

Université de Montréal

**Signification de la mort cellulaire dans l'insuffisance rénale
aiguë et la fibrose causée par ischémie-reperfusion**

par
Bing Yang

Programme de biologie moléculaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)
en biologie moléculaire
option maladies complexes chez l'humain

Décembre, 2017

© Bing Yang, 2017

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée

**Signification de la mort cellulaire dans l'insuffisance rénale
aiguë et la fibrose causée par ischémie-reperfusion**

Présentée par
Bing Yang

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Richard Bertrand, président-rapporteur
Marie-Josée Hébert, directrice de recherche
Héloïse Cardinal, co-directrice
Naglaa Shoukry, member du jury
Véronique Moulin, examinateur externe
Jean-Philippe Gratton, représentant de la doyenne

Résumé

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est un événement clinique fréquent. L'ischémie-reperfusion (IRI) est la cause la plus importante de l'IRA. La participation de la mort cellulaire programmée (PCD) dans la physiopathologie de l'IRA ont été démontrée par de nombreuses études. Les études de cette thèse ont pour but d'élucider le rôle de la PCD dans les différentes phases de l'IRA induite par l'IRI. La phase aiguë de l'IRA est caractérisée par des dommages tubulaires, des dommages microvasculaires et l'inflammation. Les dommages tubulaires ont été considérés comme la caractéristique clé de phase aiguë de l'IRA. Mais il y a de plus en plus des preuves qui identifient les dommages microvasculaires comme un contributeur central. Il était documenté que la PCD joue un rôle prédominant dans les dommages tubulaires et microvasculaires. L'activation de la caspase-3, qui est la caspase-effectrice la plus importante de l'apoptose, était trouvée dans les cellules épithéliales tubulaires (TECs) et les cellules endothéliales (EC) post-IRI. Cependant, d'autres études suggèrent que la nécroptose est la PCD prédominante des TECs. Afin de clarifier les mécanismes, nous avons créé un modèle expérimental d'IRI chez des souris type-sauvage (WT) et caspase-3 knock-out (KO) secondaire au clampage de l'artère rénale. Ce modèle a démontré que la déficience en caspase-3 protège les souris contre les dommages microvasculaires à toutes les phases de l'IRI mais aggrave la nécroptose des TECs et les dommages tubulaires induits par l'IRI.

La deuxième étude avait pour but d'étudier l'impact d'autoanticorps anti-LG3 sur l'IRI rénale. Les auto-antigènes libérés par le tissu endommagé pourrait être reconnus par leurs auto-anticorps, causant des dommages tissulaires accentués. Le LG3 est un fragment de perlécan. Il était démontré par l'équipe de Dre. Hébert que le LG3 est libéré par les ECs en aval de l'activation de la caspase-3. Nous avons donc évalué dans notre modèle de l'IRI l'hypothèse que l'IRI peut créer des conditions permissives pour libérer l'auto-antigène LG3 libérés par le tissu endommagé qui pourraient être reconnus par leurs auto-anticorps, causant des dommages tissulaires accentués. Nous avons trouvé que les anti-LG3 n'affectent pas la fonction des reins non-IRI, mais activent le système du complément dans la microvascularisation et aggravent la dysfonction rénale post-IRI. La phase chronique de l'IRI est caractérisée par l'atrophie tubulaire et la fibrose interstitielle. Il devient de plus en plus accepté que la raréfaction

microvasculaire joue un rôle crucial dans la phase chronique. Nous avons constaté que malgré une aggravation dans les dommages tubulaires, les souris déficientes en caspase-3 démontrent moins de raréfaction microvasculaire, moins de fibrose et moins de dommages tubulaires en phase chronique; ce qui suggère que la raréfaction microvasculaire, causée par les dommages microvasculaire, est la force motrice dans le processus pro-fibrotique. Nous avons aussi investigué les mécanismes moléculaires impliqués dans la fibrose induite par la raréfaction microvasculaire. La différenciation du fibroblaste en myofibroblaste est une étape cruciale dans le processus pro-fibrotique. Il était démontré que les ROS, l'autophagie et la sénescence participent tous à la fibrose. L'équipe de Dre. Hébert a déjà démontré que la SS active la différenciation en myofibroblaste par la voie de l'autophagie-mTORC2. Dans cette thèse, nous avons montré que la carence en sérum (SS) induit la production de radicaux libre oxygénés (ROS), et ces derniers activent la sénescence de façon l'autophagie-mTORC2 – dépendante. La SS est utilisée pour mimer la raréfaction microvasculaire *in vitro*. Pour le lien entre la sénescence et la différenciation. Nous avons trouvé une régulation négative de la sénescence sur la différenciation myofibroblastique.

Ensemble, nos résultats démontrent un rôle important de l'apoptose dans la régulation de l'intégrité microvasculaire, le développement de la fibrose et de la dysfonction rénale progressive dans le contexte de l'IRA induite par l'IRI.

Mots-clés : Insuffisance rénale aiguë, ischémie-reperfusion, mort cellulaire, apoptose, anti-LG3, la différenciation myofibroblastique.

Abstract

Acute kidney injury (AKI) is a common clinical event. Ischemia-reperfusion injury (IRI) is the most important cause of AKI. The participation of programmed cell death (PCD) in the physiopathology of the AKI has been demonstrated by numerous studies. The studies of this thesis aim to elucidate the role of PCD in the different phases of IRI induced AKI. The acute phase of AKI is characterized by tubular injury, microvascular injury and inflammation. Tubular injury was considered as the key feature of the acute phase of AKI. However, mounting evidence identifies microvascular injury as a central contributor. It was documented that PCD plays a predominant role in both tubular and microvascular injury.

Activation of caspase-3, the most important effector-caspase of apoptosis, has been found in both renal tubular epithelial cells (TECs) and renal endothelial cells (ECs) post-IRI. However, other studies suggest that necroptosis is the predominant PCD of TECs. To clarify the mechanisms, we created an experimental model of IRI in wild-type (WT) and caspase-3 KO mice secondary to renal artery clamping. This model demonstrated that caspase-3 deficiency protects mice against microvascular injury at all phases of IRI but worsens TEC necroptosis and IRI-induced tubular injury.

The second study aimed to study the impact of anti-LG3 autoantibodies on renal IRI. Self-antigens released by damaged tissue could be recognized by their autoantibodies, causing enhanced tissue damage. LG3 is a fragment of perlecan. It has been demonstrated by Dr Hébert 's team that LG3 is released by ECs downstream of activation of caspase-3. We therefore evaluated in our IRI model the hypothesis that IRI can create permissive conditions by releasing LG3 autoantigen by damaged tissue that could be recognized by their autoantibodies, causing enhanced tissue damage. We found that anti-LG3 did not affect the function of non-IRI kidneys, but activate the complement system in microvasculature and exacerbate renal dysfunction post-IRI.

The chronic phase of AKI is characterized by tubular atrophy and interstitial fibrosis. It is becoming increasingly accepted that microvascular rarefaction plays a crucial role in the chronic phase. We found that despite an increased tubular injury, caspase-3-deficient mice

showed less microvascular rarefaction, less fibrosis and less tubular injury in the chronic phase; suggesting that microvascular rarefaction, caused by microvascular injury, is the driving force in the pro-fibrotic process. We also investigated the molecular mechanisms involved in fibrosis induced by microvascular depletion. The differentiation of fibroblasts in myofibroblasts is a crucial step in the pro-fibrotic process. It was shown that ROS, autophagy and senescence all participate in the development of fibrosis. The team of Dr. Hébert has already demonstrated that the serum starvation (SS) induces differentiation in myofibroblasts through the autophagy-mTORC2 pathway. In this thesis, we have shown that SS (which is used to mimic microvascular rarefaction in vitro) induces the production of ROS, which activates senescence in the way of mTORC2 - dependent autophagy. For the link between senescence and differentiation. We found a negative regulation of senescence on myofibroblastic differentiation.

Together, our results demonstrate an important role of apoptosis in the regulation of microvascular integrity, the development of fibrosis and progressive renal dysfunction in the context of IRI-induced AKI.

Keywords: Acute renal injury, ischemia-reperfusion injury, cell death, apoptosis, anti-LG3, myofibroblastic differentiation.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xvi
Introduction.....	17
1 Insuffisance rénale aiguë causée par les insultes d'ischémie-reperfusion.....	17
1.1 Généralités sur l'anatomie et la physiologie rénale.....	17
1.2 Définition et étiologie.....	18
1.3 Manifestations cliniques.....	20
1.4 Traitement et pronostic.....	21
2 Physiopathologie de l'insuffisance rénale aiguë causée par l'IRI.....	21
2.1 Phases d'initiation et de persistance.....	21
2.1.1 La mort cellulaire.....	22
2.1.1.1 L'apoptose.....	23
2.1.1.1 La nécroptose.....	28
2.1.1.3 Pyroptose.....	30
2.1.1.4 La réponse au stress pro-survie – l'autophagie.....	31
2.1.2 Les dommages tubulaires.....	32
2.1.2.1 Les mécanismes de dommage tubulaire.....	32
2.1.2.2 Les marqueurs des dommages tubulaires.....	33
2.1.3 Les dommages microvasculaires.....	34
2.1.3.1 Anatomopathologie.....	34
2.1.3.2 L'effet des dommages microvasculaires.....	35
2.1.3.3 Les mécanismes des dommages microvasculaires.....	37
2.1.4 La réponse immunitaire innée.....	38

2.1.4.1 Neutrophiles	38
2.1.4.2 Macrophages	39
2.1.4.3 Cellules dendritiques.....	39
2.1.4.4 Les cellules NK.....	40
2.1.4.5 Les récepteurs de type toll	40
2.1.4.6 Le système du complément.....	41
2.1.5 La réponse immunitaire adaptée	44
2.1.5.1 Lymphocytes T	44
2.1.5.2 Lymphocytes B	45
2.2 Phase de guérison.....	45
2.2.1 La régénération tubulaire	45
2.2.2 La raréfaction microvasculaire	47
2.2.3 Rôle de la sénescence.....	47
2.2.4 La fibrose post ischémie-reperfusion.....	49
2.2.4.1 Généralités	49
2.2.4.2 Origines des myofibroblastes.....	50
2.2.4.3 Mécanismes impliqués dans la différenciation en myofibroblastes	51
3. Impacts de la mort cellulaire sur la transplantation rénale	54
3.1 Autoimmunité et l'IRI.....	55
3.1.1 Les autoanticorps anti-vimentine	55
3.1.2 Les autoanticorps anti-collagène IV	55
3.1.3 Les autoanticorps anti-tubuline k alpha1	56
3.1.4 Les autoanticorps anti-myosine	56
3.1.5 Les autoanticorps anti-récepteur de type 1 de l'angiotensine	56
3.1.6 Les autoanticorps anti-LG3.....	57
Problématique et hypothèse	58
Problématique	58
Hypothèse	59
Résultats expérimentaux	60
Article 1.	60
Article 2.	94

Article 3.....	134
Discussion.....	163
1. Un rôle prédominant de l'apoptose dans les insultes microvasculaires induites par l'IRI.....	163
2. Un rôle important de l'apoptose des ECs dans l'inflammation microvasculaire induite par l'IRI.....	165
3. Un rôle central des insultes microvasculaires dans la phase chronique de l'IRA induite par l'IRI.....	166
4. Les mécanismes impliqués dans la fibrose rénale post-IRI.....	168
5. Identification des marqueurs des dommages microvasculaires dans le contexte de l'IRA induite par l'IRI.....	170
5.1 L'E-sélectine soluble.....	171
5.2 Le PAI-1 et l'uPA.....	171
5.3 La thrombomoduline.....	171
5.4 L'angiopoïétine-2 et des autres médiateurs de l'angiogenèse.....	172
6. Les thérapies visant à limiter la raréfaction microvasculaire.....	172
6.1 L'angiogenèse.....	173
6.1.1 Les facteurs hypoxiques inductibles.....	174
6.1.2 Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF).....	174
6.1.3 La voie de signalisation angiopoïétines - Tie-2.....	175
6.2 Les cellules progénitrices endothéliales et la réparation microvasculaire.....	176
Conclusion.....	178
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau I.	Les classifications RIFLE et AKIN	19
Tableau II.	Les cause étiologiques d'IRA.	20
Tableau III.	Classification des modes de PCD	23

Liste des figures

Figure 1.	Figure 1. Anatomie rénale.....	18
Figure 2.	Les voies de signalisation apoptotiques.....	27
Figure 3.	Les voies de signalisation nécroptotiques.....	30
Figure 4.	Les voies de signalisation autophagiques.....	32
Figure 5.	Les voies des compléments.....	43
Figure 6.	Les voies moléculaires de la sénescence	49
Figure 7.	Illustration de l'angiogenèse.....	173

Liste des abréviations

AIF	Facteur d'induction de l'apoptose
AIM2	Capteur d'ADN cytosolique absent dans le mélanome 2
AMR	Rejet médié par les anticorps
Ang-2	L'angiopoïétine-2
ASC	Protéines speck associée à l'apoptose contenant un CARD
AT ₁ R	Récepteur de type 1 de l'angiotensine
Atgs	Protéines liées à l'autophagie
AVA	Anticorps anti-vimentine
BAK	Homologue antagoniste du Bcl-2
BAX	Protéines Bcl-2-associée X
BH-3	BCL-2 homologie 3
CARD	Domaine de recrutement de caspase
CDK4/6	Kinase cycline-dépendante 4/6
Cellules NK	Cellules tueuses naturelles
cIAP1 et 2	Protéines inhibitrices cellulaires de l'apoptose 1 et 2
CKO	Knock-out conditionnel
Col IV	Collagène IV
CTGF	Facteur de croissance du tissu conjonctif
DAMP	Motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires
DCs	cellules dendritiques
DED	Domaine effecteur de la mort
deptor	Protéine DEP-domain-containing mTOR interacting

DGF	Reprise de fonction retardée du greffon
DR	Récepteur de la mort
ECM	Matrice extracellulaire
ECs	Cellules endothéliales
EMT	Transition épithéliale-mésenchymateuse
EndoMT	Transition endothélial-mésenchymateuse
EPCs	Cellules progénitrices endothéliales
FADD	Domaine de mort associé à Fas
Fas	Synthétase d'acide gras
FLIPs	Protéines inhibitrices FLICE-like
GFP	Protéine fluorescente verte
HGMB1	Protéines de la boîte 1 du groupe de mobilité élevée
HIF-1 alpha	Facteur inductible par l'hypoxie 1-alpha
HSP	Protéines de choc thermique
HUVECs	ECs humaines de veine ombilicale
ICAD	Inhibiteur de la DNase activée par la caspase
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire -1
IL	Interleukine
IRA	Insuffisance rénale aiguë
IRC	Insuffisance rénale chronique
IRI	Insultes par ischémie-reperfusion
KA1T	Tubuline k alpha1
KIM-1	Molécule des dommages rénaux
KO	Knock-out

LC3	Chaîne légère 3 de la protéine 1a/1b associée aux microtubules
MAC	Complexes d'attaque membranaires
MASP	Sérine protéases associées à la MBL
MBL	Lectine à liaison au mannose
MCP-1	Protéine chimioattractive monocyttaire 1
MLKL	Mixed lineage kinase domain like pseudokinas
mLST8 / GβL	Mammalian lethal with Sec 13 protein 8/G-protein β-protein subunit-like
MOMP	Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale
MPT	Transition de perméabilité mitochondriale
mSIN1	Mammalian stress-activated protein kinase-interacting
mTOR	Cible de rapamycine des mammifères
NAC	N-acétylcystéine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NETs	Pièges extracellulaires des neutrophils
NGAL	Lipocaline associée aux neutrophiles et la gélatase
NLRs	Récepteurs de NOD-like
NOS	Synthases d'oxyde nitrique
NPCD	Mort cellulaire non-programmée
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PAR	Poly (ADP-ribose)
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymérase 1
PCD	Mort cellulaire programmée
PDGF-AA	Facteur de croissance dérivé des plaquettes AA

PI3KC1	Phosphoinositide 3-kinase du groupe 1
PKB	Protéine kinase B
PRAS40	Substrat 40 kDa de Akt / PKB
PTCs	Capillaires péri-tubulaires
PTECs	Cellules épithéliales tubulaires proximales
raptor	Protéine associée à la régulation de mTOR
RB	Protéine du rétinoblastome
riCTOR	Compagnon insensible à la rapamycine de mTOR
RIPK1/3	Recepteur-interacting protéine kinase 1/3
ROCK1	Rho-associated, coiled-coil-containing protéine kinase 1
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RTK	Récepteurs de tyrosine kinases
sFlt-1	Tyrosine kinase-1 de type fms soluble
SS	Déprivation de sérum
TECs	Cellules épithéliales tubulaires
TGFB	Facteur de croissance transformant β
TLRs	Récepteurs de type toll
TNF- α	Facteur de nécrose tumoral - α
tPA	Activateur de plasminogène tissulaire
TRADD	Domaine de mort associé au récepteur du TNF
TRAF2 et 5	Facteurs associés au TNFR 2 et 5
ULK1/2	Kinases Unc-51-like
uPA	Activateur du plasminogène de type urokinase
VEGF-A	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire-A

WT	Type-sauvage
WPB	Corps Weibel-Palade
α -SMA	Actine du muscle lisse α

À ma famille

Remerciements

Après une étude doctorale de 5 ans, j’approche enfin l’achèvement de ce grand défi. J’aimerais remercier ici beaucoup de personnes, qui m’ont soutenue et aidée tout au long de cette période d’étude.

Je voudrais tout d’abord remercier Marie-Josée, ma directrice de recherche, pour tous les enseignements et opportunités qu’elle m’a donnés. Elle a été toujours attentive et prête à m’aider. Elle m’a beaucoup influencée avec ses excellentes idées de recherche et sa motivation pour le travail. Je tiens aussi à remercier ma co-directrice de recherche, Héloïse, qui m’a fait apprendre de la recherche clinique. Je remercie sincèrement tous les membres de l’équipe du laboratoire de Marie-Josée pour leur soutien scientifique. Mention spéciale pour Mélanie Dieudé, qui m’a beaucoup écoutée, aidée et guidée pendant mes études. Mentions spéciales pour Annie, Lauriane, Katia, Alice et Stéphanie, pour leurs corrections de la grammaire de ma thèse.

Je remercie les membres de mon comité de suivi et de mon comité de pré-doc, Dr. Richard Bertrand, Dre. Naglaa Shoukry, Dre. Véronique Moulin et Dr. Andrey Cybulsky. Ils m’ont écoutée et donné beaucoup de suggestions utiles.

Je remercie tous les co-auteurs de mes articles inclus dans cette thèse. Mention spéciale pour Dr. Francis Rodier, qui nous a guidé avec son expertise dans le domaine de la sénescence cellulaire. Aussi mention spéciale pour Dre. Natacha Patey, qui nous a guidé avec son expertise dans l’anatomopathologie rénale.

Je tiens à remercier tous les patients partenaires qui ont participé dans les recherches cliniques, et aussi ceux qui ont partagé avec nous leurs histoires de vie. Leurs encouragements m’ont beaucoup motivée.

Je voudrais également remercier ma famille et mes amis, pour leurs conseils avisés et leur écoute attentive. Merci d’être toujours là pour moi!

Introduction

1 Insuffisance rénale aiguë causée par les insultes d'ischémie-reperfusion

1.1 Généralités sur l'anatomie et la physiologie rénale

Les reins sont des organes vitaux, situés dans le rétropéritonéale, mesurant en moyenne 11 cm. Ils sont composés par les néphrons, les tubes collecteurs et le système de vascularisation (Kaye and Goldberg 1982).

Les néphrons sont les unités fonctionnelles du rein. Chaque rein contient entre 400 et 800000 néphrons. Un néphron est constitué d'un glomérule et d'un tubule qui le suit. Les glomérules assurent l'ultra-filtration du sang, formant ainsi l'urine primitive. Des phénomènes de sécrétion et réabsorption entre le fluide tubulaire et les capillaires permettent ensuite d'aboutir à l'urine définitive (Figure 1) (Cambar, Dorian et al. 1987, Jamison 1987).

Son rôle exocrine de filtration et épuration sanguine, permet d'éliminer les déchets métabolites (urée, acide urique, médicaments, etc), mais également de réguler la volémie. En outre, le rein possède également des fonctions endocrines. La forme active de la vitamine D est produite dans les cellules tubulaires proximales, par hydroxylation de son précurseur hépatique, la 25(OH) vitamine D3. Les reins ont donc un rôle essentiel dans la régulation phospho-calcique, puis ce que la 1,25 (OH) vitamine D3 augmente l'absorption digestive et rénale de calcium et l'absorption intestinale de phosphate. L'érythropoïétine, produite par les cellules rénales en réponse à l'hypoxie, stimule la production de globules rouges. Enfin, la rénine, sécrétée au niveau de l'appareil juxta-glomérulaire en réponse à des variation de volémie, est la première étape du système rénine-angiotensine-aldostérone, dont les principaux effets sont la vasoconstriction et la rétention hydrosodée (Ionescu-Tirgoviste 1969, Erslev 1975, Feldman and Singer 1975, DeLuca 1976).

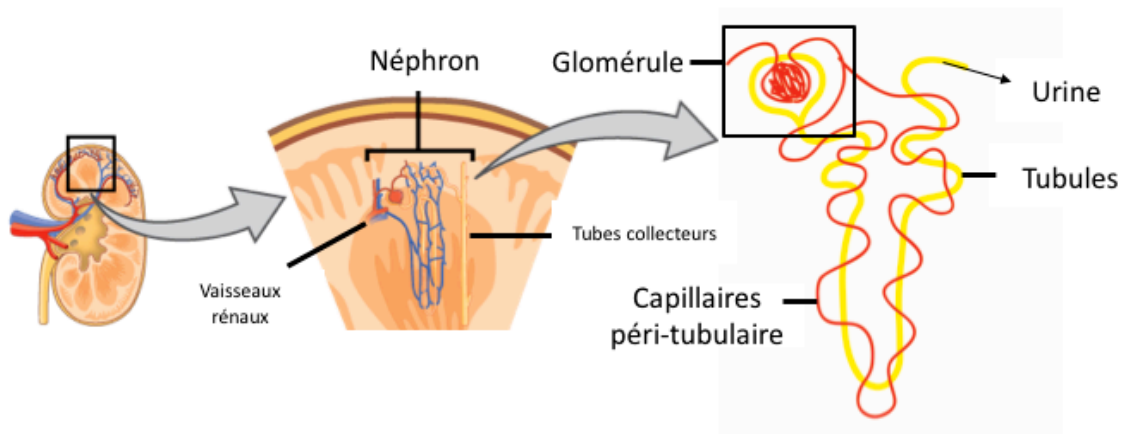


Figure 1. Anatomie rénale.

Les reins sont composés par les néphrons, les tubes collecteurs et les vaisseaux rénaux. Les néphrons sont des unités fonctionnelles du rein, ils commencent avec les glomérules, qui contiennent un réseau des capillaires. Le sang dans ces capillaires est filtré en formant de l'urine primitive. Cette dernière va ensuite subir une série de sécrétion et réabsorption dans les tubules. Les éléments réabsorbés vont rentrer dans le système de circulation par les capillaires-péritubulaire. L'urine va entrer dans les tubes collecteurs où elle va continuer à être concentrée.

1.2 Définition et étiologie

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est un événement clinique défini par une perte rapide de la fonction de filtration et d'épuration sanguine du rein (Marketos, Eftychiadis et al. 1993). De nombreuses classifications ont été établies pour évaluer la sévérité de la dysfonction rénale, dont la plupart sont basées sur l'augmentation de la créatinémie et/ou la diminution de la diurèse. Les classifications RIFLE et AKIN (Tableau I) sont cliniquement les plus utilisées.

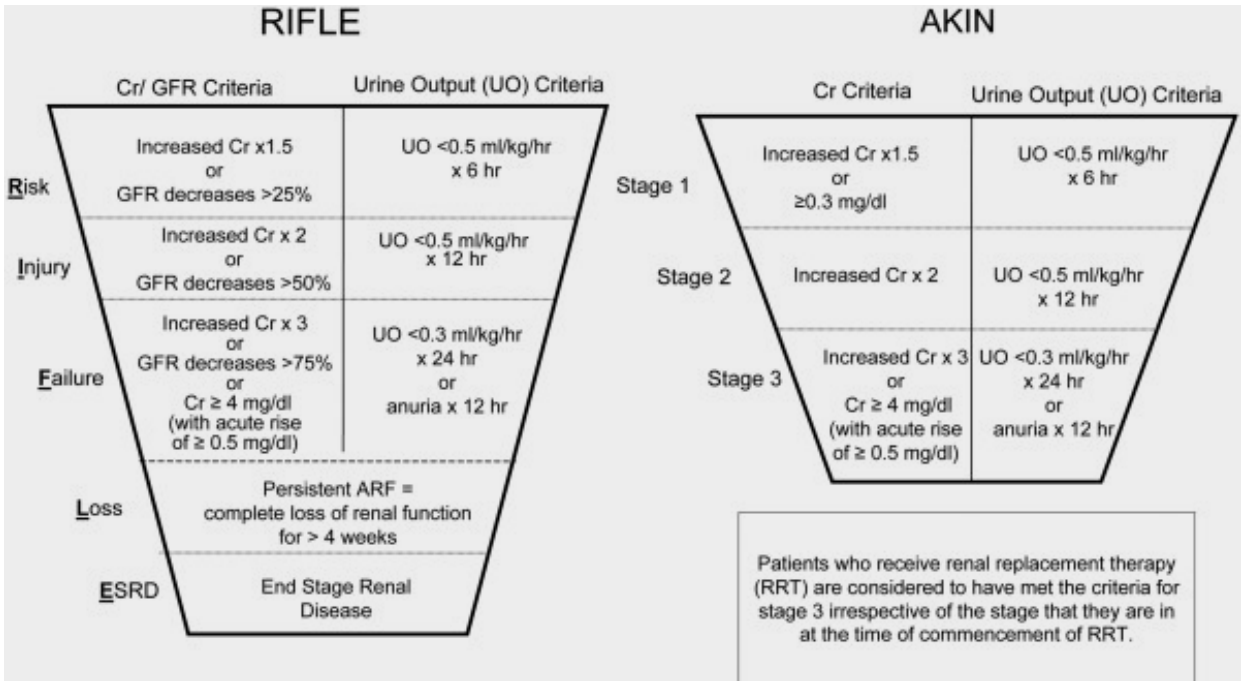


Tableau I. Les classifications RIFLE et AKIN

Cité de (Cruz, Ricci et al. 2009). Reproduit avec permission.

Contrairement à la plupart des maladies rénales, la biopsie est rarement requise pour diagnostiquer l'IRA. Les caractéristiques pathologiques sont les dommages tubulaires, les dommages microvasculaires et l'inflammation interstitielle, qui seront discutées en détail dans les chapitres suivants.

Les causes d'IRA sont nombreuses. Elles sont classées en trois catégories : les causes pré-rénales, les causes intra-rénales et les causes post-rénales (Ostermann and Joannidis 2016, Sarabu and Rahman 2016, Vanmassenhove, Veys et al. 2016) (Tableau II).

Insuffisance rénale aiguë		
<i>Les causes pré-rénales</i>	<i>Les causes intrinsèques</i>	<i>Les causes post-rénales</i>
Hypotension artérielle Réduction du débit cardiaque Réduction du volume de sang circulant Sténose ou obstruction de l'artère rénale	Les insultes par ischémie-reperfusion Glomérulonéphrite aiguë Néphrite interstitielle aiguë Médicaments néphrotoxiques Microangiopathie thrombotique Sepsis	Obstruction urétérale Obstruction de la sortie de la vessie

Tableau II. Les cause étiologiques d'IRA.

Les insultes par ischémie-reperfusion (IRI) sont un processus pathologique caractérisé par une restriction initiale du débit sanguin à un organe suivi d'une restauration de la perfusion. La dysfonction d'organe ou les morts cellulaires sont causées non seulement par la réduction du débit sanguin, mais aussi par la reperfusion qui produit des réponses paradoxales en induisant la production d'espèces réactives de l'oxygène (paradoxe de ré-oxygénation), la séquestration des cellules immunitaires pro-inflammatoires dans les tissus ischémiques, le stress du réticulum endoplasmique et la déficience de perfusion microcirculatoire post-ischémique (Yellon and Hausenloy 2007, Kalogeris, Baines et al. 2012, Kalogeris, Baines et al. 2016). De nombreuses conditions pathologiques sont attribuables aux insultes par ischémie-reperfusion, notamment l'accident vasculaire cérébral (Wechsler 2011) et le syndrome coronarien aigu (Perrelli, Pagliaro et al. 2011). Dans le contexte de l'IRA, l'IRI est la cause la plus fréquente.

1.3 Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques typiques comprennent trois phases, la phase d'initiation, la phase de persistance et la phase de guérison. Déclenchée par les insultes étiologiques, la phase d'initiation est caractérisée par l'oligurie et/ou une diminution rapide de la fonction rénale. Dans la phase de persistance, l'oligurie et la dysfonction rénale sont stabilisées et pourraient persister pendant quelques jours jusqu'à quelques mois, des complications sévères apparaissent souvent dans cette phase, *e.g.* déséquilibre électrolytique, la surcharge volémique, etc. L'hémodialyse est requise chez certains patients. Dans la phase de guérison, la fonction rénale se rétablit progressivement jusqu'à une guérison complète ou partielle (insuffisance

rénale chronique, IRC). Certains patients souffrent d'une période de polyurie, causée par une mal-résorption tubulaire (Gilbert W. Moeckel 2015). Les mécanismes principaux impliqués dans les trois phases seront discutés en détail dans les chapitres suivants.

1.4 Traitement et pronostic

Il n'existe actuellement pas de traitement étiologique l'IRA induite par l'IRI. Nous pouvons tenter de prévenir sa survenue, en minimisant le temps le temps d'ischémie et rétablir le plus tôt possible la circulation sanguine rénale. S'il survient une insuffisance rénale aiguë secondaire à l'ischémie reperfusion, des traitements symptomatiques et de soutien, pouvant aller jusqu'à l'hémodialyse, sont mis en place. Le pronostic de l'IRA corrèle avec la sévérité des complications, la cause étiologique et l'état du patient (Waikar, Liu et al. 2008). Il y a une corrélation entre les changements incrémentiels dans la créatininémie et la mortalité (Chertow, Burdick et al. 2005). Les risques de développer de l'IRC sont plus élevés chez les patients qui ont survécu à l'IRA que chez les contrôles sains (Ishani, Xue et al. 2009, Lo, Go et al. 2009, Chawla, Amdur et al. 2011). Il est important de noter que, malgré des efforts pour optimiser les traitements, le pronostic de l'IRA a peu été amélioré au courant des dernières décennies. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques est nécessaire pour mieux traiter les patients (Gilbert W. Moeckel 2015).

2 Physiopathologie de l'insuffisance rénale aiguë causée par l'IRI

2.1 Phases d'initiation et de persistance

L'homéostasie tissulaire est essentielle pour stabiliser les paramètres vitaux et effectuer les fonctions fondamentales. Dans la phase d'initiation, l'ischémie et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) libérées par la reperfusion entraînent des insultes tissulaires aiguës. Suite à ces insultes, le corps se met à rétablir un état homéostatique, ce processus commençant par

élimination des cellules endommagées qui est exécutée par l'interaction de la mort cellulaire et l'inflammation. Plus précisément, la mort cellulaire libère des signaux qui recrutent des cellules immunitaires et déclenchent des réponses pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Les réponses immunitaires pro-inflammatoires amplifient les dommages tissulaires, créant une boucle de rétroaction qui amène la phase de persistance de l'IRA qui durera plusieurs jours à plusieurs mois, même une fois la cause étiologique dissipée (Bonventre 2007, Rodriguez, Bonacasa et al. 2013, Chatauret, Badet et al. 2014, Gilbert W. Moeckel 2015, Malek and Nematbakhsh 2015, Kalogeris, Baines et al. 2016). Bien que les mécanismes et le rôle des insultes tissulaires pour chaque compartiment soient discutés séparément dans les chapitres suivants, il faut garder à l'esprit que le processus physiopathologique est un réseau interactif entre ces compartiments.

2.1.1 La mort cellulaire

La mort cellulaire peut être classée en deux grandes catégories exclusives: la mort cellulaire non-programmée (NPCD) et la mort cellulaire programmée (PCD) (Galluzzi, Bravo-San Pedro et al. 2015). La NPCD est déclenchée par des stimuli sévère, *e.g.* le choc thermique, l'exposition aux agents cytotoxiques. Bien qu'elle joue un rôle important dans les dommages tissulaires, il est moins intéressant de l'investiguer parce qu'elle ne peut pas être inhibée par des approches pharmacologiques ou génétiques (Green and Kroemer 2005). La PCD est régulée et exécutée par des machineries moléculaires. On distingue plusieurs modes de PCD en fonction des différentes machineries moléculaires impliquées. La PCD Inclut notamment l'apoptose, la nécroptose, la pyroptose, la cornification, l'entose, la catastrophe mitotique, la netose et la parthanatose (Galluzzi, Vitale et al. 2012). Les caractéristiques biochimiques clés de ces PCD sont résumées au tableau III.

