En effet, le rein présente une grande hétérogénéité cellulaire et à titre d'exemple, environ 15 types de cellules épithéliales ont été décrites (Helbert *et al.*, 1997). L'utilisation d'un modèle animal apparaît ainsi nécessaire afin de mettre en évidence les mécanismes moléculaires à l'origine des phénomènes de néphrotoxicité. Pour cela, nous avons choisi de réaliser une étude pilote en utilisant des souris CD-1, sensibles aux agressions rénales (Leelahavanichkul *et al.*, 2010). De même, les souris ont bénéficié d'une alimentation hyposodée (0,01% Na⁺) afin d'exacerber les lésions rénales, par suractivation du système rénine-angiotensine-aldostérone (Elzinga *et al.*, 1993)

II. Matériel & Méthodes

1. Modèle d'exposition

Une étude pilote a été réalisée sur trois groupes des souris mâles CD-1 âgées de 4 semaines au début du protocole. Le protocole expérimental a été soumis et approuvé par le comité d'éthique local. Trois groupes d'animaux sont constitués par tirage au sort :

- Groupe contrôle sous alimentation standard normosodée
- Groupe contrôle sous alimentation hyposodée (0,01% NaCl, Harlan Laboratories)
- Groupe exposé au Tacrolimus (1 mg/kg/j) par implantation sous-cutanée d'une pompe osmotique Alzet® (Alzet) et sous alimentation hyposodée.

Les animaux bénéficient d'une semaine d'acclimatation à leur arrivée. Le régime alimentaire des souris sous alimentation hyposodée est changé une semaine avant le début de l'expérimentation. Des pesées sont effectuées régulièrement. Après 4 semaines d'exposition, les

souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et les reins sont prélevés, avec un rein conservé dans du RNAlater® Solution (Ambion) et un rein fixé dans du formol 10% pour être inclus en paraffine.

2. Créatininémie

Le prélèvement de sang, à J14, est réalisé au niveau du sinus rétro-orbital sur tube hépariné. Après préparation du plasma, la créatininémie est mesurée, par test enzymatique, sur un automate AU480 Chemistry Analyzer (Beckman Coulter) (Service de Toxicologie, Pôle de Biologie Pathologie Génétique, CHRU Lille).

3. Colorations histologiques

Des coupes de 3 µm d'épaisseur sont réalisées à partir des reins inclus en paraffine. Après déparaffinage au xylène et réhydratation par un gradient décroissant d'éthanol, les lames sont colorées au Rouge Sirius et à l'Hématoxyline Eosine (Service Commun d'Histologie, Faculté de Médecine-Pôle Recherche).

4. Immunohistochimie

Après déparaffinage au xylène et réhydratation par un gradient décroissant d'éthanol, les lames sont rincées au PBS (Phosphate Buffer Saline), et les sites antigéniques de la coupe sont démasqués en utilisant un tampon citrate pH 6,0 Target Retrieval (DAKO), chauffé dans un four à micro-ondes pendant 20 min. Les lames sont rincées au TBS (Tris buffer saline)-peroxyde d'hydrogène à 3% pendant 15 min, bloquées avec de l'Avidine/Biotine (Vector Laboratories) et du TBS-5% sérum de chèvre puis incubées avec les anticorps primaires suivants : anti-vimentine (EPR3776, 1:200, Abcam) et anti- α -SMA (polyclonal, 1:500, Abcam) pendant 1h à température ambiante. Les lames sont incubées avec un anticorps secondaire biotinylé (Vector Laboratories) pendant 30 min. Le marquage est ensuite réalisé grâce au DAB substrate system (Sigma-Aldrich). Après contre-coloration au Fas-Red (Sigma-Aldrich), les lames sont déshydratées par un gradient croissant d'éthanol et du xylène. Le contrôle négatif est réalisé sans incubation avec l'anticorps primaire.

5. Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* de miR-21 a été réalisée en utilisant la sonde doublement marquée en 5' et 3' DIG-labeled LNA (Digoxigenin, Locked Nucleic Acid) (Exiqon). Les coupes de reins de souris inclus en paraffine sont déparaffinées au xylène et réhydratées par un gradient décroissant d'éthanol. Les

coupes, après rinçage au PBS, pH 7,5, sont perméabilisées à la pepsine 1,25 mg/mL pendant 20 min à température ambiante. La sonde 5' et 3' DIG-labeled LNA est ensuite incubée à une concentration de 100 nM durant 2h à 42°C en chambre humide. Les coupes sont rincées dans du tampon SSC 5X (Saline Sodium Citrate), 1X puis 0,2X dans les mêmes conditions de température et d'humidité que précédemment. Le blocage des sites non spécifiques et le marquage des sondes 5' et 3' DIG-labeled LNA se fait grâce à une incubation de 2 heures à température ambiante à l'aide d'une solution de sérum de mouton à 2% contenant 2 mg/L de BSA, dans du PBS Tween 20 à 0,1% ainsi que des fragments FAB anti-DIG conjugué à la phosphatase alcaline (1/1800) (Roche Applied Science). La révélation est réalisée par une incubation dans une solution de 5-bromo-4-chloro-3-indyl phosphate et de nitrobluetetrazolium (Roche Applied Science) contenant 1 mM de levamisole durant une nuit à température ambiante. La réaction de coloration est stoppée avec du PBS Tween 20-0,1%. Les coupes sont contre-colorées au Fas-Red.

6. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux (ARNt) sont extraits des tissus à l'aide du kit miRNeasy® Mini (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. La quantification des ARNt est réalisée par dosage spectrophotométrique à l'aide d'un BioSpecnano (Schimadzu).

7. Rétro-transcription des miARN

La rétro-transcription est réalisée sur un volume final de 15 µL, à partir de 5 ng d'ARN, à l'aide du kit TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) et la sonde spécifique TaqMan microRNA Assay miR-21 (Hsa-miR-21, Assay ID397) (Life Technologies). La sonde SNO-251 (Mm-snoRNA-251, Assay ID1236) (Life Technologies) est utilisée comme référence.

8. PCR en temps réel des miARN

La PCR en temps réel est réalisée en chimie TaqMan avec 1,4 µL de produits de RT. Le mélange réactionnel est réalisé sur un volume final de 20 µL contenant du TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Life Technologies) et les amorces spécifiques des miARN. La réaction d'amplification est réalisée sur l'appareil StepOne Plus Real Time PCR System (Life Technologies). La quantification du nombre de copies d'ARN contenues dans les échantillons est basée sur la méthode comparative des Ct (Cycle Threshold, cycle seuil) ; le Ct correspondant au nombre de cycles nécessaires pour obtenir un signal de fluorescence significativement différent du bruit de fond. Le nombre de transcrits est normalisé par rapport au miARN de référence ($\Delta Ct = Ct_{\text{miARN intérêt}} - Ct_{\text{miARN de référence (SNO-}}$

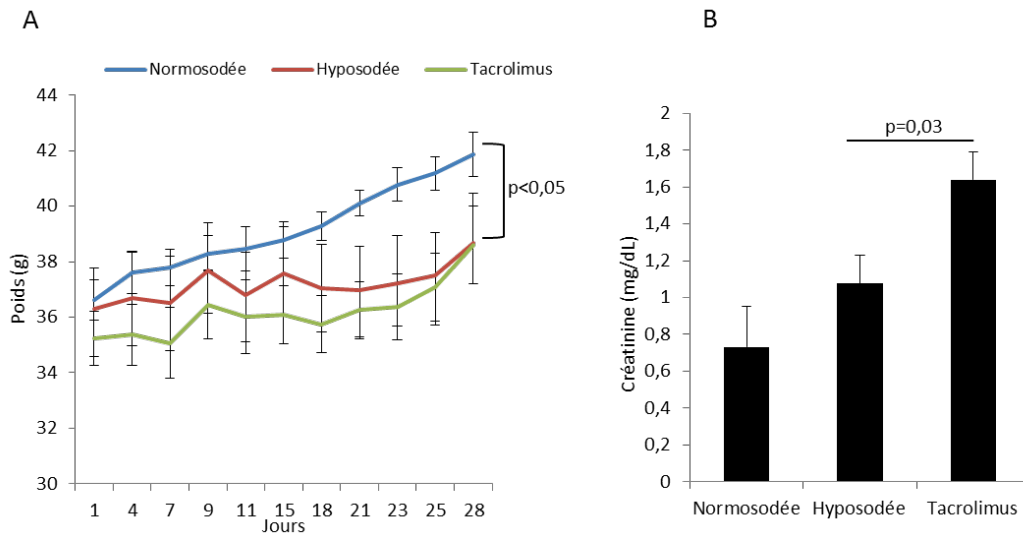


Figure 24. Evolution du poids des souris au cours du temps (A) et mesure de la créatinine plasmatique après 14 jours d'exposition (B). Données exprimées en moyenne \pm SEM (n=5).

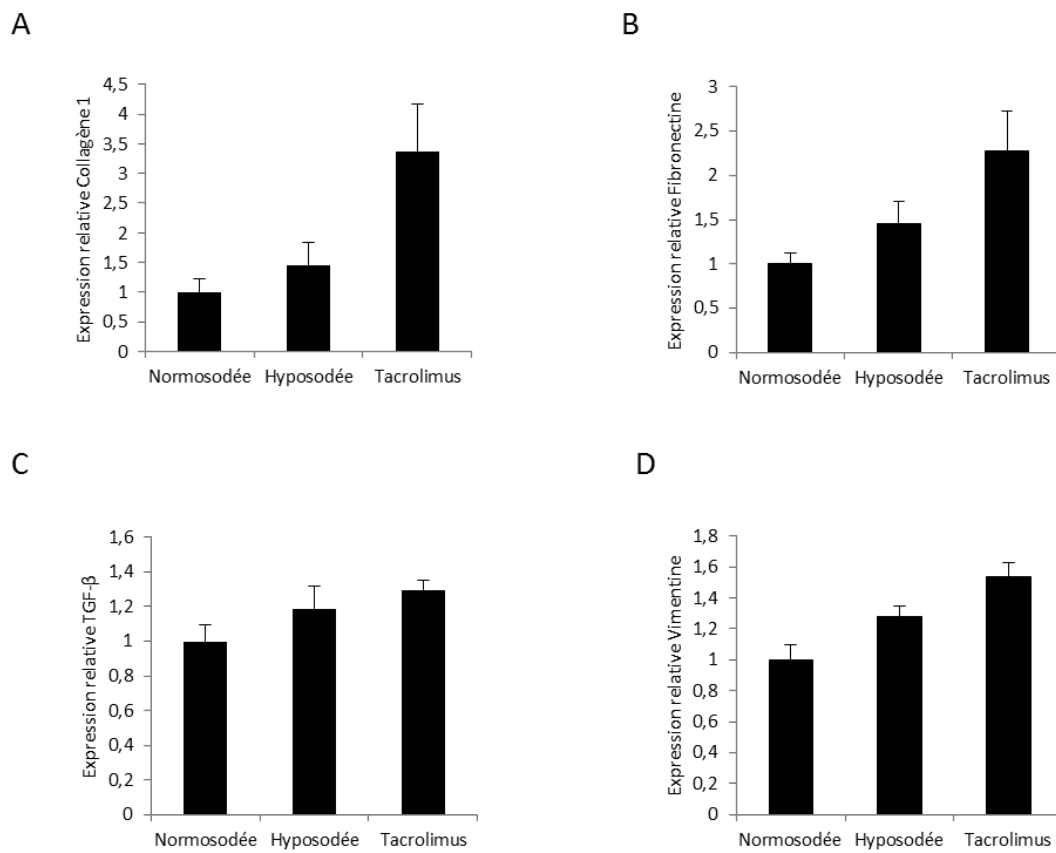


Figure 25. Expression du collagène I (A), de la fibronectine (B), du TGF-β1 (C) et de la vimentine (D). Le contrôle endogène utilisé est PPIA. Résultats exprimés en expression relative \pm SEM (n=5).

251)). La relation mathématique $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dans laquelle $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon cible}} - \Delta Ct_{\text{échantillon de référence}}$, permet d'exprimer le facteur d'expression relatif RQ (Relative Quantification) d'un échantillon (Livak & Schmittgen, 2001).

9. Rétro-transcription des ARNm

La rétro-transcription est réalisée sur 1 µg d'ARNt à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies) selon les recommandations du fournisseur dans un volume final de 15 µL.

10. PCR en temps réel des ARNm

La PCR en temps réel est réalisée en chimie TaqMan à partir de 1 µL de cDNA dans du tampon TaqMan Universal Master Mix, II no UNG avec les sondes TaqMan spécifiques du collagène I (COL1A1, Mm00801666_g1), de la fibronectine (FN1, Mm01256744_m1), du TGF-β1 (TFGB1, Mm00441724_m1) et de la vimentine (VIM, Mm01333430_m1) (Life Technologies). Le gène de référence utilisé est la cyclophiline A (PPIA, Mm03302254_g1) (Life Technologies). Les niveaux d'expression sont exprimés en utilisant la méthode de quantification relative (RQ) et la relation mathématique $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

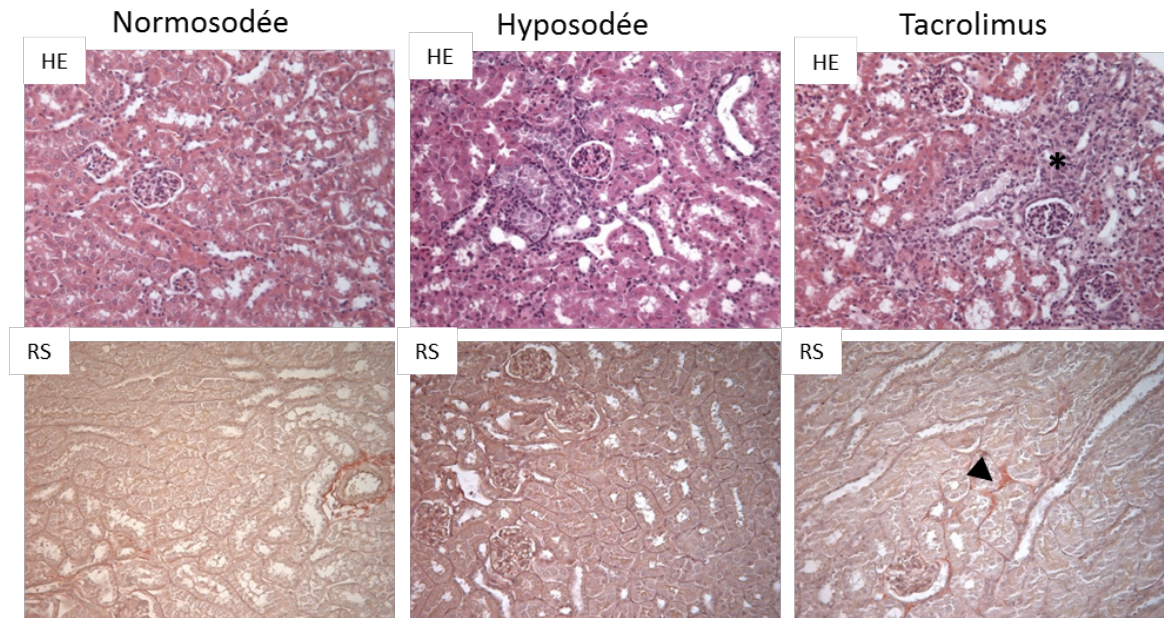
11. Statistiques

Les résultats expérimentaux sont exprimés en moyenne \pm SEM (Standard Error of the Mean). La significativité entre les différents groupes expérimentaux est évaluée à l'aide d'un test t de Student ou d'un test non paramétrique de Kruskal Wallis ou de Mann-Whitney. Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel SPSS Statistics 20® (SPSS Inc.). Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme significative.

III. Résultats et Discussion

Les souris sous alimentation hyposodée, exposées ou non au Tacrolimus, ont une évolution de poids comparable. Par contre, une différence significative est observée entre le groupe sous alimentation normosodée et les groupes sous alimentation hyposodée ($p < 0,05$) (**Figure 24A**). Les souris sous Tacrolimus ont une créatinémie significativement plus élevée à J14 de 1,64 mg/dL par rapport aux souris contrôles sous alimentation hyposodée (1,08 mg/dL ; $p < 0,05$). Nous n'avons pas observé de différence de créatinémie entre les deux groupes contrôles (**Figure 24B**).

A



B

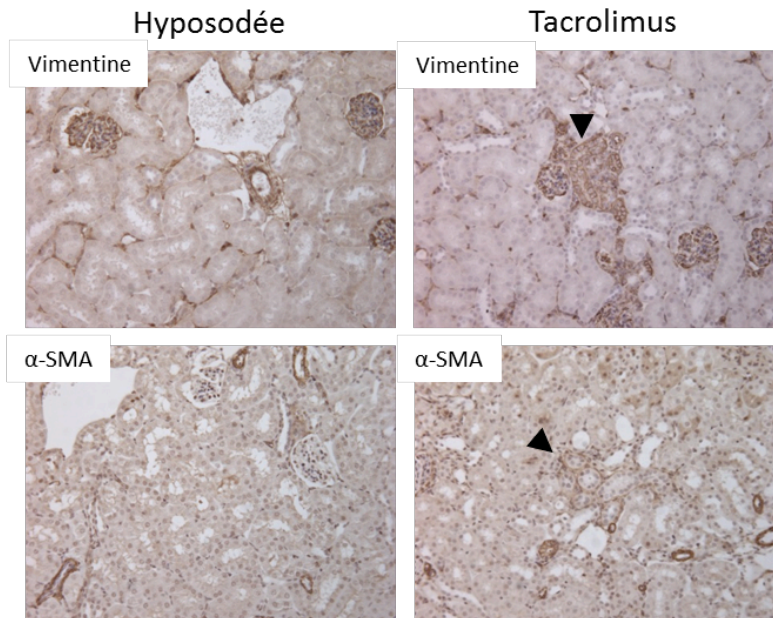
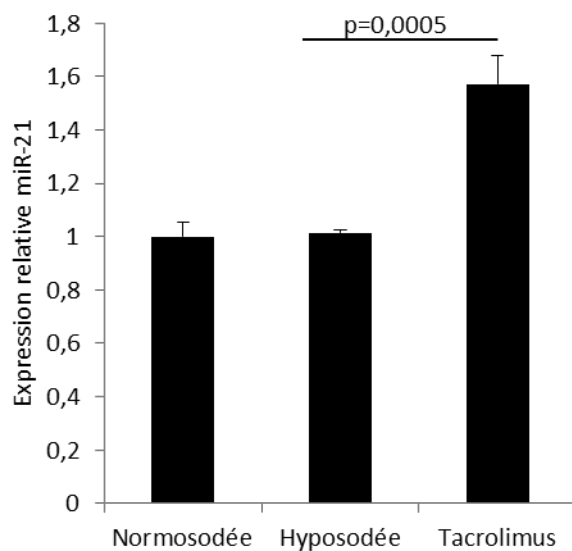


Figure 26. Aspect histologique des reins de souris contrôles sous alimentation normosodée, de souris contrôles sous alimentation hyposodée ou exposées au Tacrolimus. (A) Colorations histologiques à l'Hématoxyline Eosine (HE) et au Rouge Sirius (RS). (B) Expression de la vimentine et de l' α -SMA sur les coupes de reins par immunohistochimie. L'étoile montre une zone de basophilie. Les têtes de flèche indiquent des dépôts de collagène, des tubules proximaux exprimant la vimentine *de novo*, et l'expression de α -SMA dans l'interstitium. Grossissement : x200.

Par ailleurs, nous avons mesuré l'expression de marqueurs de fibrose (collagène I, fibronectine, TGF- β) et de TEM (Vimentine). Aucune différence significative n'a été observée entre les souris contrôles et les souris sous Tacrolimus (**Figure 25**). En revanche, les coupes colorées à l'Hématoxyline Eosine indiquent que les cytoplasmes des cellules épithéliales tubulaires des reins de souris sous Tacrolimus ont un aspect plus basophile (**Figure 26A**). Ce phénomène pourrait s'expliquer par une augmentation de la synthèse d'ARN initiée par un processus de régénération cellulaire. De plus, les reins de souris du groupe Tacrolimus présentent quelques dépôts de collagène (**Figure 26A**). Par ailleurs, nous observons une expression *de novo* de la vimentine dans certains tubes proximaux sur les coupes de reins de souris exposées au Tacrolimus (**Figure 26B**), compatible avec l'induction d'un processus de TEM ou de pseudo-TEM (Liu, 2010). Les coupes de reins de souris exposées au Tacrolimus présentent des zones d'expression de α -SMA, un marqueur des myofibroblastes (**Figure 26B**). Les myofibroblastes jouent un rôle important dans le processus de fibrose en sécrétant de nombreux composants de la MEC, tels que le collagène I ou la fibronectine (Liu, 2011 ; Grgic *et al.*, 2012). Dans des modèles murins de fibrose rénale, l'expression de l' α -SMA est augmentée de manière significative (Huang *et al.*, 2008 ; Morizane *et al.*, 2014). α -SMA est également fortement exprimée dans des tissus rénaux humains fibrosés (Rastaldi *et al.*, 2002 ; Vongwiwatana *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'expression interstitielle de α -SMA est un facteur pronostique de la dysfonction chronique du greffon (Badid *et al.*, 2002). Dans notre modèle murin d'exposition au Tacrolimus, les zones d'expression de l' α -SMA restent limitées, expliquant ainsi le fait que nous n'observons que quelques dépôts de collagène. La vimentine est un marqueur de cellules mésenchymateuses et son expression dans les cellules épithéliales est observée *in vivo* à la fois dans des modèles animaux et dans des biopsies de reins avec des lésions de fibrose (Essawy *et al.*, 1997 ; Rastaldi *et al.*, 2002). De par l'expression *de novo* de la vimentine dans les tubules proximaux des reins de souris exposées au Tacrolimus, nos résultats suggèrent que le Tacrolimus pourrait induire une TEM des cellules épithéliales tubulaires proximales, en accord avec les données de la littérature (Djama *et al.*, 2005 ; Galichon *et al.*, 2011).

Parallèlement à ces résultats, l'expression de miR-21, significativement augmentée chez les souris sous Tacrolimus (1,6 vs 1 ; p=0,0005), semble être localisée au niveau des tubules et dans le compartiment interstitiel (**Figure 27**). Ainsi, miR-21 pourrait être impliqué dans la fibrose induite par le Tacrolimus. En effet, l'expression de miR-21 est augmentée dans des modèles murins de fibrose rénale par OUU (Zarjou *et al.*, 2011, Chau *et al.*, 2012 ; Chung *et al.*, 2013) et chez l'homme dans les tissus rénaux fibrosés (Glowacki *et al.*, 2013).

A



B

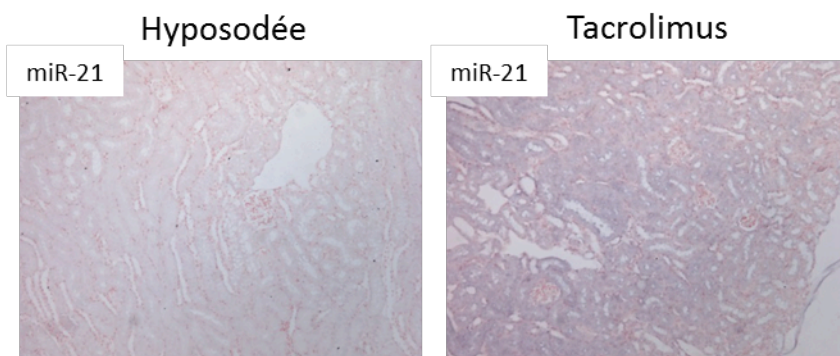


Figure 27. Expression de miR-21 dans les reins de souris. (A) Mesure de l'expression de miR-21 dans les reins de souris contrôles sous alimentation normosodée, de souris contrôles sous alimentation hyposodée et de souris exposées au Tacrolimus. Le contrôle endogène utilisé est Sno-251. (B) Hybridation *in situ* de miR-21 sur des reins de souris contrôles sous alimentation hyposodée et sur des reins de souris exposées au Tacrolimus. Grossissement : x200.

Toutefois, même si nos travaux ont révélé la présence de zones de fibrose dans les reins de souris exposées au Tacrolimus, celles-ci restent limitées. Plusieurs auteurs se sont intéressés à la néphrotoxicité des ACN dans des modèles animaux mais les études restent hétérogènes quant aux animaux utilisés, au mode d'administration du Tacrolimus ou de la Cyclosporine, l'alimentation ou encore la durée d'expérimentation. Ainsi, certains travaux ont montré que les ACN induisaient des lésions de fibrose (Piao *et al.*, 2012 ; O'Connell *et al.*, 2011 ; Shihab *et al.*, 1997), à l'inverse d'autres études (Nielsen *et al.*, 2003).

Au total, ces données n'ont été générées qu'à partir de peu de souris (n=5) et la dose de Tacrolimus n'a pu être maîtrisée en raison de la prise de poids des animaux. Ainsi, la suite des travaux sur le modèle murin s'est établie sur un nouveau protocole d'exposition par injection intrapéritonéale des souris au Tacrolimus. Au cours de ce protocole, afin d'exacerber les lésions de fibrose rénale, l'exposition au Tacrolimus sera combinée à une deuxième agression des cellules rénales, secondaire à la réalisation d'une ischémie-reperfusion du rein (**Figure 28**).

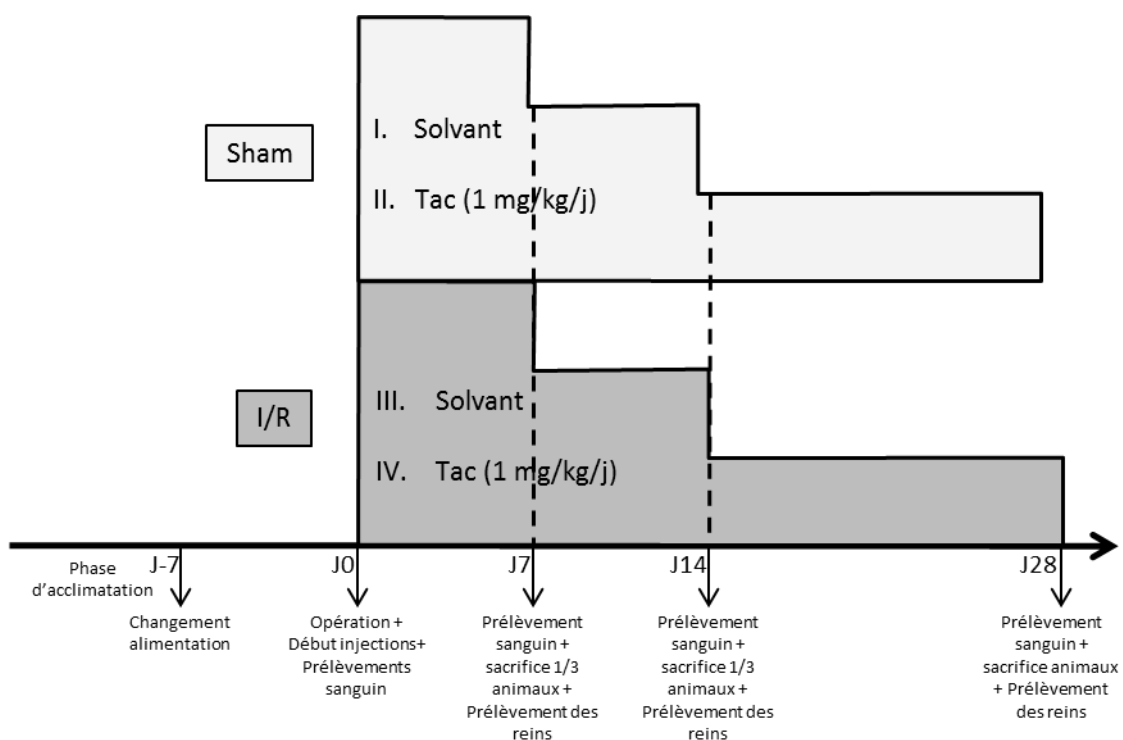


Figure 28. Protocole expérimental d'exposition des souris au Tacrolimus. Les souris seront exposées au Tacrolimus à une dose de 1 mg/kg/j par administration intrapéritonéale. Afin d'exacerber les lésions de fibrose rénale, l'exposition au Tacrolimus sera combinée à une deuxième agression cellulaire, l'ischémie-reperfusion (I/R).

Axe III. Etude clinique de la néphrotoxicité induite par le Tacrolimus

I. Impact des polymorphismes génétiques de *CYP3A5* et de *ABCB1* sur la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Article 3)

Bien qu'il ait été montré que la Cyclosporine induit une TEM en transplantation rénale (Hazzan *et al.*, 2011), l'implication du Tacrolimus dans les phénomènes de TEM n'a pas encore été évaluée. Le but de cette étude était d'explorer le lien entre l'exposition au Tacrolimus, le phénomène de TEM et la présence de SNP affectant les gènes *CYP3A5* et *ABCB1*, impliqués dans le métabolisme et le transport du Tacrolimus. Cette étude est basée sur une cohorte de 140 patients transplantés rénaux sous Tacrolimus pour lesquels nous disposons des données cliniques, de l'ADN génomique du receveur et du donneur ainsi que des biopsies protocolaires réalisées 3 mois après greffe. Dans un premier temps, cette étude a confirmé que les receveurs sous Tacrolimus porteurs d'au moins un allèle *CYP3A5* 6986A (*CYP3A5**1) nécessitent, quelque soit le moment de la greffe, des posologies plus élevées. Malgré ces doses, leur taux résiduel de Tacrolimus (C_0) reste plus faible. En ce qui concerne le devenir du greffon, le polymorphisme génétique du *CYP3A5* du receveur ou du donneur n'est statistiquement pas associé à la fonction rénale à 2 ans. De plus, l'intensité de deux marqueurs mésenchymateux de TEM, la vimentine et la β -caténine nucléaire, est statistiquement corrélée à l'importance de la fibrose interstitielle. Par contre, nous n'avons pas mis en évidence de lien entre l'exposition systémique au Tacrolimus et l'intensité des marqueurs de TEM, ni entre les marqueurs de TEM à 3 mois de greffe et la fonction rénale jusqu'à 2 ans après transplantation. Cependant, de façon intéressante, nous avons observé que les greffons qui ne développent pas de lésions de TEM sont plus fréquemment porteurs d'un allèle *CYP3A5**1. De plus, le SNP *ABCB1* 3435C>T affectant le gène *ABCB1* est associé à une plus faible expression des marqueurs de TEM. Bien que préliminaires, ces résultats suggèrent que l'étude du patrimoine génétique du donneur, en complément de l'utilisation de marqueurs histologiques de néphrotoxicité, pourrait améliorer la prise en charge des patients transplantés rénaux.

Article 3.

Donor ABCB1 genetic polymorphisms influence epithelial-to-mesenchyme transition in Tacrolimus-treated kidney recipients

Julie Bloch, Marc Hazzan, Cynthia Van der Hauwaert, David Buob, Grégoire Savary, Alexandre Hertig, Viviane Gnemmi, Marie Frimat, Michaël Perrais, Marie-Christine Copin, Franck Broly, Christian Noël, Nicolas Pottier, Christelle Cauffiez, François Glowacki

Soumis.

Donor *ABCB1* genetic polymorphisms influence epithelial-to-mesenchyme transition in Tacrolimus-treated kidney recipients

Julie Bloch^{1,2}, Marc Hazzan², Cynthia Van der Hauwaert¹, David Buob³, Grégoire Savary¹, Alexandre Hertig⁴, Viviane Gnemmi³, Marie Frimat², Michaël Perrais⁵, Marie-Christine Copin³, Franck Broly¹, Christian Noël², Nicolas Pottier¹, Christelle Cauffiez^{1*}, François Glowacki^{1,2*}

¹ EA4483, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine H Warembourg, Pôle Recherche, Lille, France

² Service de Néphrologie, Hôpital Huriez, CHRU, Lille, France

³ Institut de Pathologie, Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHRU, Lille, France

⁴ Urgences Néphrologiques et Transplantation Rénale, Hôpital Tenon, AP-HP, Paris, France

⁵ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U837, Jean-Pierre Aubert Research Center, Equipe 5 «Mucines, Différenciation et Cancérogenèse Épithéliales», Lille, France

* : These authors contributed equally to this work.

Editorial correspondence should be addressed to:

Dr. Christelle Cauffiez

EA4483, Faculté de Médecine, Pôle Recherche

1 place de Verdun, 59045 Lille cedex

Phone number : 00 33 3 20 62 68 20 ; Fax number : 00 33 3 20 62 68 91

Email: christelle.cauffiez@univ-lille2.fr

Abstract

Aim: The contribution of epithelial-mesenchymal transition (EMT) has been suggested in renal transplant recipients receiving calcineurin inhibitors and developing nephrotoxicity. **Methods:** We assessed whether inter-individual variability in Tacrolimus pharmacokinetics is associated with the occurrence in tubular cells of two EMT markers (vimentin, β -catenin) detected at 3-month in 140 allograft biopsies. We investigated whether genetic polymorphisms affecting CYP3A5 and ABCB1 influence EMT and kidney fibrosis. **Results:** The donor *CYP3A5*1* allele was significantly associated with a lower vimentin expression. Grafts carrying *ABCB1* 3435T allele(s) developed significantly less EMT and less interstitial fibrosis. **Conclusions:** Donor SNPs significantly influence the epithelial program in the context of kidney transplantation, and the epithelial metabolism of Tacrolimus is one key to understand graft fibrogenesis.

Keywords

Fibrosis, epithelial-mesenchymal transition, Tacrolimus, ABCB1, CYP3A5

Introduction

Chronic allograft dysfunction (CAD) represents the leading cause of late allograft failure in renal transplant recipients and is associated with glomerular sclerosis, progressive interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) [1,2]. Both allo-antigen-dependent and -independent factors, such as calcineurin inhibitors (CNI) nephrotoxicity, have been reported to induce CAD [3]. In particular, chronic use of CNI has been shown to be associated with IF/TA promoting and worsening in longitudinal studies [3,4]. Among the mechanisms responsible for the development of kidney fibrosis, the contribution of epithelial-mesenchymal transition (EMT) has been suggested [5.] EMT is a dynamic biological process by which a polarized epithelial cell that normally interacts with basement membrane, loses its epithelial traits and acquires a mesenchymal phenotype [6], with the progressive loss of epithelial markers and *de novo* expression of mesenchymal markers. In renal grafts, two EMT markers have been particularly studied: *de novo* vimentin (VIM) expression, and translocation of beta-catenin (BCAT) from the membrane into the cytoplasm [7-8]. Accumulating evidence suggest that cyclosporine A (CsA) may trigger EMT in tubular epithelial cells. First, Slattery *et al.* (2005) have described that human proximal tubular cells exposed *in vitro* to CsA undergo cytoskeletal rearrangement, cell junction disruption and expression of myofibroblast markers (9). Furthermore, Galichon *et al.* have demonstrated that *in vivo*, in rats, CsA alone similarly induces EMT in tubules [8]. Also, Hazzan *et al.* (2011) showed that in human kidney recipients, the intensity of expression of EMT markers in tubular cells can identify CsA-treated kidney transplant recipients at risk of fibrogenesis and thereby graft function decline [10]. Finally, CsA withdrawn has been shown to be associated with EMT regression [9,10]. In addition, whether Tacrolimus, the main calcineurin inhibitor currently prescribed in solid organ recipients, similarly affects the phenotype of tubular epithelial cells remains poorly understood [11].

Although patients receiving CNI-based immunosuppressive regimens systematically develop histological signs of nephrotoxicity, interindividual differences in the occurrence and severity of CNI-induced nephrotoxicity is usually observed [3,12]. These interindividual differences may be partly explained by variations in hepatic and/or renal expression and function of the metabolizing cytochrome CYP3A5 isoenzyme and the multidrug efflux transporter P-glycoprotein (ABCB1) [13,14]. Indeed, several single nucleotide polymorphisms (SNPs)

affecting these two genes have been shown to influence CNI pharmacokinetics, and thereby their nephrotoxicity [15]. Furthermore, as CYP3A5 and ABCB1 are expressed in liver and kidney, both recipient and donor genotypes are an important aspect to consider when evaluating treatment response.

Here, we aimed to assess whether inter-individual variability in the pharmacokinetic parameters of Tacrolimus is associated with the occurrence of EMT markers and kidney fibrosis using a large cohort of uniformly Tacrolimus-treated kidney recipients. Finally, given the influence of CYP3A5 and ABCB1 on Tacrolimus disposition, we also investigated whether genetic polymorphisms known to alter these proteins also influence EMT markers and kidney fibrosis.

Material and Methods

Patients

Patients who received a renal transplant performed at the Department of Nephrology (CHRU Lille) between January 2008 and December 2009 have been included in this observational and retrospective study. Criteria of inclusion were availability of (i) both recipient and donor DNAs, (ii) systematic protocol allograft biopsy at 3 months postgraft (M3), (iii) renal function assessment at 24 months after transplant and (iv) immunosuppressant treatment with Tacrolimus.

All patients received biological induction (antithymocyte globulin (ATG) during four days or anti-interleukin-2 receptor (Basiliximab)) associated with corticosteroids (prednisone, 500 mg at day 0, 250 mg at day 1, then 20 mg/day until day 7), mycophenolate mofetil (started at 2 g/day) and tacrolimus (started at 0.15 mg/kg/day at day 0 for patients receiving Basiliximab or day 4 under ATG therapy). Doses were adjusted according to maintain tacrolimus trough blood concentrations (C_{min}) between 10 and 15 ng/mL during the first 3 months, 8 and 12 ng/mL from month 4 to 12, then 6 to 8 ng/mL. Nevertheless, the daily Tacrolimus dose could be tapered according to the tolerance of the patient, especially in case of obvious toxicity. Steroids were withdrawn for low immunological risk patients who did not present acute rejection and maintained for sensitized recipients and/or patients who experienced acute rejection

Criteria of exclusion were (i) kidney transplantation from a living donor, (ii) double transplantation (heart-kidney, liver-kidney), (iii) early graft loss (< 3 months post transplant) due to surgical events (artery or vein thrombosis, urinary tract obstruction) or refractory acute rejection and (iv) CsA as first-line treatment.

Ethics

This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by our local ethics committee (CPP Nord-Ouest IV). Systematic graft biopsies were performed as described in our local regular protocol of renal transplant care. Informed consent was obtained for biopsy as well as for the use of clinical data and leftover histological material for research.

Anonymously identified graft donor genomic DNA was obtained from the Department of Immunology (CHRU Lille) and was prepared from lymphocyte suspensions, previously used for the cross-match test. All recipients provided their written informed consent to genetic analysis. DNA collections were registered to French "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" with the number: DC-2008-642.

Clinical data

Pre-transplant characteristics of donors and recipients, post-transplant events and therapeutic drug monitoring were retrospectively collected. Patients with previous or day 0 panel reactive antibodies >30% were considered as anti-HLA sensitized recipients. Delayed graft function (DGF) was defined by the requirement of dialysis session(s) during the first week post transplant while hyperacute rejection, vascular and urinary tract complications were ruled out. A longitudinal follow-up at 1 month (M1), 3 months (M3), 1 year (M12) and 2 years (M24) post-graft was performed for the following parameters: renal function (estimation of the Glomerular Filtration Rate (eGFR), according to aMDRD (abbreviated Modification of Diet in Renal Diseases) formula [16], proteinuria, Tacrolimus dose (in mg/kg/day), C_{min} and C_{min}/dose).

Genotyping

1. Genotyping of *ABCB1* 1199G>A (rs2229109), 1236C>T (rs1128503) and 2677G>T/A (rs2032582) SNPs

Each amplification reaction was carried out in a total volume of 25 µL 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.4 containing 50 mM KCl, 0.2 mM of each dNTP, 2 µM MgCl₂, 0.4 µM of each primer, 200 ng DNA and 0.6 U Taq DNA polymerase (Life Technologies) as described in **Table S1**. After an initial denaturation step at 94°C for 3 min, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min of hybridization at 60°C and 1 min of extension at 72°C were carried out. A final extension period of 7 min was performed at 72°C. Size and specificity of PCR fragments were controlled on 1% agarose gels after incorporation of an intercalator (EvaGreen, Jena Bioscience).

After purification with the ExoSap-IT enzyme (USB), amplicon nucleotide sequences were determined using an automated DNA sequencer (ABI Prism® 3130 Genetic Analyser (Life

Technologies). Fragments were amplified with primers (**Table S1**), labeled with the BigDye® Terminator v3.1 kit (Life Technologies) and analyzed with SeqScape v2.5.6 software (Life Technologies).

Genotyping of *CYP3A5* 6986A>G (rs776746) and *ABCB1* 3435C>T (rs1045642) SNPs

Genotyping of the *CYP3A5* 6986A>G and *ABCB1* 3435C>T SNPs were performed with TaqMan allelic discrimination assays using ABIPrism 7900HT (Life Technologies), in a 96-well format, according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). For quality control, all runs included duplicates of a null sample and of samples with known genotypes. After PCR, end-point fluorescence was measured and genotype calling was carried out using the allelic discrimination analysis module.

Histopathology

A systematic biopsy was performed at M3 post-graft for each patient. Kidney samples were fixed in alcohol-formalin-acetic acid and embedded in paraffin. Three-micrometer-thick sections were stained with hematoxylin and eosin, Masson's trichrome, PAS and Jones methenamine silver. The semi-quantitative analysis of graft histological lesions was graded according to the updated Banff 07 classification [17]. Chronic tubulo-interstitial lesions were evaluated as follow: interstitial fibrosis "ci" was graded from 0 to 3 (ci0: fibrosis <5%; ci1: fibrosis from 5 to 25%; ci2: fibrosis 26 to 50% and ci3: fibrosis >50%) and tubular atrophy "ct" was graded from 0 to 3 with the same ranges.

Immunohistochemical staining of intracellular translocation of BCAT and *de novo* VIM expression by tubular epithelial cells was performed in order to quantify mesenchymal markers on M3 graft biopsies. Slides were incubated with Phosphate Buffer Saline containing 250 µL/mL anti-BCAT (mouse monoclonal antibody; BD Biosciences) or 200 µL/mL anti-VIM (mouse monoclonal antibody; Novocastra-Leica). The sections were then incubated with anti-rabbit or anti-mouse antibody conjugated with peroxidase-labeled polymer (Dako). Immunoreactive proteins were visualized with a 3-amino-9-ethylcarbazole-containing peroxidase substrate (hydrogen peroxide; Dako). Finally, the tissue sections were counterstained with hematoxylin. These steps were performed with the Benchmark XT IHC/ISH module (Ventana Medical Systems).

Semi-quantification of VIM expression and BCAT translocation from membrane to cytoplasm was performed in a blind manner. Expression of VIM and cytoplasmic translocation of BCAT in atrophic tubules were not taken into account. Biopsies have been assessed in order to score each mesenchymal marker as follows: 0=none, 1=<10%, 2=10% to 24%, 3=25% to 50% and 4=>50% of the proximal tubules. Graft was assessed as EMT positive when BCAT nuclear translocation or VIM expression score was ≥ 2 [10]. Graft was also assessed as ci positive (ci+) and ct positive (ct+) when, respectively, ci and ct was >1 according to Banff classification

Statistical analysis

To examine the population homogeneity, the genotype frequencies were tested against Hardy-Weinberg equilibrium using a chi-square test. Baseline characteristics and histological scores according to genotype were compared with chi-square tests for categorical variables and with analyses of variance (ANOVA) and t-test (when applicable) or non parametric tests (Mann-Whitney or Kruskal-Wallis) for continuous variables. The association of SNPs with EMT, Ct and Ci after adjustment for other risk factors was assessed by multivariate binary logistic regression modeling. The model was constructed by progressively adding independent variables (preliminary transformed in categorical data) starting with those that had the strongest univariate association with the outcome of interest. Significance was assumed at a p-value less than 5%. Statistical analyses were performed using the SPSS package, version 15.0 for Windows.

Haplotype analyses were performed using Hapstat software [18], which simultaneously estimates the OR parameters and haplotype distribution for a given group of SNPs using maximum likelihood estimation and the Expectation–Maximization algorithm. Logistic regression models were applied using the following models: codominant, dominant, recessive and log-additive models.

Table 1 : Patients demographics and baseline characteristics (N=140).

Parameters	
Recipient gender (male)	64%
Recipient age (years)	48.8±12.9
BMI (kg/m ²)	25.02±4.30
Time on dialysis before renal transplantation (months)	30 [0-139]
Repeated transplant	13%
HLA sensitization before renal transplantation (% of the recipients)	16%
Cold ischemia time (hours)	19.7±6.5
Donor gender (male)	70%
Donor age (years)	47.8±14.6
Death by brain stroke	49%

The values are shown as mean±SD, median[min-max] or percentage. BMI: Body Mass Index

Table 2: Renal function, Tacrolimus exposure (daily dose, C_{min}) and immunosuppressive therapy.

	Month 3 (M3)	Month 12 (M12)	Month 24 (M24)
eGFR(mL/min/1.73m ²)	56.8±18.0	56.5±17.8	54.8±20.1
Tacrolimus daily dose (mg/kg)	0.09±0.04	0.06±0.03**	0.06±0.03**
Tacrolimus C _{min} (ng/mL)	8.9±2.7	7.2±2.7**	6.6±2.2**
MMF doses (g/day)	1.18±0.5	1.07±0.70*	1.00±0.72*
Steroids use	63%	37%**	14%**

The data are shown as mean±SD or number (percentage). eGFR: estimated Glomerular Filtration Rate; C_{min}: trough blood concentration; MMF: mycophenolatemofetil. * : p<0.05 vs month-3, ** : p<0.001 vs month3

Results

Study population and clinical outcome during the first year post transplantation

The main demographic characteristics of the 140 renal transplant patients included in this study are shown in **Table 1**. Delayed Graft Function (DGF) occurred in 44 patients (31%). During the first year post-transplantation, the incidence of biopsy-proven acute rejection was quite low (n= 9/140; 6.5%). During the study period, Tacrolimus was withdrawn for only 3 patients (one for severe chronic allograft dysfunction, one for malignancies and one for repeated severe infections). We observed a slight decrease of estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) from 56.8 ± 18.0 mL/min/1.73 m² at M3 to 56.5 ± 17.8 mL/min/1.73 m² at M12 and 54.8 ± 20.1 mL/min/1.73 m² at M24 (NS) (**Table 2**). As usually observed, immunosuppressive therapy was significantly tapered over time (**Table 2**).

Immunohistochemical expression of EMT markers

Vimentin (VIM) and beta catenin (BCAT) expression could be assessed on respectively 125 and 128 M3 protocol biopsies. Both markers were evaluated on 123 biopsies (88%). A strong correlation between nuclear BCAT and VIM expression scores was observed ($R^2=0.83$, $p<0.0001$). **Figure 1** depicts a representative staining of VIM and BCAT and the score distribution in the study population. At M3, 36% of the patients exhibited significant EMT markers (score 2: 26%; score 3: 9%; score 4: 1%).

Assessment of Interstitial Fibrosis/Tubular Atrophy (IF/TA) was performed on 137 slides. Fifty three biopsies were graded ci0 (38%), 72 biopsies ci1 (53%), 12 biopsies ci2 (9%) and no biopsy was graded ci3.

A significant association was observed between EMT score and IF/TA grade. As shown on **Figure 2**, severe IF/TA is associated to high EMT scores. The mean BCAT and VIM expression scores increased gradually with IF (ci) and TA (ct) grades (BCAT: ci0: 1.18 ± 0.6 , ci1: 1.54 ± 0.74 , ci2: 2.33 ± 0.65 , $p<0.0001$; VIM: ci0: 1.14 ± 0.58 , ci1: 1.52 ± 0.69 , ci2: 2.27 ± 0.79 , $p<0.0001$).