<i>PCD</i>	<i>Caractéristiques biochimiques clés</i>
L'apoptose	Activation des cascades des caspases
La nécroptose	Activation de RIPK1 et /ou RIPK3
La pyroptose	Activation de la caspase-1
La cornification	Activation des transglutaminases et de la caspase-14
L'entose	Activation de RHO et ROCK1
La catastrophe mitotique	Arrêt mitotique et activation de la caspase-2 ou TP53/TP73
La nétose	Libération des NETs
La parthanatose	Accumulation de PAR de façon PARP 1-dépendante

Tableau III. Classification des modes de PCD

Abbréviations : RIPK1/3 : le récepteur-interacting protéine kinase 1/3; ROCK1: rho-associated, coiled-coil-containing protéine kinase 1; NETs: pièges extracellulaires des neutrophils; PAR : poly (ADP-ribose); PARP1: poly (ADP-ribose) polymérase 1;

Depuis les années 1990, de multiples modes de PCD ont été rapportés dans le contexte de l'IRI rénale. Les modes les plus importants sont l'apoptose, la nécroptose et la pyroptose, qui seront discutés en détail ci-dessous (Kroemer, Galluzzi et al. 2009).

2.1.1.1 L'apoptose

L'apoptose (du grec ancien ἀπόπτωσις "tombant") est un processus de mort cellulaire programmée qui se produit dans les organismes multicellulaires (Kerr, Wyllie et al. 1972). Les changements morphologiques apoptotiques sont caractéristiques, incluant le bourgeonnement de la membrane cytoplasmique, la condensation de la chromatine et la fragmentation d'ADN. Les mécanismes moléculaires de l'apoptose sont très complexes et sophistiqués. Ils sont illustrés dans la figure 2.

2.1.1.1.1 L'initiation de l'apoptose

L'apoptose peut être déclenchée par de nombreux stimuli. On distingue deux voies d'apoptose en fonction des signaux initiateurs : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Gastman 2001, Elmore 2007).

Dans la voie intrinsèque, l'apoptose est déclenchée par le stress intracellulaire, par exemple, les dommages à l'ADN, les radicaux libres oxygénés, la surcharge cytosolique du calcium. Ces signaux conduisent à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) qui est une étape cruciale de l'initiation de l'apoptose de la voie intrinsèque. La MOMP est contrôlée par la famille Bcl-2 qui est constituée de plusieurs protéines qui partagent des domaines d'homologie de Bcl-2. La famille de Bcl-2 peut être divisée en trois sous-groupes qui sont fonctionnellement et structurellement distincts : les protéines composées uniquement des domaines BH-3 (BCL-2 homologie 3), les protéines gardiennes anti-apoptotiques et les protéines effectrices pro-apoptotiques. Stimulées par un stress intracellulaire, les protéines composées uniquement des domaines BH-3 (e.g. PUMA, NOXA) sont activées. Cette activation inhibe l'activité des protéines gardiennes anti-apoptotiques (Bcl-2), ce qui entraîne l'oligomérisation des protéines Bcl-2-associée X (BAX) et des homologues antagonistes du Bcl-2 (BAK). Le potentiel mitochondrial est alors dérégulé et des médiateurs qui sont normalement cachés dans l'espace intermembranaire des mitochondries sont libérés dans le cytosol (Wu and Bratton 2013, Hassan, Watari et al. 2014, Brenner, Blaser et al. 2015, Huang, Yu et al. 2015).

Les médiateurs libérés sont divisés en deux groupes selon leur effet sur les caspases. Le premier groupe comprend le cytochrome c, le Smac / DIABLO et la sérine protéase HtrA2 / Omi. Ils entraînent l'activation de la cascade des caspases pour l'exécution de l'apoptose. Par exemple, la libération de cytochrome c entraîne l'assemblage de l'apoptosome qui est un complexe activateur pour la caspase-9. La caspase-9 activée va ensuite diriger la cellule vers l'exécution de l'apoptose. Le deuxième groupe inclut le facteur d'induction de l'apoptose (AIF) et endonucléase G, qui peut se déplacer dans le noyau et causer la fragmentation d'ADN de façon caspases-indépendante (Wajant 2002, Schutze, Tchikov et al. 2008, Mehlen and Bredesen 2011).

Dans la voie extrinsèque, l'apoptose est initiée par la stimulation des récepteurs de la mort par leurs ligands. Différents récepteurs de la mort ont été identifiés, incluant le facteur de nécrose

tumoral (TNF) α / TNF-Récepteur 1, Synthétase d'acide gras (Fas) Ligand / Fas-Récepteur, Apo3L / récepteur de la mort (DR) 3, Apo2L / DR4 et Apo2L / DR5. On prend ici l'exemple de la voie de signalisation de TNF- α / TNF-R qui est l'une des mieux élucidées. Suite à l'activation par le TNF- α , le TNF-R recrute le domaine de mort associé au récepteur du TNF (TRADD), qui recrute ensuite le récepteur-interacting protéine kinase 1 (RIPK1), les protéines inhibitrices cellulaires de l'apoptose 1 et 2 (cIAP1 et 2), les facteurs associés au TNFR 2 et 5 (TRAF2 et 5). Ce complexe supra-moléculaire, appelé le complexe I, est un complexe pro-survie. Les cIAP1/2 peuvent ubiquitiner le RIPK1 afin de stabiliser ce complexe. En absence des cIAP1/2 ou présence de cylindromatose, une déubiquitinase, la RIPK1 non-ubiquitinée est libérée dans le cytoplasme. Cette libération entraîne la formation d'un autre complexe supra-moléculaire complexe II, qui est composé par le TRADD, le domaine de mort associé à Fas (FADD) et le pro-caspase-8. Les protéines inhibitrices FLICE-like (FLIPs) est une homologue enzymatiquement inactif. Sa présence à titres élevés peut inhiber l'apoptose. La formation du complexe II entraîne l'activation auto-catalytique de la procaspase-8, qui activera les caspases effectrices (Waring and Mullbacher 1999, Villa-Morales and Fernandez-Piqueras 2012) (Safa and Pollok 2011) (Deveraux, Roy et al. 1998, Conte, Liston et al. 2001, Shi 2002, Trapp, Korhonen et al. 2003).

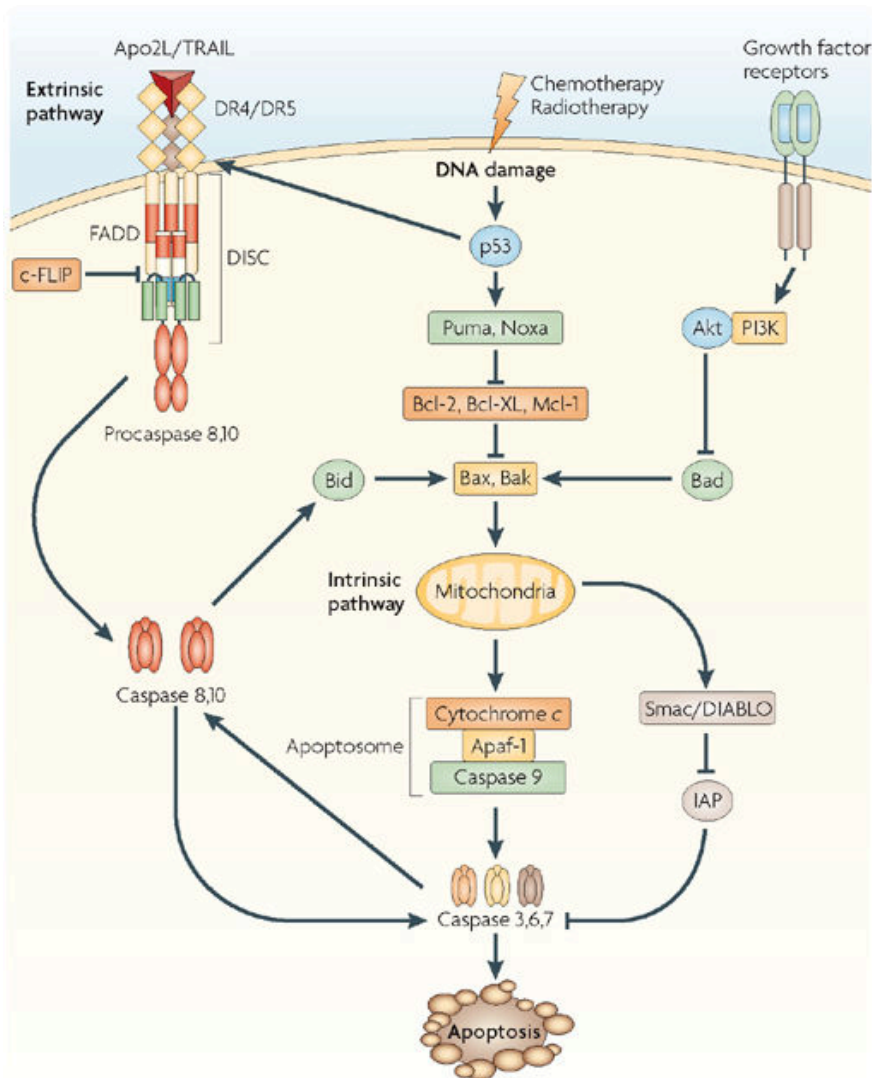
Il existe des mécanismes de 'cross-talk' entre les voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose. Bid est un membre de la famille Bcl-2. Après son clivage par la caspase-8 activée, tBid, le fragment C-terminal de Bid est libéré dans le cytosol. L'association de tBid avec la membrane externe mitochondriale facilite le recrutement du BAX, qui active ensuite l'apoptose par la voie intrinsèque (Wang and Tjandra 2013).

2.1.1.1.2 L'exécution de l'apoptose

Les caspases sont une famille de protéases cystéine-aspartique qui jouent un rôle crucial dans la mort cellulaire programmée et l'inflammation. Elles sont produites sous forme de pro-caspases qui sont des monomères inactifs. Ces monomères sont composées d'un pro-domaine N-terminal, qui contient un site d'aspartate pour (auto) protéolyse, une sous-unité petite et une sous-unité grande. La longueur des pro-domaines N-terminaux varient selon la fonction de la caspase. Les caspases effectrices (caspase-3,-6,-7) ont des pro-domaines courts, alors que les

caspases inflammatoires (caspase-1,-4,-5) et initiatrices (caspase-8,-9,-10) ont des pro-domaines longs, qui contiennent un domaine de recrutement de caspase (CARD) ou un domaine effecteur de la mort (DED). L'activation des caspases nécessite une dimérisation et souvent un clivage. Recrutés par le CARD ou DED, de différentes protéines adaptatrices pourrait faciliter la dimérisation et l'activation des caspases (Cohen 1997, McIlwain, Berger et al. 2013, McLuskey and Mottram 2015).

La caspase-3 est la caspase effectrice la plus importante. L'activation de la caspase-3 entraîne le clivage de divers substrats, y compris des protéines reliées au microfilament d'actine, l'inhibiteur de la DNase activée par la caspase (ICAD) etc. Le clivage de ces substrats entraîne au final le bourgeonnement de la membrane cytoplasmique, la condensation de la chromatine et la fragmentation d'ADN dans les cellules apoptotiques (Slee, Adrain et al. 2001).



Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 2. Les voies de signalisation apoptotiques.

Cité de (Bellance, Lestienne et al. 2009) Reproduit avec permission.

Les voies de signalisation apoptotiques comprennent les voies extrinsèques et les voies intrinsèques. Les voies extrinsèques sont induites par des signaux de stress extracellulaires qui sont détectés et propagés par des récepteurs transmembranaires spécifiques. Suite à l'activation de récepteurs par leurs ligands, différentes protéines seront recrutées pour former un complexe supramoléculaire qui sert de plateforme pour activer ultérieurement de la caspase 8 (ou-10). Par la suite, la caspase-8 activera les caspase effectrices -3,6 ou 7. La caspase-8

pourrait également cliver tBid, qui se transloque à la mitochondrie pour activer la voie intrinsèque, ce qui amplifiera la cascade apoptotique. Dans la voie intrinsèque, l'apoptose est déclenchée par le stress intra-cellulaire (*e.g.* dommage à l'ADN, surcharge cytosolique du calcium) qui conduit directement à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Le potentiel mitochondrial est alors dérégulé et des cytokines qui sont normalement cachées dans l'espace intermembranaire des mitochondries sont libérées dans le cytosol. Certaines cytokines (*e.g.* cytochrome c) vont ensuite entraîner l'activation des voies caspase-dépendantes par l'assemblage de l'apoptosome, un complexe activateur pour la cascade caspase-9-caspase-3. D'autres cytokines (*e.g.* facteur induisant de l'apoptose) déclenchent des voies caspase-indépendantes en se relocalisant dans le noyau et en médiant la fragmentation de l'ADN.

2.1.1.1 La nécroptose

La nécrose est une forme de mort cellulaire par autolyse. Auparavant, elle était considérée comme une mort cellulaire "accidentelle" et non programmée. C'est avec la découverte d'inhibiteurs chimiques de la nécrose et des preuves génétiques que l'on a prouvé l'existence de la nécrose programmée, la nécroptose (Conrad, Angeli et al. 2016).

Il existe deux voies de signalisation de la nécroptose : la voie médiée par la RIPK1 et la voie médiée par la transition de perméabilité mitochondriale (MPT) (Linkermann, Brasen et al. 2013, Linkermann, Chen et al. 2014).

(1) Caractérisée par l'activation de la chaîne RIPK1-RIPK3-MLKL, la voie RIPK1 est la voie la mieux élucidée, grâce à l'application de différents inhibiteurs ciblant ces molécules clés. La nécrostatine-1, un inhibiteur allostérique de la RIPK1, est le premier inhibiteur ayant été découvert (Degterev, Huang et al. 2005).

La plupart des stimuli impliqués dans l'initiation de la voie RIPK1 ne sont pas uniques à la nécroptose, mais peuvent également entraîner l'activation de l'apoptose. Comme il est mentionné ci-dessus, suite à l'activation du TNFR, la formation du complexe II pourrait

diriger la cellule vers l'apoptose. Dans les cas où la caspase-8 est inhibée ou la RIPK3 est surexprimée, le nécrosome est formée par l'agrégation de RIPK1 et RIPK3 et active ensuite la mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL) par phosphorylation, ce qui dirige la cellule vers la nécroptose (Galluzzi, Kepp et al. 2014, Kroemer 2014, Vanden Berghe, Linkermann et al. 2014) (Figure 3).

(2) La voie MPT partage les mêmes étapes d'initiation que l'apoptose intrinsèque. Il est connu que la voie MPT est régulée par la cyclophiline D, mais le mécanisme de régulation de la CypD sur la MPT n'est encore pas très bien décrit (Galluzzi, Kepp et al. 2014).

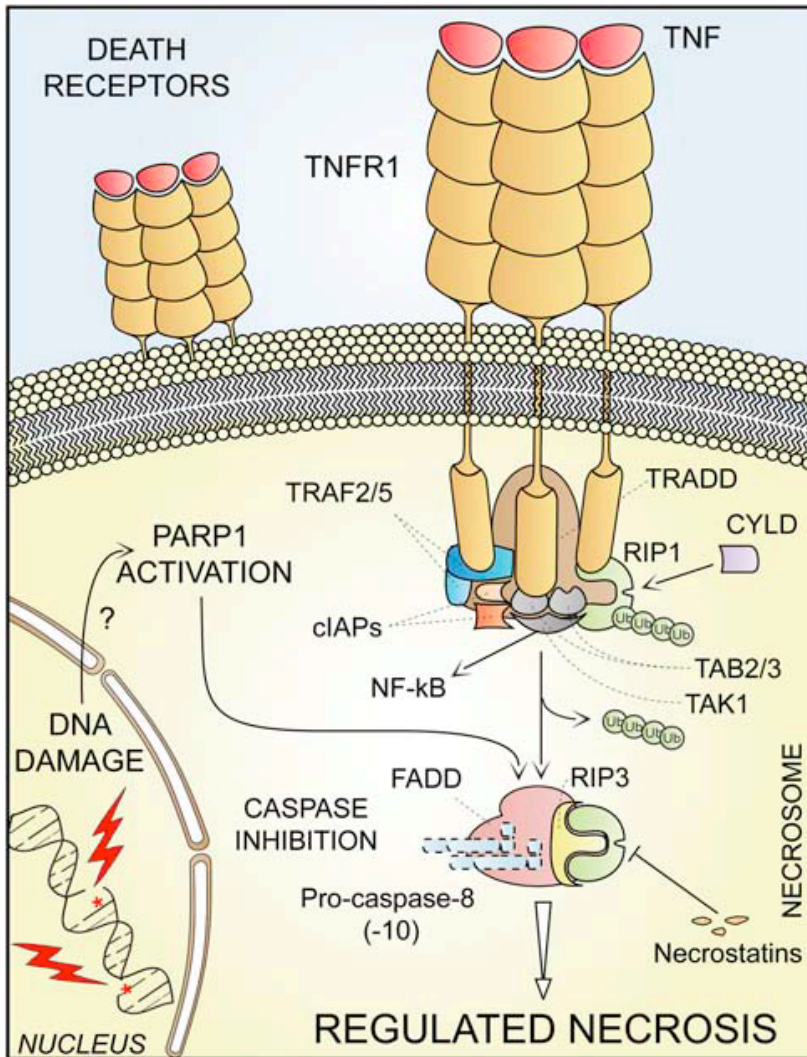


Figure 3. Les voies de signalisation nécroptotiques.

Cité de (Galluzzi, Vitale et al. 2012) Reproduit avec permission. Copyright © 2012 Macmillan Publishers Limited

L'activation du récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNFR) par son ligand facilite la formation du complexe supramoléculaire de nécrosome par l'agrégation de RIPK1 et RIPK3, ce complexe active ensuite la pseudokinase mélangé lignage kinase protéine de type de domaine

(MLKL) par phosphorylation afin d'exécuter la nécroptose.

2.1.1.3 Pyroptose

La pyroptose est une PCD pro-inflammatoire caractérisée par l'activation de la caspase-1. En réponse des stimuli, les récepteurs de NOD-like (NLRs) ou le capteur d'ADN cytosolique absent dans le mélanome 2 (AIM2) recrutent les protéines speck associées à l'apoptose contenant un CARD (ASC), formant l'inflammasome, qui est un complexe supramoléculaire.

L'inflammasome induit l'activation de la caspase-1 par dimérisation et auto-protéolyse. La caspase-1 activée clive les pro-IL-1 β et pro-IL-18, ce qui entraîne la maturation et la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 (Fernandes-Alnemri, Yu et al. 2009, Franchi, Eigenbrod et al. 2009, Aachoui, Sagulenko et al. 2013). Il est à noter que la caspase-1 activée pourrait induire l'apoptose en activant la caspase-7 (Lamkanfi, Kanneganti et al. 2008).

2.1.1.4 La réponse au stress pro-survie – l'autophagie

Différente des deux modes de mort cellulaire discutées précédemment, l'autophagie est considérée généralement comme une réponse au stress pro-survie. Elle est caractérisée par un processus de dégradation qui est déclenché par la privation d'éléments nutritifs et/ou de facteurs de croissance. Il existe au moins 3 formes d'autophagie, soit la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperons, et la macroautophagie.

La plupart des études se concentrent sur la macroautophagie qui est caractérisée par le transport de matériel cytoplasmique dans des vésicules à double membrane (autophagosomes) qui s'associent aux lysosomes pour la dégradation et le recyclage de leur contenu. Il y a trois enzymes clés dans l'initiation de la macroautophagie : la phosphoinositide 3-kinase du groupe 1 (PI3KC1), la protéine kinase B(PKB) et la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTOR). De plus, les protéines liées à l'autophagie (Atgs) sont les joueurs principaux dans l'exécution de l'autophagie. Dans le contexte physiologique, les facteurs de croissance transmettent les signaux de prolifération par leurs récepteurs membranaires qui vont activer la chaîne PI3KC1-PKB-mTOR. Une fois mTOR activé, il inhibe les kinases Unc-51-like (ULK1/2) par phosphorylation, tandis que dans le contexte de la privation de facteurs de croissance, l'inactivation de mTOR entraîne la libération des ULK1/2, qui mène à la formation des phagophores par l'activation de Beclin1 et PI3KC3. Le complexe Atg12-Atg5-Atg16 est recruté pour l'élongation du phagophore et la chaîne légère 3 de la protéine 1a/1b associée aux microtubules (LC3) est lipidée sur la membrane de l'autophagosome. Cette lipidation forme le LC3II, et contribue à la fermeture de l'autophagosome. L'augmentation du ratio LC3II /LC3I peut indiquer la formation des autophagosomes. Les Atg7/8 sont requises pour le recrutement d' Atg5 et LC3. La dernière étape de l'autophagie est la fusion de l'autophagosome avec le

lysosome, menant à la dégradation de son contenu par les enzymes lysosomiales. Les mTORs pourraient aussi être inactivés directement par le manque d'éléments nutritifs, et déclencher le processus en aval (Figure 4) (Kim and Lee 2014, Parzych and Klionsky 2014, Kroemer 2015).

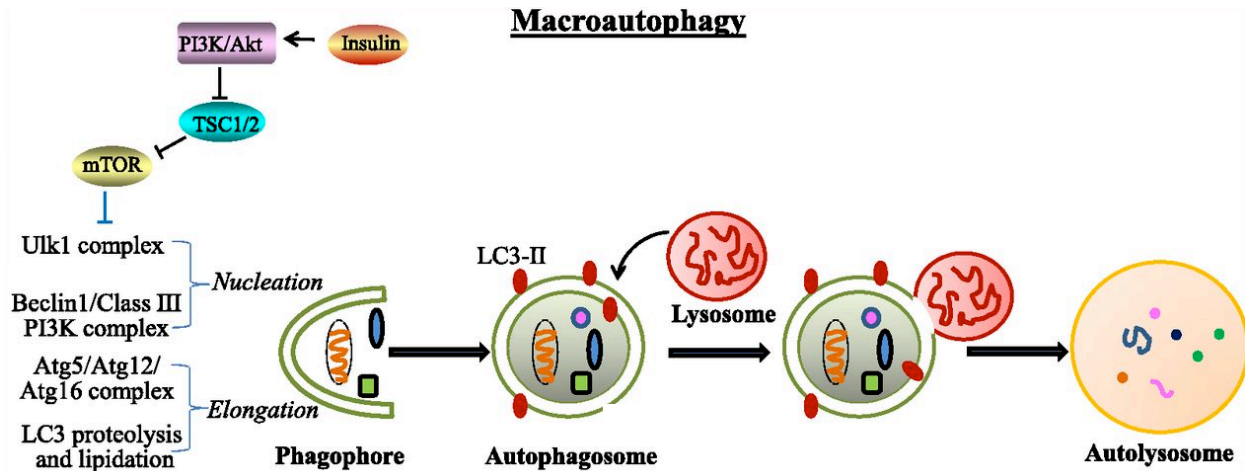


Figure 4. Les voies de signalisation autophagiques.

Cité de (Cheng, Ren et al. 2013), Reproduit avec permission

L'autophagie peut être déclenchée par différents stimuli pro-autophagique, tel que la déprivation des facteurs de croissance. Le processus d'autophagie comprend l'initiation, l'élongation et la fusion avec lysosome.

2.1.2 Les dommages tubulaires

2.1.2.1 Les mécanismes de dommage tubulaire

Les deux fonctions principales des tubules rénaux sont l'absorption et la sécrétion. Dans l'IRA causée par l'IRI, les cellules les plus vulnérables sont les cellules épithéliales des tubules proximaux et des branches ascendantes de l'anse de Henlé (Munshi, Hsu et al. 2011, Sharfuddin and Molitoris 2011). Ceci est dû au taux métabolique élevé requis afin d'effectuer le transport actif et aussi en raison d'une capacité limitée de métabolisme anaérobie. L'altération de ces tubules est donc considérée comme la caractéristique pathologique clé (Bohle, Jahnecke et al. 1976). La manifestation pathologique varie selon la sévérité et l'évolution de l'IRA, incluant la perte de bordure en brosse, la dilatation tubulaire, la

formation de cylindres, la nécrose tubulaire et la dénudation de la membrane basale (Gilbert W. Moeckel 2015).

Il est démontré que la mort cellulaire programmée joue un rôle important dans les dommages tubulaires. Plusieurs régulateurs apoptotiques et nécroptotiques sont surexprimés dans le contexte de l'IRA, incluant p53, caspase-3 et RIPK3 (Nicholson 2000, Bonegio and Lieberthal 2002, Molitoris, Dagher et al. 2009). La délétion génétique du TNF-alpha ou du TNFR2, qui sont impliqués dans l'induction de l'apoptose et de la nécroptose, réduit l'IRA induite par le cisplatine (Ramesh and Reeves 2004). La suppression conditionnelle de Bax, un régulateur important dans la voie intrinsèque de l'apoptose et dans la voie MPT de la nécroptose dans des cellules tubulaires proximales, améliore l'IRA causée par l'IRI (Wei, Dong et al. 2013). Il y a de plus en plus de preuves qui suggèrent un rôle prédominant de la nécroptose dans les dommages tubulaires. L'inhibition de la voie RIPK1-RIPK3, soit par l'utilisation de nécrostatine, un inhibiteur de RIPK1, soit chez des souris génétiquement déficientes pour RIPK3, réduit les lésions tubulaires rénales et la dysfonction rénale dans les modèles d'IRA (Tristao, Goncalves et al. 2012, Linkermann, Heller et al. 2013, Linkermann 2016). Dans un modèle murin d'IRI suivi d'une transplantation rénale, les allogreffes de rein RIPK3^{-/-} ont montré une fonction rénale améliorée et une survie plus longue après la transplantation tandis que l'inhibition génétique de caspase-8 par shARN a montré une aggravation de la nécroptose et de la dysfonction rénale (Lau, Wang et al. 2013). L'autophagie joue aussi un rôle important dans les dommages tubulaires induits par l'IRI; les souris déficientes en Atg 5 démontrent plus d'apoptose des cellules tubulaires et plus de dysfonction rénale, indiquant des effets protecteurs de l'autophagie dans les dommages tubulaires induits par l'IRI (Kimura, Takabatake et al. 2011, Liu, Hartleben et al. 2012).

2.1.2.2 Les marqueurs des dommages tubulaires

Dans l'IRA, les cellules épithéliales tubulaires proximales (PTECs) endommagées surexpriment et / ou sécrètent des molécules, *e.g.* la molécule des dommages rénaux (KIM-1), l'interleukine-18, la cystatine C, la lipocaline associée aux neutrophiles et la gélatase (NGAL), qui pourraient être utilisées comme biomarqueurs potentiels pour surveiller la sévérité des

dommages épithéliaux tubulaires (Vaidya, Waikar et al. 2008, Waikar and Bonventre 2008, Adiyanti and Loho 2012, Obermuller, Geiger et al. 2014).

KIM-1 est une glycoprotéine transmembranaire de type I qui est non-délectable dans les reins normaux. Suite aux insultes rénales, elle est surexprimée rapidement à la membrane apicale des PTECs chez les animaux ainsi que chez l'humain (Ichimura, Hung et al. 2004, Lim, Tang et al. 2013). La forme soluble de KIM-1 humaine est détectable dans l'urine des patients atteints de nécrose tubulaire aiguë et peut servir comme biomarqueur des dommages tubulaires (Han, Bailly et al. 2002).

L'interleukine-18 (IL-18) est une cytokine pro-inflammatoire de la famille de cytokines IL-1 et est synthétisée comme un précurseur inactif de 23 kDa par plusieurs types cellulaires incluant les monocytes, les macrophages et les PTECs. Elle est transformée en forme active par la caspase-1 et son niveau augmente dans le contexte de l'inflammation (Dinarello 1999). L'IL-18 est augmentée dans l'IRA causée par l'IRI. Chez l'humain, le niveau urinaire d'IL-18 est augmenté de 24 à 48 heures avant l'augmentation de la créatinine et sa concentration corrèle avec la sévérité de l'IRA (Parikh, Abraham et al. 2005, Awad and El-Sharif 2011).

La cystatine C est une protéine produite continuellement par toutes les cellules nucléées et il est démontré que le niveau de cystatin C urinaire est augmenté dans des modèles de l'IRA, incluant l'injection de gentamicine ou de cisplatine et l'IRI (Woodson, Wang et al. 2013, Kuwata, Nakamura et al. 2015).

2.1.3 Les dommages microvasculaires

2.1.3.1 Anatomopathologie

La microvascularisation rénale est une structure unique. Elle comprend les capillaires glomérulaire et les capillaires pér-itubulaires. Pénétrant dans le rein par l'intérieur du bassinnet rénal, les artères rénales se ramifient en une série de grandes artères fournissant du sang artériolaire dans le cortex superficiel via les artères interlobulaires et qui se terminent par un réseau d'artéioles afférentes et des capillaires glomérulaires. Les capillaires péri-tubulaires pourraient avoir deux origines, les artères interlobulaires et les artéioles glomérulaires

afférentes. Puisque 90% du flux sanguin est dirigé vers la zone corticale superficielle, il y a un gradient d'oxygénation décroissant de la zone corticale vers la zone médullaire. En raison de ces caractéristiques anatomiques, la zone sous-corticale est plus vulnérable dans le contexte de l'IRI (Graves 1954, Barger and Herd 1971, Beeuwkes 1980, Sampaio and Aragao 1990).

Dans le contexte de l'IRA induit par l'IRI, les dommages microvasculaires rénaux présentent habituellement peu de caractéristiques remarquables au niveau pathologique, au-delà de la congestion microvasculaire dans la zone sous-corticale, qui est reconnue par une agrégation des érythrocytes. Bien que les dommages des cellules épithéliales tubulaires soient reconnus depuis des décennies comme jouant un rôle clé de l'IRA, il y a de plus en plus d'études qui ont démontré que les dommages microvasculaires rénaux sont des facteurs importants de dysfonction rénale (Basile, Donohoe et al. 2001, Basile 2007, Basile, Friedrich et al. 2011, Sharfuddin and Molitoris 2011).

2.1.3.2 L'effet des dommages microvasculaires

Dans des contextes physiopathologiques incluant l'IRA, les dommages microvasculaires pourraient causer la dysfonction endothéliale. La dysfonction endothéliale est définie par la diminution de la synthèse, de la libération et / ou de l'activité du NO dérivé de l'endothélium. Elle peut influencer la vasoconstriction, la perméabilité microvasculaire, la coagulation et / ou les réponses inflammatoires (Brodsky, Yamamoto et al. 2002, Sutton, Fisher et al. 2002, Yamamoto, Tada et al. 2002).

La vasoconstriction est la caractéristique la plus importante de la dysfonction endothéliale dans l'IRA. Il a d'ailleurs été démontré par plusieurs études qu'elle joue un rôle crucial dans la diminution du débit sanguin rénal et certains inhibiteurs qui ciblent ces voies améliorent l'IRA (Wang, Falk Sa Fau - Jittikanont et al. , Wilhelm, Simonson et al. 1999, Knoll, Schult et al. 2001, Huang, Huang et al. 2002). Les synthèses d'oxyde nitrique (NOS) sont une famille d'oxydoréductases responsables de la production d'oxyde nitrique (NO) qui est un vasodilatateur puissant chez les mammifères (Knowles and Moncada 1994). L'eNOS est une NOS produite par les cellules endothéliales (ECs). L'absence d'eNOS aggrave la dysfonction rénale dans un modèle animal d'IRA induite par l'endotoxine (Wang, Mitra et al. 2004).

L'administration de NO ou son précurseur (L-arginine) améliore la fonction rénale dans des modèles animaux de l'IRA induite par l'IRI (Garcia-Criado, Eleno et al. 1998, Schneider, Raff et al. 2003). Les mécanismes impliqués dans l'activité eNOS altérée ne sont pas clairs, cela peut être attribuable au dommage endothélial ou à l'activité des radicaux libres, car l'administration d'un agent qui augmente les radicaux libres entraîne une diminution du débit sanguin rénal (Zou, Li et al. 2001).

L'endothélium intact est essentiel pour maintenir une perméabilité microvasculaire normale. Une augmentation de la perméabilité microvasculaire ou une fuite microvasculaire est un autre changement fonctionnel important de la dysfonction endothéliale. Les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la perméabilité ne sont pas élucidés; la plupart des études mécanistiques sont basées sur des systèmes *in vitro* qui ont montré que l'augmentation de la perméabilité est induite par l'altération du cytosquelette, la dissociation des jonctions cellules-cellules endothéliales et l'augmentation des interactions endothélium-leucocytaires (Parsons, Martin et al. 2000, Kwon, Phillips et al. 2002, Sutton, Mang et al. 2003, Verma and Molitoris 2015).

L'activation de la coagulation est une étape cruciale pour la dysfonction microcirculatoire. Dans des conditions physiologiques, les ECs inhibent la coagulation par régulation/activation d'une série de cytokines, incluant la protéine C, la thrombomoduline, des protéoglycane spécifiques et l'activateur de plasminogène tissulaire (tPA). La thrombomoduline est un cofacteur de la thrombine qui réduit la coagulation sanguine en convertissant la thrombine en une enzyme anticoagulante. Les insultes endothéliales induisent une diminution du complexe thrombine-thrombomoduline et cette diminution réduit le niveau de la protéine C activée, ce qui entraîne ensuite la génération locale de thrombine. C'est cette boucle qui induit une réponse pro-coagulante (Sadler 1997).

L'augmentation du nombre de leucocytes a été observée dans des modèles animaux de l'IRI (Bonventre 2007, Ince 2014). Deux causes importantes de cette accumulation de leucocytes sont l'obstruction de la microcirculation rénale et la participation de molécules d'adhésion, y compris les molécules sélectine et la molécule d'adhésion intercellulaire -1 (ICAM-1). Il a été démontré que les insultes ischémiques augmentent l'expression de la sélectine P et E à la surface des ECs. De plus, l'inhibition de la sélectine E et de l'ICAM-1 par différentes

approches expérimentales dans les modèles animaux d'IRA causée par l'IRI a diminué l'infiltration leucocytaire et la dysfonction rénale (Kelly, Williams et al. 1994, Kelly, Williams et al. 1996, Takada, Nadeau et al. 1997, Molitoris and MARRS 1999).