Association between clinical features and histological data

In our population, two groups of patients were defined: those whose biopsies displayed no significant EMT markers expression (EMT-: scores 0 or 1), and those whose biopsies expressed EMT markers (EMT+: score 2, 3 or 4). Whereas DGF occurrence significantly

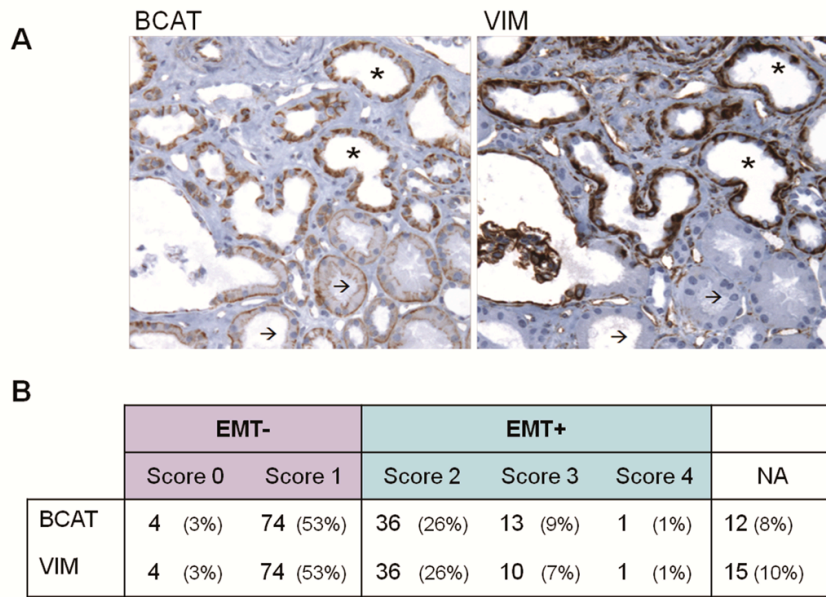


Figure 1. Semi-quantification of EMT markers on allograft biopsies performed at month 3 (M3) post-graft. (A) Colocalization of EMT markers in tubular epithelial cells (BCAT and VIM). Arrows indicate tubules in which BCAT was expressed at the membrane and VIM was absent (normal tubules); stars indicate tubules exhibiting an overexpression of BCAT that is abnormally translocated into the cytoplasm and a *de novo* expression of VIM. Magnification, 40X. (B) Biopsies have been assessed in order to score EMT markers as follows: 0= none, 1= <10%, 2= 10% to 24%, 3= 25% to 50%, and 4= >50% of the tubules. BCAT: β -catenin; VIM: vimentin; NA: not available.

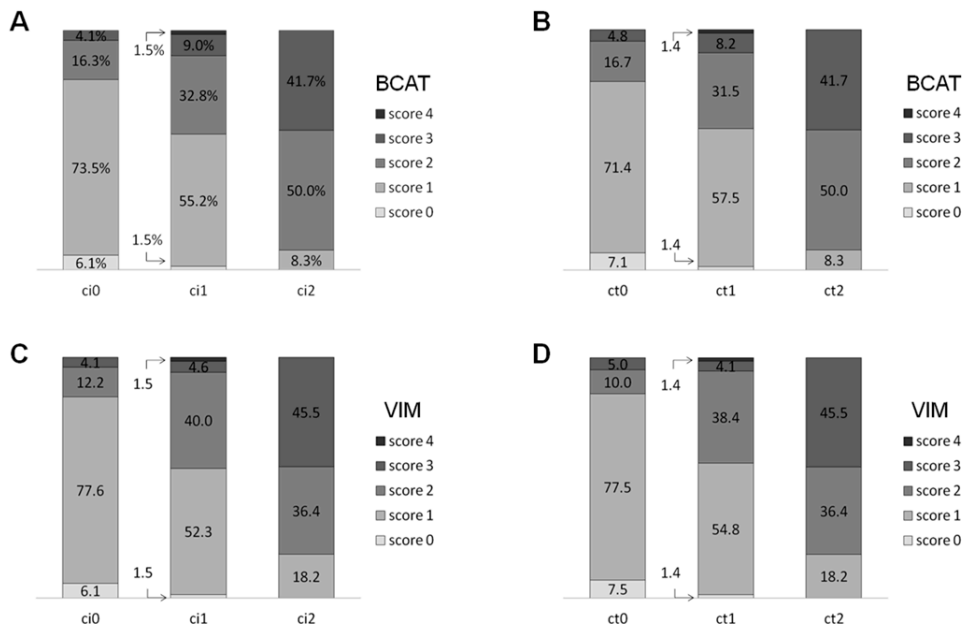


Figure 2. Distribution of BCAT and VIM scores according to IF/TA grade (ci and ct). (A) BCAT according to ci. (B) BCAT according to ct. (C) VIM according to ci. (D) VIM according to ct. n=123 biopsies. Comparisons of EMT (BCAT and VIM) score distribution between ci0, -1, -2 or ct0, -1, -2 are significant (A : $p < 10^{-3}$, B : $p < 10^{-4}$, C and D : $p < 10^{-5}$).

influences EMT, biopsy status, donor age, ischemia time, BPAR, long term use of steroids and Tacrolimus dose at M3 were similar between EMT+ and EMT- groups (**Table 3**). Similarly, DGF occurrence was significantly associated with ci and ct. In addition, donor and recipient's age are significantly associated with ci and ct, but not with EMT (**Table 3**). We also found a significant impact of IF/TA at M3 on one-year graft function: higher ci and ct score were associated with lower eGFR (score ci0, eGFR=61.5±18.8 mL/min/1.73 m²; ci1, eGFR=53.9±16.3 mL/min/1.73 m²; ci2, eGFR=53.8±9.8 mL/min/1.73 m², p=0.045). However, EMT markers score did not seem to influence the graft function up to 3 years.

Effect of candidates ABCB1 1199G>A, 1236C>T, 2677G>T/A, 3435C>T and CYP3A5 6986G>A SNPs on Tacrolimus dose, Cmin and Cmin/dose

Allelic frequencies in recipient and donor populations are shown in **Table 4**. Concerning *ABCB1* 2677G>T/A SNP, only 3 recipients carried the TA genotype, 2 harbored the GA genotype and none the AA genotype. A and T were thus pooled and designated as allele «W» [19].

All allelic frequencies observed are consistent with data previously reported in European populations [19,20] and are in equilibrium with the Hardy-Weinberg law. Recipient *CYP3A5* expressors (carrying at least one functional allele *1) required higher daily dose of Tacrolimus than non expressors (*CYP3A5**3/*3) to reach similar trough blood concentrations (Cmin) (**Figure 3**).

No association between other SNPs affecting donors or recipients and Tacrolimus parameters (dose, Cmin and Cmin/dose) was observed.

Effect of donor's candidate SNPs on EMT markers and IF/TA.

Graft carrying at least one *CYP3A5**1 allele (*CYP3A5* expressors) had significantly lower VIM score (*CYP3A5**1/*1 or *CYP3A5**1/*3: VIM score=1.18±0.88 vs *CYP3A5**3/*3: VIM score=1.50±0.69, p=0.03). Furthermore, they were more often EMT- than *CYP3A5* non expressors (*CYP3A5**3/*3) (EMT+: *CYP3A5**1/*1 or *CYP3A5**1/*3: 17.6% vs *CYP3A5**3/*3: 41.9%, p=0.057 respectively) (**Figure 4A**).

Donor *ABCB1* 1236C>T SNP was significantly associated with less IF/TA (**Table 5**). Similarly, grafts carrying at least one *ABCB1* 3435T allele exhibited less interstitial fibrosis (ci score for CC: 0.91±0.65, CT: 0.59±0.60, TT: 0.54±0.56, p<0.01) and lower EMT scores than grafts homozygotes for the C allele. For grafts carrying CC, CT and TT genotypes,

Table 3: Univariate analysis of the influence of clinical data on EMT occurrence, interstitial fibrosis occurrence (ci) or tubular atrophy occurrence (ct).

	EMT – (n=78)	EMT + (n=45)	p	Ci – (n=54)	Ci + (n=86)	p	Ct– (n=43)	Ct+ (n=96)	p
Recipient age (years)	48.2±13.1	50.5±13.1	p=0.33	44.6±12.2	51.5±12.7	p=0.002	45.5±13.0	50.4±12.6	p=0.04
Donor age (years)	46.7±15.1	49.8±14.1	p=0.24	41.9±13.6	51.5±14.0	p<0.001	42.3±14.4	50.4±14.1	p=0.002
HLA sensitisation	12.8%	25.5%	p=0.07	7.4%	22.1%	p=0.02	9.3%	19.8%	p=0.12
Cold ischemia time (hours)	19.4±6.5	20.4±6.5	p=0.39	20.2±5.9	19.5±6.8	p=0.52	20.7±5.6	19.4±6.6	p=0.25
Induction therapy									
- basiliximab	32.1%	36.0%	p=0.64	30.2%	35.4%	p=0.55	24.1%	39.5%	p=0.06
- thymoglobulin	67.9%	64.0%		69.8%	64.6%		75.9%	60.5%	
Delayed Graft Function	20.5%	51.1%	p<0.001	20.4%	38.8%	p=0.02	18.6%	37.9%	p=0.02
Steroids doses at M3 (mg/day)	10.1±3.8	11.2±3.5	p=0.23	9.9±11.0	11.0±3.7	p=0.24	9.7±3.5	11.0±3.8	p=0.18
Tacrolimus dose at M3 (mg/kg/day)	0.08±0.04	0.09±0.04	p=0.61	0.09±0.04	0.09±0.04	p=0.85	0.09±0.04	0.09±0.04	p=0.92
MMF dose at M3 (g/day)	1.16±0.5	1.18±0.5	p=0.78	1.25±0.42	1.14±0.55	p=0.21	1.29±0.37	1.13±0.56	p=0.1
BPAR	5.1%	8.8%	p=0.42	7.4%	7.0%	p=0.92	7.0%	7.3%	p=0.95

The values are shown as mean±SD or percentage. MMF: mycophenolatemofetil, BPAR: Biopsy-proven acute rejection. NS: not significant.

BCAT expression mean scores were 1.76 ± 0.8 , 1.33 ± 0.66 and 1.37 ± 0.7 , respectively ($p < 0.01$), whereas VIM expression mean scores were 1.70 ± 0.73 , 1.33 ± 0.66 , 1.27 ± 0.74 , respectively ($p < 0.05$) (**Figure 4B-C** and **Table 5**).

Eleven patients carrying at least one *CYP3A5**1 allele (*CYP3A5* expressors) were also carrying one *ABCB1* 3435T allele. None of them developed significant EMT markers on protocol biopsies at M3 (score < 2). In comparison, 42% of the patients *CYP3A5* non expressors and carrying no *ABCB1* 3435T allele exhibited EMT+ markers on renal allografts (score ≥ 2) ($p = 0.07$) (data not shown).

Among the genetic and clinical factors associated with EMT in the univariate analysis *ABCB1* 3435C>T SNP and DGF occurrence remained significant in multivariate analysis, OR=0.33[0.14-0.76], $p = 0.009$ and OR=3.49[1.51-8.06], $p = 0.004$, respectively (**Table 6**). Furthermore, in multivariate analysis, interstitial fibrosis occurrence (Ci+) was positively associated with donor age (OR=2.43[1.13-5.22], $p = 0.02$), whereas donor's *ABCB1* 3435C>T was associated with a significant decrease of interstitial fibrosis risk (OR=0.39[0.17-0.89], $p = 0.02$) (**Table 6**).

Effects of ABCB1 haplotypes on EMT markers and IF/TA.

ABCB1 haplotypes including *ABCB1* 1199G>A (rs2229109), 1236C>T (rs1128503), 2677G>W (rs2032582) and 3435C>T (rs1045642) were evaluated using Hapstat software. Using dominant model (**Table 5**), two *ABCB1* haplotypes, including the 3435C>T SNP alone (GCGT) or in combination (GTWT), were associated with EMT (GCGT: OR=0.18[0.06-0.53], $p = 0.002$; GTWT: OR=0.47[0.22-0.99], $p = 0.047$) and interstitial fibrosis, ci (GCGT: OR=0.32[0.14-0.73], $p = 0.007$; GTWT: OR=0.47[0.24-0.92], $p = 0.028$). *ABCB1* GCGT haplotype was also associated with tubular atrophy, ct (OR=0.39[0.17-0.89], $p = 0.026$).

Table 4: Genotypes and allelic frequencies of *ABCB1* 1199G>A, 1236C>T, 2677G>T/A and 3435C>T and *CYP3A5* 6986A>G in the recipient and donor populations.

SNP ^a	Recipient population				Donor population			
	Genotype wt/wt	Genotype wt/mut	Genotype mut/mut	Allelic frequencies (wt)	Genotype wt/wt	Genotype wt/mut	Genotype mut/mut	Allelic frequencies (wt)
<i>ABCB1</i>								
1199G>A (rs2229109)	0.9	0.1	0.0	G : 0.95	0.9	0.1	0.0	G : 0.95
1236C>T (rs1128503)	0.3	0.5	0.2	C : 0.55	0.4	0.4	0.2	C : 0.35
2677G>W ^a (rs2032582)	0.35	0.5	0.15	G : 0.57	0.4	0.4	0.2	G : 0.35
3435C>T (rs1045642)	0.25	0.45	0.3	C : 0.46	0.3	0.4	0.3	C : 0.45
<i>CYP3A5</i>								
6986A>G (rs776746)	0.03	0.1	0.87	A : 0.08	0.02	0.13	0.85	A : 0.08

^a : allele T or A, wt: wild type, mut: mutant.

Discussion

As CNI-based therapy can cause nephrotoxicity in renal transplant recipients, the identification of patients at increased risk for CNI nephrotoxicity is of major importance to propose alternative therapeutics to prevent graft injury and to improve graft survival. Recently, we demonstrated that 3-month expression of EMT markers by tubular epithelial cells is a predictive factor of CsA nephrotoxicity up to 4 years post-transplantation [10]. Based on these findings, one part of this study aimed to assess whether patients receiving Tacrolimus-based regimens also exhibit immunohistochemical changes consistent with EMT. Our results indeed indicate that BCAT and VIM scores were significantly correlated with IF/TA grade according to Banff classification. Interestingly, our findings show that EMT under Tacrolimus therapy occurs to a similar extent (36% exhibited EMT score ≥ 2) than kidney transplant recipients receiving CsA-based regimens (47%). However, due to the short term follow-up of this study (three years or less), the impact of EMT on long term renal function was not evaluated. Although the EMT process was initially widely accepted as a pathological mechanism contributing to kidney fibrosis through the generation of *de novo* fibroblasts arising from tubular epithelial cells [1], an increasing number of studies raised doubts about the existence of such an extreme form of EMT *in vivo* [21,22]. Indeed, in light of recent findings, pericytes and fibroblasts seem now to be the major contributors of the myofibroblast population [21, 23]. Beside this controversial question [24], it remains that EMT may contribute to renal fibrogenesis through the reprogramming of epithelial cells [25], which may, under stress, behave like myofibroblasts and produce excessive amounts of extracellular matrix [26]. The presence of EMT markers in kidney biopsies thus accurately reflects an active injurious process [27].

Given the large inter-individual differences in Tacrolimus disposition, the second aspect of this study was focused on assessing whether genetic factors known to alter Tacrolimus pharmacokinetics also influence EMT markers and kidney fibrosis. We evaluated the impact of donors and recipients SNPs affecting *CYP3A5* and *ABCB1* genes on Tacrolimus exposure. No association was found between the tested *CYP3A5* and *ABCB1* SNPs and Tacrolimus dose, C_{min} and C_{min}/dose, except for recipients *CYP3A5* SNP 6986A>G, defining *CYP3A5**3, which strongly modifies Tacrolimus bioavailability as described previously [14, 28]. In line with this, no significant association was found between Tacrolimus dose, C_{min} and C_{min}/dose (assessed 1- and 3- months post-transplantation) and either interstitial fibrosis

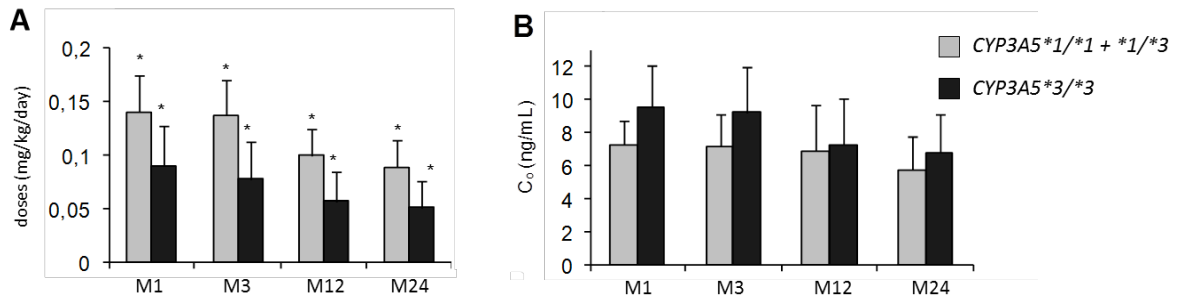


Figure 3. Influence of *CYP3A5* genotype on Tacrolimus dose, Cmin and Cmin/dose at 1 month (M1), 3 months (M3), 1 year (M12) and 2 years (M24) postgraft. *CYP3A5*1* allele is associated with increased daily doses (mg/kg/day) (A) to reach similar trough blood concentrations Cmin (ng/mL) (B). The data are shown as mean±SD. *:p<0.05 comparing *CYP3A5*1/*1* and *CYP3A5*1/*3* to *CYP3A5*3/*3* patients.

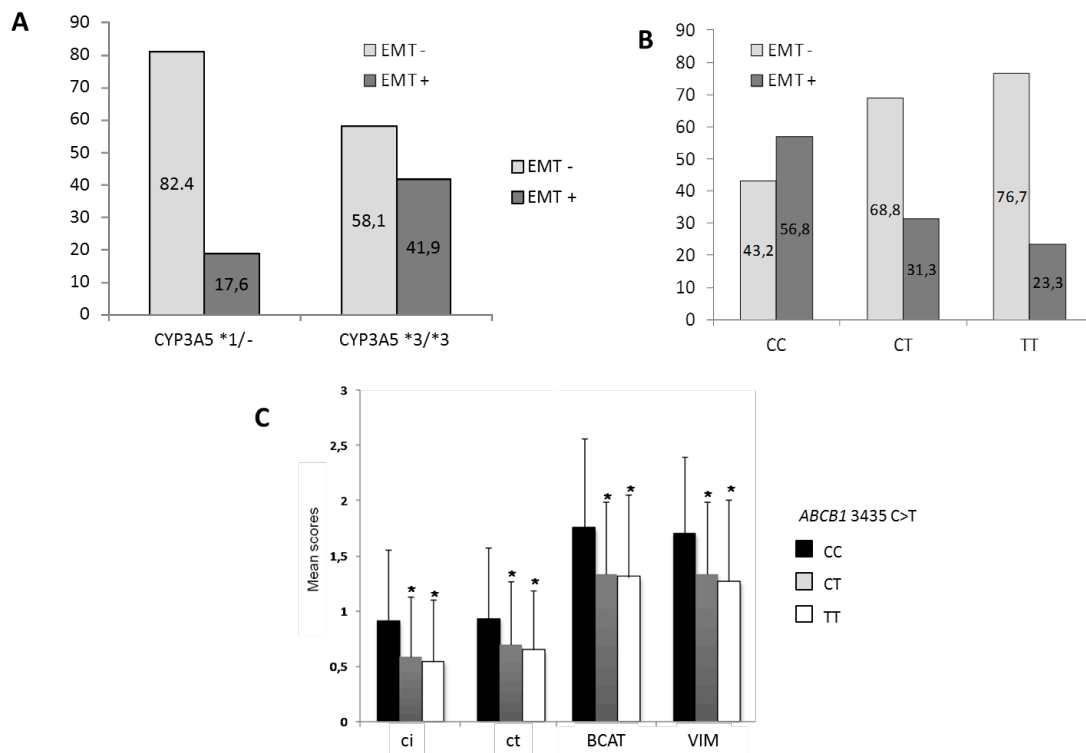


Figure 4. Influence of *CYP3A5* and *ABCB1* genotypes on EMT markers (BCAT and VIM) and ci score. *CYP3A5*1* allele is associated with higher, but non significant, EMT-frequency (A). *ABCB1* 3435T allele is associated with higher EMT- frequency (p=0.006). (B) and lower ci, BCAT and VIM score *p<0.05 comparing CC versus T allele. The data are shown as mean ± SD (C).

(ci and ct) or EMT markers. Consistent with this, several recent publications did not find a dose-dependent effect of Tacrolimus on chronic histological lesions [29-30]. Collectively, these results suggest that systemic exposure to Tacrolimus is not an independent determinant of kidney fibrosis. Nevertheless, given that the tubular epithelium has a key role in renal fibrogenesis, Tacrolimus metabolism inside tubular epithelial cells is likely to be important.

As the renal tissue exhibits higher concentration of Tacrolimus than blood [31], donor's genome is likely to significantly influence Tacrolimus cellular processing in the transplanted kidney, and thus its nephrotoxicity. To date, only two previous reports found a significant association between the development of CNI-induced histological lesions and either CYP3A5 or ABCB1 expression [32,33]. In our study, a significant association between the functional *CYP3A5*1* allele and renal proximal tubular cell VIM expression was found in an univariate analysis. Moreover, about 20% of the grafts carrying at least one allele **1* were graded as EMT+ vs about 40% for graft homozygous **3/*3*. This suggests that CYP3A5, the main CYP3A isoform in the kidney, may play an important protective role against Tacrolimus nephrotoxicity by metabolizing the drug, preventing its intracellular accumulation and limiting potential EMT induction.

Our results showed a significant association between *ABCB1* 3435C>T SNP, as well as *ABCB1* GCGT haplotype, genotyped in donors and both EMT score and interstitial fibrosis grade according to Banff classification. Grafts carrying at least one 3435T allele displayed lower interstitial fibrosis and EMT scores. The mechanisms by which SNPs, and in particular the 3435C>T SNP, affect the local renal expression of ABCB1 or its activity are not precisely identified. Functional study has revealed that the *ABCB1* 3435T variant could be associated with a lower Pg-P expression and function [34]. Consistent with this, several clinical studies have shown an association between this genetic variant and worse renal graft outcome. In particular, Hauser *et al.* (2005) reported that the *ABCB1* 3435C>T mutation of the donor, but not of the recipient, is associated with a low ABCB1 renal expression, and is a risk factor for CsA-related nephrotoxicity [35]. Recently, donor *ABCB1* SNPs have been suggested to worsen renal function and graft loss of patients receiving CsA [36]. Similarly, Naesens *et al.* (2009) demonstrated that only combined donor-recipient homozygosity *ABCB1* 3435TT was significantly associated with increased susceptibility to chronic allograft damages [37]. However, although our data are in sharp contrast to these previous reports, our results are consistent with a large recent study [38] showing that donor *ABCB1* 3435T allele is associated

Table 5: Univariate analysis of the influence of *ABCB1* SNPs and haplotypes on EMT, interstitial fibrosis (ci) or tubular atrophy occurrence (ct).

	EMT+ (%)	EMT- (%)	OR (95%CI)	P	Ci+ (%)	Ci- (%)	OR (95%CI)	P	Ct+ (%)	Ct- (%)	OR (95%CI)	P
<i>ABCB1</i> SNPs												
1199G>A	4.8	2.7	1.89 (0.48-7.42)	0.36	4.9	1.8	2.99 (0.61-14.62)	0.18	4.4	2.3	2.07 (0.42-10.18)	0.37
1236C>T	30.8	37.6	0.57 (0.35-0.90)	0.09	31.5	42.4	0.52 (0.29-0.97)	0.04	33.0	41.9	0.53 (0.29-0.98)	0.043
2677G>W	30.0	37.0	0.60 (0.30-1.17)	0.14	34.8	37.8	0.70 (0.38-1.29)	0.26	34.8	38.4	0.64 (0.35-1.18)	0.16
3435C>T	34.6	52.0	0.33 (0.29-0.64)	0.0013	40.1	54.6	0.35 (0.19-0.66)	0.001	42.9	52.3	0.44 (0.24-0.83)	0.01
<i>ABCB1</i> haplotypes^a												
GCGT	5.7	20.6	0.18 (0.06-0.53)	0.002	11.6	18.5	0.32 (0.14-0.73)	0.007	13.0	17.5	0.39 (0.17-0.89)	0.026
GCWC	3.1	1.4	0.42 (0.08-2.35)	0.33	4.0	0	ND		3.0	1.2	1.91 (0.21-17.39)	0.57
GCWT	2.2	1.4	1.16 (0.15-8.99)	0.88	1.8	1.0	1.48 (0.14-15.47)	0.74	1.6	1.2	1.01 (0.08-11.77)	0.98
GTGC	2.6	2.4	0.46 (0.11-1.95)	0.29	0	3.1	ND		4.0	0	ND	
GTGT	3.5	1.1	2.51 (0.26-24.4)	0.43	1.5	2.6	0.29 (0.06-1.33)	0.11	1.9	1.9	0.36 (0.08-1.59)	0.18
GTWT	23.6	29.0	0.47 (0.22-0.99)	0.047	25.2	30.7	0.47 (0.24-0.92)	0.028	26.4	29.3	0.58 (0.24-1.14)	0.11
ACGC	4.8	2.7	1.29 (0.32-5.23)	0.71	4.9	2.0	2.03 (0.41-10.17)	0.39	0	4	1.49 (0.29-7.52)	0.62
GTWC	0	5.2	ND		4.2	3.7	0.41 (0.12-1.44)	0.16	3.9	4.2	0.33 (0.09-1.16)	0.09

^a : in order ABCB1 1199G>A (rs2229109), 1236C>T (rs1128503) , 2677G>W (rs2032582) and 3435C>T (rs1045642).

with better renal allograft survival. This observation could be explained by the anti-apoptotic role of P-gP, which has been demonstrated to increase renal injury propensity in animal models [38]. Indeed, *ABCB1*^{-/-} mice have been shown to exhibit an increased resistance against ischemic injury [39].

We should caveat, though, that our study does not allow us to directly incriminate Tacrolimus in the occurrence of EMT in tubular epithelial cells and graft fibrogenesis. First, it is increasingly recognized that what has long been called “CNI nephrotoxicity” lacks specificity [11]. Secondly, the influence of donor SNPs on EMT and fibrosis may theoretically be independent from Tacrolimus, and rather explained by the metabolism of other endogenous molecules or even other xenobiotics. In addition, other genes have been suggested to be involved in CNI nephrotoxicity, in particular the transcriptional factor PXR (Pregnane X Receptor) that regulates the expression of CYP3A and ABCB1 [40]. Thus, comprehensive genetic analyses of both donor and recipient, combining genes encoding proteins involved in Tacrolimus renal processing and graft biopsies histological analysis may help to elucidate this complex mechanism.

In conclusion, early identification of patients at high risk of Tacrolimus renal toxicity represents one of the most important present and future challenges in kidney transplantation to tailor treatment regimens before the development of irreversible lesions. Although preliminary, our data suggest that the genetic make-up of donor as well as the early detection of nephrotoxicity markers such as mesenchymal markers, may improve the medical management of renal transplant patients.

Table 6: Risk factors for EMT, Ci and Ct occurrence (multivariate analysis).

	EMT positive			Ci positive			Ct positive		
	OR	P value	CI-95%	OR	P value	CI-95%	OR	P value	CI-95%
Recipient Age*	0.8	0.68	0.27-2.31	1.56	0.42	0.57-3.73	0.98	0.97	0.30-2.88
Donor Age*	1.09	0.86	0.38-3.14	2.43	0.02	1.13-5.22	2.21	0.03	1.13-4.67
DGF occurrence**	3.49	0.003	1.51-8.05	2.2	0.07	0.94-5.13	2.62	0.03	1.07-6.36
Donor's ABCB1/3435C>T	0.33	0.009	0.14-0.76	0.39	0.02	0.17-0.89	0.58	0.21	0.25-1.35
Induction therapy [†]							0.55	0.25	0.2-1.52
HLA sensitization**	2.73	0.06	0.97-7.70	3.7	0.03	1.12-13.32			

* :above the median value ; ** positive vs negative ; [†]basiliximab vs thymoglobulin.. The empty cells correspond to items not included in the multivariable analysis (items with insignificant effect on univariate analysis).

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Isabelle Szutser, Aurore Devos and Christophe Hallaert for their excellent technical support. The authors also thank Rose-Mary Siminski and Marie-Hélène Gevaert (Laboratoire d'Histologie, Faculté de Médecine, Lille) for their technical help.

Fundings

This study was supported in part by the following grants: Santelys association, Conseil Régional du Nord Pas de Calais.

Future perspective

This study highlights that the screening of *CYP3A5* and *ABCB1* donor's genetic polymorphisms, potentially associated with EMT and renal fibrogenesis, could improve the management of renal transplant patients. Possible mechanisms underlying these observations should be pursued in the course of future studies.

Executive summary

Current knowledge on Tacrolimus nephrotoxicity

After renal transplantation, calcineurins inhibitor (such as Tacrolimus) nephrotoxicity remains the Achilles' heel of modern immunosuppressive therapy. Although Tacrolimus induces kidney interstitial fibrosis, its implication in epithelial-to-mesenchyme transition (EMT) is unknown. CYP3A5 and ABCB1 are two proteins involved in Tacrolimus cellular processing and may influence renal allograft outcome.

Immunohistochemical expression of EMT markers

A strong correlation between nuclear Beta-catenin (BCAT) and vimentin (VIM) expression scores was observed ($R^2=0.83$, $p<0.0001$) on 3-month allograft biopsies (M3).

At M3, 36% of the patients exhibited significant EMT markers (score 2: 26%; score 3: 9%; score 4: 1%).

A significant association was observed between EMT score and fibrosis grade (ci) (BCAT: ci0: 1.18 ± 0.6 , ci1: 1.54 ± 0.74 , ci2: 2.33 ± 0.65 , $p<0.0001$; VIM: ci0: 1.14 ± 0.58 , ci1: 1.52 ± 0.69 , ci2: 2.27 ± 0.79 , $p<0.0001$).

Association between clinical features and histological data

Delayed Graft Function occurrence was significantly associated with EMT and fibrosis.

Donor and recipient's age were significantly associated with fibrosis, but not with EMT markers.

A significant impact of fibrosis at M3 on one-year graft function was observed: higher ci and ct score were associated with lower eGFR (score ci0, eGFR= 61.5 ± 18.8 mL/min/1.73 m²; ci1, eGFR= 53.9 ± 16.3 mL/min/1.73 m²; ci2, eGFR= 53.8 ± 9.8 mL/min/1.73 m², $p=0.045$).

However, EMT markers score did not seem to influence the graft function up to 3 years.

Effect of donor's candidate SNPs on EMT markers and fibrosis

While Tacrolimus systemic exposure was not associated with either interstitial fibrosis or EMT markers, the donor CYP3A5*1 allele was significantly associated with a lower vimentin expression (1.18 ± 0.88) compared to *3/*3 (1.50 ± 0.69 , $p=0.03$).

Grafts carrying one or two *ABCBI* 3435T alleles developed less mesenchymal markers expression (vimentin score: CC: 1.70±0.73, CT: 1.33±0.66, TT: 1.27±0.74; p<0.05) and less interstitial fibrosis (ci score: CC: 0.91±0.65, CT: 0.59±0.60, TT: 0.54±0.56, p<0.01).

ABCBI 3435C>T remained significantly associated with EMT and fibrosis in multivariate analysis.

References

1. Vitalone MJ, Naesens M, Sigdel T, Li L, Hseih S, Sarwal MM. The dual role of epithelial-to-mesenchymal transition in chronic allograft injury in pediatric renal transplantation. *Transplantation*. 92(7), 787-795 (2011).
2. Brouard S, Renaudin K, Souillou JP. Revisiting the Natural History of IF/TA in Renal Transplantation. *Am J Transplant*. 11(4), 647-649 (2011).
3. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*. 349(24), 2326-2333 (2003).
* Historical paper on the extent of fibrotic lesions and anticalcineurin toxicity after kidney transplantation
4. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ *et al*. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant*. 9(3), 527-535 (2009).
5. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 7(12), 684-696 (2011).
6. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 119(6), 1420-1428 (2009).
7. Hertig A, Anglicheau D, Verine J *et al*. Early epithelial phenotypic changes predict graft fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 19(8), 1584-1591 (2008).
8. Galichon P, Vittoz N, Xu-Dubois YC *et al*. Epithelial phenotypic changes detect cyclosporine in vivo nephrotoxicity at a reversible stage. *Transplantation*. 92(9), 993-998 (2011).
9. Slattery C, Campbell E, McMorro T, Ryan MP. Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *Am J Pathol*. 167(2), 395-407 (2005).
10. Hazzan M, Hertig A, Buob D *et al*. Epithelial-to-mesenchymal transition predicts cyclosporine nephrotoxicity in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 22(7), 1375-1381 (2011).
11. Djamali A, Reese S, Hafez O *et al*. Nox2 is a mediator of chronic CsA nephrotoxicity. *Am J Transplant*. 12(8), 1997-2007 (2012).
12. Snanoudj R, Royal V, Elie C *et al*. Specificity of histological markers of long-term CNI nephrotoxicity in kidney-transplant recipients under low-dose cyclosporine therapy. *Am J Transplant*. 11(12), 2635-2646 (2011).
13. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*. 4(2), 481-508 (2009).
** Broad review of anticalcineurin-induced nephrotoxicity molecular determinants

14. Staat CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet.* 49(3), 141-175 (2010).
* An exhaustive review listing CYP3A and ABCB1 genetic polymorphisms impact
15. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med.* 348(6), 538-549 (2003).
16. Levey AS, Coresh J, Greene T *et al.* Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 145(4), 247-254 (2006).
17. Solez K, Colvin RB, Racusen LC *et al.* Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* 8(4), 753-760 (2008).
18. Lin DY, Zeng D, Millikan R. Maximum likelihood estimation of haplotype effects and haplotype-environment interactions in association studies. *Genet Epidemiol.* 29(4), 299-312 (2005).
19. Jeannesson E, Albertini L, Siest G *et al.* Determination of ABCB1 polymorphisms and haplotypes frequencies in a French population. *FundamClinPharmacol.* 21(4), 411-418 (2007).
20. Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics.* 5(3), 243-272 (2004).
21. Kriz W, Kaissling B, Le Hir. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest.* 121(2), 468-474 (2011).
22. Prunotto M, Budd DC, Gabbiani G *et al.* Epithelial-mesenchymal crosstalk alteration in kidney fibrosis. *J Pathol.* 228(2), 131-147 (2012).
23. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A *et al.* Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol.* 176(1), 85-97 (2010).
24. Zeisberg M, Duffield JS. Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 21(8), 1247-1253 (2010).
25. Galichon P, Hertig A. Epithelial to mesenchymal transition as a biomarker in renal fibrosis: are we ready for the bedside? *Fibrogenesis Tissue Repair.* 4, 11 (2011).
26. Xu-Dubois YC, Baugey E, Peltier J. Epithelial phenotypic changes are associated with a tubular active fibrogenic process in human renal grafts. *Hum Pathol.* 44(7), 1251-1261 (2013).
27. Mengel M, Sis B, Haas M *et al.* Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 12(3), 563-570 (2012).

28. Glowacki F, Lionet A, Hammelin JP *et al.* Influence of cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) genetic polymorphism on the pharmacokinetics of the prolonged-release, once-daily formulation of tacrolimus in stable renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 50(7), 451-459 (2011).
29. Srinivas TR, Meier-Kriesche HU. Minimizing immunosuppression, an alternative approach to reducing side effects: objectives and interim result. *Clin J Am Soc Nephrol.* 3 Suppl 2, S101-116 (2008).
30. Naesens M, Lerut E, Damme BV, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. Tacrolimus exposure and evolution of renal allograft histology in the first year after transplantation. *Am J Transplant.* 7(9), 2114-2123 (2007).
31. Iwasaki K, Shiraga T; Matsuda H. Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion of Tacrolimus (FK506) in the Rat. *Drug Metab Pharmacokinet.* 13, 259-265 (2008).
32. Metalidis C, Lerut E, Naesens M, Kuypers DR. Expression of CYP3A5 and P-glycoprotein in renal allografts with histological signs of calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Transplantation.* 91(10), 1098-1102 (2011).
33. Joy MS, Hogan SL, Thompson BD, Finn WF, Nickleit V. Cytochrome P450 3A5 expression in the kidneys of patients with calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant.* 22(7), 1963-1968 (2007).
34. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW *et al.* A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science.* 315(5811), 525-528 (2007).
35. Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S *et al.* ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 16(5), 1501-1511 (2005).
36. Woillard JB, Rerolle JP, Picard N *et al.* Donor P-gp polymorphisms strongly influence renal function and graft loss in a cohort of renal transplant recipients on cyclosporine therapy in a long-term follow-up. *Clin Pharmacol Ther.* 88(1), 95-100 (2010).
37. Naesens M, Lerut E, de Jonge H, Van Damme B, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. Donor age and renal P-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts. *J Am Soc Nephrol.* 20(11), 2468-2480 (2009).
* A pharmacogenetic study identifying donor *ABCB1* polymorphism as a determinant of graft histological lesions
38. Moore J, McKnight AJ, Döhler B *et al.* Donor ABCB1 variant associates with increased risk for kidney allograft failure. *J Am Soc Nephrol.* 23(11), 1891-1899 (2012).
** A large pharmacogenetic study identifying donor *ABCB1* polymorphism and renal allograft outcome

39. Huls M, Kramers C, Levtchenko EN *et al.* P-glycoprotein-deficient mice have proximal tubule dysfunction but are protected against ischemic renal injury. *Kidney Int.* 72(10), 1233-1241 (2007).
40. Hauser IA, Kruck S, Gauer S *et al.* Human pregnane X receptor genotype of the donor but not of the recipient is a risk factor for delayed graft function after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther.* 91(5), 905-916 (2012).

Supplemental materials

Table S1 Details of the primers used for *ABCB1* 1199G>A, 1236C>T and 2677G>T/A single nucleotide polymorphisms genotyping.

SNP	Localization		Amplicon size
<i>ABCB1</i> 1199G>A (rs2229109)	Exon 11	forward: 5' AGAGTGGGCACAAACCAGAT 3' reverse: 5' GGCAATTCACAGACACAGGA 3'	226 bp
<i>ABCB1</i> 1236C>T (rs1128503)	Exon 12	forward: 5' TACCCATCTCGAAAAGAAGTTAAGG 3' reverse: 5' GAAAGATGTGAATGTGACTGCTGAT 3'	380 bp
<i>ABCB1</i> 2677G>T/A (rs2032582)	Exon 21	forward: 5' TGCAGGCTATAGGTTCCAG 3' reverse: 5' GAACAGTGTGAAGACAATGGC 3'	460 bp

II. Implication du SNP rs4730751 de *CAV1* sur la survie du greffon (Article 4)

La Cavéoline-1 ou *CAV1* est une protéine impliquée dans des processus anti-fibrosants (Tourkina *et al.*, 2008). Ainsi des polymorphismes génétiques affectant le gène *CAV1* pourrait avoir un impact sur le développement de lésions de fibrose. Cette hypothèse a été testée dans le cadre de la transplantation rénale par Moore *et al.* (2010) qui ont montré, chez le donneur, que le SNP rs4730751 du gène *CAV1*, codant pour la protéine anti-fibrosante Cavéoline-1, a une influence sur la survie du greffon rénal.

Dans ce travail, nous avons confirmé ce résultat dans une cohorte de 475 patients transplantés rénaux. Nos résultats indiquent que les patients dont le génotype du greffon est *CAV1* rs4730751 AA présentent une diminution du Débit de Filtration Glomérulaire (DFG), signe d'une perte de la fonction rénale. De plus, sur les biopsies rénales réalisées trois mois après transplantation, ces patients développent, de manière significative, des lésions de fibrose.

Ainsi, ce polymorphisme génétique pourrait permettre d'identifier un sous-groupe de patients présentant un risque accru de perte de greffon. A ce titre, le SNP rs4730751 pourrait être, à terme, considéré comme un biomarqueur génétique.

Article 4.

Donor CAV1 genetic polymorphism influences graft function after renal transplantation.

Van der Hauwaert Cynthia, Savary Grégoire, Pinçon Claire, Gnemmi Viviane, Frimat Marie, Noël Christian, Broly Franck, Labalette Myriam, Perrais Michaël, Pottier Nicolas, Glowacki François¹, Cauffiez Christelle

Manuscrit en préparation.

Donor *CAVI* genetic polymorphism influences graft function after renal transplantation.

Van der Hauwaert Cynthia¹, Savary Grégoire¹, Pinçon Claire², Gnemmi Viviane³, Frimat Marie⁴, Noël Christian⁴, Broly Franck¹, Labalette Myriam⁵, Perrais Michaël⁶, Pottier Nicolas¹, Glowacki François^{1,4}, Cauffiez Christelle¹

1 EA4483, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Pôle Recherche, Université Lille 2, Lille, France

2 Laboratoire de Biomathématiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Lille 2, Lille, France

3 Institut de Pathologie, Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHRU, Lille, France

4 Service de Néphrologie, Hôpital Huriez, CHRU, Lille, France

5 Service d'Immunologie, , Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHRU, Lille, France

6 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U837, Jean-Pierre Aubert Research Center, Equipe 5 «Mucines, Différenciation et Cancérogenèse Épithéliales», Lille, France

Editorial correspondence should be addressed to:

Dr. Christelle Cauffiez

EA4483, Faculté de Médecine, Pôle Recherche

1 place de Verdun, 59045 Lille cedex

Phone number : 00 33 3 20 62 68 20 ; Fax number : 00 33 3 20 62 68 91

Email: christelle.cauffiez@univ-lille2.fr

Abstract

Identification of the genes underlying multifactorial diseases is among the current challenges in molecular genetics. While recent advances in genomics research have accelerated the discovery of susceptibility genes, much remains to be discovered about the functions of disease associated genetic variants. Recently, Moore and co-workers identified, in the donor genome, an association between a common genetic variant (rs4730751) in the gene encoding caveolin-1 (CAV1), a major structural component of caveolae, and long-term allograft survival. Here, in a cohort of 475 renal transplant recipients, we showed that patients receiving a graft carrying *CAVI* rs4730751 AA genotype displayed a significant decrease in estimated Glomerular Filtration Rate by univariate and multivariate analyzes. Moreover, patients receiving a graft *CAVI* AA genotype significantly developed interstitial fibrosis lesions on systematic biopsies performed 3-months post transplantation. Genotyping of *CAVI* may be relevant to identify at risk of adverse renal transplant outcome.

Introduction

Most common diseases are complex and result from multiple genetic and environmental factors. The recent advances in genotyping and sequencing technologies have revolutionized our understanding of the genetics of complex traits. For instance, more than 2600 associated common risk alleles have been identified, with convincing associations in about 350 different complex traits (Hindorff et al., 2009). Nevertheless for the vast majority of associated alleles, the identities of causal genes and variants, as well as the function of these variants, remain unclear.

Fibrosis refers to the excessive and persistent formation of scar tissue, which is responsible for morbidity and mortality associated with organ failure in a variety of chronic diseases (Wynn 2007). Renal fibrosis is a central feature of all progressive renal diseases that ultimately leads to end-stage renal failure. In particular, kidney fibrosis is especially common in renal allografts resulting in subsequent allograft dysfunction and failure (Brouard et al., 2011). This fibrotic process results of numerous injuries related to immune allograft rejection or non immune-mediated chronic damages, in particular related to calcineurins inhibitors toxicity. In a simplistic view, renal fibrosis is characterized by an excessive wound-healing process of the kidney tissue after chronic, sustained injury resulting in an excessive accumulation of extracellular matrix component. Despite intensive studies, the underlying cause or genetic factors involved in the pathogenesis of renal fibrosis is still largely unknown. Recently, Moore and co-workers identified, in the donor genome, an association between a common genetic variant rs4730751 in the gene encoding caveolin-1 (CAV1), a major structural component of caveolae, and long-term allograft survival. More precisely, grafts carrying AA genotype is associated with a higher graft loss frequency (38.6% for AA genotypes vs 22.3% and 22.2% for AC and CC genotypes, respectively, at 12 years post-transplant) (Moore et al., 2010). Nevertheless, the impact of *CAV1* polymorphism on renal allograft function, or graft histology is currently unknown.

Caveolin-1 (CAV1), the primary structural component of specialized plasma membrane microdomains called caveolae, is a crucial regulator of tissue fibrosis. Caveolae are involved in numerous biological functions ranging from endocytosis and transcytosis to signal transduction (Razani et al., 2002 ; Chidlow et al., 2010). In kidney, CAV1 is expressed in

mesangial cells, epithelial cells, Bowman's parietal epithelial cells, as well as renal proximal tubular epithelial cells (Moriyama et al., 2011). As expected from their function and tissue distribution, caveolae and CAV1 are implicated in a variety of human disorders, including cancer, cardiovascular and inflammatory diseases (Chidlow et al., 2010 ; Cohen et al., 2004 ; Harvey et Calaghan, 2012 Feb;52(2):366-75). In particular, caveolae have a well-described profibrotic role in the context of TGF β signaling. Whereas TGF β receptor endocytosis via clathrin-coated pit-dependent internalization promotes TGF β signaling, the lipid raft-caveolar internalization pathway facilitates the degradation of TGF β receptors, therefore decreasing TGF β signaling (Del Galdo et al., 2008a ; 2008b ; Lee et al., 2007). In line with this, CAV1 null mice exhibit an extensive interstitial fibrosis following unilateral ureteral obstruction, a disease model of TGF β -driven renal fibrogenesis. (Park et al., 2010).

The aim of this study was to evaluate, in an independent large cohort of transplant recipient receiving a Tacrolimus based immunosuppressive protocol, the impact of CAV1 rs4730751 genetic variant on renal transplant function, graft histology, and graft survival.

Patients and methods

Ethics statement

The protocol has been certified to be in accordance with French laws by the Institutional Review Board of Centre Hospitalier Regional Universitaire de Lille. French health authorities have waived the requirement for consent related to patients and donors who are no longer alive. DNA collection was registered at French "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" under the number: DC-2008-642. Genotyping analysis and immunosuppressive therapy were performed as described in our local regular protocol of renal transplant care.

Patients

Four hundred seventy five French renal recipients consecutively transplanted between 1999 and 2005 participated in this cohort survey. Only recipients of kidney from deceased donor were eligible for inclusion. Patients under 18 years, and combined graft recipients were also excluded from this study.

Immunosuppressive therapy

All patients received initially biological induction (antithymoglobulin (ATG) or anti-CD25 monoclonal antibodies), Tacrolimus, Mycophenolate Mofetil (initially 1 g twice daily, thereafter tapered) and steroids (500 mg at Day 0, 250 mg at Day 1, and next 20 mg/day until Day 7). Steroids were stopped at Day 8 for patients without immunological risk or delayed graft function. The initial daily dose of Tacrolimus (PROGRAF®) was 0.075 mg/kg twice a day (0.15 mg/kg/day). Then, the dose was adjusted to reach a trough blood concentration between 10 and 15 ng/ml the first 3 months, and between 8 and 12 ng/ml within the first year. After one year, trough blood levels were targeted between 6 and 8 ng/ml. Nevertheless, the daily Tacrolimus dose was adjusted according to the clinical state of the patient.

Genotyping

Deceased donor DNA was extracted from lymphocytes used for the pre-transplantation cross match test as part of routine practice.

Each amplification reaction was carried out in a total volume of 25 μ L 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.4 containing 50 mM KCl, 0.2 mM of each dNTP, 2 μ M MgCl₂, 0.4 μ M of each primer (CAV1F: TGGTATCTAACATACAGCC and CAV1R: GGAGGTATGGCATGTGGA), 200 ng DNA and 0.6 U Taq DNA polymerase (Life Technologies). After an initial denaturation step at 94°C for 3 min, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min of hybridization at 60°C and 1 min of extension at 72°C were carried out. A final extension period of 7 min was performed at 72°C. Size and specificity of PCR fragments were controlled on 1% agarose gels after incorporation of an intercalator (EvaGreen, Jena Bioscience).

After purification with the ExoSap-IT enzyme (USB), amplicon nucleotide sequences were determined using an automated DNA sequencer (ABI Prism® 3130 Genetic Analyser (Life Technologies)). Fragments were amplified with the CAV1F and CAV1R primers, labeled with the BigDye® Terminator v3.1 kit (Life Technologies) and analyzed with SeqScape v2.5.6 software (Life Technologies).

Allograft outcome

During the follow-up period, clinical parameters were recorded, including Delayed Graft Function (DGF) (defined by the requirement of dialysis session(s) during the first week after transplantation) and the renal function (estimation of the Glomerular Filtration Rate (eGFR), according to aMDRD (abbreviated Modification of Diet in Renal Diseases) formula [Levey et al., 2006]).

Histopathology

Retrospectively, histological data were available for 207 patients (216 biopsies). Hundred twenty-two biopsies were systematically performed three months after transplant, whereas the remaining 94 biopsies were carried out on clinical indication (median = 110 days [88-470]). Borderline changes were not considered for acute rejection. Pathological criteria for the

diagnosis of Tacrolimus toxicity were cytoplasmic isometric vacuolization of tubular cells (acute tubular toxicity) and /or arteriolar nodular hyalinosis (chronic arteriolar hyalinosis). The semi-quantitative analysis of graft interstitial fibrosis (ci score) was graded according to the updated Banff 07 classification (Solez et al., 2008).