En résumé, dans le contexte de l'IRA induite par l'IRI, les dommages microvasculaires causent de la dysfonction endothéliale, ce qui contribue à la dysfonction rénale de plusieurs façons : 1. l'augmentation de la vasoconstriction pourrait altérer la perfusion post-IRI; 2. l'augmentation de la perméabilité et de la coagulation pourrait altérer la perfusion post-IRI en exacerbant la ségrégation des érythrocytes dans la microcirculation; 3 l'augmentation de la perméabilité et des molécules d'adhésion aggrave les réponses inflammatoires (Olof, Hellberg et al. 1991, Sutton, Fisher et al. 2002, Sutton, Mang et al. 2003, Kinsey, Li et al. 2008).

2.1.3.3 Les mécanismes des dommages microvasculaires

Dans le contexte physiologique, les ECs forment une barrière essentiellement continue à travers les vaisseaux de tous les organes. Un endothélium intact est requis pour la régulation normale de la tonicité vasculaire, l'activité plaquettaire, l'adhésion aux leucocytes et l'angiogenèse. Dans l'IRA causée par l'IRI, l'hypoxie et le stress oxydatif provoquent des changements au niveau du glycocalyx, ce qui conduit à une activation des ECs. Les nouveaux marqueurs exprimés sur la surface de ces ECs activées favorisent le recrutement et l'adhésion des leucocytes et des plaquettes, ce qui entraîne une détérioration de la microcirculation et une dysfonction endothéliale (Ferenbach and Bonventre 2015).

Les types de mort cellulaire impliquée dans les dommages microvasculaires sont nébuleux. Une étude a montré que, dans un modèle animal d'IRA causée par l'IRI, la caspase-3 est activée dans des ECs, ce qui suggère que l'apoptose joue un rôle important dans la mort des ECs dans ce contexte (Horbelt, Lee et al. 2007).

2.1.4 La réponse immunitaire innée

Le système immunitaire inné est la défense de première ligne contre les infections et les insultes tissulaires, et est composé de cellules immunitaires et de mécanismes anti-infectieux. Les cellules immunitaires comprennent notamment les macrophages et les neutrophiles. Les mécanismes anti-infectieux comprennent le système du complément, une série de récepteurs qui reconnaissent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) (*e.g.* des motifs de protéines des pathogènes, de lipides et d'acides nucléiques); et dans le contexte de l'inflammation « stérile », de motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (DAMP) (*e.g.* les protéines de choc thermique (HSP), les protéines de la boîte 1 du groupe de mobilité élevée (HGMB1) et l'acide urique) (de Diego, Gerold et al. 2007, Zhao and Lu 2014, Venereau, Ceriotti et al. 2015).

2.1.4.1 Neutrophiles

Les neutrophiles sont des granulocytes, le type le plus abondant de globules blancs chez les adultes. Ils représentent une partie essentielle du système immunitaire inné en effectuant des cascades inflammatoires qui incluent la génération d'espèces réactives d'oxygène, la chimiotaxie et la phagocytose.

Le rôle des neutrophiles dans l'IRA induite par IRI est controversé. Il est démontré que, dans des modèles animaux, il y a une infiltration des neutrophiles dans la partie sous-corticale (Li, Huang et al. 2008). La déplétion des neutrophiles par sérum anti-neutrophile diminue la dysfonction rénale post-IRI (Kelly, Williams et al. 1996). En revanche, d'autres études n'ont pas trouvé d'infiltration de neutrophiles et la déplétion des neutrophiles n'a pas eu d'effet protecteur au niveau de la dysfonction rénale (Thornton, Winn et al. 1989, Melnikov, Faubel et al. 2002).

2.1.4.2 Macrophages

En réponse à des signaux chimiotaxiques causés par des insultes tissulaires, les monocytes circulants migrent dans le tissu endommagé, où ils se différencient en macrophages. L'activation des macrophages peut donner naissance à deux sous-types cellulaires: 1. les macrophages pro-inflammatoires M1, qui peuvent relarguer des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-12, l'IL-23, l'IL-6 et l'IL-1 β . 2. Les macrophages M2 anti-inflammatoires, qui produisent des cytokines anti-inflammatoires telle que l'IL10 (Ovchinnikov 2008, Mills 2012). Les macrophages M1 prédominent et jouent un rôle important dans les phases aiguës de l'IRA induite par l'IRI. En effet, la déplétion des macrophages/monocytes diminue la dysfonction rénale post-IRI tandis que la persistance des macrophages M1 entraîne une guérison réduite et la progression vers l'insuffisance rénale chronique (Day, Huang et al. 2005, Jo, Sung et al. 2006, Ferenbach, Sheldrake et al. 2012, Lech, Grobmayr et al. 2014).

2.1.4.3 Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules présentatrices d'antigène; leur fonction principale est de reconnaître les antigènes et de les présenter aux cellules T. Elles servent comme des messagers entre les systèmes immunitaires inné et adapté. Dans les reins, les DCs se trouvent dans l'espace interstitiel, elles régulent l'inflammation et la réparation dans la pathogénèse de l'IRA induite par l'IRI. Le nombre total des DCs est augmenté post-IRI, elles amplifient la réponse pro-inflammatoire par production du facteur de nécrose tumorale – alpha (TNF-alpha), de l'interleukine-6 et de la protéine chimioattractive monocyttaire 1(MCP-1). L'ablation inductible des DCs réduit les dommages tubulaires et la dysfonction rénale post-IRI (Kim, Lim et al. 2005, Dong, Swaminathan et al. 2007, Li and Okusa 2010). Il est aussi démontré que les DCs jouent un rôle anti-inflammatoire et que la déplétion des DCs post-IRI entraîne une inflammation soutenue (Kim, Boo et al. 2010).

2.1.4.4 Les cellules NK

Les cellules tueuses naturelles (cellules NK) sont une classe de lymphocytes cytotoxiques qui n'expriment pas de récepteurs de cellules T ou de cellules B. Elles tuent les cellules infectées de façon directe et produisent des cytokines pro-inflammatoires, y compris l'IFN- γ et le TNF. Il est démontré que, dans un modèle animal d'IRA induite par l'IRI, les cellules NK tuent les cellules épithéliales tubulaires de façon directe et la déplétion des cellules NK dans ce modèle démontre des effets protecteurs. L'expression de l'ostéopontine par les cellules épithéliales tubulaires est essentielle pour le recrutement des cellules NK (Zhang, Wang et al. 2008, Zhang, Shek et al. 2010).

2.1.4.5 Les récepteurs de type toll

Les récepteurs de type toll (TLRs) sont des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs) et ils jouent un rôle central dans l'initiation de l'inflammation par reconnaissance des DAMPs et des PAMPs en envoyant des signaux qui sont ensuite transduits par les adaptateurs des TLRs afin d'activer les cellules effectrices du système immunitaire inné via des cytokines pro-inflammatoires, tel que l'interféron de type I (Botos, Segal et al. 2011, Kawai and Akira 2011, Moresco, LaVine et al. 2011, Sasai and Yamamoto 2013).

Chez les mammifères, il existe 13 types de TLRs dont les TLR-2 et TLR-4 qui sont exprimés par les cellules épithéliales rénales et dont l'expression augmente dans l'IRA induite par l'IRI (Kim, Lim et al. 2005). Les souris TLR-2 KO ou traitées avec des oligonucléotides anti-sens contre TLR-2 sont protégées de la dysfonction rénale post-IRI (Leemans, Stokman et al. 2005). TLR-4 est aussi exprimé par les ECs rénales post-IRI et est essentiel pour la surexpression des molécules d'adhésion (Chen, John et al. 2011). TLR4 est constitutivement exprimé sur les membranes cytoplasmiques des leucocytes tels que les macrophages. Les souris TLR-4 KO transplantées avec des cellules hématopoïétiques WT avaient moins de dysfonction rénale et moins de dommages tubulaires que les souris WT transplantées avec des cellules hématopoïétiques TLR-4 KO, suggérant que la signalisation TLR-4 dans les cellules rénales intrinsèques joue un rôle dominant dans les dommages rénaux post-IRI (Wu, Chen et al. 2007).

2.1.4.6 Le système du complément

Le système du complément est constitué d'une série de petites protéines en circulation sous forme de précurseurs inactifs. Lorsqu'il y a présence de stimuli, les protéases initient une cascade d'amplification qui finit par l'activation du complément. Cette activation stimule des phagocytes afin d'éliminer le matériel non-soi ou endommagé et accentue l'inflammation pour attirer plus de phagocytes en formant des complexes d'attaque membranaires (MAC) ayant pour but de détruire les cellules infectées/endommagées. Selon les différentes cascades impliquées dans la formation des C3 convertases, il existe trois voies biochimiques dans l'activation du système de complément : la voie classique, la voie alterne et la voie de lectine (Figure 5) (Noris and Remuzzi 2013, Holers 2014).

La voie classique est initiée par les complexes immuns. Après la liaison à ses antigènes apparentés, les anticorps IgG ou IgM interagissent avec le C1q du complexe C1 via sa partie cristallisable en fragments (Fc). Cette interaction entraîne la libération de C1r et C1s par le complexe C1, résultant en l'activation séquentielle de C1r et C1s. Le C1s activé clive ensuite C4 et C2, produisant des fragments actifs (C4b et C2a). Il est à noter que pendant ce clivage, le fragment C4d est libéré de manière concomitante, il se lie de façon covalente avec la membrane cytoplasmique des cellules du site d'activation de C4, ce qui donne un marqueur de l'activation du C4. Le C4b se lie aux glycoprotéines de la membrane cytoplasmique et au C2a, ce qui entraîne la formation de la C3 convertase C4bC2a. En plus de l'activation par les complexes immuns IgG et IgM, le C1q peut également être activé par des cellules apoptotiques et nécrotiques (Nauta, Daha et al. 2003).

La voie de lectine est initiée par la lectine liée au mannose (MBL). La MBL peut identifier des motifs de ligands glucidiques qui se trouvent à la surface des microbes. La reconnaissance de ces motifs par la MBL conduit à l'activation des sérine protéases associées à la MBL (MASP-1, MASP-2 et MASP-3), qui clivent C4 et C2, génèrent la C3 convertase C4bC2a dans une réaction analogue à la voie classique (Beltrame, Catarino et al. 2014, Garred, Genster et al. 2016).

Différente des deux voies mentionnées ci-dessus, la voie alterne est constitutivement active à faible niveau dans le contexte physiologique, via l'hydrolyse spontanée de C3 ('tickover'). Le

tickover entraîne la formation de C3 (H₂O) qui recrute le facteur B, formant le complexe C3(H₂O) B. Ce complexe est ensuite clivé par le facteur D, ce qui entraîne la formation de la convertase C3 (H₂O) Bb (Hawfield, Iskandar et al. 2013, Angioi, Fervenza et al. 2016).

Une fois que les C3 convertases C4bC2a ou C3 (H₂O) Bb sont formées, elles clivent C3 pour libérer C3a et C3b. C3b se lie avec le facteur B pour former la C3 convertase C3(H₂O) Bb, entraînant une amplification de l'activation du système du complément. Le C3b peut également se lier avec les convertases C3 pour former les C5 convertases C3bBbC3b et C4bC2aC3b. Les C5 convertases clivent ensuite C5, libérant C5a et C5b. Le C5b recrute C6, C7, C8 et C9 pour former le complexe C5b-C9, appelé le complexe d'attaque membranaire (MAC), qui forme des pores en s'insérant dans les membranes cytoplasmiques, entraînant la lyse cellulaire (Bubeck 2014, Sonnen and Henneke 2014).

En plus des effets directs par la lyse cellulaire, le système du complément peut aussi aggraver les dommages tissulaires en augmentant les réponses immunitaires via les anaphylatoxines C3a et C5a. Ces anaphylatoxines favorisent le recrutement de neutrophiles et de monocytes. Elles provoquent la libération d'histamine par les mastocytes. Elles peuvent également être impliquées dans la production du TNF- α . Elles participent aussi dans la régulation de l'immunité adaptative. Il est démontré que les cellules T régulatrices expriment le C3a récepteur et le C5a récepteur. Le blocage génétique et pharmacologique de ces récepteurs augmente l'effet négatif des cellules T régulatrices dans les réponses immunitaires (Kwan, van der Touw et al. 2013).

Il existe aussi des inhibiteurs naturels du complément. L'inhibiteur de C1 peut inactiver C1r et C1s, MASP-1 et MASP-2 en se liant avec ces molécules de manière irréversible. Le facteur H et le facteur I sont les principaux régulateurs plasmatiques de la voie alterne. Le facteur H est un co-facteur du facteur I. Ensemble, ils sont capables d'inactiver C3b de façon permanente par la protéolyse. CD59 est un régulateur clé de la formation du complexe C5b-9. Il empêche la formation du complexe C5b-9 par l'inhibition de la liaison de C9 avec C5b-8 (Klos, Tenner et al. 2009).

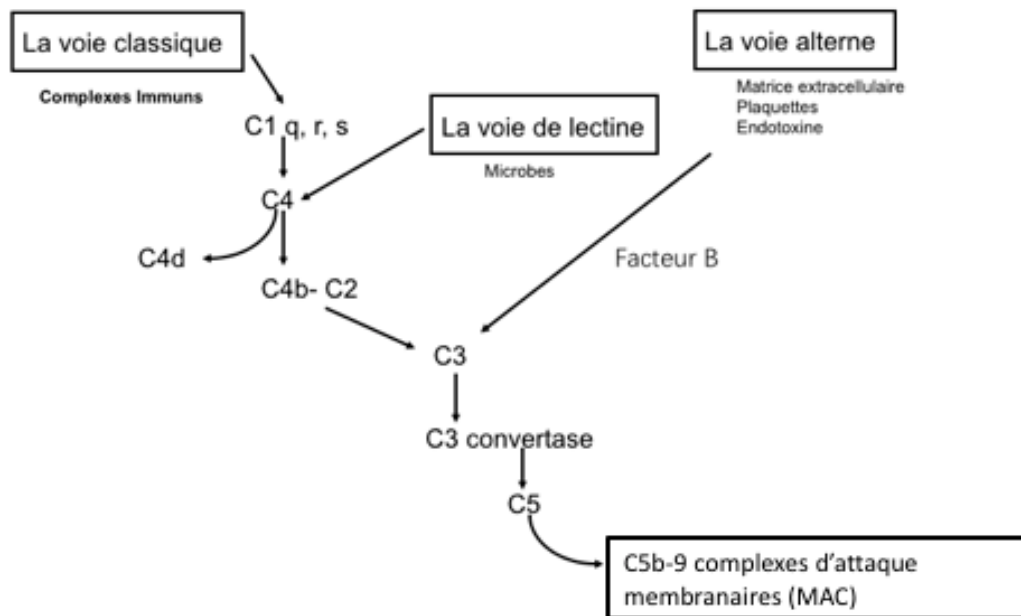


Figure 5. Les voies des compléments

Il existe trois voies biochimiques dans l'activation du système de complément : la voie classique, la voie alterne et la voie de lectine. La voie classique est activée par la formation de complexes immuns antigène-anticorps. L'activation de la voie alterne résulte de l'hydrolyse spontanée du C3, pouvant être favorisé par les surfaces cellulaires bactériennes, des levures, des parasites ou de cellules infectées. La voie des lectines est activée par l'interaction avec des résidus mannose à la surface des micro-organismes.

L'activation du système de complément joue un rôle important dans la pathogenèse de l'IRA induite par IRI. En ciblant des composantes du MAC (C5b, C6) par différentes approches expérimentales, des études ont démontré l'importance du MAC dans les dommages tubulaires et dans la dysfonction rénale post-IRI (Zhou, Farrar et al. 2000, de Vries, Kohl et al. 2003). CD55 et CD59 sont deux inhibiteurs endogéniques de MAC et les souris CD55/CD59 double KO sont plus sensibles à l'IRI, ce qui confirme la contribution de MAC (Yamada, Miwa et al. 2004).

Les voies alterne et de lectine sont impliquées dans l'IRA induite par l'IRI, mais pas la voie classique. La déposition tubulaire de C3 est augmentée post-IRI, les souris C3 KO ou facteur B KO ont moins d'infiltration leucocytaire et une fonction rénale améliorée par rapport aux souris contrôles (Zhou, Farrar et al. 2000, Thurman, Ljubanovic et al. 2003).

2.1.5 La réponse immunitaire adaptée

Les lymphocytes sont des sous-types de leucocytes qui jouent un rôle clé dans l'immunité innée et adaptée et ils peuvent être divisés en 3 sous-populations : cellules NK (discutées ci-dessus dans la réponse immunitaire innée), les lymphocytes B et les lymphocytes T. De nombreuses études ont d'ailleurs révélé un rôle important des sous-populations diversifiées de lymphocytes dans l'IRA induite par l'IRI (Noiri, Doi et al. 2009, Xue, Liu et al. 2014, de Ramon, Ripoll et al. 2015, Jun, Qingshu et al. 2015).

2.1.5.1 Lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des lymphocytes qui expriment des récepteurs de cellule-T sur la membrane cytoplasmique et ils jouent un rôle central dans la réponse immunitaire cellulaire. Les souris *foxn1^{mu/mu}*, qui sont lymphocyte T KO, sont protégées de l'IRA induite par l'IRI et cette protection est abolie par l'injection intra-péritonéale de cellules T. Le CD28 est un signal co-stimulateur qui est requis dans l'activation des cellules T. Les souris CD28 KO ou IFN- γ KO sont aussi protégées de la dysfonction et des insultes rénales causées par l'IRI, mais l'injection intra-péritonéale de cellules T chez ces souris ne change pas cette protection, ce qui suggère que l'expression du CD28 et de l'IFN- γ sont des facteurs clés dans les effets pathogéniques des lymphocytes T (Burne, Daniels et al. 2001). Les souris CD4/CD8 double-KO démontrent moins de dysfonction et de nécrose tubulaire post-IRI, et les médicaments qui ciblent les lymphocytes T (tacrolimus et mycophénolate de mofetil) ou le CD28 ont des effets protecteurs dans l'IRA induite par l'IRI (Sakr, Zetti et al. 1992, Chandraker, Takada et al. 1997, Jones and Shoskes 2000, Rabb, Daniels et al. 2000). Cependant, l'injection de globulines anti-

thymocytes n'arrive pas à diminuer les insultes causées par l'IRI rénale, indiquant un rôle important des lymphocytes T résidents des reins (Jang, Gandolfo et al. 2009).

2.1.5.2 Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont des lymphocytes qui expriment des récepteurs de cellule-B sur la membrane cytoplasmique et ils jouent un rôle central dans la réponse immunitaire humorale par la sécrétion des anticorps. Le rôle des lymphocytes B dans l'IRA induite par l'IRI est confirmé par une étude animale dans laquelle des souris déficientes en lymphocytes B sont protégées de la dysfonction rénale et des insultes tubulaires post-IRI. Dans cette étude, la transfusion de séra de souris WT, mais pas de leurs lymphocytes, restaure partiellement les insultes post-IRI chez ces souris déficientes en lymphocytes B. Cela suggère que les effets des lymphocytes B sont exécutés par des facteurs sériques (Burne-Taney, Ascon et al. 2003). Cependant, en utilisant la même souche de souris, une autre étude montre que le transfert adoptif des lymphocytes B diminue la régénération tubulaire post-IRI, ce qui indique des mécanismes d'action différents des lymphocytes B selon les différentes phases de l'IRA induite par l'IRI (Jang, Gandolfo et al. 2010).

2.2 Phase de guérison

La phase de guérison est caractérisée par la régénération tissulaire dans le contexte de guérison complète ou, parfois, peut évoluer vers une atrophie tubulaire et de la fibrose (Sharfuddin and Molitoris 2011, Skrypnik, Harris et al. 2013, Le Clef, Verhulst et al. 2016).

2.2.1 La régénération tubulaire

Suite à la mort cellulaire et au détachement des cellules épithéliales tubulaires (TECs) causés par l'IRI et la réponse immunitaire, les tubules endommagés commencent à se régénérer. De nouvelles cellules migrent et se différencient dans la région endommagée en reconstituant un épithélium tubulaire fonctionnel. Des études ont identifié trois sources possibles de ces cellules :

1) Dédifférenciation de TECs endommagés.

Bien qu'un rôle important pour les cellules souches de la moëlle avait osseuse ait été mis de l'avant il y a une quinzaine d'années, plusieurs travaux ont démontré le rôle prédominant des cellules épithéliales dans la repopulation des tubules (Ferenbach and Bonventre 2015). La contribution de cette source dans le contexte de l'IRI rénale est confirmée par les techniques de cartographie génétique (genetic fate-mapping) qui démontrent que la majorité des TECs régénérées sont originaires des TECs (Humphreys, Valerius et al. 2008). En utilisant l'analyse de lignée génétique, une autre étude a confirmé la dédifférenciation des TECs et leur rôle dans la régénération tubulaire post-IRI (Kusaba, Lalli et al. 2014).

2) Cellules souches de la moelle osseuse.

La première preuve vient d'une étude clinique où on a examiné des patients masculins transplantés qui ont reçu des reins de donneurs féminins. Chez ceux qui ont guéri d'une nécrose tubulaire aiguë, des TECs qui avaient des chromosomes Y ont été retrouvés (Gupta, Verfaillie et al. 2002). Cette observation a ensuite été confirmée dans un modèle animal d'IRI où les souris femelles transplantées avec des cellules souches hématopoïétiques de souris mâles avaient des TECs dérivées des souris mâles post-IRI (Lin, Cordes et al. 2003).

3) Cellules souches rénales ou progénitrices.

De nombreuses études ont démontré l'existence de cellules progénitrices rénales, mais leur rôle dans l'IRI est encore débattu (Kitamura, Yamasaki et al. 2005, Lindgren, Bostrom et al. 2011, Angelotti, Ronconi et al. 2012).

L'échec de la régénération tubulaire entraîne une atrophie tubulaire, qui est l'une des caractéristiques pathologiques clé de l'IRC. De plus en plus de preuves identifient l'hypoxie causée par la raréfaction microvasculaire comme la force motrice pour une régénération tubulaire altérée et la fibrose post-IRI (Kang, Kanellis et al. 2002, Eckardt, Bernhardt et al. 2005, Nangaku 2006).

2.2.2 La raréfaction microvasculaire

La microvascularisation rénale est composée par les capillaires glomérulaires et les capillaires péri-tubulaires (PTC). L'évolution de l'IRA induite par l'IRI vers l'IRC est associée à une perte progressive des PTC, et les dommages aux PTC influencent aussi le résultat à long terme post-IRI (Basile, Donohoe et al. 2001, Basile 2004). Des études cliniques et animales démontrent que, dans d'autres maladies rénales incluant les glomérulonéphrites et les néphropathies obstructives, il y a aussi une corrélation inverse entre la densité microvasculaire et la sévérité de la fibrose (Seron, Alexopoulos et al. 1990, Ohashi, Kitamura et al. 2000, Ohashi, Shimizu et al. 2002). Ensemble, ces résultats suggèrent fortement que la raréfaction des PTC joue un rôle central dans la progression et la fibrose des maladies rénales.

Outre la mort des ECs, la perte des péricytes et l'angiogenèse altérée contribuent aussi à la raréfaction microvasculaire. Les péricytes sont des cellules contractiles qui stabilisent les ECs et recouvrent les capillaires et qui, suite aux insultes, migrent et se différencient en myofibroblastes. Cette perte des péricytes entraîne une déstabilisation des ECs, ce qui favorise la raréfaction microvasculaire (Kida and Duffield 2011). L'angiogenèse est principalement régulée par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire-A (VEGF-A) et il est démontré que, dans un modèle de néphropathie obstructive, l'expression de VEGF est diminuée (Burt, Forbes et al. 2007). La voie de VEGF est aussi altérée dans l'IRA induite par l'IRI et l'administration de VEGF entraîne une préservation de la microvascularisation, indiquant un rôle important de VEGF dans l'angiogenèse post-IRI (Basile, Fredrich et al. 2008, Basile, Friedrich et al. 2011). La rarefaction microvasculaire peut aussi induire un état d'hypoxie chronique menant à la surexpression du facteur inductible par l'hypoxie 1 α (HIF-1 α) qui favorise l'expression du facteur de croissance transformant β (TGFB) et la fibrose (Tanaka 2017).

2.2.3 Rôle de la sénescence

La sénescence cellulaire est définie comme un arrêt irréversible de la croissance en réponse à de multiples types de dommages, tels que le stress oncogénique, des dommages à l'ADN et la

perte de télomères (Rodier and Campisi 2011). Les cellules sénescences se trouvent en association avec le vieillissement, la réparation tissulaire et le cancer (Munoz-Espin and Serrano 2014). Déclenchée par différents stimuli, la sénescence est exécutée principalement par deux voies de signalisation : la voie de p16 et la voie de p21. L'activation de ces deux voies inhibe diverses kinases cyclin-dépendantes (*e.g.* kinase cycline-dépendante 4, CDK4 et kinase cycline-dépendante 6, CDK6) et cette inhibition entraîne une hypophosphorylation de la protéine du rétinoblastome (RB), qui empêche l'entrée de la phase S (Figure 6). Le marqueur de sénescence le plus utilisé est l'activité de β -galactosidase associée à la sénescence. Le β -galactosidase est une exoglycosidase qui peut être détectée en utilisant X-gal. Le clivage de X-gal par β -galactosidase forme un produit bleu intense. La β -galactosidase associée à la sénescence est une isoforme de β -galactosidase avec une activité optimale à pH 6,0, et peut donc être détectée en utilisant la solution de X-gal ajustée à pH 6,0. D'autres marqueurs de sénescence canoniques incluent p53, p21, p16 et la réduction de la phosphorylation de RB, qui médient collectivement les changements phénotypiques associés à l'arrêt du cycle cellulaire. Il est à noter que, jusqu'à présent, il n'y a aucun marqueur ou caractéristique identifié qui est entièrement spécifique à la sénescence, et les cellules sénescences ne présentent pas tous les marqueurs de sénescence connus.

Dans les reins, l'expression corticale du p16 corrèle fortement avec l'âge, ce qui indique une augmentation de la sénescence chez les reins âgés (Krishnamurthy, Torrice et al. 2004, McGlynn, Stevenson et al. 2009). Dans le contexte de l'IRA induite par l'IRI, le rôle de la sénescence est controversé selon les phases physiopathologiques. Dans la phase aiguë, une étude montre une dysfonction rénale aggravée chez les souris déficientes en p21 exposées à l'IRI comparé avec leur contrôle WT alors qu'une autre étude montre que le blocage pharmacologique de CDK4 et de CDK6 chez les souris protège contre l'IRA induite par l'IRI (Megyesi, Andrade et al. 2001, DiRocco, Bisi et al. 2014). Pour la phase de régénération, comparées avec les souris jeunes, les souris âgées démontrent plus de fibrose rénale post-IRI, ce qui suggère que la sénescence affecte la régénération dans le contexte de l'IRA induite par l'IRI (Clements, Chaber et al. 2013). Cette notion est ensuite confirmée par une autre étude animale dans laquelle les souris p16 KO démontrent une meilleure régénération post-IRI comparativement aux souris WT (Lee, Wolstein et al. 2012).

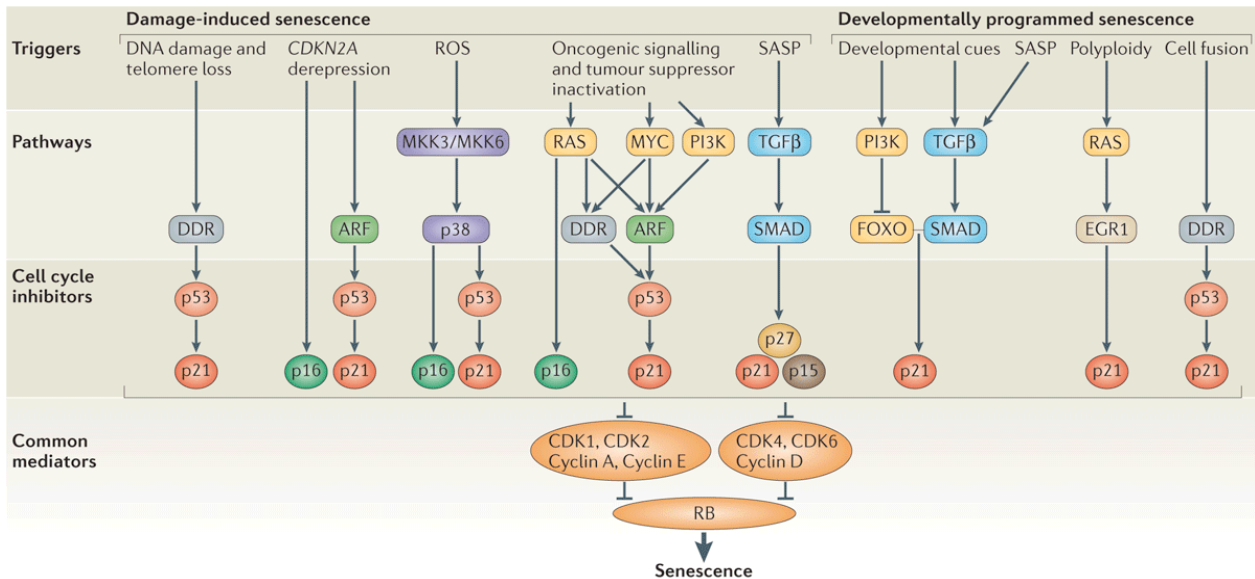


Figure 6. Les voies moléculaires de la sénescence

Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular Cell Biology (Munoz-Espin and Serrano 2014), copyright (2014)

La sénescence peut être déclenchée par de nombreux stimuli, incluant les dommages à l'ADN, les ROS etc. Dépendamment du stimuli, les signaux sont transmis par différents adaptateurs/voies de signalisation. La sénescence est exécutée principalement par la voie de p16 et la voie de p21 qui inhibent diverses kinases cyclin-dépendantes et cette inhibition entraîne une hypophosphorylation de la protéine du rétinoblastome (RB), qui empêche l'entrée de la phase S.

2.2.4 La fibrose post ischémie-reperfusion

2.2.4.1 Généralités

La fibrose est définie par des dépôts aberrants et excessifs de protéines de la matrice extracellulaire (ECM), ce qui mène à des changements de l'architecture tissulaire et à une

perte de fonction du tissu fibrotique. Indépendamment de l'étiologie, la fibrose rénale est une caractéristique pathologique commune de l'IRC ; elle prédispose toujours une insuffisance rénale en phase terminale et les traitements efficaces qui arrêtent ou induisent une régression de la fibrose rénale sont cruciaux pour prévenir une perte de fonction rénale irréversible (Boor, Ostendorf et al. 2010). Comme mentionné ci-dessus, les insultes tissulaires induisent une réponse inflammatoire qui cause non seulement une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, mais aussi des cytokines profibrotiques. Ces dernières conduisent inévitablement à l'activation de cellules productrices de l'ECM, ce qui est sans doute un événement central de la fibrogénèse rénale (Strutz and Muller 2006).

2.2.4.2 Origines des myofibroblastes

Il est généralement admis que les myofibroblastes sont le type cellulaire le plus responsable de la synthèse et de l'accumulation de la matrice conduisant à la fibrose rénale. Plusieurs sources différentes, avec des mécanismes divers, ont été proposés comme contributeurs au pool de myofibroblastes dans le processus de fibrose rénale (Strutz and Zeisberg 2006).

Les fibroblastes résidents et les péricytes

Les fibroblastes sont des cellules mésenchymateuses qui sont en forme de fuseau et qui jouent un rôle crucial dans l'homéostasie de l'ECM. Ils sont la première source identifiée et sont toujours considérés comme la source la plus importante des myofibroblastes (Strutz and Muller 2006).

Les fibroblastes interstitiels sont caractérisés par la production de fibronectine. En cas d'activation par des stimuli profibrotiques, les fibroblastes se différencient en proto-myofibroblastes en exprimant la fibronectine contenant un domaine supplémentaire A (ED-A fibronectine), l'actine filamenteuse et les adhérences focales. Cette transition est réversible. Les proto-myofibroblastes peuvent ensuite se différencier en myofibroblastes qui sont caractérisés par l'actine du muscle lisse α (α -SMA). L' α -SMA est utilisé comme un marqueur fiable pour la différenciation en myofibroblastes (Gabbiani 1992, Desmouliere, Chaponnier et al. 2005, Liu 2011, Falke, Gholizadeh et al. 2015).

Les péricytes sont des cellules qui entourent et stabilisent les ECs des capillaires. Suite aux insultes tissulaires, les péricytes sont détachés de l'endothélium, subissent une migration et une prolifération, et se différencient en myofibroblastes. En utilisant les techniques de cartographie génétique dans un modèle murin de fibrose rénale induite par l'IRI, on a identifié des péricytes/fibroblastes périvasculaires comme étant la source dominante des myofibroblastes (Diaz-Flores, Gutierrez et al. 2009, Humphreys, Lin et al. 2010).

Les fibrocytes circulants sont une sous-population de monocytes dérivés de la moelle osseuse ; ils expriment le marqueur de cellules hématopoïétiques CD45 et ont certaines caractéristiques des fibroblastes, *e.g.* la forme du fuseau, la capacité de production du collagène de type I. Un modèle animal de fibrose rénale induite par l'IRI où des rats ont été transplantés avec des cellules de moelles osseuses marquées démontre que les cellules de moelle osseuse contribuent à 30% de la population des myofibroblastes, indiquant un rôle important des fibrocytes (Broekema, Harmsen et al. 2007).

La transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT)

L'EMT est un processus cellulaire qui est caractérisé par la perte de polarité cellulaire et le changement de forme cellulaire du cuboïde au fibroblastoïde, par la sous-régulation des marqueurs épithéliaux et par la sur-régulation des marqueurs mésenchymateux (Acloque, Adams et al. 2009). La transition endothéliale-mésenchymateuse (EndoMT) est considérée comme une forme unique d'EMT, car les ECs sont un type cellulaire spécial d'épithélium. Le fait que l'EMT contribue au pool de myofibroblastes *in vivo* est encore débattu. Dans le contexte de l'IRA induite par l'IRI, en utilisant les techniques de cartographie génétique, une étude démontre qu'une population de myofibroblastes est d'origine endothéliale (Basile, Friedrich et al. 2011), tandis qu'une autre étude exclut la contribution de l'EMT (Humphreys, Lin et al. 2010). Il est à noter que cette étude n'exclut pas la contribution potentielle de l'EndoMT, car ils utilisent le *six-2* comme étiquette génétique et les cellules *six-2* positives ne deviennent pas des ECs rénales (Kobayashi, Valerius et al. 2008).

2.2.4.3 Mécanismes impliqués dans la différenciation en myofibroblastes

2.2.4.3.1 La voie TGF β -CTGF

Le TGF β est l'un des médiateurs principaux dans l'induction de la différenciation en myofibroblastes. Lors de la stimulation par le TGF β , les fibroblastes sont activés et subissent une transition phénotypique vers un phénotype de myofibroblastes. Plusieurs voies sont impliquées dans cette différenciation induit par le TGF β , notamment les voies du Smad3, FAK, JNK, TAK et PI3 kinase / Akt (Bakin, Tomlinson et al. 2000, Liu, Xu et al. 2007, Dobaczewski, Bujak et al. 2010).

Le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) est un autre inducteur puissant de la différenciation en myofibroblastes. L'expression du CTGF est activée en aval de la voie de signalisation du TGF β , et pourrait amplifier la voie du TGF β par une rétroaction positive (Mori, Kawara et al. 1999, Abreu, Ketpura et al. 2002). Il a été démontré par notre équipe que le CTGF peut induire la différenciation en myofibroblastes de façon TGF β -indépendante (Laplante, Sirois et al. 2010, Bernard, Dieudé et al. 2014). Dans une étude clinique ainsi que dans un modèle animal de transplantation rénale allogénique, il a été rapporté que la présence de haut titre de CTGF urinaire corrèle avec le développement de fibrose interstitielle (Yue, Xia et al. 2010, Metalidis, van Vuuren et al. 2013).

2.2.4.3.2 ROS

Les ROS sont des espèces chimiques oxygénées telles que les anions oxygène, les radicaux libres et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Il existe deux sources principales de production de ROS dans les cellules: les mitochondries (qui génèrent des ROS comme sous-produits de la respiration) et la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (Scherz-Shouval and Elazar 2011, Rahal, Kumar et al. 2014). Il est démontré que les NADPH oxydases sont la source principale de ROS qui favorise les processus fibrotiques. Les voies de signalisation impliquées dans la différenciation en myofibroblastes induite par les ROS ne sont pas encore complètement comprises. Il a été suggéré que les enzymes NOX induisent la différenciation en myofibroblastes par la voie MEK-ERK1/2 (Barnes and Gorin 2011).

2.2.4.3.3 Autophagie-mTORC2

La voie de l'autophagie est une sorte de réponse pro-survie au stress. En utilisant différentes approches expérimentales, des études ont démontré que l'autophagie joue un rôle important dans le processus fibrotique. Il a été démontré que l'induction d'autophagie favorise la survie des fibroblastes synoviaux (Shin, Han et al. 2010). Dans une étude clinique, l'autophagie corrèle avec la différenciation en myofibroblastes dans la muqueuse buccale (Vescarelli, Pilloni et al. 2017). Dans des modèles de fibrose hépatique, il a été démontré qu'une diminution dans l'autophagie réduit la différenciation des cellules stellaires hépatiques en myofibroblastes, conduisant à une réduction de la fibrose (Hernandez-Gea, Ghiassi-Nejad et al. 2012). Cependant, il est intéressant de noter que dans certaines approches expérimentales, il a été rapporté que l'inhibition de l'autophagie accentue plutôt la fibrose. Dans un modèle murin de cardiomyopathie, la carence en autophagie augmente en effet la fibrose interstitielle (Tannous, Zhu et al. 2008). Il a été proposé que l'autophagie dans des types cellulaires différents aurait des impacts différents sur le processus fibrotique. L'ensemble de ces études suggère donc qu'il est important d'évaluer le rôle de l'autophagie dans les différents types cellulaires.

La cible de rapamycine des mammifères (mTOR) est une sérine / thréonine kinase qui contrôle de nombreux processus cellulaires. Il existe deux sortes de mTORs qui sont structurellement et fonctionnellement distincts: le mTOR complexe 1 (mTORC1) et le mTOR complexe 2 (mTORC2). Le mTORC1 est composé par la protéine associée à la régulation de mTOR(raptor), le mammalian lethal with Sec 13 protein 8/G-protein β -protein subunit-like (mLST8 / G β L), le substrat 40 kDa de Akt / PKB (PRAS40) et la protéine DEP-domain-containing mTOR interacting (deptor). Le mTORC2 est composée par la compagnon insensible à la rapamycine de mTOR (riCTOR), la protéine 1 de mammalian stress-activated protein kinase-interacting (mSIN1), la protéine observée avec rictor1/2 (protor1/2), mLST8/G β L and deptor (Huang and Fingar 2014). L'ablation spécifique de Rictor chez les fibroblastes entraîne une diminution de la fibrose et du niveau d' α -SMA dans un modèle murin de l'obstruction urétérale unilatérale, suggérant un rôle important de mTORC2 dans la différenciation en myofibroblastes (Li, Ren et al. 2015).

En utilisant un système *in vitro* de fibroblastes, notre équipe a aussi démontré que l'autophagie pourrait activer la différenciation en myofibroblastes de façon mTORC2 dépendante (Bernard, Dieudé et al. 2014).

2.2.4.3.4 *Sénescence*

Le lien entre la sénescence cellulaire et la différenciation en myofibroblastes n'est pas entièrement élucidé, les preuves indirectes sont controversées. Il a été démontré dans un modèle murin de fermeture de plaie cutanée, que des fibroblastes sénescents apparaissent tôt au niveau de la plaie, et qu'ils accélèrent la fermeture de celle-ci en induisant la différenciation en myofibroblastes via la sécrétion du facteur de croissance dérivé des plaquettes AA (PDGF-AA) (Demaria, Ohtani et al. 2014). Les cellules stellaires hépatiques sont des péricytes/fibroblastes spécifiques du foie qui sont la source dominante des myofibroblastes hépatiques (Mederacke, Hsu et al. 2013). Les souris avec des hépatocytes Cyr61-null ont des HSC non-sénescents, ce qui entraîne une réponse fibrotique augmentée (Kim, Chen et al. 2013).

3. Impacts de la mort cellulaire sur la transplantation rénale

Dans la transplantation rénale, l'IRI est une conséquence grave et inévitable qui peut avoir un impact sur le pronostic du greffon. La reprise de fonction retardée du greffon (DGF) (l'équivalent de l'IRA) est l'une des complications fréquentes lors de transplantation rénale et elle est principalement due à la nécrose tubulaire aiguë causée par l'IRI. Outre les mécanismes physiopathologiques qui sont discutés ci-dessus, l'autoimmunité contribue également aux dommages rénaux induits par l'IRI (Ford, Adams et al. 2014).

3.1 Autoimmunité et l'IRI

Dans le contexte de transplantation, il a été rapporté que la mort cellulaire causée par l'IRI induit un environnement autoimmunitaire : 1. les insultes tissulaires causées par l'IRI entraînent la libération d'autoantigènes par des cellules apoptotiques ou nécrotiques, *e.g* la vimentine, les fragments de perlécan. La reconnaissance de ces autoantigènes par des anticorps pré-existants crée une boucle de rétroaction qui amplifie les dommages tissulaires. 3. Les PAMPs et DAMPs qui sont libérées au cours de la mort cellulaire augmentent la réponse inflammatoire, ce qui favorise la production des autoanticorps.

3.1.1 Les autoanticorps anti-vimentine

La vimentine est une protéine de filament intermédiaire trouvée dans le cytosol des cellules d'origine mésenchymateuse, incluant les leucocytes adultes, les fibroblastes et les ECs. La vimentine est exprimée à la surface des cellules et peut être sécrétée dans certaines conditions. Il a été suggéré que la vimentine sécrétée pourrait contribuer au développement de réponse autoimmunitaire (Rose 2013). Il a été démontré que les patients qui ont reçu des reins de donneurs après arrêt cardiaque (avec un temps ischémique plus long) ont des taux plus élevés d'anticorps anti-vimentine (AVA) post-transplantation, suggérant que l'IRI est un déclencheur important de la production des AVA (Mi, Carter et al. 2005). Les recherches cliniques et animales identifient l'AVA comme un facteur accélérant les rejets d'allogreffes cardiaques (Mahesh, Leong et al. 2007, Nath, Ilias Basha et al. 2010). Il existe également une corrélation entre l'AVA pré-transplantation et la fibrose rénale post-transplantation, ce qui suggère un rôle d'AVA dans la pathologie de la fibrose d'allogreffe rénale (Besarani, Cerundolo et al. 2014).

3.1.2 Les autoanticorps anti-collagène IV

Le collagène est la principale protéine structurale de la matrice extracellulaire (Di Lullo, Sweeney et al. 2002). Le collagène IV (Col IV ou Col 4) est un type de collagène qui se trouve

principalement dans la lamina basale comme les glomérules rénaux (Hudson , Tryggvason et al. 2003). La présence de hauts titres d'autoanticorps anti-collagène IV corrèle avec le développement de glomérulopathie chez des receveurs de transplantation rénale, et une augmentation concomitante des réponses immunitaires cellulaires (Angaswamy, Klein et al. 2014).

3.1.3 Les autoanticorps anti-tubuline k alpha1

La tubuline k alpha1 (KA1T) est une protéine de jonction communicante épithéliale. Il a été démontré que la production des autoanticorps anti-KA1T corrèle avec l'augmentation des cytokines pro-fibrotiques et le rejet chronique chez les patients qui ont reçu des allogreffes pulmonaires (Goers, Ramachandran et al. 2008). Cette corrélation est également observée dans la transplantation cardiaque (Nath, Tiriveedhi et al. 2011). Une étude *in vitro* suggère que le rôle des anticorps anti-KA1T dans la fibrose et le rejet chronique de transplantation pulmonaire est HIF-1 α dépendant (Tiriveedhi, Gelman et al. 2012).

3.1.4 Les autoanticorps anti-myosine

La myosine est une protéine motrice qui est responsable de la motilité à base de l'actine, via les mécanismes de contraction musculaire (Tiriveedhi, Gelman et al. 2012). Il a été démontré qu'un niveau élevé d'anticorps anti-myosine pré-transplantation cardiaque corrèle avec une diminution du taux de survie du greffon (Morgun, Shulzhenko et al. 2004). Il existe aussi une corrélation entre l'immunité anti-myosine cardiaque et la vasculopathie chronique dans la transplantation cardiaque (Kalache, Dinavahi et al. 2011).

3.1.5 Les autoanticorps anti-récepteur de type 1 de l'angiotensine

Le récepteur de type 1 de l'angiotensine (AT₁R) est un récepteur couplé à la protéine G qui est exprimé à la surface des ECs. En se liant avec l'angiotensine II, l'AT₁R participe à la régulation de l'homéostasie osmotique et de la pression artérielle (Seva Pessoa, van der Lubbe

et al. 2013). Il a été rapporté que les autoanticorps anti-AT₁R ont un rôle agoniste sur l'AT₁R, résultant en des rejets vasculaires et une hypertension maligne (Dragun, Müller et al. 2005). Une autre étude animale a démontré que les autoanticorps anti-AT₁R peuvent induire la contraction des vaisseaux rénaux, aggravant l'IRA induite par l'IRI (Lukitsch, Kehr et al. 2012). Il a aussi été démontré que la présence d'autoanticorps anti-AT₁R pré-transplantation chez 47% des patients ayant subi une transplantation rénale corrèle avec le développement de rejets aigus et la perte du greffon (Giral, Foucher et al. 2013). Une autre étude a montré également une corrélation entre la présence d'autoanticorps anti-AT₁R et le rejet médié par les anticorps (AMR) (In, Park et al. 2014).

3.1.6 Les autoanticorps anti-LG3

Le perlécan est un grand protéoglycane de sulfate d'héparane qui se trouve dans la paroi vasculaire. L'endorépelline est le domaine C-terminal de perlécan, qui contient trois domaines globulaires (LG) semblable à la laminine. Les ECs apoptotiques libèrent la cathepsine-L, qui clive l'endorépellin, libérant ainsi le domaine LG3 du fragment C-terminal du perlécan (Cailhier, Sirois et al. 2008). Notre équipe a mis en évidence que la présence de niveaux élevés d'anticorps anti-LG3 pré-transplantation et post-transplantation chez les receveurs de greffe rénale corrèle avec le développement de rejet vasculaire aigu (Cardinal, Dieude et al. 2013). En utilisant un modèle murin de transplantation aortique allogénique, il a été démontré que le transfert passif d'anticorps anti-LG3 accélère l'inflammation vasculaire et le dépôt du complément (Cardinal, Dieude et al. 2013).

Problématique et hypothèse

Problématique

L'IRI est l'une des causes les plus fréquentes d'IRA et un facteur de risque important d'IRC. Il est maintenant généralement accepté que les insultes tubulaires et les insultes microvasculaires sont deux caractéristiques importantes de l'IRA induite par l'IRI. La mort cellulaire programmée joue un rôle prédominant dans les dommages des cellules épithéliales tubulaires et les dommages endothéliaux. L'activation de la caspase-3, une étape cruciale dans l'apoptose, a été rapportée dans les cellules épithéliales tubulaires et les ECs dans le contexte de l'IRA. L'importance relative de l'activation de la caspase-3 dans les insultes tubulaire et microvasculaire causées par l'IRI et les effets fonctionnels des dommages de ces compartiments restent mal définis.

Les dommages tubulaires et microvasculaires libèrent des signaux qui déclenchent des réponses inflammatoires. Les réponses inflammatoires amplifient les dommages tissulaires, créant une boucle de rétroaction. Il a été démontré que, en présence d'auto-anticorps, la libération des auto-antigènes par du tissu endommagé par l'IRI entraîne une aggravation des dommages tissulaires. Puisque les anti-LG3 sont des autoanticorps, il est permis de se demander si l'IRI peut créer des conditions permissives pour les anti-LG3, leur permettant d'interagir avec leurs cibles antigéniques et d'augmenter la dysfonction rénale ?

La fibrose interstitielle est la caractéristique anatomopathologique clé dans la phase chronique de l'IRA. Les myofibroblastes sont les cellules effectrices de la fibrose. La différenciation de fibroblastes en myofibroblastes est la source principale des myofibroblastes. Il a été démontré par différentes études que les ROS, l'autophagie et la sénescence participent tous dans la fibrose. Cependant le rôle de ceux-ci dans la différenciation de fibroblastes en myofibroblastes est encore inconnu.

Hypothèse

1. L'apoptose est la mort cellulaire prédominante dans le contexte de l'IRA causée par l'IRI. La déficience en caspase-3 aurait des effets protecteurs contre l'IRI.
2. L'IRI peut créer des conditions permissives pour les anti-LG3 en favorisant la libération du LG3, entraînant les conditions favorisant l'activation du complément, ce qui entraîne une aggravation dans l'inflammation microvasculaire et la dysfonction rénale post-IRI.
3. Dans la phase chronique de l'IRI où il y a une raréfaction microvasculaire, la déprivation des facteurs de croissance induit la production des ROS, qui induit l'autophagie et la sénescence, ces dernières activent la différenciation myofibroblastique.

Résultats expérimentaux

Article 1.

Caspase-3 is a pivotal regulator of microvascular rarefaction and renal fibrosis after ischemia-reperfusion injury

Auteurs: Bing Yang[#], Shanshan Lan[#], Mélanie Dieudé, Julie Turgeon, Shijie Qi, Lakshman Gunaratnam, Natalie Patey *et Marie-Josée Hébert *

Les co-premiers auteurs

* Les auteurs correspondants

Article sous révision dans Journal of American Society of Nephrology.

Bing Yang et Shanshan Lan ont contribué de manière égale dans cet article, elles ont élaboré les hypothèses de travail avec Marie-Josée Hébert et Natalie Patey. Elles ont planifié et réalisé les expériences de cet article. Elles ont analysé et interprété les résultats générés. Enfin, elles ont participé à la rédaction du manuscrit avec Marie-Josée Hébert et Natalie Patey.

Mélanie Dieudé a participé dans l'analyse des résultats et a également participé à la correction du manuscrit.

Julie Turgeon a participé dans la gestion des souris expérimentales

Shijie Qi nous a guidé dans la modélisation de l'IRI

Lakshman Gunaratnam a réalisé la coloration immunohistochimique de KIM-1.

Marie-Josée Hébert et Natalie Patey ont dirigé et supervisé l'ensemble de ce travail, de la génération des hypothèses à la rédaction du manuscrit.

Abstract

Ischemia-reperfusion injury (IRI) is a major risk factor for chronic renal failure. Here, we characterize the different modes of programmed cell death in the tubular and microvascular compartments during the various stages of IRI-induced acute kidney injury (AKI). Unilateral renal artery clamping for 30 minutes with contralateral nephrectomy was performed in wild-type mice (C57BL/6) or caspase-3^{-/-} mice. In the early stage of AKI, caspase-3^{-/-} mice showed aggravated tubular epithelial cell (TEC) injury and enhanced TEC necroptosis compared with the wild type. In contrast, damage to peritubular capillaries and microvascular congestion were reduced in caspase-3^{-/-} mice both in the early and late stages. In the long term, microvascular rarefaction was reduced in caspase-3^{-/-}. This was associated with reduced interstitial α -smooth muscle actin expression, and collagen deposition. In the long-term, preservation of the peritubular microvasculature in caspase-3^{-/-} mice also led to reduced tubular ischemia and lower tubular injury scores. Collectively, these results highlight different modes of regulated cell death after IRI over time in tubular and microvascular compartments. They establish the pivotal importance of microvascular integrity in preventing renal fibrosis and identify caspase-3 as a novel and pivotal regulator of microvascular rarefaction and renal fibrosis.

Introduction:

Acute kidney injury (AKI) is a major risk factor for progressive renal insufficiency. More than 20% of hospitalized adults worldwide experience some level of AKI(1-3) prompted most commonly by ischemia-reperfusion injury (IRI) and sepsis.(4) The severity and number of AKI episodes in various patient cohorts have been shown to predict progressive long-term renal dysfunction.(3, 5) This association holds true whether or not patients presented renal conditions prior to AKI.(6) Also, in renal transplant patients, AKI at the time of transplantation portends reduced renal allograft survival, independently from the risk of rejection.(7)

Programmed death of tubular epithelial cells is a classical hallmark of AKI.(4) Apoptotic renal tubular cells, as assessed either through TUNEL staining, immunohistochemistry for the effector caspase-3, or electron microscopy, have been highlighted in animal models of AKI and human renal biopsy samples.(8-12) The presence of renal tubular cells with a morphology suggestive of necrosis is also a classical finding in AKI. Necrotic tubular cells present with cell swelling, loss of cell membrane integrity, mitochondrial rupture, and externalization of intracellular content into the extracellular environment.(13) Although both apoptotic and necrotic tubular epithelial cells are present in the acute phase of AKI, mounting evidence suggests a predominant role for programmed necrosis, or necroptosis, in acute renal dysfunction. Receptor-interacting serine/threonine-protein kinases 1 and 3 (RIPK1 and RIPK3) and mixed lineage kinase domain–like protein (MLKL) regulate necroptosis in various cell types, including renal tubular cells.(14) Inhibition of RIPK3 activation, either through the use of the RIPK1 inhibitor necrostatin or in mice genetically deficient for RIPK3, reduces early renal tubular injury and renal dysfunction in models of IRI or cisplatin-induced AKI.(15, 16) In murine models of IRI followed by renal transplantation, RIPK3^{-/-} kidney allografts showed improved renal function and longer survival post transplantation.(17)

Although tubular epithelial cell injury has been recognized for decades as an important characteristic of AKI, renal microvascular injury is now appreciated as an important contributor to renal dysfunction.(4, 18-20) In the early phase of AKI, endothelial activation, dysfunction, and cell apoptosis promote inflammatory leukocyte trafficking, complement activation, and thrombosis. The reduced blood flow and vascular congestion that ensue

contribute to the extension phase of AKI, producing further epithelial injury. In the long term, microvascular involution leads to chronic hypoxia, which translates into increased expression of (hypoxia inducible factor 1 α) HIF-1 α within tubular epithelial cells, renal fibrosis, and progressive loss of renal function.(4, 21-23) In transplanted kidneys, the magnitude of microvascular involution during the first 3 months following transplantation is a major predictor of long-term renal allograft function.(7)

The molecular pathways and programs that control renal microvascular cell death during the various stages of AKI remain debated. Upregulation of caspase-3, the main effector of apoptosis, has been described in both renal tubular and microvascular endothelial cells in the early stages of IRI-induced AKI.(21, 24) Caspase-3 inactivation with siRNAs prior to IRI yielded contradictory results in different animal models, with both cases of ameliorated and deteriorated renal dysfunction observed following IRI.(24-26) In addition, the relative importance of caspase-3 in renal tubular and microvascular cell injury throughout the early, extension, and pro-fibrotic phases of AKI remains to be characterized.

Here, we used caspase-3^{-/-} mice to delineate the mechanisms of tubular and microvascular injury throughout the various phases of IRI-induced AKI. We report that early tubular injury and renal dysfunction are increased in caspase-3^{-/-} mice, whereas microvascular integrity is ameliorated throughout the various phases. In the long term, caspase-3^{-/-} mice show reduced microvascular drop-out, decreased tubular ischemia, and reduced interstitial fibrosis, establishing a major role for caspase-3 activation in microvascular rarefaction and renal fibrosis.

Results

Caspase-3 deficiency aggravates early tubular epithelial injury following ischemia-reperfusion.

Renal artery clamping for 30 minutes followed by contralateral nephrectomy is a classical model of IRI. Unexpectedly, caspase-3^{-/-} mice showed accentuated renal dysfunction following renal artery clamping (Figure 1). Creatinine levels were significantly higher in caspase-3^{-/-} mice at 1 day post IRI, and rapidly returned to levels comparable to wild-type mice thereafter (Figure 1A). However, renal tubular injury scores were significantly higher at 1, 2, and 7 days post IRI in caspase-3^{-/-} mice (Figure 1B, 1C), suggesting rapid and sustained accentuation of tubular injury. Urinary cystatin C and tubular KIM-1 immunostaining, both assessed 1 day post IRI, were also increased in caspase-3^{-/-} mice, providing further evidence of enhanced epithelial injury in the absence of caspase-3 (Figure 1D, 1E). Furthermore, influx of CD45⁺ leukocytes was also higher in caspase-3^{-/-} mice at 1 day post IRI, demonstrating enhanced inflammation in association with increased tubular injury (Figure S1). Interestingly, later time points were not different between caspase-3^{-/-} mice and wild-type controls (data not shown).

We then investigated the morphological characteristics of tubular cell death at day 1 post IRI. Light microscopy revealed severe features of acute tubular necrosis in caspase-3^{-/-} mice, particularly renal tubule denudation, tubular dilation caused by tubular cell flattening, and extensive cast formation (Figure 2A). Renal tubular epithelial cell swelling and sloughing were common, suggesting extensive necrotic cell death, whereas nuclear condensation typical of apoptosis was typically absent in caspase-3^{-/-} mice (Figure 2A). Electron microscopy confirmed these findings and highlighted the presence of severely damaged tubules containing remnants of tubular epithelial cells detached from the basement membrane in caspase-3^{-/-} mice at 1 day post IRI. Tubular epithelial cells were swollen with degenerative damages in mitochondria, showing intense vacuolization and membrane rupture that are both consistent with necrosis (Figure 2B). In caspase-3^{-/-} mice, there were few, if any, tubular epithelial cells showing ultrastructural features of apoptotic cell death, such as chromatin condensation and fragmentation. In wild-type mice, tubular epithelial cell injury was less prominent and characterized mainly by loss of brush borders and microvilli and basolateral infoldings in the

proximal tubules (Figure 2B). Collectively, these findings suggest enhanced necrosis in tubular epithelial cells of caspase-3^{-/-} mice. To evaluate whether markers of necroptosis, a genetically programmed form of necrosis, was enhanced in caspase-3^{-/-} mice, we performed RIPK3 immunostaining in kidney sections at 1 day post IRI. Indeed, RIPK3 immunostaining was found to be enhanced in damaged tubules, consistent with accentuation of tubular necroptosis in caspase-3^{-/-} mice following IRI (Figure 2C).

Caspase-3 deficiency attenuates microvascular injury and preserves microvascular integrity

We then evaluated whether microvascular endothelial cells were similarly affected by caspase-3 deficiency. Intriguingly, rouleaux formation, a read-out of microvascular congestion, tended to be attenuated in caspase-3^{-/-} mice at days 1 and 2, but was significantly reduced at day 3 (Figure 3A). CD34, a marker of endothelial progenitor cells,(27) was significantly higher 1 day post IRI in glomerulus and peritubular capillaries in caspase-3^{-/-} mice compared to wild-type mice (Figure S2). As evidence of better preservation of microvascular integrity in caspase-3^{-/-} mice during the extension phase of AKI, staining of mouse endothelial cell antigen (MECA-32), a marker of microvascular endothelial cells,(28) was found to be significantly increased within peritubular capillaries in caspase-3^{-/-} mice compared to wild-type mice at 3 days post IRI (Figure 3B). Electron microscopy results were also consistent with this observation. Wild-type mice showed widespread signs of peritubular microvascular damage with detachment from the basement membrane, reduced endothelial fenestration, and irregularities in the endothelium and basement membrane at 1 day post IRI (Figure 3C). In contrast, these changes were uncommon in caspase-3^{-/-} mice, where fenestration of peritubular endothelial cells was preserved (Figure 3C). Collectively, these results suggest that caspase-3 deficiency aggravates tubular injury while concomitantly preserving the integrity of the microvasculature.

Caspase-3 deficiency attenuates activation of fibrogenic pathways post IRI

Previously, we showed that caspase-3 activation within apoptotic endothelial cells leads to the release of the fibrogenic mediator connective tissue growth factor (CTGF).(29) Higher circulating levels of CTGF predict renal fibrosis and reduced renal allograft function in renal transplant patients.(30, 31) Consistent with reduced vascular cell damage in caspase-3^{-/-} mice,

we found significantly decreased circulating CTGF levels in caspase-3^{-/-} mice at day 2 post IRI compared with wild-type controls (Figure 4A). Microvascular injury and dysfunction is known to lead to increased α -smooth muscle actin (α -SMA) expression, denoting pericyte activation.(32) Although peritubular capillaries showed α -SMA upregulation in wild-type mice at day 3 post IRI, caspase-3^{-/-} mice showed markedly reduced peritubular α -SMA staining (Figure 4B). Collectively, these results confirm better preservation of microvascular integrity in the early and extension phases of AKI in caspase-3^{-/-} mice.

During the extension and repair phases of AKI, microvascular rarefaction plays a key role in renal fibrogenesis, at least in part through induction of renal tubular ischemia associated with HIF-1 α overexpression and activation of downstream fibrogenic pathways.(4, 33, 34) The molecular mechanisms controlling microvascular rarefaction remain ill-defined. We therefore evaluated the impact of caspase-3 invalidation on microvascular rarefaction and fibrogenesis. Collagen deposition, as evaluated with Sirius Red staining, tended to be lower in caspase-3^{-/-} mice at day 7 post IRI compared with wild-type mice. In the latter, intense Sirius Red staining was present within peritubular spaces, whereas glomerular and macrovascular compartments were largely negative (Figure 4C).

We then evaluated whether the positive impact of caspase-3 invalidation on preservation of microvascular integrity was sustained in the long term. Peritubular microvascular density, as assessed with MECA-32 staining, was significantly higher at 21 days post IRI in caspase-3^{-/-} mice (Figure 5). Electron microscopy also highlighted preservation of microvascular integrity in caspase-3^{-/-} mice (Figure 6A). In wild-type mice, peritubular capillaries showed characteristic apoptotic ultrastructural changes within peritubular capillaries, such as chromatin condensation and formation of apoptotic bodies (Figure 6B,6C). These changes were absent in caspase-3^{-/-} mice. In addition, α -SMA staining within peritubular capillaries was significantly reduced in caspase-3^{-/-} mice, consistent with better microvascular homeostasis and reduced fibrogenesis (Figure 5B). Sirius Red staining was also significantly reduced within peritubular capillaries in caspase-3^{-/-} mice, indicating reduced collagen deposition (Figure 7). Similarly, Glomerular Sirius Red staining was also significantly reduced in caspase-3^{-/-} mice compared with wild-type controls. Positivity was characteristically periglomerular, and glomerulosclerosis was uncommon in both wild-type and caspase-3^{-/-} mice. Collectively, these results demonstrate a sustained advantage for caspase-3^{-/-} mice in

preserving microvascular integrity and reducing fibrosis after IRI, and highlight a novel role for caspase-3 in the regulation of microvascular rarefaction.

Microvascular drop-out can lead to a state of tubular ischemia characterized by HIF-1 α overexpression, which in turn favors tubular atrophy and renal dysfunction.(33) We found that expression of tubular HIF-1 α was significantly reduced in caspase-3^{-/-} mice at 21 days post IRI (Figure 8A). Significantly lower tubular injury scores were observed in caspase-3^{-/-} mice at 21 days, suggesting that preservation of microvascular integrity in caspase-3–deficient mice likely benefits tubular homeostasis in the long term (Figure 8B). Electron microscopy was also consistent with better preservation of tubular homeostasis in caspase-3^{-/-} mice at 21 days. Renal tubular cells showed evidence of apoptotic morphology in wild-type mice but not in caspase-3^{-/-} mice, whereas necrotic morphology was uncommon in both wild-type and caspase-3^{-/-} at 21 days post IRI. Although it did not reach statistical significance, serum creatinine tended to be lower at 21 days post IRI in caspase-3^{-/-} mice (Figure 8C), which is consistent with histological findings, but also highlights the lack of sensitivity of creatinine as a biomarker of renal fibrosis. Collectively, these results demonstrate the importance of caspase-3–dependent pathways in controlling late tubular damage following IRI.

Discussion

IRI is one of the most common causes of AKI and a major risk factor for chronic renal failure. In this study, we identified caspase-3 as a central regulator of peritubular capillary injury and rarefaction post IRI.

Intriguingly, our results showed a deleterious impact of caspase-3 on renal function and tubular epithelial cell injury in the early stage of AKI. Caspase-3^{-/-} mice displayed enhanced tubular injury scores, increased urinary KIM-1 levels, and deteriorated serum creatinine at 1 day post IRI. Electron microscopy confirmed the necrotic tubular cell death phenotype, whereas increased RIPK3 staining demonstrated an increased propensity to necroptosis in caspase-3^{-/-} mice. These results are consistent with mounting evidence highlighting a major role for necroptosis as the predominant type of renal tubular demise in the early stage of AKI.(13, 14, 35, 36)

However, the present results are in stark contrast with a previous report by Zhang et al describing a protective role for small interfering RNA (siRNA) targeting caspase-3 when infused intravenously prior to renal IRI.(24) One major difference between the two studies is the method of caspase-3 invalidation. Intravenous infusion of caspase-3 siRNA prior to IRI could lead to predominantly vascular renal caspase-3 silencing. The relative levels of caspase-3 silencing in renal tubules compared with the microvasculature were not addressed in the study by Zhang. Nonetheless, this prompted us to evaluate the relative contributions of caspase-3 in both cellular compartments in our system.

In the early stage of AKI, caspase-3^{-/-} mice showed enhanced tubular injury, yet reduced microvascular damage. Staining for CD34, a marker of endothelial progenitor cells, and the endothelial marker MECA-32 within peritubular capillaries was enhanced in caspase-3^{-/-} mice in the early and extension stages of AKI. Rouleaux formation was reduced in caspase-3^{-/-} mice, demonstrating reduced microvascular congestion. Electron microscopy highlighted better preservation of endothelial ultrastructure within peritubular capillaries. Collectively, our results and the work of others highlight different predominant modes of regulated cell death in renal tubules compared with peritubular capillaries after IRI. Whereas RIPK1 and RIPK3 have been shown to play a predominant role in regulated epithelial cell death post IRI, our results show that microvascular endothelial cell injury is under the control of caspase-3. We also

demonstrate that necroptosis does not represent a major default death pathway for the renal microvasculature, since the absence of caspase-3 does not enhance other regulated modes of cell death within this compartment after IRI.