Statistical analysis

To assess the homogeneity of the patient population, genotype frequencies were tested against Hardy-Weinberg equilibrium using a chi-square test.

Categorical variables are described as absolute numbers and proportions, continuous variables as mean \pm standard deviation or median [25th-75th percentiles]. Baseline characteristics according genotype were compared with Chi-square tests for categorical variables and with analyses of variance for continuous variables.

Serum creatinine data and eGFR data from 3 months to 6 years were analyzed using repeated-measures analysis of covariance (PROC MIXED, SAS Institute, Cary, NC, USA), with time, genotype and their interaction as independent predictors, and adjusted for baseline characteristics. Data were log₁₀-transformed due to skewed distributions. The repeated-measures covariance structure was specified as a spatial power function to handle unequally spaced measurements over time. When creatinine or eGFR change was not linear with respect to a continuous predictor, the predictor was transformed into a binary variable, the cut-off value being the value minimizing the Bayesian Information Criterion of the model. Parameters of the model were tested with polynomial contrasts. Regression underlying assumptions were visually inspected with residual plots. Statistical significance was set at $\alpha=0.05$.

Graft survival related to *CAVI* genotype was estimated by the Kaplan-Meyer method and compared with the logrank test.

Table 1: Clinical characteristics according to *CAVI* genotype

	<i>CAVI</i> genotype (n=475)		
	<i>AA</i> n= 36 (7.6%)	<i>AC</i> n=194(40.8%)	<i>CC</i> n=245 (33.2%)
BMI (kg/m ²)	23.4±4.0	24.4±4.6	24.1±4.3
Age at transplantation (years)	44.0±14.4	47.8±12.5	47.5± 12.3
Sex of the recipient (M/F)	69.4%/30.6%	66.0%/34.0%	60.0%/40.0%
Age of donor (years)	41.9±15.8	45.8±14.9	45.4±15.1
Sex of the donor (M/F)	68.6%/31.4%	70.3%/29.7%	69.0%/31.0%
Immunization (HLA antibody >30%)	2.8%	10.9%	9.8%
Cold ischemia time (h)	20.8±6.9	21.3±6.9	20.8±6.7
HLA mismatch (A/B/DR)	3.6±1.4	3.4±1.9	3.4±1.3
Anti CD-25 antibody induction	41.4%	44.4%	48.2%
ATG induction	58.6%	55.6%	51.8%
Delayed graft function	12.9%	25.7%	20.3%
Acute rejection	8.6%	15.6%	9.8%

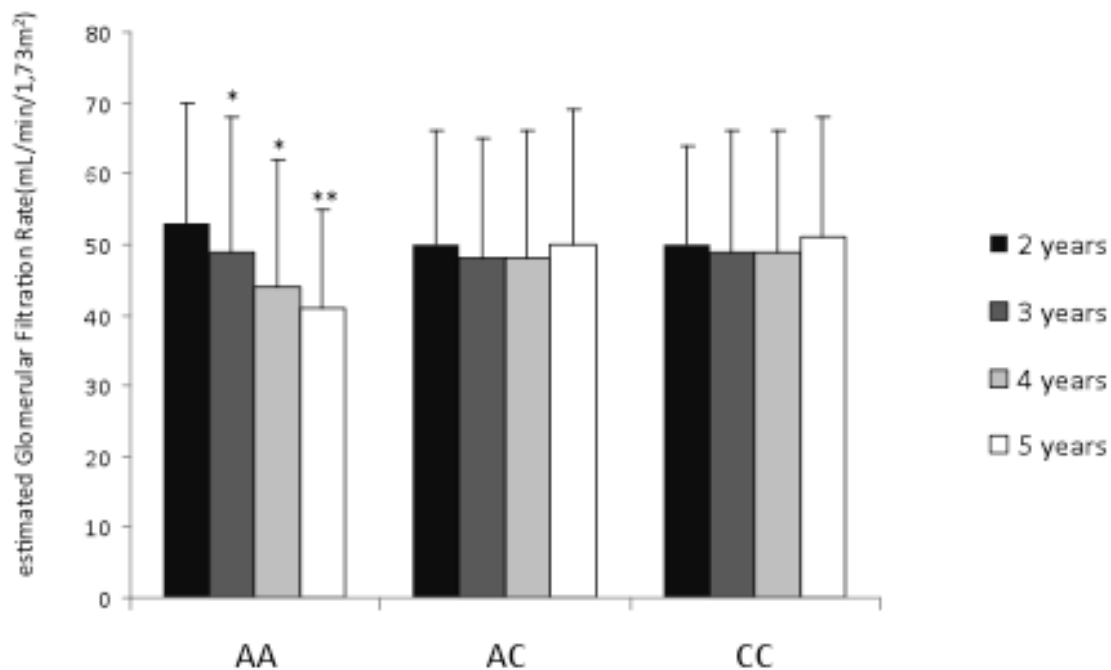


Figure 1: Evolution of on the estimated Glomerular Filtration Rate according to donor *CAVI* genotype (rs4730751) between 2- and 5-years post transplant. estimated Glomerular Filtration Rate was evaluated according to aMDRD. Data are described as mean± Standard Deviation. *: p<0,05 vs 2 years ** : p<0,005 vs 2 years.

Results

Description of the cohort

In this retrospective survey, the mean follow-up was 4.8 ± 2.6 years after renal transplantation. *CAVI* rs4730751 AA, AC and CC genotypes were observed in respectively 7.6% (n = 36), 40.8% (n = 194) and 51.6% (n = 245) of patients. Alleles A and C frequencies (respectively 0.28 and 0.72) are in equilibrium with the Hardy Weinberg law. Demographic and clinical parameters were not significantly different between AA, AC or CC genotype groups (**Table 1**).

Association between rs4730751 and renal graft function

Renal function was evaluated according to *CAVI* genotype. By univariate analysis, in the per protocol population, patients receiving a graft carrying *CAVI* rs4730751 AA genotype displayed a significant decrease in eGFR, whereas eGFR remained stable for patients transplanted with a rs4730751 AC or CC graft (**Figure 1**). More precisely, eGFR modification between two- and five-years post transplant was -10 ± 9 mL/min/1.73m² for AA group, 0 ± 11 mL/min/1.73m² for AC group and 1 ± 13 mL/min/1.73m² for CC group (AA vs AC, p=0,003 ; AA vs CC, P=0,003) (**Figure 2**).

In multivariate analysis of the renal transplant function determinants, analysis of covariance for serum creatinine levels (expressed as log₁₀-transformed, **Table 2**) showed a significant interaction between genotype and time post-transplant (p=0.02), and between genotype and Delayed Graft Function (DGF) (p=0.003). In the group of patients that did not experience DGF, 3-month creatinine levels were similar for all *CAVI* graft genotypes (p=0.10). By contrast, for patients with a past-history of DGF (22,1%), 3-month creatinine levels were significantly different (AA vs. AC: p=0.01; AA vs. CC: p=0.001, AC vs. CC: p=0.07). Due to the significant interaction between genotype and time post-transplant, the change in creatinine slopes over time differed significantly according to genotype. Specifically, creatinine increased significantly over time only for genotype AA (p=0.0005). Of note, the slope for genotype AC nearly reached significance (p=0.08). The donor age (p<0.0001) was also an independent predictor of creatinine increase over time (p<0.0001).

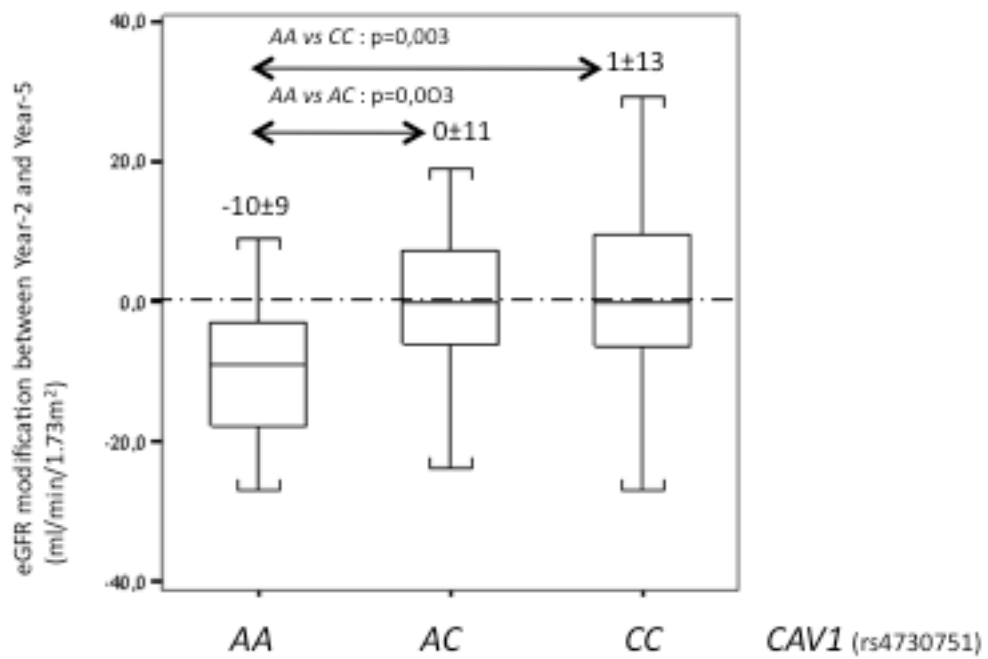


Figure 2: estimated Glomerular Filtration Rate modification according to donor CAV1 genotype (rs4730751) between 2- and 5-years post transplant. estimated Glomerular Filtration Rate was evaluated according to aMDRD.

Analysis of covariance for eGFR levels (expressed as log₁₀-transformed) was consistent with the conclusions regarding serum creatinine levels (**Table 2**). Again, significant interactions were observed between genotype and time (p=0.02) as well as between genotype and delayed graft function (p=0.001). Three-month eGFR levels were not significantly different for patients that did not experience delayed graft function (p=0.24), whereas three-month eGFR levels were statistically different according to graft genotype for patients that experienced delayed graft function (AA vs. AC: p=0.01; AA vs. CC: p=0.0005, AC vs. CC: p=0.02). In particular, eGFR decreased significantly over time for patients transplanted with a AA graft genotype (p=0.0005) or a AC graft genotype (p=0.04). This decrease was faster for AA genotype compared to AC genotype (test of equality of slopes: p=0.01). Other predictors associated with an eGFR decrease were a higher donor age (p<0.0001) and an acute rejection after transplantation (p=0.0001).

By Kaplan Maier analysis, rs4730751 did not affect renal survival (data not shown).

Association between rs4730751 and renal graft histology

Regardless of the biopsy indications (systematic or on clinical indication), neither the development of Tacrolimus nephrotoxicity nor acute tubular necrosis were influenced by *CAVI* genotype (**Table 3**). Similarly, the frequency of acute rejection lesions was independent of *CAVI* genotype (data not shown). Concerning the clinically indicated biopsies, the incidence of interstitial fibrotic lesions (ci=1 and ci=2) was statistically higher for grafts carrying the rs4730751 AA compared to AC or CC grafts. This relation between *CAVI* genotypes and fibrotic lesions was also observed on systematic biopsies, but did not reach significance. As few patients exhibited severe interstitial fibrotic lesions (ci=3) (6 patients), statistical analysis could not be performed.

Table 2: Covariance analysis of repeated measures for creatinine and estimated glomerular filtration rate.

Variable	Creatinine			eGFR(aMDRD)		
	Beta	F	p	Beta	F	p
Intercept	0.9319			1.8358		
CAV1 Genotype		4.93	0.008		5.98	0.003
AA	Reference			Reference		
AC	0.0515			-0.0508		
CC	0.0254			-0.0310		
Time (per year)	0.0262	17.63	<0.0001	-0.0298	18.23	<0.0001
Interaction genotype/time (per year)		3.88	0.02		3.75	0.02
AA	Reference			Reference		
AC	-0.0209			0.0230		
CC	-0.0219			0.0249		
Delayed graft function.		0.08	0.78		0.53	0.47
No	Reference			Reference		
Yes	-0.0956			0.1322		
Interaction Génotype/DGF		6.02	0.003		6.98	0.001
AA	Reference			Reference		
AC	0.0990			-0.1287		
CC	0.1691			-0.2123		
Donor age (per year)	0.0036	84.10	<0.0001	-0.0045	140.76	<0.0001
Acute rejection			NS		15.15	0.0001
No				Reference		
Yes				-0.0695		

eGFR : estimated glomerular filtration rate, aMDRD : abbreviated modified diet for renal disease.

Discussion

Since the first draft of the human genome has been released, substantial progress has been made in our understanding of the genetic basis of many complex diseases. In particular, large scale analyses have provided important new insights into the genetic architecture of chronic kidney disease (CKD) by identifying new susceptibility loci influencing susceptibility to develop CKD (Doi et al., 2008 ; Parsa et al., 2013). Nevertheless, much less is known about the allelic spectrum for genes underlying kidney fibrosis (Hold et al., 2013), a progressive pathogenic process ultimately leading to end-stage renal failure. Recently, using a tagging approach, Moore et al. (2010) identified and validated an association between a common genetic variant (rs4730751) within the *CAVI* gene and renal allograft failure and fibrosis, when present in the donor kidney. Furthermore, *CAVI*, the primary structural component of plasma membrane caveolae, has independently been identified as a crucial inhibitor of tissue fibrosis and has been functionally implicated in the pathogenesis of various fibrotic disorders including kidney fibrosis (Wynn 2007).

In this study, we investigated whether patients harboring the *CAVI* rs4730751 AA genotype are at higher risk of chronic allograft dysfunction. Our results showed that patients receiving a graft *CAVI* genotype significantly developed interstitial fibrosis lesions (ci=1 and ci=2), and are more prone to experience a decrease of kidney function overtime. Modification of graft function was observed with both creatinine measurement and estimation of the glomerular filtration rate, underlying that graft function modification was independent of recipient age progression. Moreover, for patients with a past history of graft-delayed function, *CAVI* genotype is a determinant of renal function recovery at three months post-transplant. However, no association with tacrolimus-induced lesions of acute or chronic toxicity was found, suggesting that this genotype does not influence Tacrolimus nephrotoxicity. Others factors associated with worse renal allograft function were donor age and a past history of acute rejection. These factors are usually observed in renal transplant cohort study (r Abramowicz et al., 2014). Of note, the follow-up of our cohort was not sufficient to test an association between graft survival and *CAVI* genotype and thus we were unable to independently replicate findings obtained by Moore et al. (2010). Furthermore, patients

Table 3 : Impact of *CAVI* genotype on graft histological lesions.

Biopsies	<i>CAVI</i> genotype		
	AA	AC	CC
Systematic	N= 10	N=43	N=69
Acute tubular necrosis	0	0	1 (1,4%)
Tacrolimus acute tubular toxicity	1 (10,0%)	7 (16,3%)	18 (26,1%)
Tacrolimus chronic vascular toxicity	1 (10,0%)	5 (11,6%)	7 (10,1%)
FI/AT grade I or II	5 (50,0%)	14 (32,6%)	18 (26,1%)
FI/AT grade III	0	1 (2,3%)	0
Clinically indicated biopsies	N=7	N=38	N=49
Acute tubular necrosis	2 (28,6%)	12 (31,6%)	11 (22,4%)
Tacrolimus acute tubular toxicity	1 (14,3%)	5 (13,2%)	9 (18,4%)
Tacrolimus chronic vascular toxicity	2 (28,6%)	7 (18,4%)	9 (18,4%)
FI/AT grade I or II	5 (71,4%)*	11 (28,9%)*	5 (10,2%)*
FI/AT grade III	0	1 (2,6%)	3 (6,1%)
Total of biopsies	N=17	N=81	N=118
Acute tubular necrosis	2 (11,8%)	12 (14,8%)	12 (10,2%)
Tacrolimus acute tubular toxicity	3 (17,6%)	12 (14,8%)	27 (22,9%)
Tacrolimus chronic vascular toxicity	3 (17,6%)	12 (14,8%)	16 (13,5%)
FI/AT grade I or II	10 (58,8%)**	25 (30,8%)**	23 (19,5%)**
FI/AT grade III	0	3 (3,7%)	3 (2,5%)

receiving a graft from AA genotype were quite younger and experienced delayed graft function to a lesser extent. While non significant, this discrepancies between genotypes groups could impact renal survival analysis.

Although our study as well as that of Moore et al.(2010) identified a statistical association between the rs4730751 tag SNP and renal allograft function, the precise variants that have a causal role remain to be identified. As the rs4730751 tag SNP is not in linkage disequilibrium with other variants located in exons that may truncate or otherwise alter CAV1 gene product, the causative variant is likely to be regulatory rather than coding. Indeed, for multifactorial traits, most of the genetic variants identified so far have been mapped to non-protein-coding regions, where they influence transcriptional output (Freedman et al. , 2011). Interestingly, Manetti et al. (2012), recently identified an association between the *CAVI* rs959173 intronic SNP and systemic sclerosis, a connective tissue disease associated with fibrosis. Therefore, *CAVI* genetics is likely to be complex, and deep resequencing at the *CAVI* locus is required to clearly define the causal variants.

As renal transplantation may be viewed as an *in vivo* model of accelerated tissue fibrosis, genotyping of *CAVI* may be relevant in other renal and non renal diseases characterized by tissue fibrosis. In line with this, Chand et al. (2013) recently found an association between rs4730751 *CAVI* genetic polymorphism and the prognosis of ANCA associated vasculitis, with a protective effect of the CC genotype. Also, CAV1 genotyping may extend to other chronic kidney disease-conditions in which CAV1 is thought to play a major role.

References

Abramowicz D, Cochat P, Claas FH, Heemann U, Pascual J, Dudley C, Harden P, Hourmant M, Maggiore U, Salvadori M, Spasovski G, Squifflet JP, Steiger J, Torres A, Viklicky O, Zeier M, Vanholder R, Van Biesen W, Nagler E. European Renal Best Practice Guideline on kidney donor and recipient evaluation and perioperative care. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Jul 9. pii: gfu216.

Brouard S, Renaudin K, Souillou JP. Revisiting the Natural History of IF/TA in Renal Transplantation. *Am J Transplant*. 2011 Apr;11(4):647-9.

Chand S, Holle JU, Hilhorst M, Simmonds MJ, Smith S, Kamesh L, Hewins P, McKnight AJ, Maxwell AP, Cohen Tervaert JW, Wieczorek S, Harper L, Borrows R. Caveolin-1 single nucleotide polymorphism in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis. *PLoS One*. 2013 Jul 19;8(7):e69022.

Chidlow JH Jr, Sessa WC. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2010 May 1;86(2):219-25

Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev*. 2004 Oct;84(4):1341-79.

Del Galdo F, Lisanti MP, Jimenez SA. (2008a) Caveolin-1, transforming growth factor-beta receptor internalization, and the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 20(6):713-719.

Del Galdo F, Sotgia F, de Almeida CJ, Jasmin JF, Musick M, et al. (2008b) Decreased expression of caveolin 1 in patients with systemic sclerosis: crucial role in the pathogenesis of tissue fibrosis. *Arthritis Rheum*. 58(9):2854-2865.

Doi K, Okamoto K, Tokunaga K, Fujita T, Noiri E. Genome study of kidney disease in the age of post genome-sequencing. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2008 Sep;8(3):173-83

Freedman ML¹, Monteiro AN, Gayther SA, Coetzee GA, Risch A, Plass C, Casey G, De Biasi M, Carlson C, Duggan D, James M, Liu P, Tichelaar JW, Vikis HG, You M, Mills IG.

Principles for the post-GWAS functional characterization of cancer risk loci. *Nat Genet.* 2011 Jun;43(6):513-8.

Harvey RD, Calaghan SC. Caveolae create local signalling domains through their distinct protein content, lipid profile and morphology. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Feb;52(2):366-75.

Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, Manolio TA. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 9;106(23):9362-7.

Hold GL, Untiveros P, Saunders KA, El-Omar EM. Role of host genetics in fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2009 Dec 4;2(1):6.

Lee EK, Lee YS, Han IO, Park SH. (2007) Expression of Caveolin-1 reduces cellular responses to TGF-beta1 through down-regulating the expression of TGF-beta type II receptor gene in NIH3T3 fibroblast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 359(2):385-390.

Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, Kusek JW, Van Lente F; Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2006 Aug 15;145(4):247-54

Manetti M1, Allanore Y, Saad M, Fatini C, Cohignac V, Guiducci S, Romano E, Airó P, Caramaschi P, Tinazzi I, Riccieri V, Della Rossa A, Abbate R, Caporali R, Cuomo G, Valesini G, Dieudé P, Hachulla E, Cracowski JL, Tiev K, Letenneur L, Amouyel P, Lambert JC, Chiocchia G, Martinez M, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. Evidence for caveolin-1 as a new susceptibility gene regulating tissue fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2012 Jun;71(6):1034-41.

Moore J, McKnight AJ, Simmonds MJ, Courtney AE, Hanvesakul R, Brand OJ, BriggsD, Ball S, Cockwell P, Patterson CC, Maxwell AP, Gough SC, Borrows R. Association of caveolin-1 gene polymorphism with kidney transplant fibrosis and allograft failure. *JAMA.* 2010 Apr 7;303(13):1282-7.

Moriyama T, Tsuruta Y, Shimizu A, Itabashi M, Takei T, Horita S, Uchida K, Nitta K. The significance of caveolae in the glomeruli in glomerular disease. *J ClinPathol.* 2011 Jun;64(6):504-9.

Park HC, Yasuda K, Ratliff B, Stoessel A, Sharkovska Y, Yamamoto I, Jasmin JF, Bachmann S, Lisanti MP, Chander P, Goligorsky MS. Postobstructive regeneration of kidney is derailed when surge in renal stem cells during course of unilateral ureteral obstruction is halted. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Feb;298(2):F357-64.

Parsa A, Fuchsberger C, Köttgen A, O'Seaghdha CM, Pattaro C, de Andrade M, Chasman DI, Teumer A, Endlich K, et al. Common variants in Mendelian kidney disease genes and their association with renal function. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Dec;24(12):2105-17.

Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev*. 2002 Sep;54(3):431-67.

Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*. 2008 Apr;8(4):753-60

Wynn T. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*. 2007 March 1; 117(3): 524–529.

Discussion générale

Discussion générale

Les anticalcicurines (ACN), traitements pivots en transplantation rénale, ont permis de diminuer de manière drastique l'incidence de rejet de greffe. Au sein de cette classe thérapeutique, le Tacrolimus devient l'agent majoritairement utilisé : en 2011, plus de 90% des patients américains transplantés rénaux bénéficient de ce traitement (www.usrds.org). L'utilisation de la Cyclosporine est progressivement devenue minoritaire. Cependant, paradoxalement, les effets néphrotoxiques des ACN représentent des limites à leur utilisation. Bien que controversé, il a été suggéré que le Tacrolimus posséderait un potentiel néphrotoxique moins important que la Cyclosporine (Martins *et al.*, 2004 ; Schmitz *et al.*, 2008 ; Fioretto *et al.*, 2011). Même s'il n'existe pas de marqueurs spécifiques de la néphrotoxicité induite par les ACN (El Zoghby *et al.*, 2009 ; Mengel *et al.*, 2011), des lésions de FI/AT (Fibrose Interstitielle / Atrophie Tubulaire) sont décrites dans les greffons rénaux de patients exposés à ces immunosuppresseurs (Nankivell *et al.*, 2003 ; Snanoudj *et al.*, 2011). L'objet des travaux de cette thèse était d'apporter des éléments supplémentaires permettant d'améliorer la connaissance des effets toxiques du Tacrolimus.