Another important finding that stems from this study is the different impact of tubular versus endothelial cell death on progressive renal dysfunction. Progression from AKI to chronic kidney disease (CKD) is a common clinical event. Large cohort studies have highlighted the robust predictive impact of AKI on risk of chronic renal failure.(6) Although the precise cellular mechanisms explaining the major role of AKI in progressive renal failure are still debated, most clinical studies have identified diabetes, hypertension, severity of AKI, and preexisting CKD as predictors of CKD. Notably, these predictors are all major cardiovascular risk factors, suggesting a relationship between vascular vulnerability and progressive renal dysfunction post IRI. The present results now provide molecular and cellular insights into the pathways controlling microvascular injury and the major role of caspase-3 dependent microvascular injury in long-term renal dysfunction after IRI. The presence of increased tubular damage concomitant with microvascular protection early after IRI in caspase-3^{-/-} mice allowed us to discriminate the relative importance of both cell compartments in progressive renal dysfunction. Early accentuation of renal tubular injury did not portend negative long-term renal outcomes in caspase-3^{-/-} mice. Preservation of microvascular integrity was present both in the early and late phases of AKI in caspase-3^{-/-} mice. This translated into reduced levels of fibrogenic markers, such as circulating CTGF levels, renal α -SMA expression, and collagen deposition. These results are in keeping with recent elegant studies demonstrating a pivotal role for peritubular capillary damage in progressive renal fibrosis and dysfunction.(28, 37) In addition, our results provide novel insights into the mechanisms controlling microvascular drop-out, and identify caspase-3 as a novel and pivotal upstream regulator of microvascular rarefaction and renal fibrogenesis after IRI.

Finally, the present results also demonstrate that various modes of programmed cell death contribute to tubular injury during the different stages of AKI. Although caspase-3^{-/-} mice showed higher levels of necroptotic epithelial cell death in the early AKI stage, this propensity disappeared over time. In contrast, tubular injury scores were reduced in caspase-3^{-/-} mice 3 weeks after IRI. Tubular ischemia, as assessed by HIF-1 α expression, was also reduced in

caspase-3^{-/-} mice in the long term in association with better preservation of peritubular capillaries (Figure 9).

Collectively, our results demonstrate a predominant role for microvascular versus epithelial injury in regulating the development of fibrosis and progressive renal dysfunction following renal IRI. We also identify caspase-3 as a pivotal regulator of renal microvascular integrity, and reaffirm the central role of peritubular capillaries in controlling renal fibrosis and progressive dysfunction.

Materials and Methods

Animals and Surgical Procedures:

6-to-8-week-old female C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA), and kept in 12-hour light/dark cycles, with normal food provided ad libitum. IRI was performed as described previously.(38) Briefly, 2% isoflurane inhalation was used as anesthesia, and mice were then fixed on a heating blanket (37 °C). After opening the abdominal cavity via midline incision, a micro-aneurysm clip was placed on the left renal pedicle. Complete ischemia was indicated by color change of the kidney from red to dark purple. After 30 minutes, the micro-aneurysm clip was released, and the right kidney was removed. Mice were sacrificed at day 1, 2, 3, 7, or 21 post surgery; the left kidneys, sera, and urine were collected.

Biochemical Evaluation of Renal Function

Serum Creatinine:

Serum creatinine levels were determined using Vitro CREA Slides and Vitro Chemistry Products (Vitro 250/350 Chemistry System; Ortho Clinical Diagnostics; Raritan, NJ, USA).

Histopathological Examination

Tubular Injury Score:

Tubular injury score was estimated in hematoxylin and eosin (H&E)-stained renal tissue, as described previously.(39) Renal tubular damage was graded on six levels based on the loss of brush border, tubular dilation, cast formation, tubular necrosis, and neutrophil infiltration. Ten high-power fields were chosen randomly, and each field was scored from 0 to 5 (0: normal; 1: mild injury, involvement of 0%-10%; 2: moderate injury, involvement of 11%-25%; 3: severe injury, involvement of 26%-49%; 4: high severe injury, involvement of 50%-75%; 5: extensive injury, involvement of >75%). All assessments were done by two investigators blinded to experimental conditions.

Peritubular Capillary Vascular Congestion:

On H&E-stained sections, numbers of aggregated erythrocytes inside peritubular capillaries were counted in ten randomly chosen high-power fields by two investigators blinded to experimental conditions.

Immunohistochemistry

Ischemic kidneys were retrieved at days 1, 2, 3, 7, and 21 post surgery, fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and subsequently cut into 4- μ m slices. Immunohistochemistry staining was performed on paraffin-embedded slices as described previously.(40) The antibodies used in this study were KIM-1 (1/8; AF1817; R&D systems; Minneapolis, USA), RIPK3 (1/500; ab152130; Abcam; Toronto, Canada), MECA-32 (1/20; 120501; Biolegend; San Diego, USA), HIF-1 α (1/500; ab2185; Abcam; Toronto, Canada), α -SMA (1/500; clone 1A4; Dako), Sirius Red, and caspase-3 (1/50; CP229B; Biocare Medical; Pacheco, USA).

Sirius Red Staining:

Sirius Red staining was carried out using the Picro Sirius Red Stain Kit (Abcam; Toronto, Canada) according to the manufacturer's instructions.

Images of stained slices were captured using the Leica DM4000B microscope (Leica Microsystems; Germany). Analyses of α -SMA and Sirius Red were performed using the Visiomorph software (Hoersholm, Denmark).

Electron Microscopy Examination

Renal tissue was cut into small pieces that were fixed with 3% glutaraldehyde, post-fixed with 1% osmium tetroxide, and incubated consecutively in an ascending acetone series (50%, 70%, and 90%), with a final incubation in 100% ethanol for hydration. After incubation in acetone, the tissue was embedded in Epon. One-nm sections were cut and stained using uranyl acetate and lead citrate. Electron microscopy images were taken with the Phillips EM208 electron microscope.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Serum levels of connective tissue growth factor (CTGF) and urinary levels of cystatin C were determined using the following commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

kits according to the manufacturer's instructions: mouse CTGF (Elabscience; E-EL-M0340; Bethesda, USA), and mouse Cystatin C (Abcam; ab201280; Toronto, Canada).

Statistics

All data were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were conducted with the unpaired Student's *t*-test using Prism 5 (GraphPad Software Inc.), where $P < 0.05$ was considered significant for all tests.

Study approval

All the animal experimental protocols were reviewed and approved by the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA).

Author contributions:

BY, SL and MJH designed experiments, BY, SL, MJH and NP analyzed the data, and wrote the manuscript. BY, SL and JT performed experiments. MD participated in analyzing the data and the preparation of the manuscript. LG performed KIM-1 immunohistochemical staining.

Acknowledgments :

This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-123436 and PJT-148884), B.Y. is a recipient of a research fellowship from the University of Montreal Nephrology Research Consortium and a CNTRP student. SL is a recipient of Merit scholarship for foreign students from Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) and CNTRP student. M.J.H. is the holder of the Shire Chair in Nephrology, Transplantation and Renal Regeneration of l'Université de Montréal. We thank the J.-L. Levesque Foundation for renewed support. We thank the CHUM Research Centre's cytometry, cell imaging and molecular pathology core facility for their technical help, and Ms. Josée-Marie Dubé for helping taking electron microscopy photos.

References:

1. Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, Abulfaraj M, Alqahtani F, Koulouridis I, et al. World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(9):1482-93. doi: 10.2215/CJN.00710113. Epub 2013 Jun 6.
2. Bedford M, Farmer C, Levin A, Ali T, and Stevens P. Acute kidney injury and CKD: chicken or egg? *Am J Kidney Dis*. 2012;59(4):485-91. doi: 10.1053/j.ajkd.2011.09.010.
3. Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, Eggers PW, Kimmel PL, Molitoris BA, et al. Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(1):223-8. doi: 10.1681/ASN.2007080837. Epub 2008 Nov 19.
4. Molitoris BA. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis. *J Clin Invest*. 2014;124(6):2355-63. doi: 10.1172/JCI72269. Epub 2014 Jun 2.
5. Amdur RL, Chawla LS, Amodeo S, Kimmel PL, and Palant CE. Outcomes following diagnosis of acute renal failure in U.S. veterans: focus on acute tubular necrosis. *Kidney Int*. 2009;76(10):1089-97. doi: 10.38/ki.2009.332. Epub Sep 9.
6. Lo LJ, Go AS, Chertow GM, McCulloch CE, Fan D, Ordonez JD, et al. Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2009;76(8):893-9. doi: 10.1038/ki.2009.289. Epub Jul 29.
7. Steegh FM, Gelens MA, Nieman FH, van Hooff JP, Cleutjens JP, van Suylen RJ, et al. Early loss of peritubular capillaries after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(6):1024-9. doi: 10.681/ASN.2010050531. Epub 2011 May 12.
8. Nogae S, Miyazaki M, Kobayashi N, Saito T, Abe K, Saito H, et al. Induction of apoptosis in ischemia-reperfusion model of mouse kidney: possible involvement of Fas. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(4):620-31.
9. Toronyi E, Lord R, Bowen ID, Perner F, and Szende B. Renal tubular cell necrosis and apoptosis in transplanted kidneys. *Cell Biol Int*. 2001;25(3):267-70.
10. Jaffe R, Ariel I, Beerl R, Paltiel O, Hiss Y, Rosen S, et al. Frequent apoptosis in human kidneys after acute renal hypoperfusion. *Exp Nephrol*. 1997;5(5):399-403.
11. Havasi A, and Borkan SC. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney Int*. 2011;80(1):29-40. doi: 10.1038/ki.2011.120. Epub May 11.
12. Kishino M, Yukawa K, Hoshino K, Kimura A, Shirasawa N, Otani H, et al. Deletion of

- the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates tubular cell apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(7):1826-34.
13. Kers J, Leemans JC, and Linkermann A. An Overview of Pathways of Regulated Necrosis in Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol*. 2016;36(3):139-52. doi: 10.1016/j.semnephrol.2016.03.002.
 14. Linkermann A, Chen G, Dong G, Kunzendorf U, Krautwald S, and Dong Z. Regulated cell death in AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(12):2689-701.
 15. Linkermann A, Brasen JH, Himmerkus N, Liu S, Huber TB, Kunzendorf U, et al. Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int*. 2012;81(8):751-61. doi: 10.1038/ki.2011.450. Epub 2 Jan 11.
 16. Xu Y, Ma H, Shao J, Wu J, Zhou L, Zhang Z, et al. A Role for Tubular Necroptosis in Cisplatin-Induced AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(11):2647-58. doi: 10.1681/ASN.2014080741. Epub 2015 Mar 18.
 17. Lau A, Wang S, Jiang J, Haig A, Pavlosky A, Linkermann A, et al. RIPK3-mediated necroptosis promotes donor kidney inflammatory injury and reduces allograft survival. *Am J Transplant*. 2013;13(11):2805-18. doi: 10.1111/ajt.12447. Epub 2013 Sep 18.
 18. Sharfuddin AA, and Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(4):189-200. doi: 10.1038/nrneph.2011.16. Epub Mar 1.
 19. Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int*. 2007;72(2):151-6. Epub 2007 May 2.
 20. Basile DP, Friedrich JL, Spahic J, Knipe N, Mang H, Leonard EC, et al. Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;300(3):F721-33. doi: 10.1152/ajprenal.00546.2010. Epub 2010 Dec 1.
 21. Horbelt M, Lee SY, Mang HE, Knipe NL, Sado Y, Kribben A, et al. Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293(3):F688-95. Epub 2007 Jul 11.
 22. Basile DP, Donohoe DL, Roethe K, and Mattson DL. Chronic renal hypoxia after acute ischemic injury: effects of L-arginine on hypoxia and secondary damage. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284(2):F338-48. Epub 2002 Oct 1.

23. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, and Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;281(5):F887-99.
24. Zhang X, Zheng X, Sun H, Feng B, Chen G, Vladau C, et al. Prevention of renal ischemic injury by silencing the expression of renal caspase 3 and caspase 8. *Transplantation*. 2006;82(12):1728-32.
25. Yang C, Jia Y, Zhao T, Xue Y, Zhao Z, Zhang J, et al. Naked caspase 3 small interfering RNA is effective in cold preservation but not in autotransplantation of porcine kidneys. *J Surg Res*. 2013;181(2):342-54. doi: 10.1016/j.jss.2012.07.015. Epub Jul 26.
26. Yang C, Zhao T, Zhao Z, Jia Y, Li L, Zhang Y, et al. Serum-stabilized naked caspase-3 siRNA protects autotransplant kidneys in a porcine model. *Mol Ther*. 2014;22(10):1817-28. doi: 10.1038/mt.2014.111. Epub Jun 16.
27. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*. 1990;75(12):2417-26.
28. Babickova J, Klinkhammer BM, Buhl EM, Djudjaj S, Hoss M, Heymann F, et al. Regardless of etiology, progressive renal disease causes ultrastructural and functional alterations of peritubular capillaries. *Kidney Int*. 2017;91(1):70-85. doi: 10.1016/j.kint.2016.07.038. Epub Sep 24.
29. Laplante P, Sirois I, Raymond MA, Kokta V, Beliveau A, Prat A, et al. Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis. *Cell Death Differ*. 2010;17(2):291-303. doi: 10.1038/cdd.2009.124. Epub Sep 4.
30. Cheng O, Thuillier R, Sampson E, Schultz G, Ruiz P, Zhang X, et al. Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis. *Am J Transplant*. 2006;6(10):2292-306. Epub 006 Aug 4.
31. Mannon RB, and Fairchild R. Allograft fibrosis--unmasking the players at the dance. *Am J Transplant*. 2010;10(2):201-2.
32. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, et al. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney

- fibrosis. *Am J Pathol.* 2010;176(1):85-97. doi: 10.2353/ajpath.010.090517. Epub 2009 Dec 11.
33. Kapitsinou PP, Sano H, Michael M, Kobayashi H, Davidoff O, Bian A, et al. Endothelial HIF-2 mediates protection and recovery from ischemic kidney injury. *J Clin Invest.* 2014;124(6):2396-409. doi: 10.1172/JCI69073. Epub 2014 May 1.
 34. Dagher PC, Hato T, Mang HE, Plotkin Z, Richardson QV, Massad M, et al. Inhibition of Toll-Like Receptor 4 Signaling Mitigates Microvascular Loss but Not Fibrosis in a Model of Ischemic Acute Kidney Injury. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5).(pii):E647. doi: 10.3390/ijms17050647.
 35. Linkermann A, Brasen JH, Darding M, Jin MK, Sanz AB, Heller JO, et al. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(29):12024-9. doi: 10.1073/pnas.1305538110. Epub 2013 Jul 1.
 36. Linkermann A. Nonapoptotic cell death in acute kidney injury and transplantation. *Kidney Int.* 2016;89(1):46-57. doi: 10.1016/j.kint.2015.10.008.
 37. Ehling J, Babickova J, Gremse F, Klinkhammer BM, Baetke S, Knuechel R, et al. Quantitative Micro-Computed Tomography Imaging of Vascular Dysfunction in Progressive Kidney Diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(2):520-32. doi: 10.1681/ASN.2015020204. Epub 2015 Jul 20.
 38. Wei Q, and Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303(11):F1487-94. doi: 10.152/ajprenal.00352.2012. Epub 2012 Sep 19.
 39. Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJ, Kirschning CJ, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2894-903.
 40. Eitner F, Ostendorf T, Kretzler M, Cohen CD, Eriksson U, Grone HJ, et al. PDGF-C expression in the developing and normal adult human kidney and in glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(5):1145-53.

Figure legends:

Figure 1: Caspase-3 deficiency aggravates IRI-induced tubular injury. A) Serum creatinine levels in wild-type and caspase-3^{-/-} mice at time = 0 (N ≥ 2), 1 day post IRI (N ≥ 7), 2 days post IRI (N ≥ 8), 3 days post IRI (N ≥ 6), and 7 days post IRI (N = 5). B) Representative hematoxylin and eosin (H&E)-stained murine renal cortical sections post IRI (N ≥ 5 per group; magnification 200X). C) Mean tubular injury scores of ten randomly chosen high-power fields (magnification 200X) in mice kidney sections post IRI. D) Urinary levels of cystatin C in wild-type and caspase-3^{-/-} mice that underwent IRI and were sacrificed at 1 day post IRI (N ≥ 5 per group). E) Left panels: representative KIM-1 immunohistochemistry in cortical kidney sections from wild-type and caspase-3^{-/-} mice that underwent IRI and were sacrificed 1 day post IRI (N ≥ 7; magnification 200X). Right panel: quantification of KIM-1 immunohistochemistry-stained murine renal cortical sections at 1 day post IRI. All error bars = 50 μm. Values are mean + SEM. *P < 0.05, compared between WT and KO at the same time-point. Statistical analyses were performed using the unpaired Student's t-test.

Figure 2: Caspase-3 deficiency increases IRI-induced necroptosis in tubular cells. A) Representative H&E-stained cortical kidney sections from wild-type (left panel) and caspase-3^{-/-} (right panel) mice that underwent IRI and were sacrificed 1 day post IRI (N ≥ 7 per group; magnification 400X), error bars = 50 μm B) Representative electron microscopy of cortical kidney sections from wild-type (left panel) and caspase-3^{-/-} (right panel) mice that underwent IRI and were sacrificed 1 day post IRI (N = 3; magnification 1000X), error bars = 10 μm C) Left panels: representative RIPK3 immunohistochemistry in cortical kidney sections from wild-type and caspase-3^{-/-} mice that underwent IRI and were sacrificed 1 day post IRI (N ≥ 7; magnification 200X). Right panel: quantification of RIPK3 immunohistochemistry-stained murine renal cortical sections at 1 day post IRI error bars = 50 μm. Values are mean + SEM. Statistical analyses were performed using the unpaired Student's t-test. *P < 0.05 compared between WT and KO at the same time-point.

Figure 3: Caspase-3 deficiency attenuates IRI-induced microvascular injury. A) Left panel: quantification of rouleaux formation in H&E-stained kidney sections from mice that underwent IRI and were sacrificed 1, 2, 3, or 7 days post IRI (N ≥ 5 per group). Right panels:

representative H&E-stained murine renal cortical sections at 3 days post IRI (N ≥ 6 per group; magnification 400X). Error bars=20μm B) Left panels: representative image of MECA-32 immunohistochemistry in cortical kidney sections from wild-type and caspase-3^{-/-} mice that underwent IRI and were sacrificed 3 days post IRI (magnification 200X). Right panel: quantification of MECA-32 in murine renal cortical sections at 1, 2, 3, or 7 days post IRI. Error bars=50μm, Values are mean + SEM. Statistical analyses were performed using the unpaired Student's t-test. *P < 0.05, compared between WT and KO at the same time point. C) Representative electron microscopy image of cortical kidney sections from wild-type (left panels) and caspase-3^{-/-} (right panels) mice that underwent IRI and were sacrificed 1 day post IRI (N = 3; magnification 5000X). Error bars =500nm.

Figure 4: Caspase-3 deficiency attenuates IRI-induced upregulation of pro-fibrotic markers. A) Serum levels of CTGF in wild-type and caspase-3^{-/-} mice that underwent IRI and were sacrificed at 1 or 2 days post IRI (N ≥ 5 per group). B) Left panel: quantification of α-SMA immunohistochemistry in cortical kidney sections from wild-type and caspase-3^{-/-} mice that underwent IRI and were sacrificed 1, 2, 3, or 7 days post IRI (magnification 200X). Right panel: representative image of α-SMA immunohistochemistry in murine renal cortical sections at 3 days after surgery. Error bars=50μm C) Left panels: representative image of Sirius Red staining in renal cortical medullary junction sections from wild-type (upper panel) and caspase-3^{-/-} (lower panel) mice that underwent IRI and were sacrificed 7 days post IRI (magnification 200X). Right panel: quantification of Sirius Red staining in murine renal cortical medullary junction sections at 7 days post IRI. Error bars =50μm. Values are mean + SEM. *P < 0.05, compared between WT and KO at the same time point. Statistical analyses were performed using the unpaired Student's t-test .

Figure 5: Caspase-3 deficiency attenuates IRI-induced microvascular rarefaction. A) Left panels: representative image of MECA-32 immunohistochemistry in cortical kidney sections from wild-type and caspase-3^{-/-} mice that underwent IRI and were sacrificed 21 days post IRI (magnification 200X). Right panel: quantification of MECA-32 staining in murine renal cortical sections at 21 days post IRI. Error bars= 50μm B) Upper panels: representative image

of α -SMA immunohistochemistry in cortical kidney sections from wild-type and caspase-3^{-/-} mice that underwent IRI and were sacrificed 21 days post IRI (magnification 200X). Lower panels: quantification of α -SMA staining in PTC(left panel)and glomeruli (right panel) in murine renal cortical sections at 21 days post IRI Error bars =50 μ m. Values are mean + SEM.*P < 0.05. Statistical analyses were performed using the unpaired Student's t-test .

Figure 6 Caspase-3 deficiency prevents IRI-induced long-term renal endothelial cell death. A) Representative electron micrograph of cortical kidney sections from caspase-3^{-/-} mice sacrificed 21 days post-IRI (N=3) (magnification 10000X).Error bars=500nm B) Representative electron micrograph of cortical kidney sections from wild type mice sacrificed 21 days post-IRI (N=3), showing an apoptotic endothelial cell (magnification 2000X).Error bars=2 μ m C) Representative electron micrograph of cortical kidney sections from wild type mice sacrificed 21 days post IRI (N=3), red arrows indicate apoptotic bodies and blue arrows indicate exosome-like membrane vesicles (magnification 10000X). black arrows indicate apoptotic bodies and blue arrows indicate exosome-like membrane vesicles (magnification 10000X).Error bars =500nm.

Figure 7: Caspase-3 deficiency prevents IRI-induced fibrosis. Upper panels: representative image of Sirius Red staining at renal cortical medullary junction sections from wild-type and caspase-3^{-/-} mice that underwent IRI and were sacrificed 21 days post IRI (magnification 200X).

Lower panels: quantification of Sirius Red staining in PTC(left panel)and glomeruli (right panel) at murine renal cortical medullary junction sections at 21 days post IRI.Error bars =50 μ m. Values are mean + SEM.*P < 0.05. Statistical analyses were performed using the unpaired Student's t-test .

Figure 8: Caspase-3 deficiency prevents IRI-induced long-term renal dysfunction. A) Left panels: quantification of HIF-1 α immunohistochemistry in cortical kidney sections from wild-type and caspase-3^{-/-} mice that underwent IRI and were sacrificed 21 days post IRI (magnification 200X). Right panel: representative image of HIF-1 α staining in murine renal

cortical sections at 21 days after surgery. B) Upper panels: representative H&E-stained murine renal cortical sections post IRI (N = 5 per group; magnification 200X). Lower panel: mean tubular injury scores of ten randomly chosen high-power fields in mice kidney sections post IRI. C) Serum creatinine levels in wild-type and caspase-3^{-/-} mice at 21 days post IRI. All error bars =50µm. Values are mean + SEM.*P < 0.05. Statistical analyses were performed using the unpaired Student's t-test .

Figure 9. Caspase-3 is a pivotal regulator of peritubular capillary rarefaction and renal dysfunction. Early tubular injury and renal dysfunction are increased in caspase-3^{-/-} mice, whereas microvascular integrity is ameliorated throughout the various phases. In the long term, caspase-3^{-/-} mice show reduced microvascular drop-out, decreased tubular injury, and reduced interstitial fibrosis.

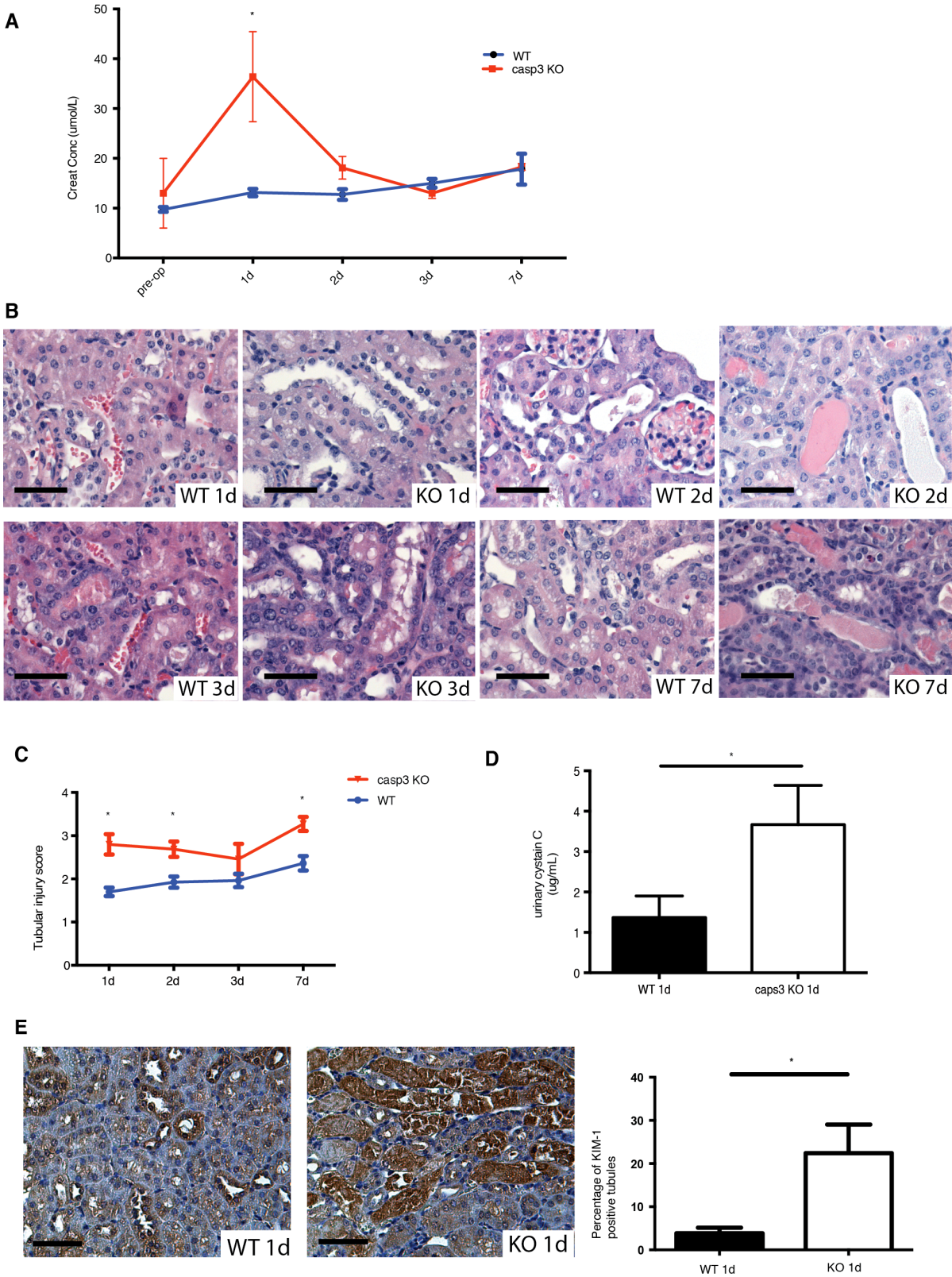
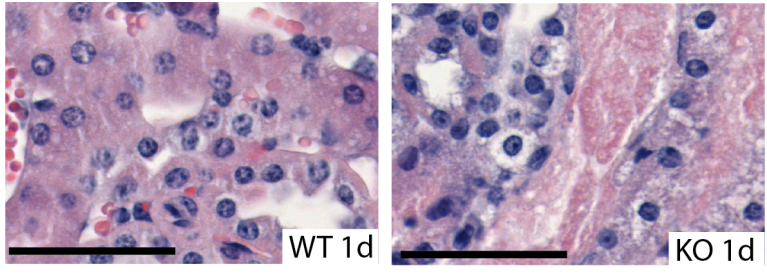
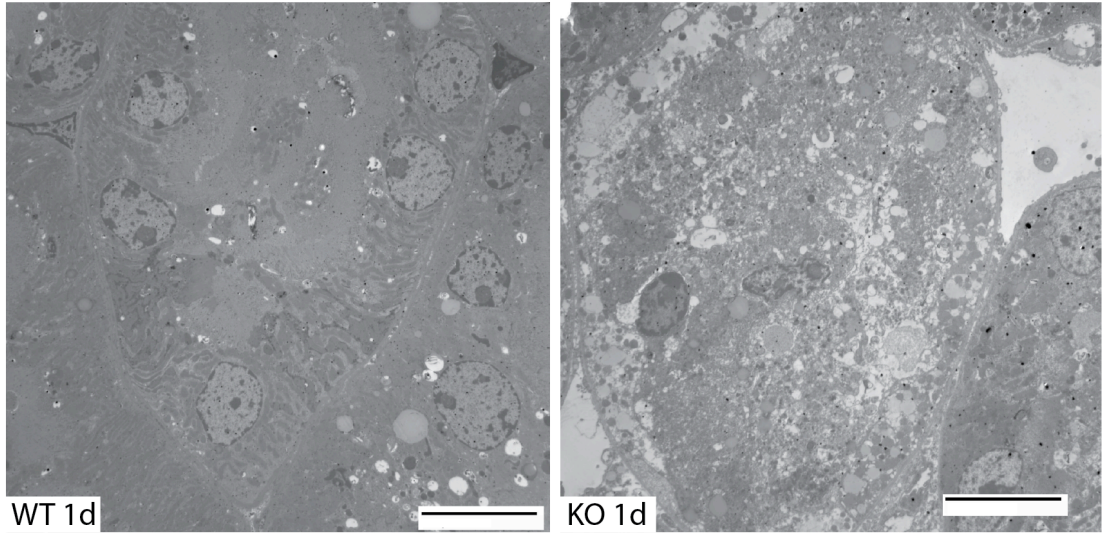


Figure 1: Caspase-3 deficiency aggravates IRI-induced tubular injury.

A



B



C

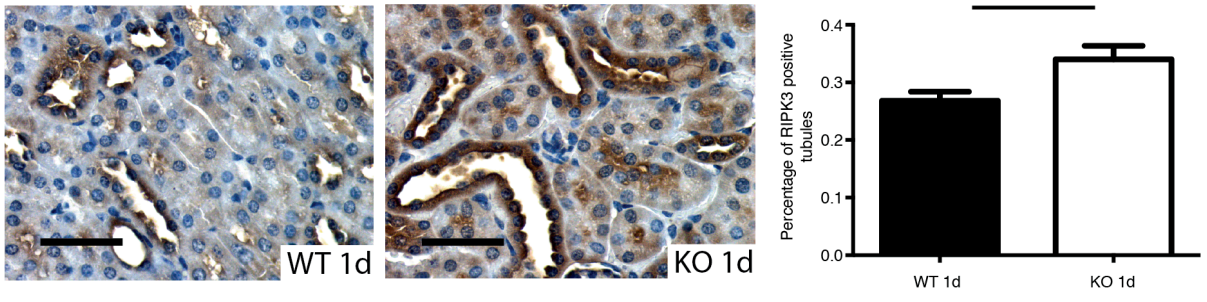


Figure 2: Caspase-3 deficiency increases IRI-induced necroptosis in tubular cells

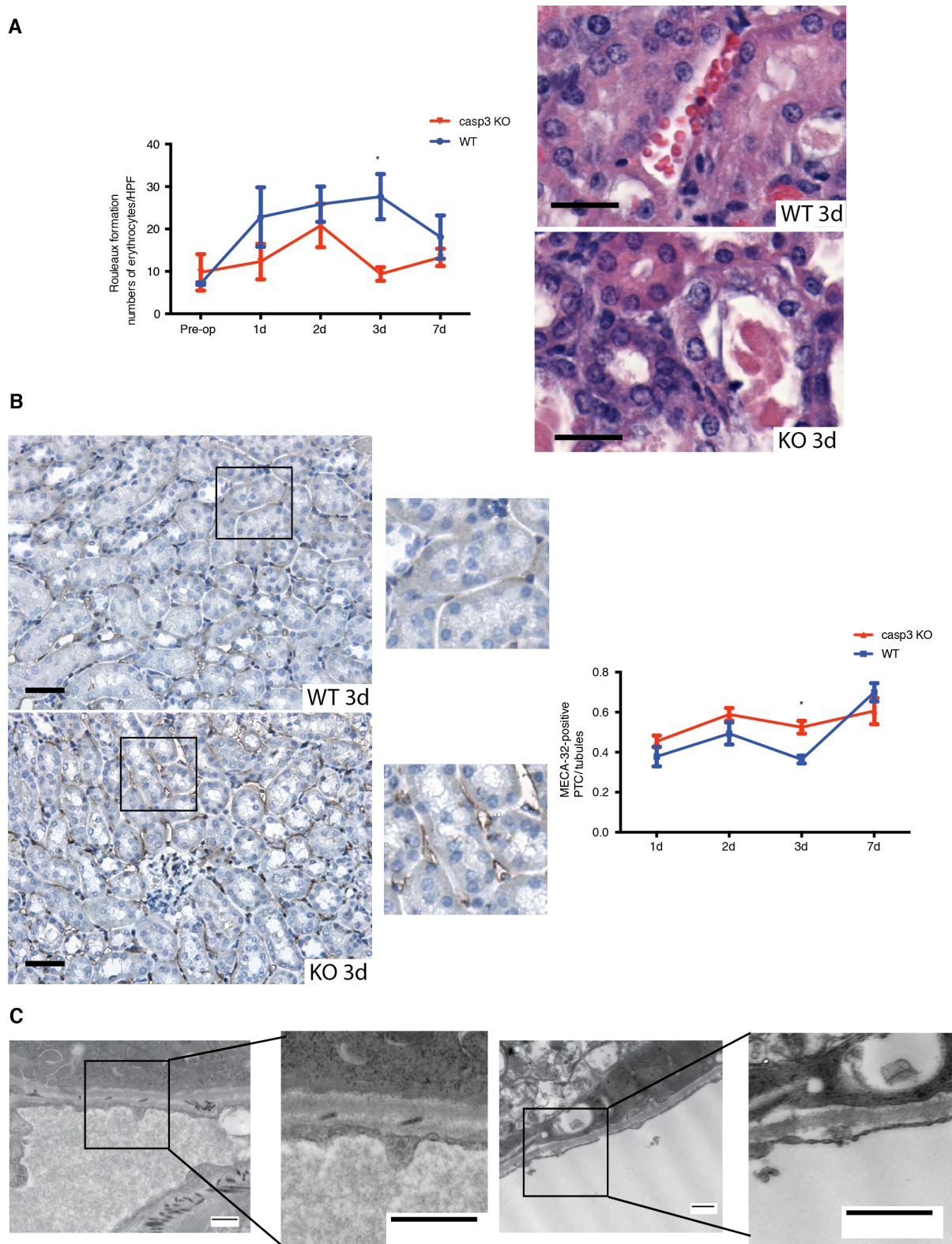


Figure 3: Caspase-3 deficiency attenuates IRI-induced microvascular injury.