La compréhension des mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité et les lésions de fibrose induite par le Tacrolimus nécessite la mise en place de modèles expérimentaux. De tels modèles permettent de mieux caractériser la toxicité du Tacrolimus en fonction du niveau d'expression des protéines d'intérêt, mais également de contrôler de manière stricte les conditions d'exposition au Tacrolimus. Un des premiers objectifs de ces travaux était de mettre en place un modèle cellulaire pertinent. Les lignées HK2 et HEK293 classiquement utilisées présentent des inconvénients majeurs. Ainsi, la lignée cellulaire de cellules épithéliales HK2, du fait de son immortalisation, tend à se différencier et à acquérir des caractéristiques non spécifiques (Bens & Vandewalle, 2008). Parmi les autres modèles de cellules rénales disponibles, nous avons montré que la lignée cellulaire HEK293 présente un profil d'expression d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques et de transporteurs éloigné de celui du tissu rénal. De plus, bien que les cellules HEK293 proviennent de tissu rénal embryonnaire, elles expriment des protéines normalement non observées dans le tissu rénal comme par exemple des neurofilaments (Shaw *et al.*, 2002). Le choix du modèle *in vitro* s'est donc porté sur des cultures primaires de cellules épithéliales tubulaires proximales rénales humaines (CTP) qui représentent une cible privilégiée de l'agression toxique du Tacrolimus (Atcherson & Trifillis, 1994). De plus, dans le tissu rénal sain, les CYP3A5 et ABCB1, qui interviennent dans la prise en charge du Tacrolimus, sont exprimés de manière importante par les CTP (Hesselink *et al.*, 2010). Ainsi, nous

avons développé et caractérisé un modèle de culture primaire de CTP à partir de pièces de néphrectomies. Les cultures cellulaires nous ont permis d'aborder l'évaluation de la toxicité du Tacrolimus sur les CTP et, bien que les résultats soient préliminaires, le Tacrolimus semble être un stimulus pro-fibrosant. Cependant, alors que les cultures primaires de CTP représentent un modèle pertinent pour étudier des mécanismes physiologiques, physiopathologiques ou encore de toxicité, nous avons été limités à la fois par la disponibilité des tissus rénaux et par le faible nombre de passages cellulaires (5 passages) au cours duquel les cultures primaires restent stables. Par ailleurs, des cultures primaires commerciales de CTP sont disponibles et ont déjà été utilisées dans des études toxicologiques (Li *et al.*, 2003, 2006 ; Königs *et al.*, 2009). Néanmoins, les cultures primaires commerciales expriment de manière plus faible des marqueurs tubulaires proximaux, tels que CD10 et CD13, comparé à notre modèle de culture primaire de CTP. Au total, la culture cellulaire représente un moyen performant pour connaître l'impact d'une substance sur sa cible potentielle, décrire les mécanismes impliqués et établir des hypothèses concernant la réalité *in vivo*. Le modèle de culture primaire de CTP que nous avons développé pourra ainsi représenter un modèle intéressant pour mieux comprendre la susceptibilité du tissu rénal à l'agression chimique d'autres composés environnementaux néphrotoxiques (métaux lourds, cisplatine...), et pour étudier des mécanismes physiopathologiques tels que la fibrogenèse

L'utilisation de modèles cellulaires de CTP, qui ne représentent qu'une sous population cellulaire du fait de l'hétérogénéité du rein, ne permet pas d'appréhender totalement les phénomènes de toxicité *in situ*. C'est pourquoi nous avons mis en place un modèle murin afin d'étudier les effets néphrotoxiques du Tacrolimus. Le modèle murin d'exposition au Tacrolimus ne reflète pas directement la situation clinique, mais il permet d'appréhender les mécanismes conduisant au développement de lésions de fibrose et de néphrotoxicité. De plus, dans l'étude pilote que nous avons réalisée, bien que la dose administrée de Tacrolimus soit plus importante que celle donnée en clinique, les concentrations plasmatiques restent comparables à celles observées chez les patients (Shihab *et al.*, 1997). Dans notre étude, nous observons que l'exposition au Tacrolimus, chez les souris, entraîne une altération de la fonction rénale, une expression de marqueurs de TEM au niveau des tubules proximaux et une surexpression de miR-21. L'étude de ce microARN, en particulier, était basée sur son implication dans le processus de fibrose rénale (Zarjou *et al.*, 2011 ; Glowacki *et al.*, 2013), ainsi que le mécanisme de TEM (Luo *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2014), à la fois dans des modèles animaux et chez l'homme. Nos résultats apportent ainsi des éléments en faveur de l'implication de miR-21 dans la néphrotoxicité induite par le Tacrolimus. Afin de confirmer ces résultats, il serait intéressant de poursuivre l'étude en inhibant miR-21 dans des modèles

expérimentaux. D'une part, dans un modèle *in vitro*, des cellules peuvent être exposées au Tacrolimus avec ou sans inhibiteurs de mir-21 de type antagomir. D'autre part, nous pourrions utiliser des inhibiteurs de miR-21 chez des souris sauvages ou bien nous pourrions comparer la toxicité du Tacrolimus et du développement de lésions de fibrose chez des souris KO *miR-21^{-/-}*, disponibles au laboratoire par rapport à des souris sauvages. Par ailleurs, en transplantation rénale, plusieurs auteurs ont montré que les marqueurs de TEM sont associés à la fibrose et à la survie des greffons (Robertson *et al.*, 2004 ; Hertig *et al.*, 2006 ; de Matos *et al.*, 2010 ; Hazzan *et al.*, 2011 ; Xu-Dubois *et al.*, 2013a, 2013b). C'est dans ce cadre que nous avons mesuré le phénomène de TEM sous Tacrolimus. Au delà de l'observation de marqueurs de TEM, il aurait été intéressant d'analyser l'expression des MMP-2 et -9, des enzymes clé de la TEM qui, en clivant spécifiquement le collagène de type IV et les laminines, les constituants majeurs de la membrane basale tubulaire, perturbent l'intégrité membranaire des cellules tubulaires (Lenz *et al.*, 2000 ; Zheng *et al.*, 2009 ; Tan *et al.*, 2010).

Au delà du développement de ces modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*, nous avons abordé les effets néphrotoxiques du Tacrolimus par une approche clinique. En effet, alors que l'ensemble des patients transplantés rénaux sous ACN développe, à long terme, des lésions de néphrotoxicité, le délai d'apparition et l'intensité de ces lésions demeurent variables d'un individu à l'autre. La susceptibilité interindividuelle pourrait être alors en partie liée à des mécanismes génétiques et épigénétiques affectant la capacité du tissu rénal à se défendre contre les xénobiotiques. De nombreuses études pharmacocinétiques (Hesselink *et al.*, 2003 ; Uesegi *et al.*, 2006, Staatz *et al.*, 2010) ont démontré que des SNP affectant la séquence de certains gènes du receveur (*CYP3A5*, *ABCB1*) sont des déterminants majeurs de la pharmacocinétique du Tacrolimus. Par contre, les déterminants génétiques impliqués dans la survenue d'effets indésirables d'ordre néphrotoxique chez les patients traités par Tacrolimus sont bien moins connus. L'analyse des caractéristiques génétiques du rein greffé (et donc du donneur) constitue une voie pertinente pour appréhender les mécanismes moléculaires à l'origine de la toxicité locale du Tacrolimus. L'hypothèse de l'impact du patrimoine génétique sur la néphrotoxicité du Tacrolimus étant relativement récente, peu d'études sont disponibles dans la littérature. L'association du SNP *ABCB1* 3A35C>T avec les lésions néphrotoxiques des ACN a été observée dans quelques études (Hauser *et al.*, 2005 ; Naesens *et al.*, 2009a). En revanche, dans notre étude clinique, nous avons montré, chez des patients transplantés rénaux sous Tacrolimus, que les greffons porteurs d'un allèle *ABCB1* 3435T développent moins de fibrose et de TEM. Ces résultats restent concordants avec ceux de Moore *et al.* (2012) qui ont montré, dans une large cohorte (environ 780 patients) avec un suivi de plus de 13 ans, que les

patients dont le greffon est de génotype *ABCB1* 3435CC ont un risque plus important de perte de greffon. Par ailleurs, dans notre étude nous nous sommes intéressés qu'à deux gènes (*CYP3A5*, *ABCB1*) impliqués dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques. Il aurait été intéressant d'évaluer l'impact de SNP affectant d'autres gènes impliqués dans la prise en charge du Tacrolimus tels que PXR, un régulateur transcriptionnel du *CYP3A5* et de *ABCB1* (Burk *et al.*, 2004 ; Jiang *et al.*, 2011). Enfin, la susceptibilité interindividuelle aux effets néphrotoxiques du Tacrolimus peut s'expliquer par des facteurs indépendants de ceux impliqués dans la prise en charge cellulaire du Tacrolimus. Ainsi, dans ce travail, nous avons montré que le polymorphisme génétique rs4730751 affectant le gène *CAV1*, un gène anti-fibrosant, était associé à une perte de fonction rénale. Dans la littérature, une association entre le génotype *CAV1* rs4730751AA et le développement de lésions de fibrose et de perte de greffon a été observée dans de larges cohortes avec un suivi d'environ 6 ans (Moore *et al.*, 2010). Enfin, d'autres gènes candidats ont été évoqués dans le cadre de la néphrotoxicité des ACN et plus généralement dans le cadre de la transplantation rénale. C'est le cas du gène *APOL1*, codant pour l'Apolipoprotéine L1, pour lequel le variant G1 (associé à deux SNP non synonymes : rs73885319, Ser342Gly et rs60910145, Ile384Met) et le variant G2 (associé à une délétion de 6 paires de base), chez le donneur, représentent des facteurs de risque de perte de greffon précoce. La fréquence de ces variants est très faible chez les Caucasiens (moins de 1%) mais 50% des Afro-Américains expriment au moins un variant, 12% possèdent les deux (Reeves-Daniel *et al.*, 2011 ; Palanisamy *et al.*, 2013).

Au total, dans ce travail nous nous sommes intéressés qu'à certains polymorphismes génétiques affectant des gènes candidats. Ainsi, des approches à haut débit pourraient être pertinentes dans l'identification de déterminants moléculaires de la néphrotoxicité induite par le Tacrolimus. Les études pan-génomiques ou GWAS (Genome Wide Association Study) permettent d'étudier des signatures géniques dans l'ensemble du génome associées à des caractéristiques biologiques (Donnelli, 2008). L'avantage des GWAS est que cette approche n'est pas biaisée puisqu'il n'y a pas d'hypothèse *a priori* sur les gènes analysés. Cependant, ce type d'étude nécessite des cohortes de patients bien caractérisées d'un point de vue phénotypique et dont le nombre est suffisant pour être statistiquement puissant. Cette caractérisation phénotypique pose la question d'une définition très unanime des phénomènes histologiques de néphrotoxicité et peut représenter un frein à la constitution d'une très large cohorte de patients. De plus, plusieurs signatures géniques peuvent être associées à un même phénotype. Le séquençage haut débit (NGS pour Next Generation Sequencing) permettrait, de mettre en évidence des mutations qui peuvent jouer un rôle dans les phénomènes de néphrotoxicité induite par le Tacrolimus. Néanmoins, en dehors des coûts

d'analyses, le séquençage haut débit génère de nombreuses données dont la gestion demeure délicate (Metzker, 2010). Dans le cadre des néphropathies, plusieurs études pan-génomiques ont d'ores et déjà mis en lien des polymorphismes génétiques, tels que des SNP affectant les gènes *UMOD* (codant pour l'uromoduline), ou *NAT8* et *SLC7A9* (tous deux impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques) avec la Maladie Rénale Chronique (Kottgen *et al.*, 2009 ; Böger *et al.*, 2011). Enfin, plus récemment, une étude pan-génomique, menée dans une cohorte d'Afro-Américains, a révélé que 37 SNP sont associés à la néphropathie diabétique, dont les variants G1 et G2 de *APOL1* (Palmer *et al.*, 2014).

Au-delà des aspects génétiques, des facteurs épigénétiques impliqués dans le processus de fibrogenèse jouent potentiellement un rôle dans la néphrotoxicité du Tacrolimus. Ainsi, il a été montré, dans le rein, que l'hyperméthylation du promoteur de *RASAL1* (Ras protein Activator Like-1), un inhibiteur de Ras, induisait l'activation des fibroblastes et donc la fibrogenèse (Bechtel *et al.*, 2010). De plus, dans la fibrose pulmonaire, l'hypoacétylation des histones induit une diminution de l'expression de COX-2, un gène anti-fibrosant (Coward *et al.*, 2009) De même, dans un modèle *in vitro* de cultures primaires de cellules mésangiales, le TGF- β peut induire des modifications dans la méthylation des histones au niveau des promoteurs des gènes pro-fibrosants *COL1A1*, *CTGF* et *PAI-1* (Sun *et al.*, 2010). Dans le rein, à l'heure actuelle, les données restent parcellaires. Néanmoins, il a été montré dans un modèle d'OUU et *in vitro*, que l'inhibition des histones déacétylases (HDAC) diminue l'expression du récepteur au TGF- β T β RI, bloque l'activation des fibroblastes en myofibroblastes et ainsi inhibe la fibrogenèse (Pang *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2013). Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur les miARN et plus précisément sur miR-21, du fait de son implication dans la fibrose rénale ; à titre d'exemple, il a été rapporté que miR-21 cible certains gènes tels que Smad7 (Zarjou *et al.*, 2011 ; Chau *et al.*, 2012 ; Chung *et al.*, 2013 ; Zhong *et al.*, 2013). D'autres miARN candidats peuvent également être étudiés dans les phénomènes de néphrotoxicité induite par le Tacromus tels que les miARN régulant l'expression du *CYP3A5* ou d'*ABCB1* ou les miARN impliqués dans la fibrose. La technique du séquençage haut débit apparait donc de nouveau intéressante car elle permettrait d'identifier et de quantifier des miARN ou d'autres ARN non codants ou encore d'identifier des variants qui pourraient être impliqués dans la néphrotoxicité du Tacrolimus.

Parmi les différents mécanismes épigénétiques, nous nous sommes préférentiellement intéressés aux miARN car d'un point de vue clinique, de nombreuses études suggèrent la possibilité d'utiliser les miARN comme outils diagnostiques et pronostiques. En effet, dans certaines conditions physiopathologiques, les miARN tissulaires peuvent être relargués dans la circulation sanguine

(Cortez *et al.*, 2011). Les miARN sont stables dans les fluides biologiques et peuvent être considérés comme de potentiels biomarqueurs non invasifs (Etheridge *et al.*, 2011). La stabilité des miARN dans les fluides biologiques peut s'expliquer par la découverte de microvésicules lipidiques ou exosomes qui contiennent les miARN (Cortez & Calin, 2009). Les miARN, contenus dans les exosomes, joueraient un rôle « d'hormone ». Grâce à ce mécanisme, une cellule « donneuse » pourrait moduler l'expression de gènes d'une cellule « receveuse ». Néanmoins, des études sont nécessaires pour valider et explorer ce mécanisme (Cortez *et al.*, 2011). Dans le cadre de la transplantation rénale et de la fibrose rénale, l'intérêt des miARN circulants est important puisque le diagnostic du caractère extensif de la fibrose repose sur des critères histologiques et est donc soumis à la réalisation d'une biopsie rénale. Quelques études ont testé l'intérêt des miARN circulants en pathologie rénale. Ainsi dans notre laboratoire, nous avons montré que le niveau d'expression sérique de miR-21 est associé aux lésions sévères de fibrose rénale (Glowacki *et al.*, 2013). De plus, le niveau d'expression, dans les urines, de miR-29c est corrélé, de manière inverse, à la fibrose interstitielle dans le rein (Lv *et al.*, 2013). Dans le cadre de la transplantation rénale, une étude a mis en évidence une modulation de certains miARN (surexpression de miR-142-3p ; sous-expression de miR-99a, miR-200b, miR-204 et de miR-211) dans les urines de patients présentant des lésions de FI/AT sur leur greffon (Scian *et al.*, 2011 ; Maluf *et al.*, 2014). Néanmoins, ces deux dernières études, n'ont pas évalué la sévérité des lésions de fibrose. Enfin, la modulation de l'expression de miARN peut aboutir à de nouvelles stratégies thérapeutiques. A l'heure actuelle, cette stratégie est testée en clinique, avec l'utilisation d'antagoniste de miR-122 dans le domaine de l'hépatite C (Janssen *et al.*, 2013).

Au total, les corrélations pharmacogénétiques / toxicité obtenues devraient permettre de déterminer des facteurs individuels de vulnérabilité à la toxicité du Tacrolimus. De telles données, utilisées comme outil prédictif de la susceptibilité à des effets néphrotoxiques plus ou moins importants, ouvre de nombreuses opportunités en matière de Médecine Personnalisée appliquée à la transplantation. Une adaptation de posologie ou l'introduction de moyens de néphroprotection pourraient être ainsi proposées. A terme, sur le plan médico-économique, le type d'étude que nous avons abordée, pourrait permettre d'améliorer la prise en charge de la néphrotoxicité des ACN, et ainsi réduire les coûts de traitement liés aux pertes de greffons induites par la toxicité du Tacrolimus. Enfin, compte tenu du caractère très ubiquitaire de la fibrogenèse, cette démarche pourrait ensuite être transposée à d'autres néphropathies au cours de la Maladie Rénale Chronique. L'identification d'un biomarqueur pronostique précisant le risque d'évolution vers la fibrose interstitielle sévère, ou

d'un biomarqueur diagnostique du niveau actuel de fibrose permettrait de mieux prédire le risque évolutif d'une néphropathie.

Bibliographie

Bibliographie

- Akhurst RJ, Hata A. (2012) Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov.* **11**(10):790-811.
- Allorge D, Lorient MA. (2004) Pharmacogenetics or the promise of a personalized medicine: variability in drug metabolism and transport. *Ann Biol Clin (Paris).* **62**(5):499-511.
- Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, Hummel A, Snopkowski C, *et al.* (2009) MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**(13):5330-5335.
- Atcherson MM, Trifillis AL. (1994) Cytotoxic effects of FK506 on human renal proximal tubule cells in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **30A**(9):562-567.
- Azzi JR, Sayegh MH, Mallat SG. (2013) Calcineurin Inhibitors: 40 Years Later, Can't Live Without ... *J Immunol.* **191**(12):5785-5791.
- Bach PH, Obatomi DK, Brant S. (1993) In Vitro Models for Nephrotoxicity Screening and Risk Assessment. In: Castell JV and Gómez-Lechón MJ, ed. *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research* pp.55-101,I-II.
- Badid C, Desmouliere A, Babici D, Hadj-Aissa A, McGregor B, *et al.* (2002) Interstitial expression of alpha-SMA: an early marker of chronic renal allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant.* **17**(11):1993-1998.
- Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron GM, Fruncillo R, *et al.* (1999) Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther.* **66**(3):288-294.
- Bannister AJ, Kouzarides T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**(3):381-395.
- Bao L, Hazari S, Mehra S, Kaushal D, Moroz K, Dash S. (2012) Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298. *Am J Pathol.* **180**(6):2490-2503.
- Barracough KA, Isbel NM, Lee KJ, Bergmann TK, Johnson DW, *et al.* (2012) NR112 polymorphisms are related to tacrolimus dose-adjusted exposure and BK viremia in adult kidney transplantation. *Transplantation.* **94**(10):1025-1032.
- Baskerville S, Bartel DP. (2005) Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA.* **11**(3):241-247.
- Beaune P, Lorient MA. (2000) Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques : aspects métaboliques. *Médecine/Sciences.* **16** :1051-1056.
- Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Müller GA, Kalbacher H, *et al.* (2010) Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med.* **16**(5):544-550.

- Becknell B, Greenbaum LA, Smoyer WE. (2012) A new 'tac' for childhood nephrotic syndrome. *Kidney Int.* **82**(10):1049-1051.
- Bellini A, Mattoli S. (2007) The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest.* **87**(9):858-870.
- Ben-Dov IZ, Muthukumar T, Morozov P, Mueller FB, Tuschl T, Suthanthiran M. (2012) MicroRNA sequence profiles of human kidney allografts with or without tubulointerstitial fibrosis. *Transplantation.* **94**(11):1086-1094.
- Benish RL, Rodriguez B, Zimmerman PA, Mehlotra RK. (2010) Comparative description of haplotype structure and genetic diversity of MDR1 (ABCB1) in HIV-positive and HIV-negative populations. *Infect Genet Evol.* **10**(1):60-67.
- Bens M, Vandewalle A. (2008) Cell models for studying renal physiology. *Pflugers Arch.* **457**(1):1-15.
- Bird A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**(1):6-21.
- Blahna MT, Hata A. (2013) Regulation of miRNA biogenesis as an integrated component of growth factor signaling. *Curr Opin Cell Biol.* **25**(2):233-240.
- Böger CA, Heid IM. (2011) Chronic kidney disease: novel insights from genome-wide association studies. *Kidney Blood Press Res.* **34**(4):225-234.
- Boudjema K, Camus C, Saliba F, Calmus Y, Salamé E, *et al.* (2011) Reduced-dose tacrolimus with mycophenolate mofetil vs. standard-dose tacrolimus in liver transplantation: a randomized study. *Am J Transplant.* **11**(5):965-976.
- Brennan EP, Nolan KA, Börgeson E, Gough OS, McEvoy CM, *et al.* (2013) Lipoxins attenuate renal fibrosis by inducing let-7c and suppressing TGF β R1. *J Am Soc Nephrol.* **24**(4):627-637.
- Burk O, Koch I, Raucy J, Hustert E, Eichelbaum M, *et al.* (2004) The induction of cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) in the human liver and intestine is mediated by the xenobiotic sensors pregnane X receptor (PXR) and constitutively activated receptor (CAR). *J Biol Chem.* **279**(37):38379-38385.
- Burns WC, Kantharidis P, Thomas MC. (2007) The role of tubular epithelial-mesenchymal transition in progressive kidney disease. *Cells Tissues Organs.* **185**(1-3):222-231.
- Carrion R, Morgan BE, Tannenbaum M, Salup R, Morgan MB. (2003) Caveolin expression in adult renal tumors. *Urol Oncol.* **21**(3):191-196.
- Castell JV, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. (2005) Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Pathol.* **57** Suppl 1:189-204.
- Chai X, Zeng S, Xie W. (2013) Nuclear receptors PXR and CAR: implications for drug metabolism regulation, pharmacogenomics and beyond. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **9**(3):253-266.
- Chau BN, Xin C, Hartner J, Ren S, Castano AP, *et al.* (2012) MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Sci Transl Med.* **4**(121):121ra18.

- Chen KG, Wang YC, Schaner ME, Francisco B, Durán GE, *et al.* (2005) Genetic and epigenetic modeling of the origins of multidrug-resistant cells in a human sarcoma cell line. *Cancer Res.* **65**(20):9388-9397.
- Chiasson VL, Jones KA, Kopriva SE, Mahajan A, Young KJ, Mitchell BM. (2012) Endothelial cell transforming growth factor- β receptor activation causes tacrolimus-induced renal arteriolar hyalinosis. *Kidney Int.* **82**(8):857-866.
- Chidlow JH Jr, Sessa WC. (2010) Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovasc Res.* **86**(2):219-225.
- Cho JH, Huh S, Kwon TG, Choi JY, Hur IK, *et al.* (2008) Association of C-509T and T869C polymorphisms of transforming growth factor-beta1 gene with chronic allograft nephropathy and graft survival in Korean renal transplant recipients. *Transplant Proc.* **40**(7):2355-2360.
- Chung AC, Huang XR, Meng X, Lan HY. (2010) miR-192 mediates TGF-beta/Smad3-driven renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* **21**(8):1317-1325.
- Chung AC, Yu X, Lan HY. (2013) MicroRNA and nephropathy: emerging concepts. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* **6**:169-179.
- Cook LG, Chiasson VL, Long C, Wu GY, Mitchell BM. (2009) Tacrolimus reduces nitric oxide synthase function by binding to FKBP rather than by its calcineurin effect. *Kidney Int.* **75**(7):719-726.
- Cortez MA, Calin GA. (2009) MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther.* **9**(6):703-711.
- Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. (2011) MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol.* **8**(8):467-477.
- Coto E, Tavira B. (2009) Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in renal transplantation. *Transplantation.* **88**(3 Suppl):S62-67.
- Coward WR, Watts K, Feghali-Bostwick CA, Knox A, Pang L. (2009) Defective histone acetylation is responsible for the diminished expression of cyclooxygenase 2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Mol Cell Biol.* **29**(15):4325-4339.
- Crabtree GR, Olson EN. (2002) NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell.* **109** Suppl:S67-79.
- Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, *et al.* (2006) Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos.* **34**(5):836-847.
- Davis BB, Mattammal MB, Zenser TV. (1981) Renal metabolism of drugs and xenobiotics. *Nephron.* **27**(4-5):187-196.
- Del Galdo F, Lisanti MP, Jimenez SA. (2008a) Caveolin-1, transforming growth factor-beta receptor internalization, and the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* **20**(6):713-719.

- Del Galdo F, Sotgia F, de Almeida CJ, Jasmin JF, Musick M, *et al.* (2008b) Decreased expression of caveolin 1 in patients with systemic sclerosis: crucial role in the pathogenesis of tissue fibrosis. *Arthritis Rheum.* **58**(9):2854-2865.
- de Matos AC, Câmara NO, Tonato EJ, Durão Júnior Mde S, Franco MF, *et al.* (2010) Vimentin expression and myofibroblast infiltration are early markers of renal dysfunction in kidney transplantation: an early stage of chronic allograft dysfunction? *Transplant Proc.* **42**(9):3482-3488.
- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* **425**(6958):577-584.
- Deshpande SD, Putta S, Wang M, Lai JY, Bitzer M, *et al.* (2013) Transforming growth factor- β -induced cross talk between p53 and a microRNA in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes.* **62**(9):3151-3162.
- Dessilly G, Elens L, Panin N, Capron A, Decottignies A, *et al.* (2014) ABCB1 1199G>A Genetic Polymorphism (Rs2229109) Influences the Intracellular Accumulation of Tacrolimus in HEK293 and K562 Recombinant Cell Lines. *PLoS One.* **9**(3):e91555.
- Ding X, Kaminsky LS. (2003) Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **43**:149-173.
- Djamali A, Reese S, Yracheta J, Oberley T, Hullett D, Becker B. (2005) Epithelial-to-mesenchymal transition and oxidative stress in chronic allograft nephropathy. *Am J Transplant.* **5**(3):500-509.
- Donnelly P. (2008) Progress and challenges in genome-wide association studies in humans. *Nature.* **456**(7223):728-731.
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, *et al.* (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science.* **293**(5539):2449-2452.
- Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, *et al.* (2005) Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest.* **115**(1):56-65.
- Dwivedi RS, Herman JG, McCaffrey TA, Raj DS. (2011) Beyond genetics: epigenetic code in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **79**(1):23-32.
- Fang Y, Yu X, Liu Y, Kriegel AJ, Heng Y, *et al.* (2013) miR-29c is downregulated in renal interstitial fibrosis in humans and rats and restored by HIF- α activation. *Am J Physiol Renal Physiol.* **304**(10):F1274-1282.
- Hebbring SJ, Moyer AM, Weinshilboum RM. (2009) Sulfotransferase gene copy number variation: pharmacogenetics and function. *Cytogenet Genome Res.* **123**(1-4):205-210.
- Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, *et al.* (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem.* **276**(16):12477-12480.

- Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, *et al.* (2007) Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med.* **357**(25):2562-2575.
- Elens L, Bouamar R, Hesselink DA, Haufroid V, van der Heiden IP, *et al.* (2011) A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clin Chem.* **57**(11):1574-1583.
- Elzinga LW, Rosen S, Bennett WM. (1993) Dissociation of glomerular filtration rate from tubulointerstitial fibrosis in experimental chronic cyclosporine nephropathy: role of sodium intake. *J Am Soc Nephrol.* **4**(2):214-221.
- El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, *et al.* (2009) Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant.* **9**(3):527-535.
- Ernst E. (2002) St John's Wort supplements endanger the success of organ transplantation. *Arch Surg.* **137**(3):316-319.
- Essawy M, Soylemezoglu O, Muchaneta-Kubara EC, Shortland J, Brown CB, el Nahas AM. (1997) Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* **12**(1):43-50.
- Esteller M. (2011) Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* **12**(12):861-874.
- Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. (2011) Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res.* **717**(1-2):85-90.
- Fine LG, Norman JT. (2008) Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney Int.* **74**(7):867-872.
- Fioretto P, Najafian B, Sutherland DE, Mauer M. (2011) Tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity in native kidneys of pancreas transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol.* **6**(1):101-106.
- Firdaous I, Verbeeck RK, Hassoun A, Langrehr JM, Wallemacq PE. (1997) Excretion of tacrolimus glucuronides in human bile. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* **22**(3):217-221.
- Funk C. (2008) The role of hepatic transporters in drug elimination. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **4**(4):363-379.
- Galichon P, Vittoz N, Xu-Dubois YC, Cornaire E, Vandermeersch S, *et al.* (2011) Epithelial phenotypic changes detect cyclosporine in vivo nephrotoxicity at a reversible stage. *Transplantation.* **92**(9):993-998.
- Galichon P, Xu-Dubois YC, Finianos S, Hertig A, Rondeau E. (2013a) Clinical and histological predictors of long-term kidney graft survival. *Nephrol Dial Transplant.* **28**(6):1362-1370.
- Galichon P, Finianos S, Hertig A. (2013b) EMT-MET in renal disease: should we curb our enthusiasm? *Cancer Lett.* **341**(1):24-29.
- Galletti P, Di Gennaro CI, Migliardi V, Indaco S, Della Ragione F, *et al.* (2005) Diverse effects of natural antioxidants on cyclosporin cytotoxicity in rat renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant.* **20**(8):1551-1558.

- Ghildiyal M, Zamore PD. (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet.* **10**(2):94-108.
- Ghosh AK, Vaughan DE. (2012) PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol.* **227**(2):493-507.
- Ghosh AK, Quaggin SE, Vaughan DE. (2013) Molecular basis of organ fibrosis: potential therapeutic approaches. *Exp Biol Med (Maywood).* **238**(5):461-481.
- Gijzen VM, van Schaik RH, Elens L, Soldin OP, Soldin SJ, *et al.* (2013) CYP3A4*22 and CYP3A combined genotypes both correlate with tacrolimus disposition in pediatric heart transplant recipients. *Pharmacogenomics.* **14**(9):1027-1036.
- Glowacki F, Lionet A, Buob D, Labalette M, Allorge D, *et al.* (2011) CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in donor and recipient: impact on Tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* **26**(9):3046-3050.
- Glowacki F, Savary G, Gnemmi V, Buob D, Van der Hauwaert C, *et al.* (2013) Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis. *PLoS One.* **8**(2):e58014.
- Grgic I, Duffield JS, Humphreys BD. (2012) The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* **27**(2):183-193.
- Guder WG, Morel F. (1992) Biochemical characterization of individual nephron segments. In: Windhager EE, ed London: Oxford University Press. *Handbook of Physiology. Section 8: Renal Physiology. Vol II.* pp2119-2164.
- Guengerich FP, Rendic S. (2010) Update information on drug metabolism systems--2009, part I. *Curr Drug Metab.* **11**(1):1-3.
- Habano W, Gamo T, Sugai T, Otsuka K, Wakabayashi G, Ozawa S. (2009) CYP1B1, but not CYP1A1, is downregulated by promoter methylation in colorectal cancers. *Int J Oncol.* **34**(4):1085-1091.
- Habano W, Gamo T, Terashima J, Sugai T, Otsuka K, *et al.* (2011) Involvement of promoter methylation in the regulation of Pregnane X receptor in colon cancer cells. *BMC Cancer.* **11**:81.
- Haehner BD, Gorski JC, Vandenbranden M, Wrighton SA, Janardan SK, *et al.* (1996) Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Mol Pharmacol.* **50**(1):52-59.
- Halloran PF. (2004) Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med.* **351**(26):2715-2729.
- Han SY, Mun KC, Choi HJ, Kwak CS, Bae JH, *et al.* (2006) Effects of cyclosporine and tacrolimus on the oxidative stress in cultured mesangial cells. *Transplant Proc.* **38**(7):2240-2241.
- Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, Scheuermann EH, Wegner B, *et al.* (2005) ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* **16**(5):1501-1511.
- Haug C, Grill C, Schmid-Kotsas A, Gruenert A, Jehle PM. (1998) Endothelin release by rabbit proximal tubule cells: modulatory effects of cyclosporine A, tacrolimus, HGF and EGF. *Kidney Int.* **54**(5):1626-1636.

- Hazzan M, Hertig A, Buob D, Copin MC, Noël C, *et al.* (2011) Epithelial-to-mesenchymal transition predicts cyclosporine nephrotoxicity in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.* **22**(7):1375-1381.
- He L, Vasiliou K, Nebert DW. (2009) Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum Genomics.* **3**(2):195-206.
- Helbert MJ, Dauwe SE, Van der Biest I, Nouwen EJ, De Broe ME. (1997) Immunodissection of the human proximal nephron: flow sorting of S1S2S3, S1S2 and S3 proximal tubular cells. *Kidney Int.* **52**(2):414-428.
- Hertig A, Verine J, Mougenot B, Jouanneau C, Ouali N, *et al.* (2006) Risk factors for early epithelial to mesenchymal transition in renal grafts. *Am J Transplant.* **6**(12):2937-2946.
- Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, *et al.* (2003) Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther.* **74**(3):245-254.
- Hesselink DA, Bouamar R, van Gelder T. (2010) The pharmacogenetics of calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity. *Ther Drug Monit.* **32**(4):387-393.
- Hirota T, Takane H, Higuchi S, Ieiri I. (2008) Epigenetic regulation of genes encoding drug-metabolizing enzymes and transporters; DNA methylation and other mechanisms. *Curr Drug Metab.* **9**(1):34-38.
- Ho RH, Kim RB. (2005) Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther.* **78**(3):260-277.
- Höcherl K, Dreher F, Vitzthum H, Köhler J, Kurtz A. (2002) Cyclosporine A suppresses cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol.* **13**(10):2427-2436.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, *et al.* (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(7):3473-3478.
- Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **17**(18):2205-2232.
- Holdsworth SR, Summers SA. (2008) Role of mast cells in progressive renal diseases. *J Am Soc Nephrol.* **19**(12):2254-2261.
- Hortelano S, Castilla M, Torres AM, Tejedor A, Boscá L. (2000) Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol.* **11**(12):2315-2323.

- Huang XR, Chung AC, Wang XJ, Lai KN, Lan HY. (2008) Mice overexpressing latent TGF-beta1 are protected against renal fibrosis in obstructive kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* **295**(1):F118-127.
- Huls M, Kramers C, Levtchenko EN, Wilmer MJ, Dijkman HB, *et al.* (2007) P-glycoprotein-deficient mice have proximal tubule dysfunction but are protected against ischemic renal injury. *Kidney Int.* **72**(10):1233-1241.
- Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, *et al.* (2010) Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol.* **176**(1):85-97.
- Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, *et al.* (2001) The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics.* **11**(9):773-779.
- Ieiri I, Takane H, Hirota T, Otsubo K, Higuchi S. (2006) Genetic polymorphisms of drug transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **2**(5):651-674.
- Ikemura K, Yamamoto M, Miyazaki S, Mizutani H, Iwamoto T, Okuda M. (2013) MicroRNA-145 post-transcriptionally regulates the expression and function of P-glycoprotein in intestinal epithelial cells. *Mol Pharmacol.* **83**(2):399-405.
- Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. (1999) Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci.* **20**:342-349.
- Ingelman-Sundberg M. (2004) Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **369**(1):89-104.
- Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. (2007) Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.* **116**(3):496-526.
- Ingelman-Sundberg M, Zhong XB, Hankinson O, Beedanagari S, Yu AM, *et al.* (2013) Potential role of epigenetic mechanisms in the regulation of drug metabolism and transport. *Drug Metab Dispos.* **41**(10):1725-1731.
- International Transporter Consortium, Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, *et al.* (2010) Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* **9**(3):215-236.
- Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* **110**(3):341-350.
- Iwasaki K, Shiraga T, Nagase K, Tozuka Z, Noda K, *et al.* (1993) Isolation, identification, and biological activities of oxidative metabolites of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone. *Drug Metab Dispos.* **21**(6):971-977.
- Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, Nagase K, Tokuma Y, *et al.* (1995) Further metabolism of FK506 (tacrolimus). Identification and biological activities of the metabolites oxidized at multiple sites of FK506. *Drug Metab Dispos.* **23**(1):28-34.

- Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. (2010) Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **154**(2):103-116.
- Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, *et al.* (2013) Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med.* **368**(18):1685-1694.
- Jiang XL, Gonzalez FJ, Yu AM. (2011) Drug-metabolizing enzyme, transporter, and nuclear receptor genetically modified mouse models. *Drug Metab Rev.* **43**(1):27-40.
- Jiménez-Sousa MA, Fernández-Rodríguez A, Heredia M, Tamayo E, Guzmán-Fulgencio M, *et al.* (2012) Genetic polymorphisms located in TGFB1, AGTR1, and VEGFA genes are associated to chronic renal allograft dysfunction. *Cytokine.* **58**(3):321-326.
- John R, Nelson PJ. (2007) Dendritic cells in the kidney. *J Am Soc Nephrol.* **18**(10):2628-2635.
- Joseph PD, Guengerich FP, Miners JO. (2005) "Phase I and Phase II" drug metabolism: terminology that we should phase out? *Drug Metab Rev.* **37**(4):575-580.
- Joy MS, Nিকেleit V, Hogan SL, Thompson BD, Finn WF. (2005) Calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity and renal expression of P-glycoprotein. *Pharmacotherapy.* **25**(6):779-789.
- Joy MS, Hogan SL, Thompson BD, Finn WF, Nিকেleit V. (2007) Cytochrome P450 3A5 expression in the kidneys of patients with calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant.* **22**(7):1963-1968.
- Kacevska M, Ivanov M, Wyss A, Kasela S, Milani L, *et al.* (2012) DNA methylation dynamics in the hepatic CYP3A4 gene promoter. *Biochimie.* **94**(11):2338-2344.
- Kalluri R, Weinberg RA. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* **119**(6):1420-1428.
- Katari SR, Magnone M, Shapiro R, Jordan M, Scantlebury V, *et al.* (1997) Clinical features of acute reversible tacrolimus (FK 506) nephrotoxicity in kidney transplant recipients. *Clin Transplant.* **11**(3):237-242.
- Kato M, Zhang J, Wang M, Lanting L, Yuan H, *et al.* (2007) MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**(9):3432-3437.
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, *et al.* (2000) Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell.* **6**(6):1365-1375.
- Khanna A, Plummer M, Bromberek C, Bresnahan B, Hariharan S. (2002) Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* **62**(6):2257-2263.
- Kim VN. (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**(5):376-385.
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, *et al.* (2007) A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science.* **315**(5811):525-528.

- King CR, Xiao M, Yu J, Minton MR, Addleman NJ, *et al.* (2007) Identification of NR112 genetic variation using resequencing. *Eur J Clin Pharmacol.* **63**(6):547-554.
- Ko GJ, Boo CS, Jo SK, Cho WY, Kim HK. (2008) Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* **23**(3):842-852.
- Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmüller J, Hustert E, *et al.* (2002) Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos.* **30**(10):1108-1114.
- Köhle C, Bock KW. (2009) Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Biochem Pharmacol.* **77**(4):689-699.
- Königs M, Mulac D, Schwerdt G, Gekle M, Humpf HU. (2009) Metabolism and cytotoxic effects of T-2 toxin and its metabolites on human cells in primary culture. *Toxicology.* **258**(2-3):106-115.
- Kotta-Loizou I, Patsouris E, Theocharis S. (2013) Pregnane X receptor polymorphisms associated with human diseases. *Expert Opin Ther Targets.* **17**(10):1167-1177.
- Köttgen A, Glazer NL, Dehghan A, Hwang SJ, Katz R, *et al.* (2009) Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat Genet.* **41**(6):712-717.
- Kouzarides T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell.* **128**(4):693-705.
- Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, Ilnytskyy Y, Tryndyak VP, *et al.* (2008) Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Mol Cancer Ther.* **7**(7):2152-2159.
- Kriegel AJ, Fang Y, Liu Y, Tian Z, Mladinov D, *et al.* (2010) MicroRNA-target pairs in human renal epithelial cells treated with transforming growth factor beta 1: a novel role of miR-382. *Nucleic Acids Res.* **38**(22):8338-8347.
- Kriegel AJ, Liu Y, Cohen B, Usa K, Liu Y, Liang M. (2012) MiR-382 targeting of kallikrein 5 contributes to renal inner medullary interstitial fibrosis. *Physiol Genomics.* **44**(4):259-267.
- Krishna DR, Klotz U. (1994) Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet.* **26**(2):144-160.
- Kriz W, Kaissling B, Le Hir M. (2011) Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest.* **121**(2):468-474.
- Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M *et al.* (2003) Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics.* **13**(8):481-494.
- Krupa A, Jenkins R, Luo DD, Lewis A, Phillips A, Fraser D. (2010) Loss of MicroRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* **21**(3):438-447.

- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, *et al.* (2001) Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* **27**(4):383-391.
- Kung L, Batiuk TD, Palomo-Pinon S, Noujaim J, Helms LM, Halloran PF. (2001) Tissue distribution of calcineurin and its sensitivity to inhibition by cyclosporine. *Am J Transplant.* **1**(4):325-333.
- Kurtz A, Della Bruna R, Kühn K. (1988) Cyclosporine A enhances renin secretion and production in isolated juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* **33**(5):947-953.
- Lacoste N, Côté J. (2003) Le code épigénétique des histones. *Médecine/Sciences.* **19**:955-959.
- Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. (2002) Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev.* **54**(10):1271-1294.
- Lamba V, Ghodke Y, Guan W, Tracy TS. (2014) microRNA-34a is associated with expression of key hepatic transcription factors and cytochromes P450. *Biochem Biophys Res Commun.* **445**(2):404-411.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **15**(3):178-196.
- Lande-Diner L, Cedar H. (2005) Silence of the genes--mechanisms of long-term repression. *Nat Rev Genet.* **6**(8):648-654.
- Lash LH. (1994) Role of renal metabolism in risk to toxic chemicals. *Environ Health Perspect.* **102** Suppl 11:75-79.
- Lassila M. (2002) Interaction of cyclosporine A and the renin-angiotensin system; new perspectives. *Curr Drug Metab.* **3**(1):61-71.
- Laverdière I, Caron P, Harvey M, Lévesque É, Guillemette C. (2011) In vitro investigation of human UDP-glucuronosyltransferase isoforms responsible for tacrolimus glucuronidation: predominant contribution of UGT1A4. *Drug Metab Dispos.* **39**(7):1127-1130.
- LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, *et al.* (2013) Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med.* **19**(8):1047-1053.
- Lee M, Park J. (2006) Regulation of NFAT activation: a potential therapeutic target for immunosuppression. *Mol Cells.* **22**(1):1-7.
- Lee EK, Lee YS, Han IO, Park SH. (2007) Expression of Caveolin-1 reduces cellular responses to TGF-beta1 through down-regulating the expression of TGF-beta type II receptor gene in NIH3T3 fibroblast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **359**(2):385-390.
- Leelahavanichkul A, Yan Q, Hu X, Eisner C, Huang Y, *et al.* (2010) Angiotensin II overcomes strain-dependent resistance of rapid CKD progression in a new remnant kidney mouse model. *Kidney Int.* **78**(11):1136-1153.
- Lenz O, Elliot SJ, Stetler-Stevenson WG. (2000) Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *J Am Soc Nephrol.* **11**(3):574-581.

- Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. (2007) ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J.* **7**(3):154-179.
- Li J, Qu X, Bertram JF. (2009) Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Pathol.* **175**(4):1380-1388.
- Li J, Bertram JF. (2010) Review: Endothelial-myofibroblast transition, a new player in diabetic renal fibrosis. *Nephrology (Carlton).* **15**(5):507-512.
- Li W, Choy DF, Lam MS, Morgan T, Sullivan ME, Post JM. (2003). Use of cultured cells of kidney origin to assess specific cytotoxic effects of nephrotoxins. *Toxicol In Vitro.* **17**, 107-113.
- Li W, Lam M, Choy D, Birkeland A, Sullivan ME, Post JM. (2006) Human primary renal cells as a model for toxicity assessment of chemo-therapeutic drugs. *Toxicol In Vitro.* **20**(5):669-676.
- Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA, Duffield JS. (2008) Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol.* **173**(6):1617-1627.
- Liptak P, Ivanyi B. (2006) Primer: Histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts. *Nat Clin Pract Nephrol.* **2**(7):398-404.
- Liu EH, Siegel RM, Harlan DM, O'Shea JJ. (2007) T cell-directed therapies: lessons learned and future prospects. *Nat Immunol.* **8**(1):25-30.
- Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, *et al.* (2010) miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med.* **207**(8):1589-1597.
- Liu N, He S, Ma L, Ponnusamy M, Tang J, *et al.* (2013) Blocking the class I histone deacetylase ameliorates renal fibrosis and inhibits renal fibroblast activation via modulating TGF-beta and EGFR signaling. *PLoS One.* **8**(1):e54001.
- Liu Y. (2010) New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* **21**(2):212-222.
- Liu Y. (2011) Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* **7**(12):684-696.
- Lv LL, Cao YH, Ni HF, Xu M, Liu D, *et al.* (2013) MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* **305**(8):F1220-1227.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **25**(4):402-408.
- Long J, Wang Y, Wang W, Chang BH, Danesh FR. (2011) MicroRNA-29c is a signature microRNA under high glucose conditions that targets Sprouty homolog 1, and its in vivo knockdown prevents progression of diabetic nephropathy. *J Biol Chem.* **286**(13):11837-11848.
- Lunde I, Bremer S, Midtvedt K, Mohebi B, Dahl M, *et al.* (2014) The influence of CYP3A, PPARA, and POR genetic variants on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine in renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol.* **70**(6):685-693.

- Luo L, Luo G, Fang Q, Sun Z. (2014) Stable expression of hypoxia-inducible factor-1 α in human renal proximal tubular epithelial cells promotes epithelial to mesenchymal transition. *Transplant Proc.* **46**(1):130-134.
- Macconi D, Tomasoni S, Romagnani P, Trionfini P, Sangalli F *et al.* (2012) MicroRNA-324-3p promotes renal fibrosis and is a target of ACE inhibition. *J Am Soc Nephrol.* **23**(9):1496-1505.
- Magga JM, Kay JG, Davy A, Poulton NP, Robbins SM, Braun JE. (2002) ATP dependence of the SNARE/caveolin 1 interaction in the hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.* **291**(5):1232-1238.
- Maluf DG, Dumur CI, Suh JL, Scian MJ, King AL, *et al.* (2014) The urine microRNA profile may help monitor post-transplant renal graft function. *Kidney Int.* **85**(2):439-449.
- Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer.* **1**(3):194-202.
- Martins L, Ventura A, Branco A, Carvalho MJ, Henriques AC, *et al.* (2004) Cyclosporine versus tacrolimus in kidney transplantation: are there differences in nephrotoxicity? *Transplant Proc.* **36**(4):877-879.
- McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD. (2006) Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene.* **25**(11):1639-1648.
- Medyouf H, Ghysdael J. (2008) The calcineurin/NFAT signaling pathway: a novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. *Cell Cycle.* **7**(3):297-303.
- Mengel M, Mihatsch M, Halloran PF. (2011) Histological characteristics of calcineurin inhibitor toxicity--there is no such thing as specificity! *Am J Transplant.* **11**(12):2549-2550.
- Meran S, Steadman R. (2011) Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol.* **92**(3):158-167.
- Metzker ML. (2010) Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* **11**(1):31-46.
- Moes DJ, Swen JJ, den Hartigh J, van der Straaten T, van der Heide JJ, *et al.* (2014) Effect of CYP3A4*22, CYP3A5*3, and CYP3A combined genotypes on cyclosporine, everolimus, and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplantation. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* **3**:e100.
- Möller A, Iwasaki K, Kawamura A, Teramura Y, Shiraga T, *et al.* (1999) The disposition of 14C-labeled tacrolimus after intravenous and oral administration in healthy human subjects. *Drug Metab Dispos.* **27**(6):633-636.
- Moreau A, Vilarem MJ, Maurel P, Pascussi JM. (2008) Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response. *Mol Pharm.* **5**(1):35-41.