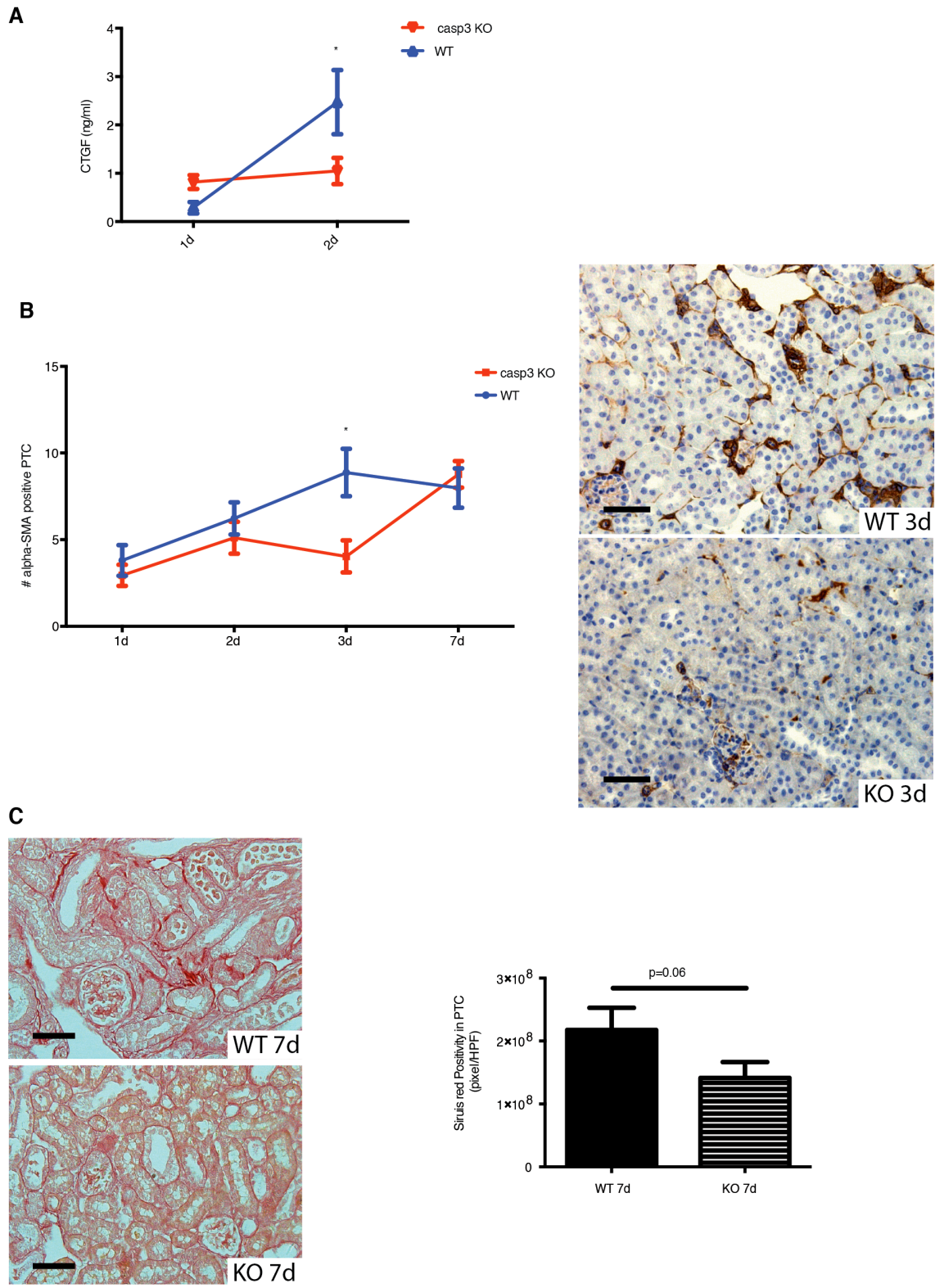


Figure 4: Caspase-3 deficiency attenuates IRI-induced upregulation of pro-fibrotic markers.

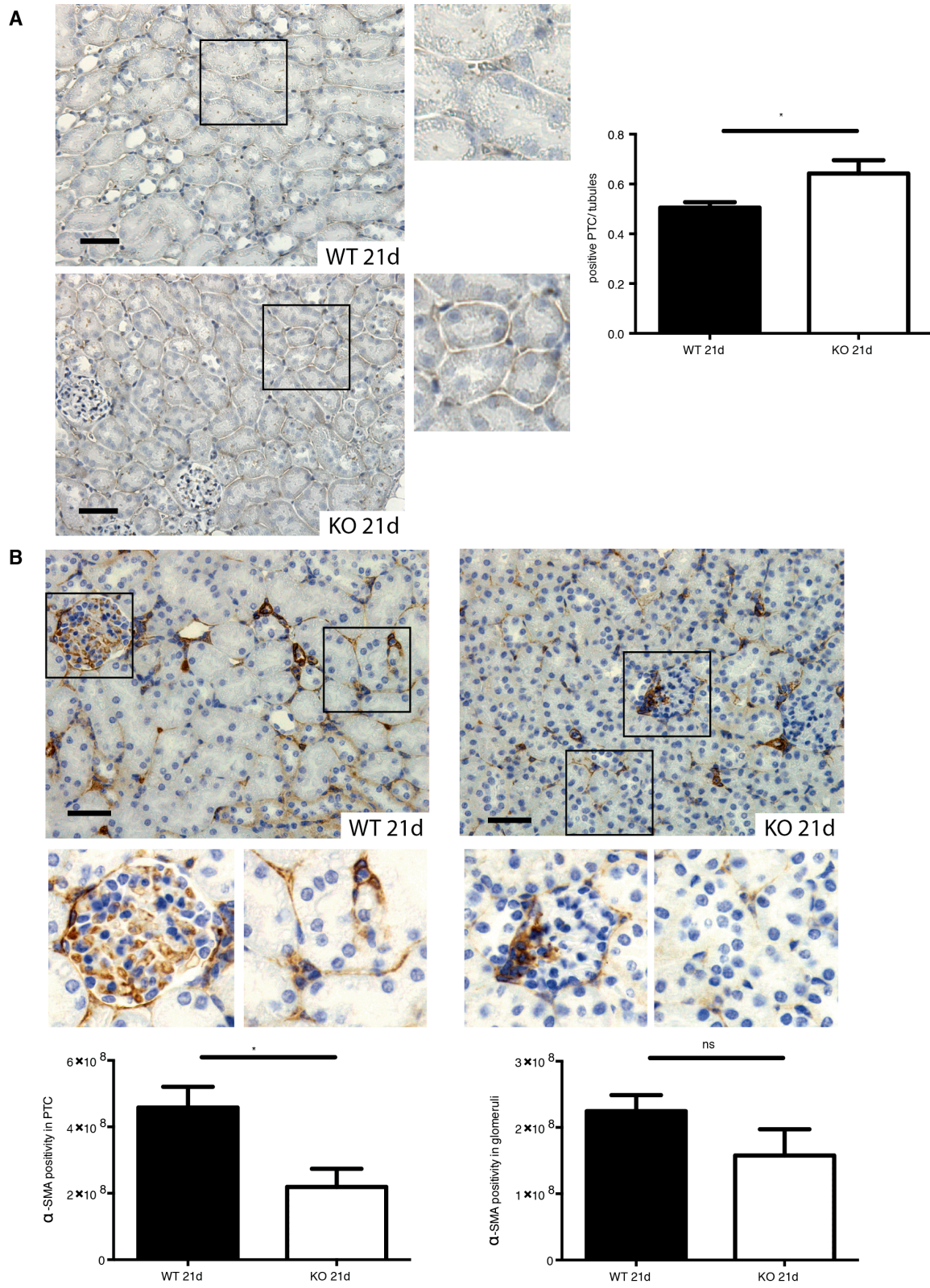
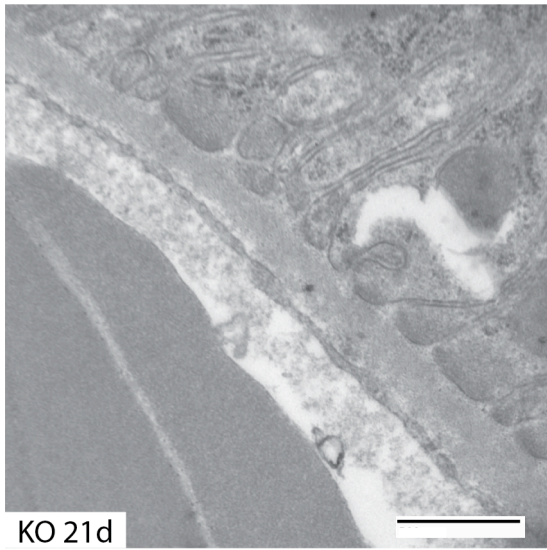
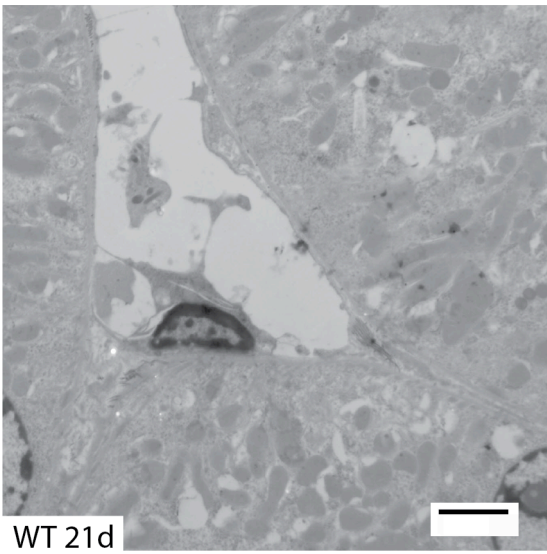


Figure 5: Caspase-3 deficiency attenuates IRI-induced microvascular rarefaction.

A



B



C

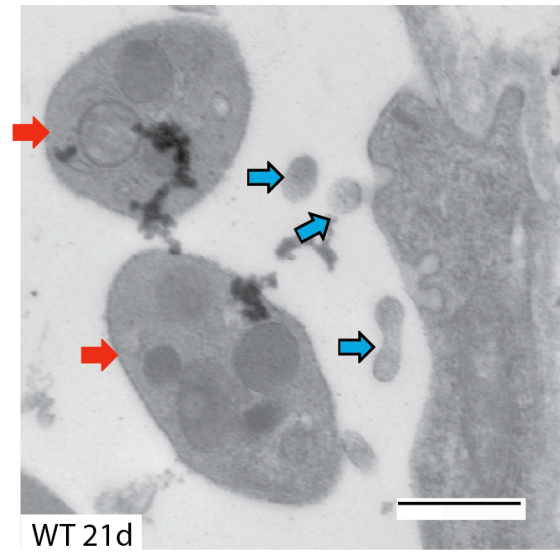


Figure 6 Caspase-3 deficiency prevents IRI-induced long-term renal endothelial cell death.

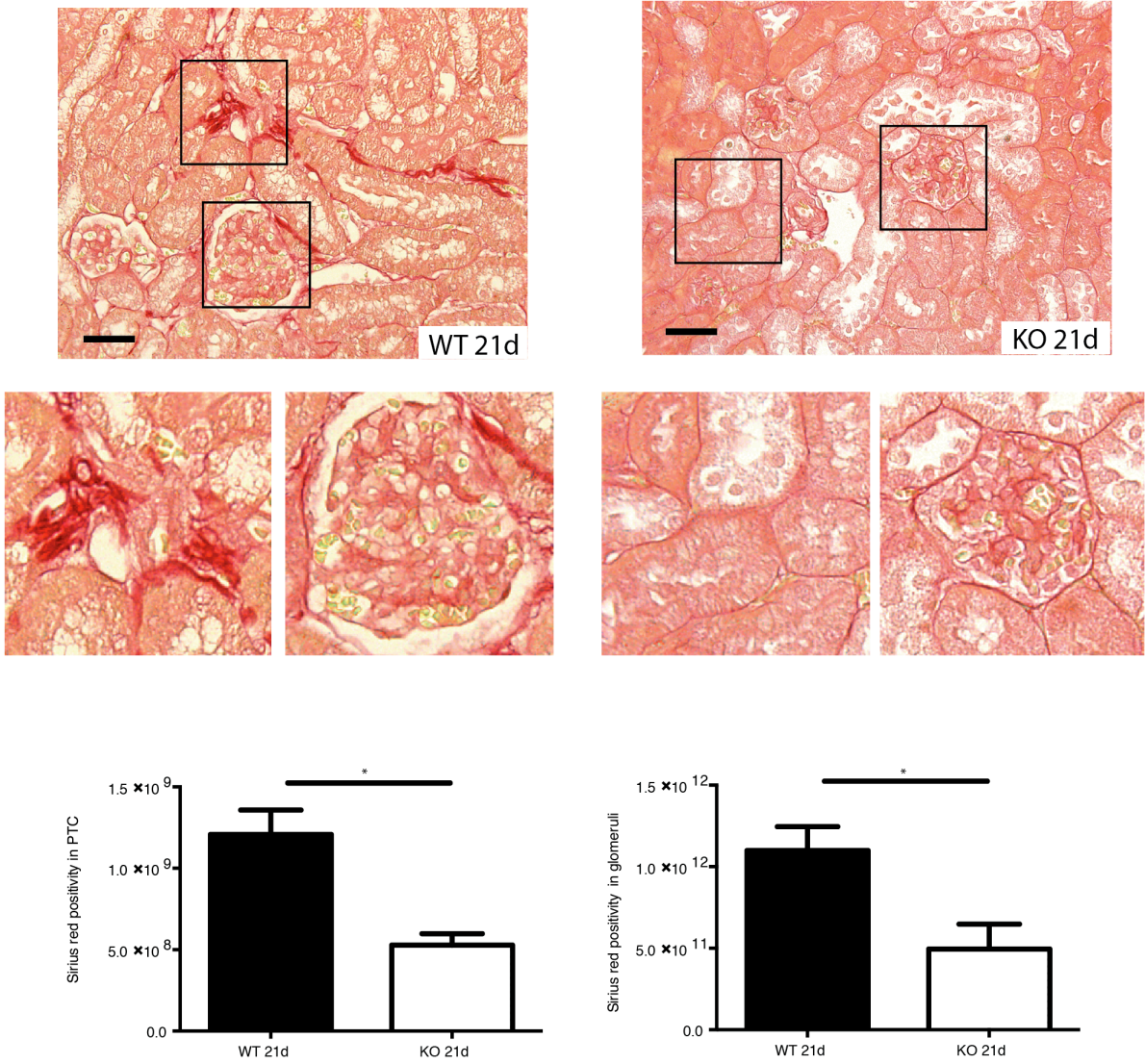


Figure 7: Caspase-3 deficiency prevents IRI-induced fibrosis.

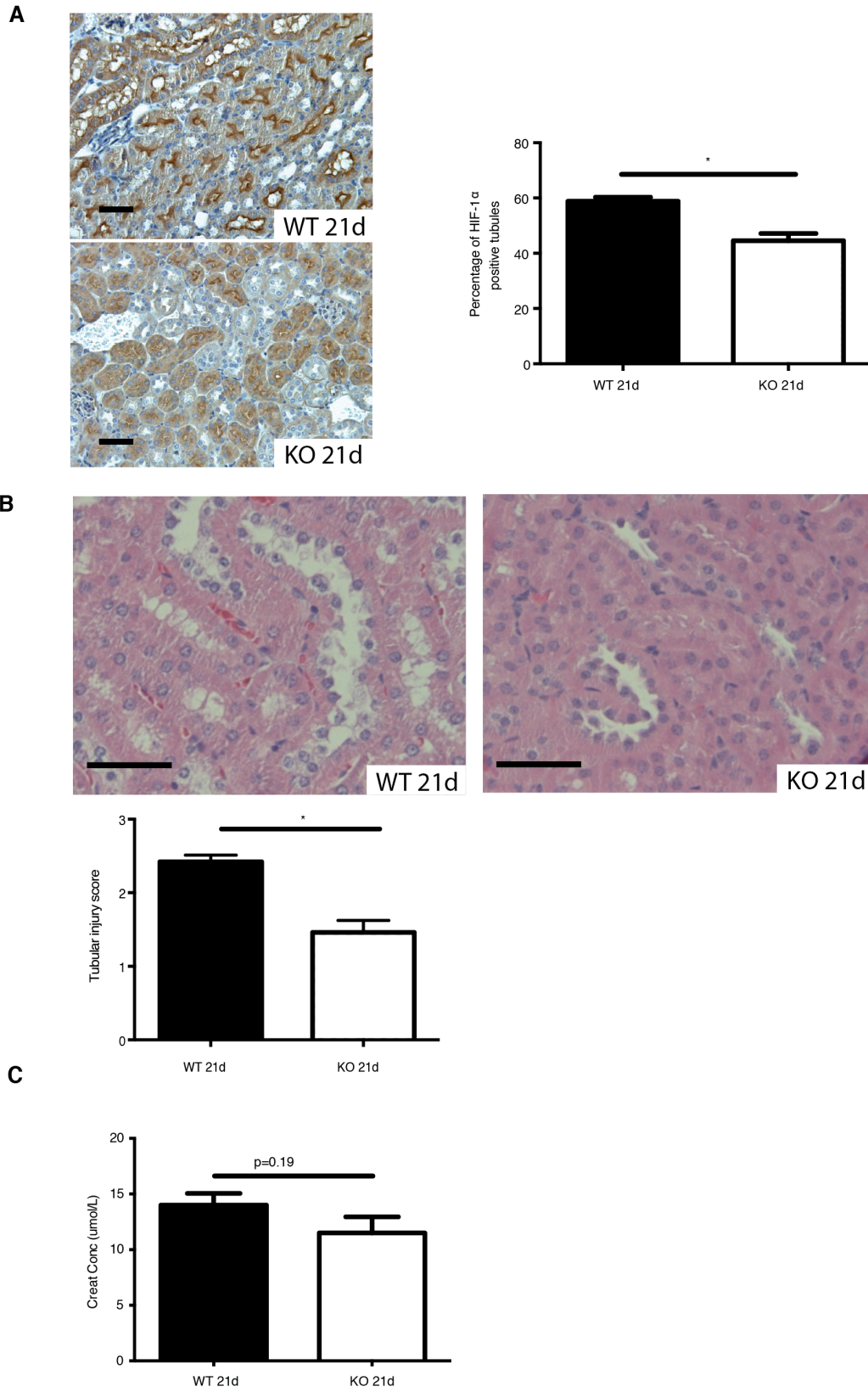


Figure 8: Caspase-3 deficiency prevents IRI-induced long-term renal dysfunction.

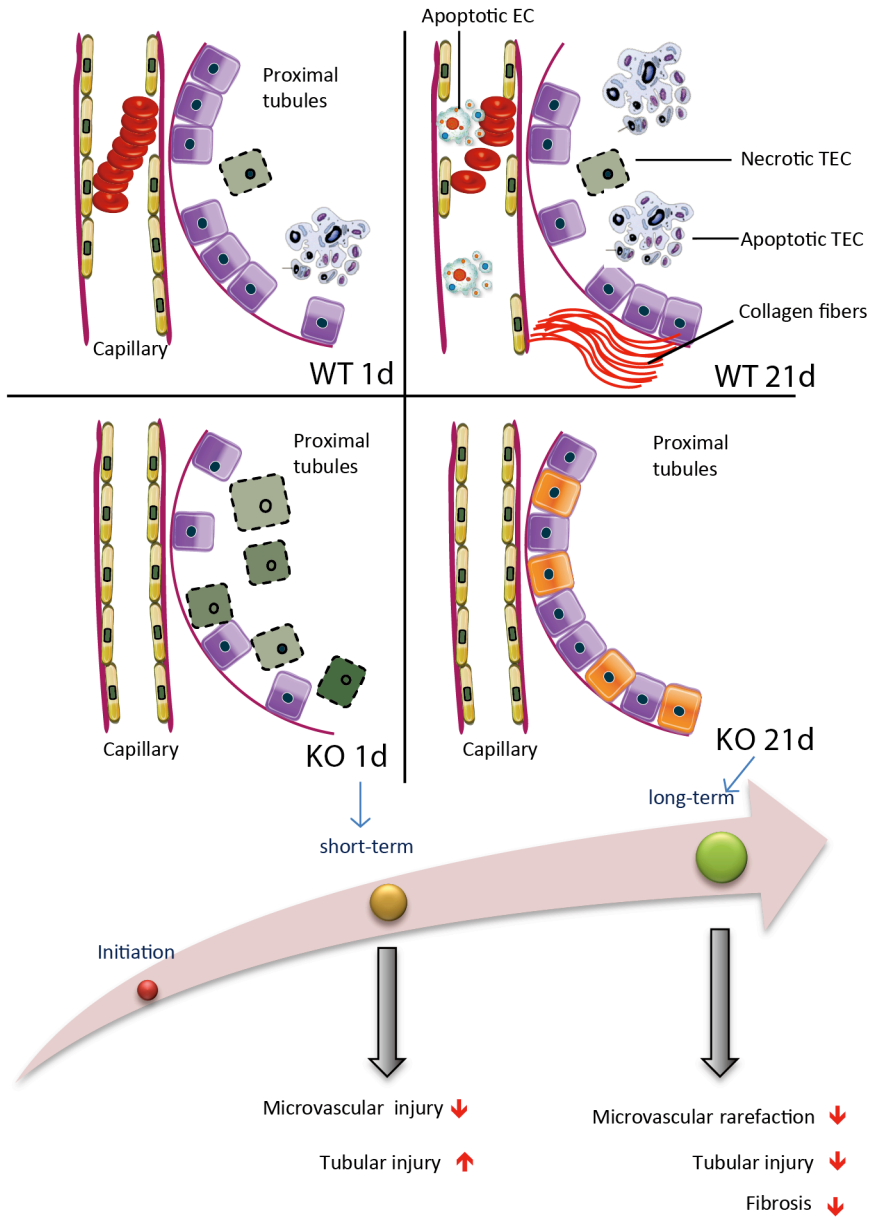


Figure 9. Caspase-3 is a pivotal regulator of peritubular capillary rarefaction and renal dysfunction.

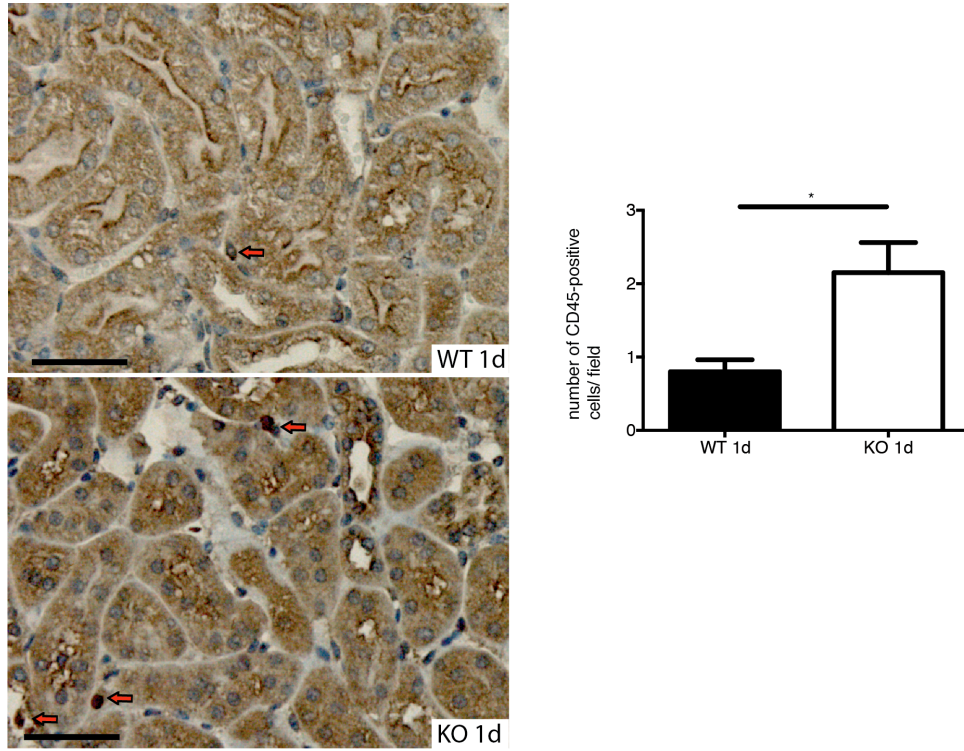


Figure S1: Caspase-3 deficiency aggravates IRI-induced leucocytes infiltration. Left panels : Representative image of CD45 immunohistochemistry in cortical kidney sections from wild-type (upper panel) and caspase-3^{-/-} (lower panel) mice that underwent IRI and were sacrificed 1 days after surgery (N = 5; magnification 400X), red arrows indicate positive cells, All error bars =50µm. Right panel: quantification of CD45 staining in murine renal cortical sections at 1 days post IRI. Values are mean + SEM.*P < 0.05. Statistical analyses were performed using the unpaired Student's t-test .

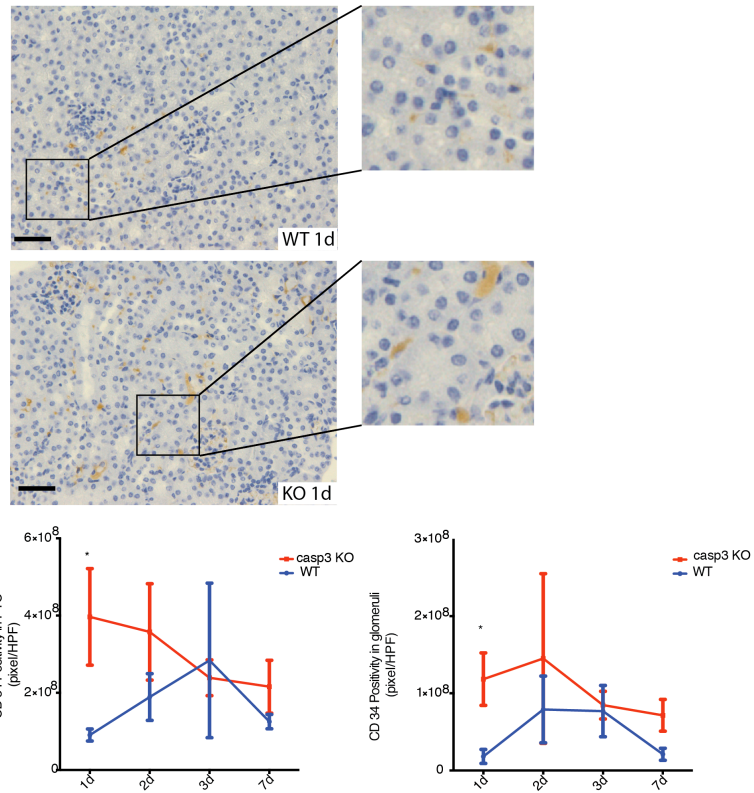


Figure S2: Caspase-3 deficiency aggravates IRI-induced microvascular injury. Upper panels: representative image of CD34 immunohistochemistry in cortical kidney sections from wild-type and caspase-3^{-/-} mice that underwent IRI and were sacrificed 1 day post IRI (magnification 200X). Lower panels: quantification of CD34 in murine renal cortical sections at 1, 2, 3, or 7 days post IRI. All error bars =50 μ m. Values are mean + SEM. *P < 0.05, compared between WT and KO at the same timepoint. Statistical analyses were performed using the unpaired Student's t-test .

Article 2.

Anti-LG3 Antibodies Aggravate Renal Ischemia–Reperfusion Injury and Long-Term Renal Allograft Dysfunction

Auteurs: Bing Yang, Mélanie Dieudé, Katia Hamelin, Mélissa Hénault-Rondeau, Natalie Patey, Julie Turgeon, Shanshan Lan, Luc Pomerleau, Myriam Quesnel, Junzheng Peng, Johanne Tremblay, Yixuan Shi, John. S.D Chan, Marie-Josée Hébert *et Héroïse Cardinal *

* Les co-auteurs correspondants

Article publié le 23 Juin 2016 dans American journal of transplantation.

Bing Yang a élaboré les hypothèses de travail avec Marie-Josée Hébert et Héroïse Cardinal. Elle a planifié et réalisé les expériences de cet article. Elle a analysé et interprété les résultats générés. Enfin, elle a participé à la rédaction du manuscrit avec Marie-Josée Hébert et Héroïse Cardinal.

Mélanie Dieudé a participé dans l'analyse des résultats et a également participé à la correction du manuscrit.

Katia Hamelin a participé dans la gestion des souris expérimentales et de la banque des données des patients.

Mélissa Hénault-Rondeau a participé dans la gestion de la banque des données des patients.

Natalie Patey a participé dans la standardisation des analyses histologiques.

Julie Turgeon a produit les anticorps anti-LG3 et les IgG contrôles.

Shanshan Lan a participé dans la prise des photos de l'histologie et l'analyse de l'histologie.

Luc Pomerleau a participé dans la gestion des souris expérimentales.

Myriam Quesnel a participé dans l'analyse de l'histologie.

Junzheng Peng et Johanne Tremblay ont réalisé les chirurgies de l'IRI.

Yixuan Shi et John. S.D Chan ont réalisé la coloration immunohistochimique de Collagène IV.

Marie-Josée Hébert et Héroïse Cardinal ont dirigé et supervisé l'ensemble de ce travail, de la génération des hypothèses à la rédaction du manuscrit.

Abstract

Pre-transplant autoantibodies to LG3 and angiotensin-II type 1 receptors (anti-AT1R) are associated with acute rejection in kidney transplant recipients while anti-vimentin autoantibodies participate in heart transplant rejection. Ischemia-reperfusion injury (IRI) can modify self-antigenic targets. Here, we hypothesize that ischemia-reperfusion creates permissive conditions for autoantibodies to interact with their antigenic target and lead to enhanced renal damage and dysfunction. In 172 kidney transplant recipients, we found that pre-transplant anti-LG3 antibodies are associated with an increased risk of delayed graft function (DGF). Pre-transplant anti-LG3 antibodies are inversely associated with graft function 1 year after transplantation in patients who experience DGF, independent of rejection. Pre-transplant anti-AT1R and anti-vimentin were not associated with DGF, nor with its functional outcome. In a model of renal IRI in mice, passive transfer of anti-LG3 IgGs led to enhanced dysfunction and microvascular injury compared to passive transfer with control IgGs. Passive transfer of anti-LG3 antibodies also favored intra-renal microvascular complement activation, microvascular rarefaction and fibrosis post-IRI. Our results suggest that anti-LG3 antibodies are novel aggravating factors for renal IRI. These results provide novel insights into the pathways that modulate the severity of renal injury at the time of transplantation and their impact on long-term outcomes.

Keywords: anti-LG3 antibodies, delayed graft function, kidney transplantation, acute kidney injury, autoantibodies

Introduction

In the immediate post-transplant period, ischemia-reperfusion injury (IRI) to kidney allografts leads to acute kidney injury (AKI) in 20%-50% of transplantations from deceased donors.(1-3) Post-transplant AKI manifests as delayed graft function (DGF), a condition that refers to the need for dialysis, or the failure of serum creatinine to decrease adequately in the first week after transplantation.(4) DGF is associated with an increased risk of acute rejection (5) and reduced long-term graft survival in some (6, 7) but not all studies.(8, 9) This suggests that undefined factors may synergize with DGF in some patients but not others to durably alter renal function.

Renal epithelial cell injury and death are major hallmarks of AKI. In recent years however microvascular damage has emerged as a major contributor to acute and long-term renal dysfunction secondary to AKI.(10) In the acute phases of AKI, injury to the peritubular capillaries (PTC) enhances renal hypoperfusion and tubular cell damage. On the long-term, microvascular injury leads to microcapillary rarefaction, promoting interstitial fibrosis and contributing to chronic kidney disease progression.(11) Whether factors implicated in shaping the severity of microvascular damage during AKI could contribute to the long-term impact of AKI on renal function remains to be evaluated.

An association between autoantibodies and acute or chronic vascular rejection in kidney, heart and lung transplant patients has been evidenced in recent years.(12-16) Autoantibodies against angiotensin-II type 1 receptors (anti-AT1R), vimentin (anti-vimentin) and perlecan LG3 fragment (anti-LG3) behave as accelerators of rejection in animal models of kidney, heart and/or aortic transplantation.(13, 16, 17) In addition to their role in acceleration of rejection, mounting evidence suggests that some types of autoantibodies can also mediate tissue damage associated with IRI.(18, 19) In animal models of intestinal IRI, the binding of natural autoantibodies to self-antigenic targets leads to enhanced tissue damage through complement activation.(20) Ischemia has been shown to enhance the vasoconstrictive effect of anti-AT1R autoantibodies.(17, 21) We showed previously that vascular ischemia greatly enhances the capacity of anti-LG3 antibodies to enhance vascular inflammation.(17)

Hence, we hypothesize that ischemia-reperfusion injury can create permissive conditions for autoantibodies such as anti-LG3, anti-AT1R and anti-vimentin to interact with their antigenic target and potentially enhance renal damage and renal dysfunction, even in the absence of rejection. To test this hypothesis, we assessed whether these autoantibodies, measured immediately prior to transplantation, are associated with an increased risk of DGF, and with lower long-term graft function in kidney transplant recipients. We then turned to an animal model of renal IRI to get a better understanding of the mechanisms by which autoantibodies modulate renal injury.