- Mohri T, Nakajima M, Fukami T, Takamiya M, Aoki Y, Yokoi T. (2010) Human CYP2E1 is regulated by miR-378. *Biochem Pharmacol.* **79**(7):1045-1052.
- Moore J, McKnight AJ, Simmonds MJ, Courtney AE, Hanvesakul R, *et al.* (2010) Association of caveolin-1 gene polymorphism with kidney transplant fibrosis and allograft failure. *JAMA.* **303**(13):1282-1287.
- Moore J, McKnight AJ, Döhler B, Simmonds MJ, Courtney AE, *et al.* (2012) Donor ABCB1 variant associates with increased risk for kidney allograft failure. *J Am Soc Nephrol.* **23**(11):1891-1899.
- Morizane R, Fujii S, Monkawa T, Hiratsuka K, Yamaguchi S, *et al.* (2014) miR-34c attenuates epithelial-mesenchymal transition and kidney fibrosis with ureteral obstruction. *Sci Rep.* **4**:4578.
- Morrissey KM, Stocker SL, Wittwer MB, Xu L, Giacomini KM. (2013) Renal transporters in drug development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **53**:503-529.
- Munshi A, Shafi G, Aliya N, Jyothy A. (2009) Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics.* **36**(2):75-88.
- Murray GI, McFadyen MC, Mitchell RT, Cheung YL, Kerr AC, Melvin WT. (1999) Cytochrome P450 CYP3A in human renal cell cancer. *Br J Cancer.* **79**(11-12):1836-1842.
- Mytilineos J, Laux G, Opelz G. (2004) Relevance of IL10, TGFbeta1, TNFalpha, and IL4Ralpha gene polymorphisms in kidney transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant.* **4**(10):1684-1690.
- Naesens M, Lerut E, de Jonge H, Van Damme B, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. (2009a) Donor age and renal P-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts. *J Am Soc Nephrol.* **20**(11):2468-2480.
- Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. (2009b) Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.* **4**(2):481-508.
- Nakata K, Tanaka Y, Nakano T, Adachi T, Tanaka H, *et al.* (2006) Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab Pharmacokinet.* **21**(6):437-457.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman J. (2003) The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* **349**:2326-2333.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. (2004) Evolution and pathophysiology of renal-transplant glomerulosclerosis. *Transplantation.* **78**(3):461-468.
- Nankivell BJ, Kuypers DR. (2011) Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet.* **378**(9800):1428-1437.
- Nielsen FT, Ottosen P, Starklint H, Dieperink H. (2003) Kidney function and morphology after short-term combination therapy with cyclosporine A, tacrolimus and sirolimus in the rat. *Nephrol Dial Transplant.* **18**(3):491-496.
- Nishiyama A, Kobori H, Fukui T, Zhang GX, Yao L, *et al.* (2003) Role of angiotensin II and reactive oxygen species in cyclosporine A-dependent hypertension. *Hypertension.* **42**(4):754-760.

- Nüsing R, Lesch R, Ullrich V. (1990) Immunohistochemical localization of thromboxane synthase in human tissues. *Eicosanoids*. **3**(1):53-58.
- Oba S, Kumano S, Suzuki E, Nishimatsu H, Takahashi M, *et al.* (2010) miR-200b precursor can ameliorate renal tubulointerstitial fibrosis. *PLoS One*. **5**(10):e13614.
- O'Connell S, Slattery C, Ryan MP, McMorrow T. (2011) Identification of novel indicators of cyclosporine A nephrotoxicity in a CD-1 mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol*. **252**(2):201-210.
- Ofir M, Hacoheh D, Ginsberg D. (2011) MiR-15 and miR-16 are direct transcriptional targets of E2F1 that limit E2F-induced proliferation by targeting cyclin E. *Mol Cancer Res*. **9**(4):440-447.
- Ohkawa Y, Hayashi K, Sobue K. (2003) Calcineurin-mediated pathway involved in the differentiated phenotype of smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **301**(1):78-83.
- Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, *et al.* (2003) Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med*. **349**(10):931-940.
- Okey AB, Boutros PC, Harper PA. (2005) Polymorphisms of human nuclear receptors that control expression of drug-metabolizing enzymes. *Pharmacogenet Genomics*. **15**(6):371-379.
- Omicinski CJ, Vanden Heuvel JP, Perdew GH, Peters JM. (2011) Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol Sci*. **120** Suppl 1:S49-75.
- Op den Buijsch RA, Christiaans MH, Stolk LM, de Vries JE, Cheung CY, *et al.* (2007) Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and cytochrome (CYP) 3A polymorphisms. *Fundam Clin Pharmacol*. **21**(4):427-435.
- Owen A, Goldring C, Morgan P, Chadwick D, Park BK, Pirmohamed M. (2005) Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. *Br J Clin Pharmacol*. **59**(3):365-370.
- Palanisamy A, Reeves-Daniel AM, Freedman BI. (2013) The impact of APOL1, CAV1, and ABCB1 gene variants on outcomes in kidney transplantation: donor and recipient effects. *Pediatr Nephrol*. DOI 10.1007/s00467-013-2531-7
- Palleria C, Di Paolo A, Giofrè C, Caglioti C, Leuzzi G, *et al.* (2013) Pharmacokinetic drug-drug interaction and their implication in clinical management. *J Res Med Sci*. **18**(7):601-610.
- Pallet N, Rabant M, Xu-Dubois YC, Lecorre D, Mucchielli MH, *et al.* (2008) Response of human renal tubular cells to cyclosporine and sirolimus: a toxicogenomic study. *Toxicol Appl Pharmacol*. **229**(2):184-196.
- Palmer ND, Ng MC, Hicks PJ, Mudgal P, Langefeld CD, *et al.* (2014) Evaluation of candidate nephropathy susceptibility genes in a genome-wide association study of African American diabetic kidney disease. *PLoS One*. **9**(2):e88273.
- Pan YZ, Gao W, Yu AM. (2009) MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting. *Drug Metab Dispos*. **37**(10):2112-2117.

- Pang M, Kothapally J, Mao H, Tolbert E, Ponnusamy M, *et al.* (2009) Inhibition of histone deacetylase activity attenuates renal fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* **297**(4):F996-F1005.
- Park BK, Pirmohamed M, Kitteringham NR. (1995) The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol Ther.* **68**(3):385-424.
- Park HC, Yasuda K, Ratliff B, Stoessel A, Sharkovska Y, *et al.* (2010) Postobstructive regeneration of kidney is derailed when surge in renal stem cells during course of unilateral ureteral obstruction is halted. *Am J Physiol Renal Physiol.* **298**(2):F357-364.
- Parkinson A, Casarett L, Doull J, Klaassen CD (Eds). (1996) Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. *McGraw Hill Companies.* 113-186.
- Parton RG, Simons K. (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**(3):185-194.
- Patel V, Nouredine L. (2012) MicroRNAs and fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **21**(4):410-416.
- Perico N, Dadan J, Remuzzi G. (1990) Endothelin mediates the renal vasoconstriction induced by cyclosporine in the rat. *J Am Soc Nephrol.* **1**(1):76-83.
- Pfaller W, Gstraunthaler G. (1998). Nephrotoxicity testing in vitro--what we know and what we need to know. *Environ Health Perspect.* **106** Suppl 2, 559-569.
- Piao SG, Bae SK, Lim SW, Song JH, Chung BH, *et al.* (2012) Drug interaction between cyclosporine and mTOR inhibitors in experimental model of chronic cyclosporine nephrotoxicity and pancreatic islet dysfunction. *Transplantation.* **93**(4):383-389.
- Picard N, Marquet P. (2011) The influence of pharmacogenetics and cofactors on clinical outcomes in kidney transplantation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **7**(6):731-743.
- Piera-Velazquez S, Jimenez SA. (2012) Molecular mechanisms of endothelial to mesenchymal cell transition (EndoMT) in experimentally induced fibrotic diseases. *Fibrogenesis Tissue Repair.* **5**(Suppl 1 Proceedings of Fibroproliferative disorders: from biochemical analysis to targeted therapiesPetro E Petrides and David Brenner):S7.
- Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. (1997) A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation.* **63**(7):977-983.
- Pogribny IP, Beland FA. (2013) Role of microRNAs in the regulation of drug metabolism and disposition genes in diabetes and liver disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **9**(6):713-724.
- Ponticelli C. (2007) De novo thrombotic microangiopathy. An underrated complication of renal transplantation. *Clin Nephrol.* **67**(6):335-340.

- Press RR, Ploeger BA, den Hartigh J, van der Straaten T, van Pelt H, *et al.* (2010) Explaining variability in ciclosporin exposure in adult kidney transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol.* **66**(6):579-590.
- Qin W, Chung AC, Huang XR, Meng XM, Hui DS, *et al.* (2011) TGF- β /Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29. *J Am Soc Nephrol.* **22**(8):1462-1474.
- Randhawa PS, Saad RS, Jordan M, Scantlebury V, Vivas C, Shapiro R. (1999) Clinical significance of renal biopsies showing concurrent acute rejection and tacrolimus-associated tubular vacuolization. *Transplantation.* **67**(1):85-89.
- Rao A, Luo C, Hogan PG. (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* **15**:707-747.
- Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, Dell'Antonio G, Grillo C, *et al.* (2002) Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int.* **62**(1):137-146.
- Razani B, Lisanti MP. (2001) Caveolins and caveolae: molecular and functional relationships. *Exp Cell Res.* **271**(1):36-44.
- Razani B, Zhang XL, Bitzer M, von Gersdorff G, Böttinger EP, Lisanti MP. (2001a) Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *J Biol Chem.* **276**(9):6727-6738.
- Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, *et al.* (2001b) Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem.* **276**(41):38121-38138.
- Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. (2002) Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev.* **54**(3):431-467.
- Reeves-Daniel AM, DePalma JA, Bleyer AJ, Rocco MV, Murea M, *et al.* (2011) The APOL1 gene and allograft survival after kidney transplantation. *Am J Transplant.* **11**(5):1025-1030.
- Rendic S. (2002) Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev.* **34**(1-2):83-448.
- Rhyu DY, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, *et al.* (2005) Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* **16**(3):667-675.
- Robertson H, Ali S, McDonnell BJ, Burt AD, Kirby JA. (2004) Chronic renal allograft dysfunction: the role of T cell-mediated tubular epithelial to mesenchymal cell transition. *J Am Soc Nephrol.* **15**(2):390-397.
- Rushmore TH, Kong AN. (2002) Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab.* **3**(5):481-490.
- Salahudeen AK, Haider N, May W. (2004) Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts. *Kidney Int.* **65**(2):713-718.

- Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins SP, Higgins PJ. (2012) TGF- β 1 \rightarrow SMAD/p53/USF2 \rightarrow PAI-1 transcriptional axis in ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Cell Tissue Res.* **347**(1):117-128.
- Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ. (2013) TGF- β signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities. *Cell Signal.* **25**(1):264-268.
- Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kübler E, Song KS, *et al.* (1995) Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(20):9407-9411.
- Satarug S, Nishijo M, Lasker JM, Edwards RJ, Moore MR. (2006) Kidney dysfunction and hypertension: role for cadmium, p450 and heme oxygenases? *Tohoku J Exp Med.* **208**(3):179-202.
- Sayed D, Abdellatif M. (2011) MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev.* **91**(3):827-887.
- Schlegel A, Schwab RB, Scherer PE, Lisanti MP. (1999) A role for the caveolin scaffolding domain in mediating the membrane attachment of caveolin-1. The caveolin scaffolding domain is both necessary and sufficient for membrane binding in vitro. *J Biol Chem.* **274**(32):22660-22667.
- Schmiedlin-Ren P, Edwards DJ, Fitzsimmons ME, He K, Lown KS, *et al.* (1997) Mechanisms of enhanced oral availability of CYP3A4 substrates by grapefruit constituents. Decreased enterocyte CYP3A4 concentration and mechanism-based inactivation by furanocoumarins. *Drug Metab Dispos.* **25**(11):1228-1233.
- Schmitz V, Laudi S, Moeckel F, Puhl G, Stockmann M, *et al.* (2008) Chronic renal dysfunction following liver transplantation. *Clin Transplant.* **22**(3):333-340.
- Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J. (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol.* **127**(5):1217-1232.
- Schubert W, Frank PG, Razani B, Park DS, Chow CW, Lisanti MP. (2001) Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem.* **276**(52):48619-48622.
- Scian MJ, Maluf DG, David KG, Archer KJ, Suh JL, *et al.* (2011) MicroRNA profiles in allograft tissues and paired urines associate with chronic allograft dysfunction with IF/TA. *Am J Transplant.* **11**(10):2110-2122.
- Sean Eardley K, Cockwell P. (2005) Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. *Kidney Int.* **68**(2):437-455.
- Shang Y, Zhang Z, Liu Z, Feng B, Ren G, *et al.* (2014) miR-508-5p regulates multidrug resistance of gastric cancer by targeting ABCB1 and ZNRD1. *Oncogene.* **33**(25):3267-3276.
- Sharom FJ. (2008) ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics.* **9**(1):105-127.
- Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* **16**(8):869-871.

- Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, Andoh TF. (1997) Mechanism of fibrosis in experimental tacrolimus nephrotoxicity. *Transplantation*. **64**(12):1829-1837.
- Shishido S, Asanuma H, Nakai H, Mori Y, Satoh H, *et al.* (2003) The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. **14**(4):1046-1052.
- Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, *et al.* (2002) The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clin Pharmacol Ther*. **72**(5):572-583.
- Sim SC, Kacevska M, Ingelman-Sundberg M. (2013) Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes: a recent update on clinical implications and endogenous effects. *Pharmacogenomics J*. **13**(1):1-11.
- Simic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, Mimic-Oka J. (2009) Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *Nat Rev Urol*. **6**(5):281-289.
- Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. (2013) Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol*. **87**(7):1157-1180.
- Skinner R. (2011) Nephrotoxicity--what do we know and what don't we know? *J Pediatr Hematol Oncol*. **33**(2):128-134.
- Smart EJ, Ying Ys, Donzell WC, Anderson RG. (1996) A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem*. **271**(46):29427-29435.
- Smith PL, Buffington DA, Humes HD. (2006) Kidney epithelial cells. *Methods Enzymol*. **419**:194-207.
- Snanoudj R, Royal V, Elie C, Rabant M, Girardin C, *et al.* (2011) Specificity of histological markers of long-term CNI nephrotoxicity in kidney-transplant recipients under low-dose cyclosporine therapy. *Am J Transplant*. **11**(12):2635-2646.
- Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. (2010a) Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet*. **49**(3):141-175.
- Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. (2010b) Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part II. *Clin Pharmacokinet*. **49**(4):207-221.
- Stefańska A, Péault B, Mullins JJ. (2013) Renal pericytes: multifunctional cells of the kidneys. *Pflugers Arch*. **465**(6):767-773.
- Strassburg CP, Barut A, Obermayer-Straub P, Li Q, Nguyen N, *et al.* (2001) Identification of cyclosporine A and tacrolimus glucuronidation in human liver and the gastrointestinal tract by a differentially expressed UDP-glucuronosyltransferase: UGT2B7. *J Hepatol*. **34**(6):865-872.
- Strolin Benedetti M, Whomsley R, Baltés E. (2006) Involvement of enzymes other than CYPs in the oxidative metabolism of xenobiotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. **2**(6):895-921.

- Sui W, Dai Y, Huang Y, Lan H, Yan Q, Huang H. (2008) Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation. *Transpl Immunol.* **19**(1):81-85.
- Sun G, Reddy MA, Yuan H, Lanting L, Kato M, Natarajan R. (2010) Epigenetic histone methylation modulates fibrotic gene expression. *J Am Soc Nephrol.* **21**(12):2069-2080.
- Szakács G, Váradi A, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B. (2008) The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today.* **13**(9-10):379-393.
- Tada H, Tsuchiya N, Satoh S, Kagaya H, Li Z, *et al.* (2005) Impact of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* **37**(4):1730-1732.
- Takagi S, Nakajima M, Mohri T, Yokoi T. (2008) Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4. *J Biol Chem.* **283**(15):9674-9680.
- Takeda Y, Yoneda T, Ito Y, Miyamori I, Takeda R. (1993) Stimulation of endothelin mRNA and secretion in human endothelial cells by FK 506. *J Cardiovasc Pharmacol.* **22** Suppl 8:S310-312.
- Tamási V, Vereczkey L, Falus A, Monostory K. (2003) Some aspects of interindividual variations in the metabolism of xenobiotics. *Inflamm Res.* **52**(8):322-333.
- Tan TK, Zheng G, Hsu TT, Wang Y, Lee VW, *et al.* (2010) Macrophage matrix metalloproteinase-9 mediates epithelial-mesenchymal transition in vitro in murine renal tubular cells. *Am J Pathol.* **176**(3):1256-1270.
- Tapaninen T, Neuvonen PJ, Niemi M. (2010) Grapefruit juice greatly reduces the plasma concentrations of the OATP2B1 and CYP3A4 substrate aliskiren. *Clin Pharmacol Ther.* **88**(3):339-342.
- Tapmeier TT, Fearn A, Brown K, Chowdhury P, Sacks SH, *et al.* (2010) Pivotal role of CD4+ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction. *Kidney Int.* **78**(4):351-362.
- Terada T, Inui K. (2007) Gene expression and regulation of drug transporters in the intestine and kidney. *Biochem Pharmacol.* **73**(3):440-449.
- Thervet E, Lorient MA, Barbier S, Buchler M, Ficheux M, *et al.* (2010) Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin Pharmacol Ther.* **87**(6):721-726.
- Thiery JP, Sleeman JP. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**(2):131-142.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* **139**(5):871-890.
- Thomas CM, Smart EJ. (2008) Caveolae structure and function. *J Cell Mol Med.* **12**(3):796-809.
- Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, *et al.* (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature.* **456**(7224):980-984.

- Tirona RG, Lee W, Leake BF, Lan LB, Cline CB, *et al.* (2003) The orphan nuclear receptor HNF4alpha determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. *Nat Med.* **9**(2):220-224.
- Tourkina E, Gooz P, Pannu J, Bonner M, Scholz D, *et al.* (2005) Opposing effects of protein kinase Calpha and protein kinase Cepsilon on collagen expression by human lung fibroblasts are mediated via MEK/ERK and caveolin-1 signaling. *J Biol Chem.* **280**(14):13879-13887.
- Tourkina E, Richard M, Gööz P, Bonner M, Pannu J, *et al.* (2008) Antifibrotic properties of caveolin-1 scaffolding domain in vitro and in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **294**(5):L843-861.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Takagi S, Taniya T, Yokoi T. (2006) MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res.* **66**(18):9090-9098.
- Ueda K. (2011) ABC proteins protect the human body and maintain optimal health. *Biosci Biotechnol Biochem.* **75**(3):401-409.
- Utecht KN, Hiles JJ, Kolesar J. (2006) Effects of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of calcineurin inhibitors. *Am J Health Syst Pharm.* **63**(23):2340-2348.
- Van der Hauwaert C, Savary G, Gnemmi V, Glowacki F, Pottier N, *et al.* (2013) Isolation and characterization of a primary proximal tubular epithelial cell model from human kidney by CD10/CD13 double labeling. *PLoS One.* **8**(6):e66750.
- Van Vleet TR, Schnellmann RG. (2003). Toxic nephropathy: environmental chemicals. *Semin Nephrol.* **23**, 500-508.
- Veroux M, Grosso G, Corona D, Mistretta A, Giaquinta A, *et al.* (2012) Age is an important predictor of kidney transplantation outcome. *Nephrol Dial Transplant.* **27**(4):1663-1671.
- Verrecchia F, Mauviel A. (2002) Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol.* **118**(2):211-215.
- Verrecchia F, Mauviel A. (2007) Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol.* **13**(22):3056-3062.
- Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner DC, Melk A, Halloran PF. (2005) Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: the role of tubular cells in fibrogenesis. *Am J Transplant.* **5**(6):1367-1374.
- Wada T, Sakai N, Sakai Y, Matsushima K, Kaneko S, Furuichi K. (2011) Involvement of bone-marrow-derived cells in kidney fibrosis. *Clin Exp Nephrol.* **15**(1):8-13.
- Wang B, Herman-Edelstein M, Koh P, Burns W, Jandeleit-Dahm K, *et al.* (2010) E-cadherin expression is regulated by miR-192/215 by a mechanism that is independent of the profibrotic effects of transforming growth factor-beta. *Diabetes.* **59**(7):1794-1802.
- Wang B, Komers R, Carew R, Winbanks CE, Xu B, *et al.* (2012) Suppression of microRNA-29 expression by TGF- β 1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* **23**(2):252-265.

- Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadée W. (2005) Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*. **15**(10):693-704.
- Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. (2011) Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J*. **11**(4):274-286.
- Wang JY, Gao YB, Zhang N, Zou DW, Wang P, *et al.* (2014) miR-21 overexpression enhances TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition by target smad7 and aggravates renal damage in diabetic nephropathy. *Mol Cell Endocrinol*. **392**(1-2):163-172.
- Wang XM, Zhang Y, Kim HP, Zhou Z, Feghali-Bostwick CA, *et al.* (2006) Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Exp Med*. **203**(13):2895-2906.
- Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. **11**(3):228-234.
- Woillard JB, Rerolle JP, Picard N, Rousseau A, Guillaudeau A, *et al.* (2010) Donor P-gp polymorphisms strongly influence renal function and graft loss in a cohort of renal transplant recipients on cyclosporine therapy in a long-term follow-up. *Clin Pharmacol Ther*. **88**(1):95-100.
- Wolf SJ, Bachtiar M, Wang J, Sim TS, Chong SS, Lee CG. (2011) An update on ABCB1 pharmacogenetics: insights from a 3D model into the location and evolutionary conservation of residues corresponding to SNPs associated with drug pharmacokinetics. *Pharmacogenomics J*. **11**(5):315-325.
- Woods K, Thomson JM, Hammond SM. (2007) Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem*. **282**(4):2130-2134.
- Wynn TA. (2007) Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*. **117**(3):524-529.
- Xiao JJ, Huang Y, Dai Z, Sadée W, Chen J, *et al.* (2005) Chemoresistance to depsipeptide FK228 [(E)-(1S,4S,10S,21R)-7-[(Z)-ethylidene]-4,21-diisopropyl-2-oxa-12,13-dithia-5,8,20,23-tetraazabicyclo[8,7,6]-tricos-16-ene-3,6,9,22-pentanone] is mediated by reversible MDR1 induction in human cancer cell lines. *J Pharmacol Exp Ther*. **314**(1):467-475.
- Xiong M, Jiang L, Zhou Y, Qiu W, Fang L, *et al.* (2012) The miR-200 family regulates TGF- β 1-induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression. *Am J Physiol Renal Physiol*. **302**(3):F369-379.
- Xu C, Li CY, Kong AN. (2005) Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res*. **28**(3):249-268.
- Xu Y, Ohms SJ, Li Z, Wang Q, Gong G, *et al.* (2013) Changes in the expression of miR-381 and miR-495 are inversely associated with the expression of the MDR1 gene and development of multi-drug resistance. *PLoS One*. **8**(11):e82062.
- Xu-Dubois YC, Baugey E, Peltier J. (2013a) Epithelial phenotypic changes are associated with a tubular active fibrogenic process in human renal grafts. *Hum Pathol*. **44**(7):1251-1261.

- Xu-Dubois YC, Galichon P, Brocheriou I, Baugey E, Morichon R, *et al.* (2013b) Expression of the transcriptional regulator *snail1* in kidney transplants displaying epithelial-to-mesenchymal transition features. *Nephrol Dial Transplant.* **0** :1-9.
- Yang CW, Faulkner GR, Wahba IM, Christianson TA, Bagby GC, *et al.* (2002) Expression of apoptosis-related genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity in mice. *Am J Transplant.* **2**(5):391-399.
- Yang T, Zheng ZM, Li XN, Li ZF, Wang Y, *et al.* (2013) MiR-223 modulates multidrug resistance via downregulation of ABCB1 in hepatocellular carcinoma cells. *Exp Biol Med.* **238**(9):1024-1032.
- Yokomori H, Oda M, Ogi M, Sakai K, Ishii H. (2002) Enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in human cirrhosis. *Liver.* **22**(2):150-158.
- Zanger UM, Schwab M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* **138**(1):103-141.
- Zarjou A, Yang S, Abraham E, Agarwal A, Liu G. (2011) Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: role of miR-21. *Am J Physiol Renal Physiol.* **301**(4):F793-801.
- Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. (2008) Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol.* **19**(12):2282-2287.
- Zeisberg M, Neilson EG. (2010) Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* **21**(11):1819-1834.
- Zentner GE, Henikoff S. (2013) Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol.* **20**(3):259-266.
- Zhang YE. (2009) Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* **19**(1):128-139.
- Zhao Y, Srivastava D. (2007) A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci.* **32**(4):189-197.
- Zhao H, Dong Y, Tian X, Tan TK, Liu Z, *et al.* (2013) Matrix metalloproteinases contribute to kidney fibrosis in chronic kidney diseases. *World J Nephrol.* **2**(3):84-89.
- Zheng G, Lyons JG, Tan TK, Wang Y, Hsu TT, *et al.* (2009) Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells. *Am J Pathol.* **175**(2):580-591.
- Zhong X, Chung AC, Chen HY, Dong Y, Meng XM, *et al.* (2013) miR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia.* **56**(3):663-674.
- Zhou H, Hasni SA, Perez P, Tandon M, Jang SI, *et al.* (2013) miR-150 promotes renal fibrosis in lupus nephritis by downregulating SOCS1. *J Am Soc Nephrol.* **24**(7):1073-1087.