Methods

Human study

Study design and patients

We performed a retrospective cohort study in consecutive patients who received a kidney transplantation at our center between June 1st, 2008 and June 1st, 2013. All patients participated in the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) clinical and biological database, and sera were banked immediately prior to transplantation. Clinical information was retrieved from the electronic database, complementing with chart review by trained research nurses when needed. Patients entered the cohort on the date of transplantation, and were followed until February 1st, 2015. The study was approved by our local ethics review board.

Outcomes

The primary outcome was the occurrence of DGF. DGF was defined as either the need for dialysis in the first post-transplant week, the failure of serum creatinine to decrease by more than 10% on the first 3 post-operative days, or as serum creatinine levels $>250 \mu\text{mol/L}$ on post-operative day 5 in the presence of scintigraphic evidence of acute tubular necrosis.(4) The secondary outcome was graft function one year after transplantation, estimated with the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) 4-variable equation.(22)

Measurements

Anti-AT1R, anti-vimentin and anti-LG3 antibodies were measured on pre-transplant sera. We used a locally developed ELISA to measure anti-LG3 IgG antibodies, as described previously.(17) We used commercially available ELISA to measure anti-AT1R (OneLambda, ThermoFisher, USA) and anti-vimentin antibodies (Antibodies-online.com, USA). For anti-

AT1R, thresholds for positivity were > 17 U/ml results between 10-17 U/ml are considered intermediate, and results <10 U/ml are considered negative. For anti-vimentin, values >1.31 (sample positivity index semiquantitative measurement) are positive, while values between 1-1.3 are considered intermediate and values <1 are negative, as per manufacturer's protocol. We collected data on recipient medical history and demographic characteristics (age, gender, renal disease, number of previous transplantations, pre-transplant panel reactive antibodies), on donor characteristics (donor type, age, height, weight, hypertension and diabetes), on procedural and management characteristics (cold ischemic time, induction type and maintenance immunosuppressive protocol), as well as on post-transplant outcomes (rejection as per the Banff 2013 classification,(23) graft function, patient and graft survival).

Statistical analyses

Continuous variables are reported as means and standard deviations and categorical variables are summarized as proportions. Student T tests were used to compare between-group differences in continuous variables according to their distribution. Chi-square or Fisher's exact tests were used to determine differences between categorical variables. Logistic regression was used to assess whether pre-transplant anti-LG3, anti-AT1R and anti-vimentin antibodies were associated with DGF. The pre-transplant autoantibodies were analyzed as categorical variables. After plotting the median of each quartile of the distribution for each antibody against the log odds of cases to controls, we chose a cut-off of 225 (corresponding to the median of the last quartile) for anti-LG3 positivity. As there was no visual signal for a potential cut-off between anti-AT1R or anti-vimentin and the outcome, we used the manufacturer's recommended cut-off for positivity. Variables with a p-value <0.05 on univariate analysis were included in the final multivariate model. No other variables were forced in the model to avoid overfitting. Linear regression was used to study the association between graft function at 1 year post-transplant and pre-transplant anti-LG3 titers. Analyses were performed using SAS version 9.3 (Cary, NC, USA).

Animal study

Animals and surgical procedures

Adult C57Bl/6 (20–25 g) were purchased from Charles River (St-Constant, QC), maintained on a 12 h light-dark cycle, and fed a normal diet ad libitum. All experiments on mice were approved by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) of the

CHUM research center. AKI in mice was carried out as described previously.(24) Briefly, mice were anaesthetized using isoflurane (2%) by inhalation and were placed on a heated surgical pad. A midline incision was made; microvascular clamps were placed on the left renal pedicle for 30 min and then released. The right kidney was removed after the release of microvascular clamps.

Production and passive transfer of murine anti-LG3 IgG

Naïve C57Bl/6 mice were injected subcutaneously with either recombinant LG3 (50 µg) or PBS, emulsified in incomplete Freund's adjuvant (IFA), every 2 weeks for a total of 4 immunizations. Blood was recovered with cardiac puncture at sacrifice 12–14 days after the last immunization. Sera (diluted 1/100) were tested for the presence of anti-LG3 IgGs as described. IgGs were isolated from pooled sera of either LG3-immunized mice (anti-LG3 IgGs) or PBS-immunized mice (control IgGs) using protein A Sepharose CL-4B (Sigma–Aldrich, ON, CA), and quantitated by Micro BCA assay (Pierce, Rockford, IL, USA). For passive transfer of anti-LG3 IgGs, mice received tail vein IV injections of either 50 µg anti-LG3 IgGs or 50 µg of control IgGs. Each group received injections 2 days before surgery, the day of surgery, and every other day until sacrifice. A total of 3 doses were given to mice that were sacrificed at day 2 post-surgery, or 4 doses for those sacrificed at day 7 post-surgery.

Immunohistochemistry

Clamped kidneys were recovered at day 2 or 7 post-surgery; tissues were fixed with 10% neutral buffered formalin and paraffin embedded according to usual methods. Samples were cut into 4 µm slices. Immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded sections using an automated Dako immunostainer (ArtisanLink, Dako, DK) according to the manufacturer's protocols. The antibody used in our study were C4d (1/1600, BI-RC4D, Alpco, Salem, NH), C5b-9 or MAC (Membrane attack complex) (1/200, SC5b-9, Quidel, San Diego, CA), CD31 (1/20, CM303A, Biocare Medical, CONCORD, CA), α -SMA (1/500, clone 1A4, Dako, Ontario, CA), collagen IV (1/100, AB769, Millipore, Ontario, Canada) and caspase-3 (1/50, CP229B, Biocare Medical, CONCORD, CA). Digital images of stained tissues were captured by a Leica DMLS microscope and a Leica DFC420C camera (Leica Microsystems, Richmond Hill, ON, USA). CD31-positive staining was quantified using Visiopharm (Hoersholm, Denmark).

Histopathological scoring

Histopathological scoring was done in hematoxylin and eosin (H&E) stained renal sections as described previously.(25) Briefly, the percentage of damaged tubules in the renal cortex was estimated using a 5-point scale based on the following criteria: brush border loss, tubular dilatation, cast deposition, and cellular necrosis in 10 randomly selected, non-overlapping fields (200X magnification). Lesions were graded on a scale from 0 to 5: 0 = normal; 1= mild, involvement of less than 10% of the cortex; 2 = moderate, involvement of 10 to 25% of the cortex; 3 = severe, involvement of 25 to 50% of the cortex; 4 = very severe, involvement of 50–75% of cortex; and 5 = extensive damage, involvement of more than 75% of the cortex. (25)

Biochemical analysis

The VITROS CREA Slide method was performed for measurement of serum creatinine by using the VITROS CREA Slides and the VITROS Chemistry Products VITROS 250/350 Chemistry Systems (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA). Levels of blood urea nitrogen (BUN) were measured using the Quantichrom urea assay kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA).

Results

Among the 173 patients included in this study, one died immediately after transplantation from a myocardial infarction and another one within 1 year post-transplant (Figure 1). Recipient, donor and peri-procedural characteristics are found in Table 1. All patients received tacrolimus, mycophenolate mofetil and prednisone, except for 3 patients who received cyclosporine in combination with mycophenolate mofetil and prednisone. Patient and graft survival over a median follow-up of 3.5 years were 95% and 89% respectively. We observed no associations between pre-transplant positivity for anti-LG3 and anti-vimentin antibodies and previous sensitizing events (transplantations, pregnancies or transfusions) or classical autoimmune diseases (lupus erythematosus, ANCA or anti-GBM-associated vasculitis)(supplemental Figure 1). Positivity for anti-AT1R was more frequent in retransplant patients ($p < 0.01$) (supplemental Figure 1a). Pre-transplant anti-LG3 titers were associated with anti-vimentin ($\rho: 0.23$, 95% CI: 0.08-0.37), but not with anti-AT1R titers ($\rho: 0.15$, 95% CI: -0.01-0.29).

Pre-transplant anti-LG3 titers are associated with an increased risk of delayed graft function

Of the 172 study participants included in the primary outcome analysis, 53 (31%) experienced DGF as defined above, of whom 12 needed hemodialysis in the first week after transplantation. Pre-transplant anti-LG3 titers were higher in patients with DGF compared to those with immediate graft function, while pre-transplant anti-AT1R and anti-vimentin antibody titers were similar in both groups (Figure 2). When antibodies were analyzed as dichotomous variables, we also observed a difference in pre-transplant positivity status for anti-LG3 antibodies, but not in anti-AT1R or anti-vimentin, between patients who developed DGF and those who did not (Figure 3). This was also true when anti-AT1R and anti-vimentin antibodies were classified as positive, intermediate and negative (data not shown). In univariate analyses, positive pre-transplant anti-LG3 status was associated with DGF (OR: 2.57, 95% CI: 1.03-6.38, $p=0.04$), while positive pre-transplant anti-AT1R status (OR: 1.10, 95% CI: 0.42-2.91, $p=0.84$) and positive anti-vimentin status (OR: 0.95, 95% CI: 0.48-1.89, $p=0.88$) were not (Table 2). Rejection was not associated with an increased risk of DGF (OR: 1.61, 95% CI: 0.50-5.51, $p=0.40$). In multivariate analyses, positive pre-transplant anti-LG3 status (OR: 2.77, 95% CI: 1.01-7.68), female gender (OR: 0.35, 95% CI: 0.16-0.79), donor type (deceased after neurological determination of death versus living OR: 2.89, 95% CI:

1.31-6.36, deceased after cardiocirculatory arrest versus living OR: 16.00, 95% CI: 2.32-110.75), and donor height (OR: 0.64 per 10-cm increase, 95% CI: 0.44-0.91) were independently associated with DGF.

Pre-transplant anti-LG3 titers are associated with lower estimated glomerular filtration rate 1-year after transplantation in patients with delayed graft function, but not in those with immediate graft function

To evaluate whether auto-antibodies can negatively impact renal function independent of their role in induction/acceleration of rejection, we evaluated the association between pre-transplant autoantibody titers and renal function at one year. Amongst the 171 patients available for this analysis, eGFR 1 year after transplantation was lower in patients with delayed compared to immediate graft function (44 ± 16 ml/min/1.73m² versus 61 ± 22 ml/min/1.73m², $p=0.001$). In patients with DGF, eGFR 1 year after transplantation was significantly lower in patients who had positive pre-transplant anti-LG3 antibodies ($p=0.003$) (Figure 4).

Positive pre-transplant anti-LG3 status, but not anti-vimentin or anti-AT1R status, were associated with reduced eGFR 1 year after transplantation in patients with DGF (β : -15 ml/min/1.73m², 95% CI: -24, -5) (Table 3). Donor age (β : -3 ml/min/1.73m², 95% CI: -19, 0) and height (β : 4 ml/min/1.73m² per 10 cm-increase, 95% CI: 1, 8) were also associated with 1-year graft function in patients with DGF, while rejection and donor type were not (Table 3). We observed no relationship between any of the pre-transplant autoantibodies and 1-year graft function in patients with immediate graft function. These results support the notion that, in recipients of a renal allograft with DGF, elevated anti-LG3 titers at the time of transplantation durably and negatively impact renal function. This effect was specific to anti-LG3 antibodies, as anti-vimentin and anti-AT1R antibodies were not associated with 1-year graft function.

Anti-LG3 antibodies enhance renal dysfunction following ischemia-reperfusion in mice

We turned to a murine model of renal IRI to characterize the mechanisms of aggravated renal dysfunction induced by anti-LG3 antibodies. Renal IRI in mice was induced by left renal artery clamping and contralateral nephrectomy. Mice were passively transferred with anti-LG3 IgGs 2 days prior to renal artery clamping and every other day thereafter in order to reach and maintain anti-LG3 IgG titers within the range observed in renal transplant patients (Figure S2A). (17) Passive transfer of anti-LG3 antibodies is associated with injections

of large amounts of fluid that protect against AKI (Figure S2B). Therefore, we used as controls mice injected with equivalent amounts of mouse IgGs and fluid. After IRI, both control and anti-LG3 IgGs transferred mice showed deterioration in renal function and histological evidence of tubular and microvascular injury (Figure 5A-D). Compared with mice passively transferred with control IgGs, BUN levels were significantly higher at day 2 post-IRI in mice passively transferred with anti-LG3 antibodies (Figure 5A). There was a trend towards increased BUN levels at day 7 (Figure 5A). Serum creatinine levels were significantly higher in mice passively transferred with anti-LG3 antibodies at day 7 post-IRI (Figure S2C). This was associated with increased tubular damage, as shown by an elevated tubular injury score at day 2 and further increase at day 7 (Figure 5C). Microvascular injury with microvascular congestion and rouleaux formation was also increased at day 2 and further enhanced at day 7 (Figure 5B and D). Activated caspase-3 staining was significantly increased in mice transferred with anti-LG3 antibodies compared with controls at days 2 and 7 (Figure 5E). We found a significant increase in caspase-3 staining between days 2 and 7 in anti-LG3 transferred mice whereas caspase-3 staining in control mice remained relatively stable post-IRI (Figure 5E), supporting the notion that anti-LG3 lead to prolonged aggravation of renal injury post-IRI. We also performed passive transfer of anti-LG3 IgGs in the absence of renal IRI in another set of mice. This did not lead to alteration in renal function (Figure S2D) or histological evidence of renal injury (data not shown). Collectively, these results suggest that anti-LG3 antibodies lead to progressive and sustained aggravation of renal cell death post-IRI.

Anti-LG3 antibodies trigger activation of the classical complement pathway and enhance renal microvascular injury after ischemia-reperfusion

LG3 being a cryptic fragment of perlecan, a constituent of vascular and to a lesser extent tubular basement membranes, we considered the possibility that following IRI, anti-LG3 antibodies bind basement membranes and activate complement. In renal IRI, complement activation is classically associated with activation of the alternative pathway, with little contribution of the classical pathway.⁽²⁶⁾ We quantified C4d and MAC staining at days 2 and 7 post-IRI. There was a trend towards increased C4d staining in peritubular capillaries at day 2 post-IRI in mice transferred with anti-LG3 IgGs (Figure 6 for the cortico-medullary junction

and Figure S3 for the superficial cortex), but this did not translate into increased MAC deposition (Figure 7 for the cortico-medullary junction and Figure S4 for the superficial cortex). However C4d and MAC staining were both significantly increased at day 7 post-IRI within peri-tubular capillaries sampled at the cortico-medullary junction (Figures 6-7). C4d tubular staining was not enhanced in anti-LG3-transferred mice compared to IgG controls (Figure 6C for the cortico-medullary junction).

Taking into consideration the importance of complement activation in microvascular involution and fibrosis following IRI, we then evaluated whether CD31 alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and collagen IV staining within peritubular capillaries was modulated by anti-LG3 antibodies. Mice transferred with anti-LG3 IgGs showed reduced peritubular CD31 staining (Figure 8A), increased collagen IV staining (Figure 8B) and increased α -SMA (Figure 8C) compared with controls, confirming enhanced microvascular rarefaction and fibrosis markers in mice transferred with anti-LG3 antibodies. Collectively, these results suggest that, when associated with IRI, anti-LG3 antibodies activate the classical complement pathway, further compromising microvascular integrity and enhancing renal injury and fibrosis.

Discussion

Ischemia-reperfusion is an integral component of renal transplantation. Whether IRI influences long-term outcomes in renal transplant patients is still debated.(27) While clinical factors such as donor age and donor type may influence the occurrence and functional impact of DGF,(28) recent data show that autoantibodies can participate in IRI-mediated tissue damage.(12, 18) Here we identify antibodies against a C-terminal perlecan fragment (LG3) as novel modulators of AKI in response to IRI. In kidney transplant recipients, pre-transplant anti-LG3 antibodies titers are associated with an increased risk of DGF. Also, in patients with DGF but not in those with immediate graft function, anti-LG3 antibodies titers assessed immediately before transplantation predict lower graft function 1-year after transplantation. The impact of anti-LG3 antibodies on the occurrence and functional impact of DGF cannot be attributed to a confounding effect of rejection, as the latter was not associated with DGF or graft function 1 year post-transplantation in patients with DGF. Anti-AT1R and anti-vimentin were not associated with DGF or graft function 1-year post-transplant. These results suggest that, in addition to their function as accelerators of rejection, anti-LG3 antibodies can impair renal function through rejection-independent pathways, while anti-AT1R and anti-vimentin do not.

We turned to an animal model of IRI to investigate how anti-LG3 antibodies aggravate renal dysfunction. We chose a model of IRI and not renal transplantation as we wanted to evaluate whether anti-LG3 antibodies can accelerate renal dysfunction caused by IRI in the absence of any contributing mechanisms that stem from alloimmunity. We found that when present at high titers at the time of IRI, anti-LG3 antibodies enhance renal dysfunction in association with activation of the complement pathway within peritubular capillaries. This was associated with enhanced microvascular rarefaction, evidenced by reduced CD31 staining and increased levels of α -SMA and collagen IV, two fibrotic markers. Anti-LG3 antibodies in the absence of IRI did not however induce renal dysfunction, confirming their role as aggravators but not as inducers of renal dysfunction. Collectively, these results suggest that ischemia represents a permissive factor for intra-renal activation of complement by anti-LG3 antibodies, leading to enhanced microvascular injury, involution and fibrosis.

Tubular injury was also increased in mice transferred with anti-LG3 antibodies but various elements argue for an indirect effect rather than direct epithelial toxicity. First, there was no evidence of C4d deposition within renal tubules either at day 2 or 7 post-IRI, demonstrating the absence of classical complement activation within tubules. We did, however, find increased tubular MAC staining at day 7 post-IRI in mice transferred with anti-LG3 antibodies, suggesting enhanced tubular activation of the alternative complement pathway. Future studies will be needed to explain this finding. One potential explanation is the possibility that progressive microvascular involution (evidenced by reduced CD31 staining) caused by complement-induced microvascular injury associated with anti-LG3 leads to tubular ischemia which in turn fuels tubular epithelial cell death leading to activation of the alternative complement pathway. This possibility would be consistent with our findings showing progressive increase in caspase-3 staining in mice transferred with anti-LG3 antibodies. This possibility is also consistent with previous publications demonstrating a role for tubular ischemia in activation of the alternative complement pathway in renal tubular cells.(29) Delineating the contributions of the classical and alternative pathways in anti-LG3-dependent renal injury will be key to develop clinically-relevant strategies of complement inhibition for prevention of progressive renal dysfunction.

Injury to the microvasculature is emerging as an important contributor to renal dysfunction post-IRI.(11, 30, 31) Endothelial injury and apoptosis contribute to renal dysfunction by durably limiting perfusion of tubules and perpetuating tubular damage.(32, 33) Microvascular drop-out also favors tubulointerstitial fibrosis, myofibroblast differentiation and progressive loss of renal function.(32, 34) Endothelial injury and apoptosis also contribute to the processing of perlecan and production of LG3(35, 36) and circulating LG3 has been recently reported as an early predictor of AKI in heart-surgery patients with AKI.(37) The mechanisms responsible for increased LG3 levels in association with AKI are still incompletely defined. Recent results from our group have identified apoptotic exosome-like vesicles, a novel type of membrane vesicles released by dying vascular cells, as a central trigger for anti-LG3 production.(36) The presence of LG3 and active 20S proteasome complex within these vesicles plays a major role in the immunogenic processing of perlecan required for anti-LG3 production. We also showed that acute vascular injury, whether renal or not, increases circulating levels of these vesicles in vivo. Other mechanisms of LG3 production

associated with IRI include the possibility that proteolytic enzymes released by infiltrating leukocytes (38) also contribute to the proteolysis of perlecan and to the production of LG3. Further studies will be needed to characterize the full spectrum of mechanisms by which ischemia-reperfusion favors the production of LG3 and anti-LG3-dependent microvascular injury in transplantation and other clinical situations associated with IRI.

Interactions between auto- and alloimmune pathways after solid organ transplantation are increasingly recognized as a risk factor for rejection. In kidney transplant patients, pre-transplant anti-LG3, anti-AT1R, and autoreactive antibodies against apoptotic cells have been linked with severe acute rejection.(13, 14, 17, 39) Anti-agrin, anti-fibronectin, anti-collagen type IV and anti-vimentin autoantibodies have been linked with transplant glomerulopathy (40, 41) and tubular atrophy/ interstitial fibrosis.(42) Our present work however is the first to report an interaction between a circulating autoantibody and the severity of AKI following renal IR in transplant patients.

We considered the possibility that autoantibodies could aggravate post-transplant AKI, leading to an increased risk of DGF, based on 2 observations. First, in murine models of intestinal IRI, binding of natural autoantibodies to self-antigenic targets were shown to increase tissue damage through complement activation following ischemia/reperfusion.(18) Second, recent data in human lung transplant patients demonstrated an association between pre-transplant levels of autoantibodies to K-alpha-1 tubulin and collagen type V and increased incidence of primary graft dysfunction.(12) We observed that pre-transplant anti-LG3 antibodies were associated with the occurrence and functional impact of DGF, while anti-AT1R and anti-vimentin were not. This suggests that autoantibodies to cryptic antigens that may become exposed or mobilized by ischemia can behave as accelerators of injury at the time of transplantation. While our data suggest that this is the case for LG3, AT1R and vimentin may not be as susceptible to ischemic modifications, explaining their lack of association with DGF.

The mechanisms that support the production of anti-LG3, anti-AT1R and anti-vimentin antibodies in patients awaiting a renal transplantation also remain ill-characterized. Although other studies have reported an association between anti-AT1R, lupus erythematosus and systemic sclerosis(43-46), we did not find an association between the autoantibodies we studied and autoimmune diseases. However, this conclusion is limited by the small number of

patients with autoimmune diseases (n=8) included in the present cohort. In previous work, we also showed that in pregnant women anti-LG3 antibodies do not correlate with anti-AT1R autoantibodies, and that both antibodies do not increase in association with normal pregnancy.(47) In the present study we did however find an association between anti-AT1R and prior transplantation, while anti-LG3 and anti-vimentin were not associated with classical allo-sensitizing events. Collectively, these results suggest that the factors associated with the production of anti-LG3 and anti-AT1R antibodies are likely different from classic autoimmune conditions and from one another.

In addition to anti-LG3, donor age and height were associated with graft function 1 year post-transplantation in patients with DGF, while donor type and cold ischemic time were not. Other studies have also shown that recipients of kidneys from donors after cardiocirculatory arrest experience more DGF, but that this does not affect graft survival.(48, 49) Cold ischemic time was not associated with DGF or its functional impact in multivariate analyses, which is probably due to relatively homogeneous and short cold ischemic times at our center (Table 1).

In summary, we show that high titers of anti-LG3 antibodies at the time of transplantation are associated with an increased risk of DGF and with lower long-term renal function post-DGF. Anti-LG3 antibodies also aggravate AKI after IRI in mice, in association with activation of the classical complement pathway in peritubular capillaries, increased tubular activation of the alternative complement pathway at a distance from IRI and increased microvascular damage and involution. Our results identify anti-LG3 antibodies as novel regulators of IRI in renal transplant patients, providing new insights into the pathways that modulate the severity of renal injury at the time of transplantation and their impact on long-term outcomes.

Acknowledgments: This work was supported by a research grant from the Kidney Foundation of Canada (KFOC140012) to HC and a research grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-15447) and Kidney Foundation of Canada to MJH. HC is a research scholar of the Fonds de recherche du Québec (FRQ) santé, and a KRESCENT new investigator. BY is a recipient of a research fellowship from the University of Montreal Nephrology Research Consortium and a CNTRP student.

MJH is the holder of the Shire Chair in Nephrology, Transplantation and Renal Regeneration

of l'Université de Montréal. We thank the J.-L. Levesque Foundation for renewed support.

Disclosure: None.

Figure legends

Figure 1. Patient flow chart

Figure 2. Pre-transplant titers of anti-LG3, anti-AT1R and anti-vimentin antibodies in patients with and without delayed graft function **A.** Pre-transplant anti-LG3 titers in patients who went on to develop delayed graft function (DGF) and those who did not. Mean titers were higher in patients who went on to develop DGF compared to those who did not (251 ± 449 OD versus 118 ± 109 OD, $p = 0.04$). **B.** Mean pre-transplant anti-AT1R levels in patients with and without DGF (14 ± 20 U/ml versus 13 ± 17 U/ml, $p = 0.75$) **C.** Mean pre-transplant anti-vimentin titers in patients with and without DGF (1.9 ± 1.9 sample positivity index versus 1.7 ± 1.7 sample positivity index, $p = 0.66$).

Figure 3. Pre-transplant positivity status for anti-LG3, anti-AT1R and anti-vimentin antibodies in patients with and without delayed graft function. The proportion of patients who were positive for pre-transplant anti-LG3 antibodies (titers >225) was greater in patients who went on to develop DGF than in those who did not (21% versus 9%, $p = 0.03$), while the proportions of patients with positive pre-transplant anti-vimentin or anti-AT1R antibodies were similar in patients who went on to develop DGF and in those who did not (anti-vimentin: 42% versus 43%, $p = 0.87$ and anti-AT1R: 15% versus 14%, $p = 0.89$).

Figure 4. Estimated glomerular filtration rate (eGFR) 1 year after transplantation according to the presence of delayed graft function and positive pre-transplant anti-LG3 antibodies. In patients with delayed graft function, eGFR 1 year post-transplantation was lower in patients with positive pre-transplant anti-LG3 antibodies than in those who were negative (31 ± 18 ml/min/1.73m² versus 47 ± 14 ml/min/1.73m², $p = 0.003$). In contrast, in patients who did not experience delayed graft function, eGFR 1 year post-transplant was not associated with pre-transplant anti-LG3 status (69 ± 28 ml/min/1.73m² versus 61 ± 22 ml/min/1.73m², $p = 0.23$).

Figure 5. Anti-LG3 antibodies aggravate renal dysfunction post-ischemia/reperfusion. A. BUN levels in mice after sham surgery or IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs ($n \geq 4$ per group). **B.** Representative H&E stained kidney sections from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 days (upper panels) and 7 days (lower panels) surgery, black boxes showing

rouleaux formation. Scale bar =50µm. **C.** Tubular injury score in H&E stained kidney sections from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 and 7 days post-surgery. (n≥5 per group) **D.** Quantification of rouleaux formation in H&E stained kidney sections from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 and 7 days post-surgery. (n≥5 per group) **E.** Immunohistochemistry and quantification for activated caspase-3 from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 and 7 days post-surgery (n≥5 per group). Scale bar=50µm.

Figure 6. Anti-LG3 antibodies increase intra-renal C4d deposition post-ischemia/reperfusion. **A.** Immunohistochemistry for C4d deposition in cortico-medullary kidney sections from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 days (upper panels) and 7 days (lower panels) post-surgery (Magnification 200X), black arrowheads indicate positive peritubular capillary, scale bar=50µm. (n≥5 per group) **B.** Number of C4d-positive peritubular capillaries, per 5 randomly chosen high power fields (200X) at the cortico-medullary junction from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 days and 7 days post-surgery (n≥5 per group) **C.** Percentage of C4d positive tubules per 5 randomly chosen high power fields (200X) at the cortico-medullary junction from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 days and 7 days post-surgery (n≥5 per group).

Figure 7. Anti-LG3 antibodies increase intra-renal deposition of membrane attack complex post-ischemia/reperfusion. **A.** Representative MAC immunohistochemistry in cortico-medullary kidney sections from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 days (upper panels) and 7 days (lower panels) post-surgery. (Magnification 200X), black arrowheads indicate positive peritubular capillaries, scale bar=50µm. Lower panels: **B.** Numbers of MAC-positive peritubular capillaries per 5 randomly chosen high power fields (200X) at the cortico-medullary junction from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 and 7 days post-surgery. (n≥5 per group) **C.** Percentage of MAC-positive tubules per 5 randomly chosen high power fields (200X) at the cortico-medullary

junction from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 and 7 days post-surgery. (n≥5 per group).

Figure 8. Anti-LG3 antibodies increase peritubular capillary loss and fibrotic markers post-ischemia/reperfusion. **A.** Immunohistochemistry and quantification of CD31 in kidney sections from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 7 days post-surgery (630X), arrows indicate CD31-positive peritubular capillaries, scale bar=10µm. (n=5 per group). **B.** Immunohistochemistry and quantification of collagen IV in kidney sections from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 7 days post-surgery. (200X) scale bar=50µm. **C.** Immunohistochemistry and quantification of α -SMA in kidney sections from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 7 days post-surgery. (200X) scale bar=50µm.

Supporting information:

Additional Supporting information may be found in the online version of this article:

Supplementary Figures

Figure S1. Anti-LG3, anti-AT1R and anti-vimentin and allosensitizing events and classical autoimmune diseases . Positive pre-transplant anti-AT1R antibody status was more frequent in recipients of a retransplant than in patients with a first kidney transplantation (42% versus 10%, p<0.001). Positive pre-transplant status for anti-LG3 (13% in both groups, p=0.25) and anti-vimentin (50% versus 41%, p=0.42) was similar in patients who had received a previous transplantation compared to those who had not. **B.** Positive pre-transplant status for anti-LG3 (8% versus 14%, p=0.42), anti-AT1R (18% versus 14%, p=0.16), and anti-vimentin (38% versus 44%, p=0.47) were similar in patients who had a history of pregnancy compared to those who did not. **C.** Positive pre-transplant status for anti-LG3 (14% versus 12%, p=0.81), anti-AT1R (19% versus 12%, p=0.27), and anti-vimentin (47% versus 40%, p=0.41) were similar in patients who had a history of transfusions compared to those who did not. **D.** Positive pre-transplant status for anti-LG3 (0% versus 13%, p=0.32), anti-AT1R (0% versus 15%, p=0.60), and anti-vimentin (50% versus 42%, p=0.72) were similar in patients who had a history of autoimmune disease compared to those who did not. **E.** Positive pre-transplant status for anti-LG3 (0% versus 13%, p=0.43), anti-AT1R (33% versus 14%, p=0.17), and anti-

vimentin (33% versus 43%, $p=0.30$) were similar in patients with a pre-transplant cPRA>20% compared to <20%.

Figure S2. A. ELISA dosage of anti-LG3 IgG titers, 2 days post-renal artery clamping, in mice passively transferred with anti-LG3 antibodies or control mouse IgGs ($n\geq 8$ per group). **B.** BUN levels in control, sham operated or IRI mice with/without injection of PBS (vehicle for IgG ctrl and anti-LG3) ($n\geq 4$ per group) 2 days post-renal artery clamping. **C.** Serum creatinine levels in mice passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 days or 7 days post-IRI. **D.** BUN levels in non-operated mice injected with IgG ctrl or anti-LG3 IgGs every 2 days and sacrificed 2 days or 7 days after the second injection.

Figure S3. A. Immunohistochemistry and quantification of C4d staining (superficial cortex) in kidney sections from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 and 7 days post-surgery ($n\geq 5$ per group), black arrowheads indicate positive peritubular capillary, scale bars=50 μ m. **B.** Numbers of C4d-positive peritubular capillaries per 5 randomly chosen high power fields (200X) in superficial cortex of mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 and 7 days post-surgery. ($n\geq 5$ per group).

Figure S4. A. Immunohistochemistry of MAC staining (superficial cortex) in kidney sections from mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 days (upper panels) and 7 days (lower panels) post-surgery ($n\geq 5$ per group), arrowheads indicate positive peritubular capillary, bar scales=50 μ m. **B.** Numbers of MAC-positive peritubular capillaries per 5 randomly chosen high power fields (200X) in superficial cortex of mice submitted to IRI and passively transferred with anti-LG3 IgGs or control mouse IgGs and sacrificed 2 and 7 days post-surgery. ($n\geq 5$ per group)

References

1. Cavaille-Coll M, Bala S, Velidedeoglu E, Hernandez A, Archdeacon P, Gonzalez G, et al. Summary of FDA workshop on ischemia reperfusion injury in kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13(5):1134-48.
2. Irish WD, McCollum DA, Tesi RJ, Owen AB, Brennan DC, Bailly JE, et al. Nomogram for predicting the likelihood of delayed graft function in adult cadaveric renal transplant recipients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2003;14(11):2967-74.
3. Lechevallier E, Dussol B, Luccioni A, Thirion X, Vacher-Copomat H, Jaber K, et al. Posttransplantation acute tubular necrosis: risk factors and implications for graft survival. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1998;32(6):984-91.
4. Yarlagadda SG, Coca SG, Garg AX, Doshi M, Poggio E, Marcus RJ, et al. Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2008;23(9):2995-3003.
5. Wu WK, Famure O, Li Y, Kim SJ. Delayed graft function and the risk of acute rejection in the modern era of kidney transplantation. *Kidney international*. 2015.
6. Legendre C, Canaud G, Martinez F. Factors influencing long-term outcome after kidney transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2014;27(1):19-27.
7. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Jr., Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2009;24(3):1039-47.
8. Boom H, Mallat Mj Fau - de Fijter JW, de Fijter Jw Fau - Zwinderman AH, Zwinderman Ah Fau - Paul LC, Paul LC. Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney international*. 2000(Aug 58(2)):859-62.
9. Lapointe I, Lachance Jg Fau - Noel R, Noel R Fau - Cote I, Cote I Fau - Caumartin Y,

Caumartin Y Fau - Agharazii M, Agharazii M Fau - Houde I, et al. Impact of donor age on long-term outcomes after delayed graft function: 10-year follow-up. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2013; Feb;26(2)(1432-2277 (Electronic)):162-9.

10. Verma SK, Molitoris BA. Renal endothelial injury and microvascular dysfunction in acute kidney injury. *Seminars in nephrology*. 2015;35(1):96-107.

11. Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney international*. 2007;72(2):151-6.

12. Bharat A, Saini D, Steward N, Hachem R, Trulock EP, Patterson GA, et al. Antibodies to self-antigens predispose to primary lung allograft dysfunction and chronic rejection. *Ann Thorac Surg*. 2010;90(4):1094-101. doi: 10.16/j.athoracsur.2010.06.009.

13. Dragun D, Muller DN, Brasen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelha M, Dechend R, et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2005;352(6):558-69.

14. Gao B, Moore C, Porcheray F, Rong C, Abidoglu C, DeVito J, et al. Pretransplant IgG reactivity to apoptotic cells correlates with late kidney allograft loss. *Am J Transplant*. 2014;14(7):1581-91. doi: 10.1111/ajt.12763. Epub 2014 Jun 16.

15. Jurcevic S, Ainsworth ME, Pomerance A, Smith JD, Robinson DR, Dunn MJ, et al. Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation. *Transplantation*. 2001;71(7):886-92.

16. Mahesh B, Leong HS, McCormack A, Sarathchandra P, Holder A, Rose ML. Autoantibodies to vimentin cause accelerated rejection of cardiac allografts. *Am J Pathol*. 2007;170(4):1415-27.

17. Cardinal H, Dieude M, Brassard N, Qi S, Patey N, Soulez M, et al. Antiperlecan antibodies are novel accelerators of immune-mediated vascular injury. *Am J Transplant*. 2013;13(4):861-74.

18. Zhang M, Alicot EM, Carroll MC. Human natural IgM can induce ischemia/reperfusion injury in a murine intestinal model. *Molecular immunology*. 2008;45(15):4036-9.

19. Zhang M, Carroll MC. Natural IgM-mediated innate autoimmunity: a new target for early intervention of ischemia-reperfusion injury. *Expert opinion on biological therapy*.

2007;7(10):1575-82.

20. Zhang M, Austen WG, Jr., Chiu I, Alicot EM, Hung R, Ma M, et al. Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.

2004;101(11):3886-91.

21. Lukitsch I, Kehr J, Chaykovska L, Wallukat G, Nieminen-Kelha M, Batuman V, et al. Renal ischemia and transplantation predispose to vascular constriction mediated by

angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies. *Transplantation*. 2012;94(1):8-13. doi:

0.1097/TP.0b013e3182529bb7.

22. Shaffi K, Uhlig K, Perrone RD, Ruthazer R, Rule A, Lieske JC, et al. Performance of creatinine-based GFR estimating equations in solid-organ transplant recipients. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*.

2014;63(6):1007-18.

2014;63(6):1007-18.

23. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant*. 2014;14(2):272-83.

2014;14(2):272-83.

24. Wei Q, Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and

tricks. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(11):F1487-94. .

25. Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJ, Kirschning CJ, et al.

Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest*.

2005;115(10):2894-903.

26. McCullough JW, Renner B, Thurman JM. The role of the complement system in acute

kidney injury. *Semin Nephrol*. 2013;33(6):543-56. doi: 10.1016/j.semnephrol.2013.08.005.

27. Ponticelli C. Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney

transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(6):1134-40. doi: 10.093/ndt/gft488. Epub

2013 Dec 10.

28. Irish WD, Ilesley JN, Schnitzler MA, Feng S, Brennan DC. A risk prediction model for delayed graft function in the current era of deceased donor renal transplantation. *Am J*

Transplant. 2010;10(10):2279-86. doi: 10.1111/j.600-6143.2010.03179.x.

29. Thurman JM. Altered renal tubular expression of the complement inhibitor Crry

permits complement activation after ischemia/reperfusion. *Journal of Clinical Investigation*.

2006;116(2):357-68.

30. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature reviews Nephrology*. 2011;7(4):189-200.
31. Molitoris BA. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(6):2355-63.
32. Basile DP, Friedrich JL, Spahic J, Knipe N, Mang H, Leonard EC, et al. Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2011;300(3):F721-F33.
33. Horbelt M, Lee Sy Fau - Mang HE, Mang He Fau - Knipe NL, Knipe Nl Fau - Sado Y, Sado Y Fau - Kribben A, Kribben A Fau - Sutton TA, et al. Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;sep(1931-857X (Print)).
34. Basile DP, Yoder MC. Renal endothelial dysfunction in acute kidney ischemia reperfusion injury. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2014;14(1):3-14.
35. Soulez M, Pilon Ea Fau - Dieude M, Dieude M Fau - Cardinal H, Cardinal H Fau - Brassard N, Brassard N Fau - Qi S, Qi S Fau - Wu S-J, et al. The perlecan fragment LG3 is a novel regulator of obliterative remodeling associated with allograft vascular rejection. *Circ Res*. 2012;110(1524-4571 (Electronic)).
36. Dieude M, Bell C, Turgeon J, Beillevaire D, Pomerleau L, Yang B, et al. The 20S proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection. *Sci Transl Med*. 2015;7(318):318ra200. doi: 10.1126/scitranslmed.aac9816.
37. Haase M, Bellomo R, Albert C, Vanpoucke G, Thomas G, Laroy W, et al. The identification of three novel biomarkers of major adverse kidney events. *Biomark Med*. 2014;8(10):1207-17. doi: 10.2217/bmm.14.90.
38. Sutton TA, Mang HE, Campos SB, Sandoval RM, Yoder MC, Molitoris BA. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(2):F191-8. Epub 2003 Apr 8.
39. Giral M, Foucher Y, Dufay A, Van Huyen JP, Renaudin K, Moreau A, et al. Pretransplant sensitization against angiotensin II type 1 receptor is a risk factor for acute

rejection and graft loss. *Am J Transplant*. 2013;13(10):2567-76.

40. Angaswamy N, Klein C, Tiriveedhi V, Gaut J, Anwar S, Rossi A, et al. Immune responses to collagen-IV and fibronectin in renal transplant recipients with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant*. 2014;14(3):685-93.
41. Joosten SA, Sijpkens YW, van Ham V, Trouw LA, van der Vlag J, van den Heuvel B, et al. Antibody response against the glomerular basement membrane protein agrin in patients with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant*. 2005;5(2):383-93.
42. Besarani D, Cerundolo L, Smith JD, Procter J, Barnardo MC, Roberts IS, et al. Role of anti-vimentin antibodies in renal transplantation. *Transplantation*. 2014;98(1):72-8.
43. Riemekasten G, Philippe A, Nather M, Slowinski T, Muller DN, Heidecke H, et al. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(3):530-6. doi: 10.1136/ard.2010.135772. Epub 2010 Nov 15.
44. Becker MO, Kill A, Kutsche M, Guenther J, Rose A, Tabeling C, et al. Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(7):808-17. doi: 10.1164/rccm.201403-0442OC.
45. Kill A, Tabeling C, Undeutsch R, Kuhl AA, Gunther J, Radic M, et al. Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):R29. doi: 10.1186/ar4457.
46. Xiong J, Liang Y, Yang H, Zhu F, Wang Y. The role of angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies in patients with lupus nephritis. *Int J Clin Pract*. 2013;67(10):1066-7. doi: 10.1111/ijcp.12242.
47. Hirt-Minkowski P, Roth M, Honger G, Amico P, Hopfer H, Schaub S. Soluble CD30 correlates with clinical but not subclinical renal allograft rejection. *Transpl Int*. 2013;26(1):75-83. doi: 10.1111/j.1432-2277.012.01578.x. Epub 2012 Nov 8.
48. Summers DM, Johnson RJ, Allen J, Fuggle SV, Collett D, Watson CJ, et al. Analysis of factors that affect outcome after transplantation of kidneys donated after cardiac death in the UK: a cohort study. *Lancet*. 2010;376(9749):1303-11. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60827-6. Epub 2010 Aug 18.
49. Singh RP, Farney AC, Rogers J, Zuckerman J, Reeves-Daniel A, Hartmann E, et al. Kidney transplantation from donation after cardiac death donors: lack of impact of delayed

graft function on post-transplant outcomes. Clin Transplant. 2011;25(2):255-64. doi:
10.1111/j.399-0012.2010.01241.x.

Figure 1.

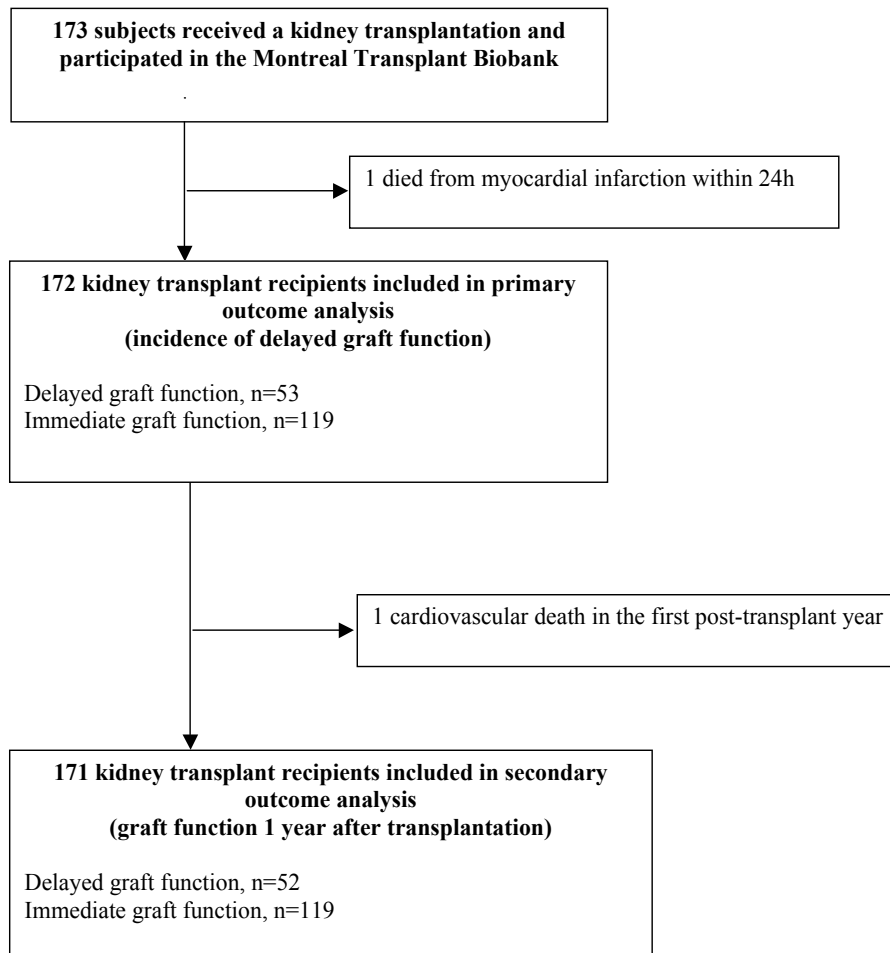


Figure 2.

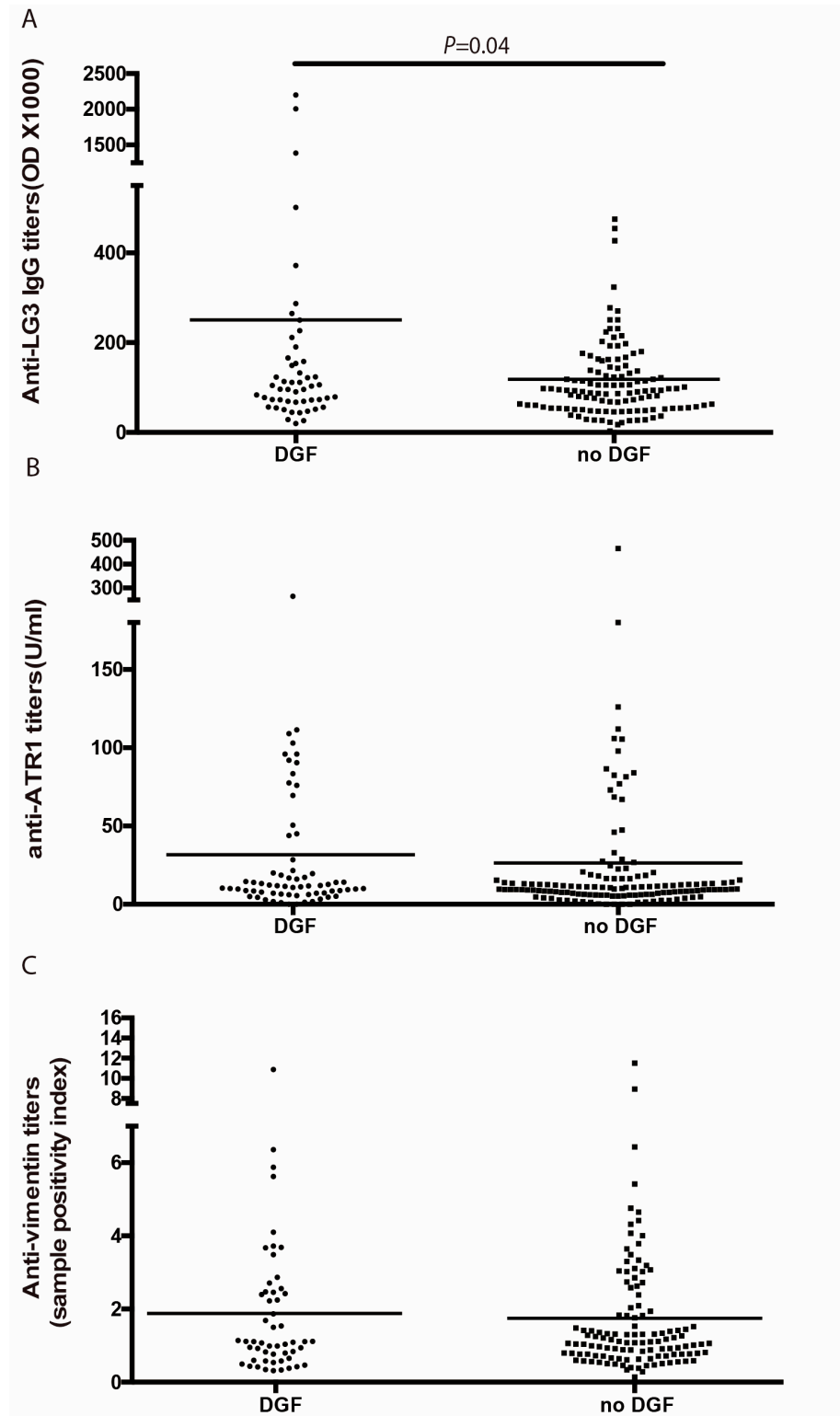


Figure 3

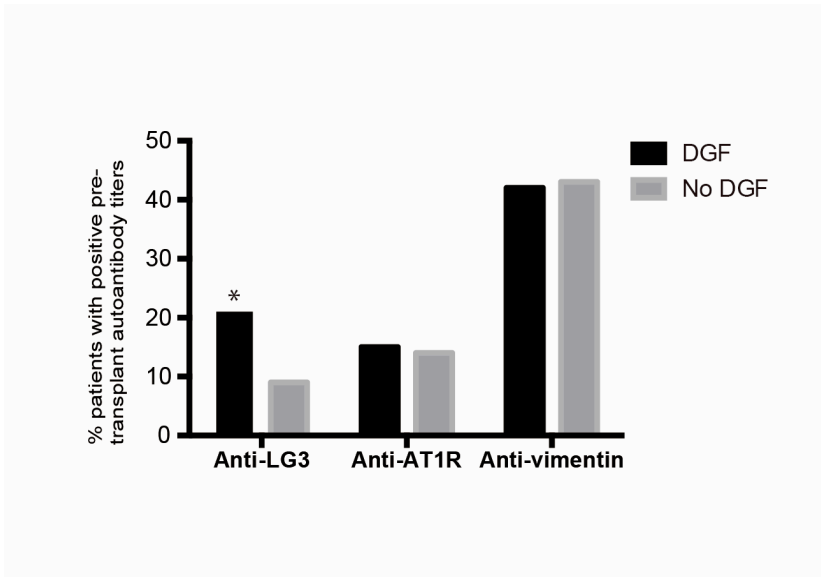


Figure 4

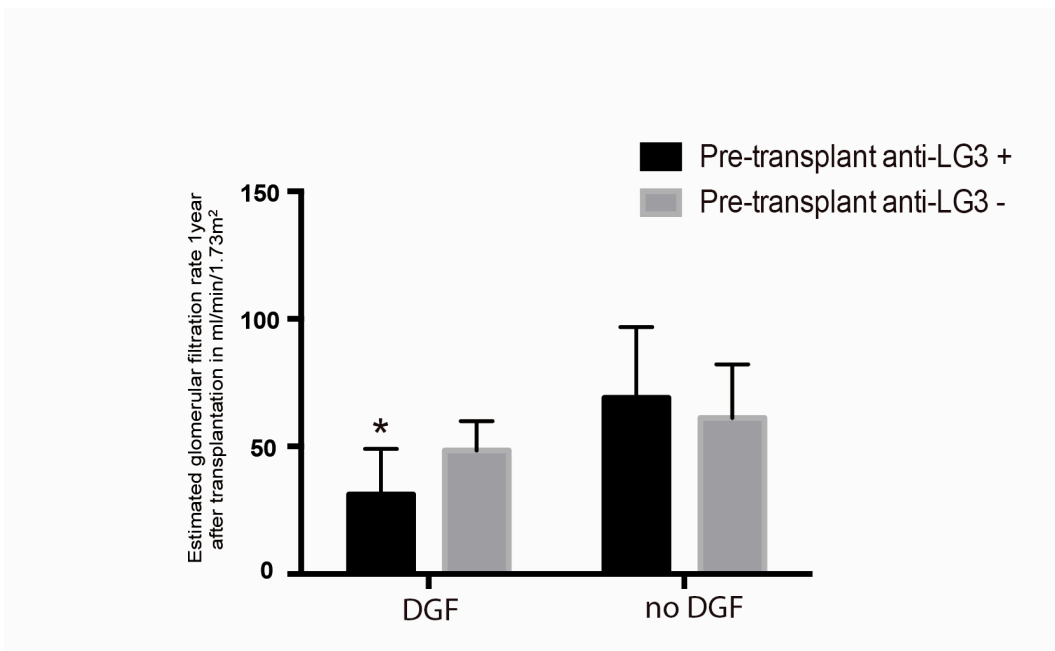


Figure 5

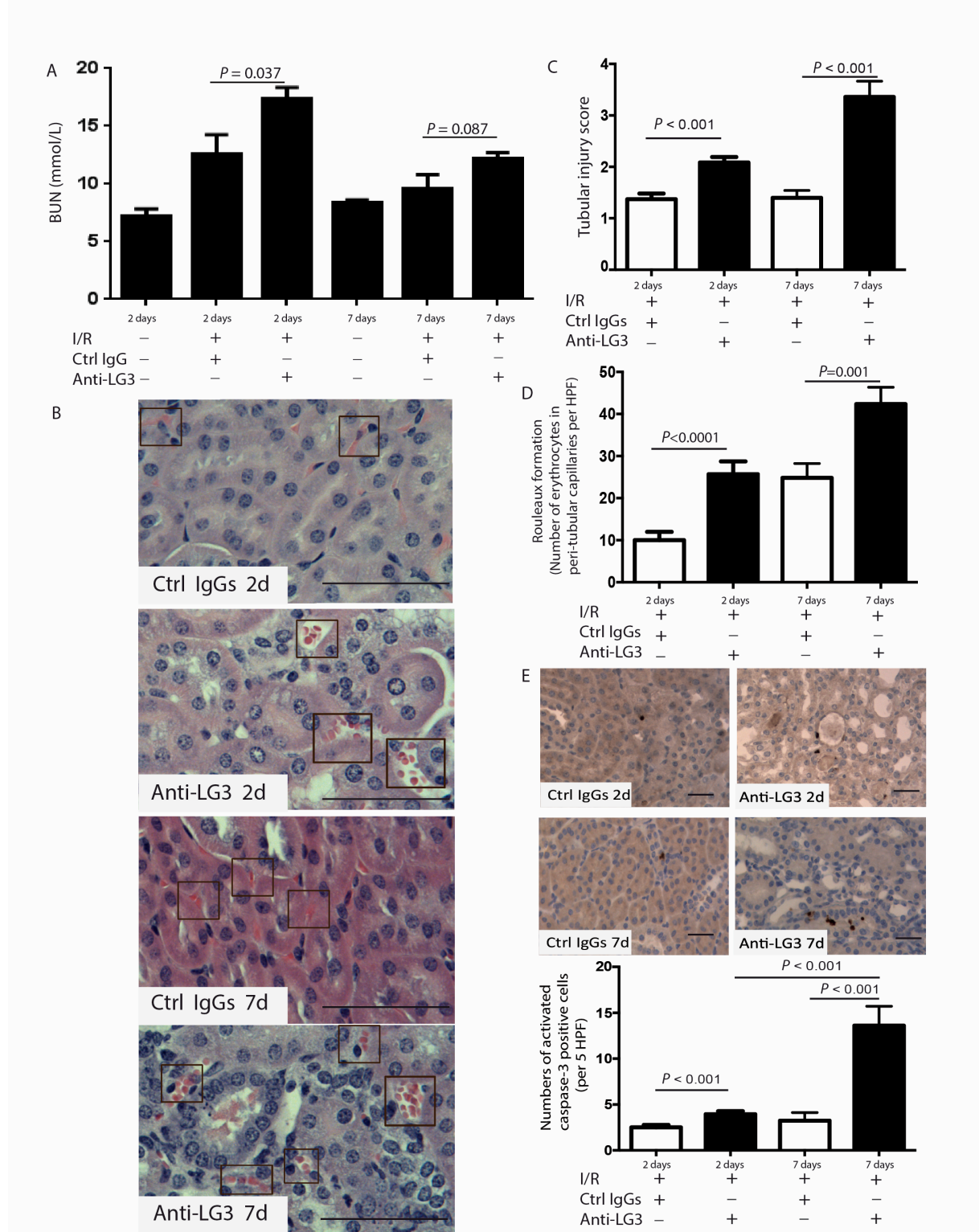
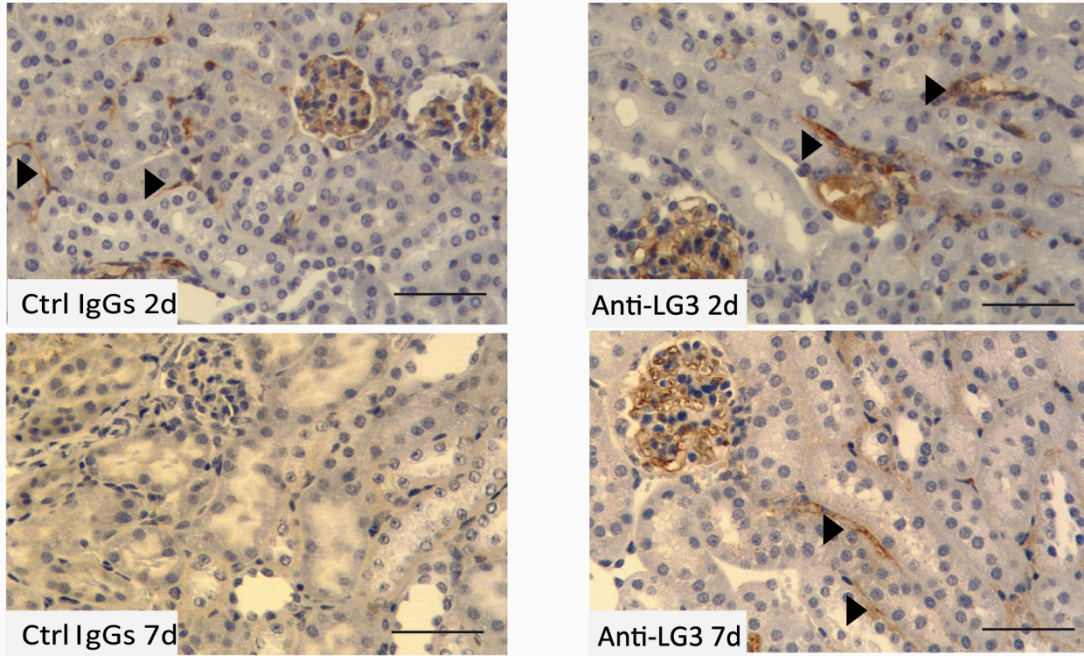
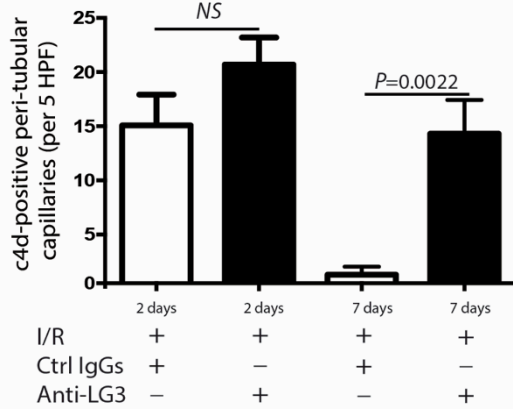


Figure 6

A. C4d staining at renal cortical medullary junction



B



C

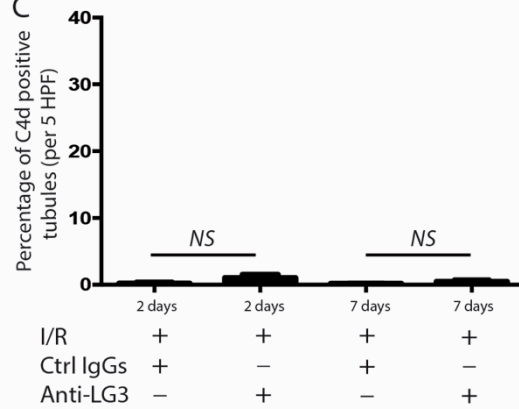


Figure 7

A. MAC staining at renal cortical medullary junction

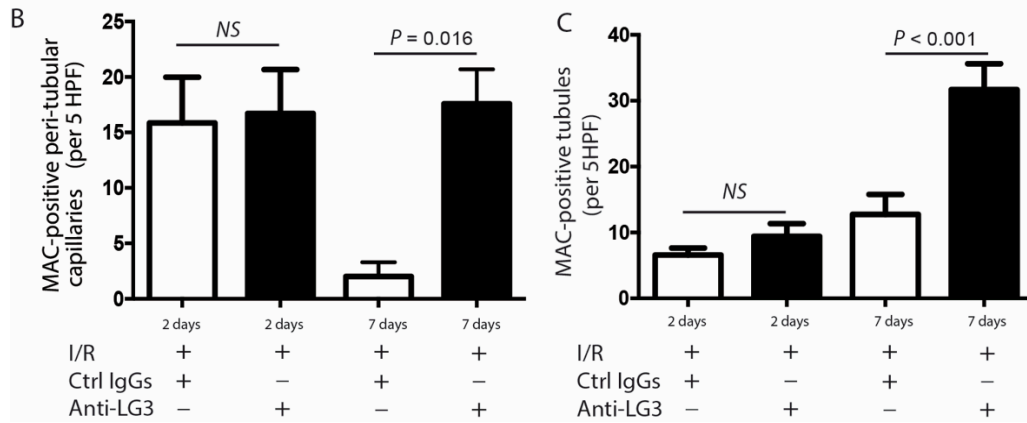
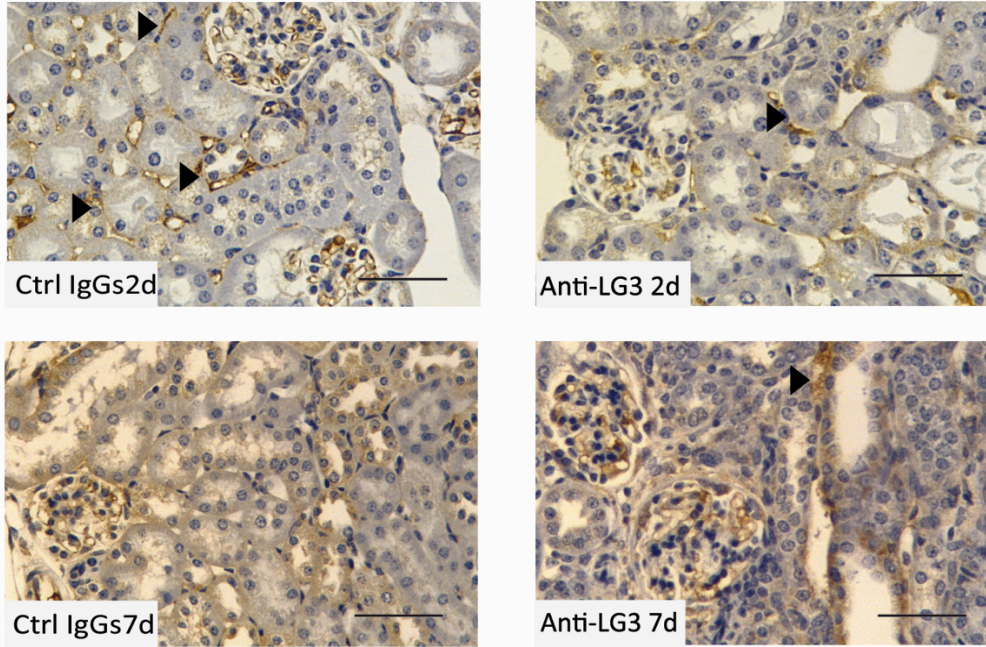


Figure 8

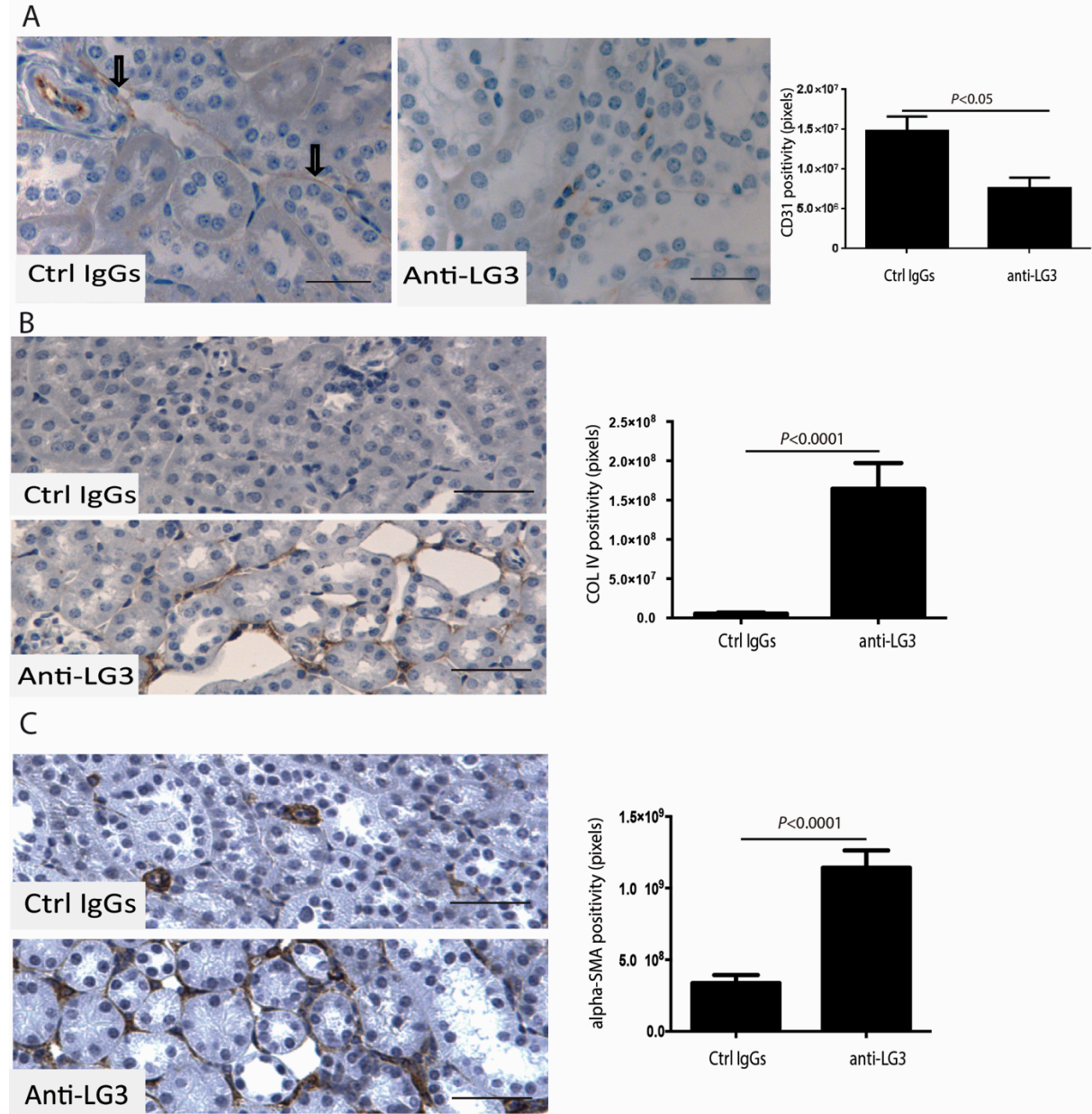


Figure S1

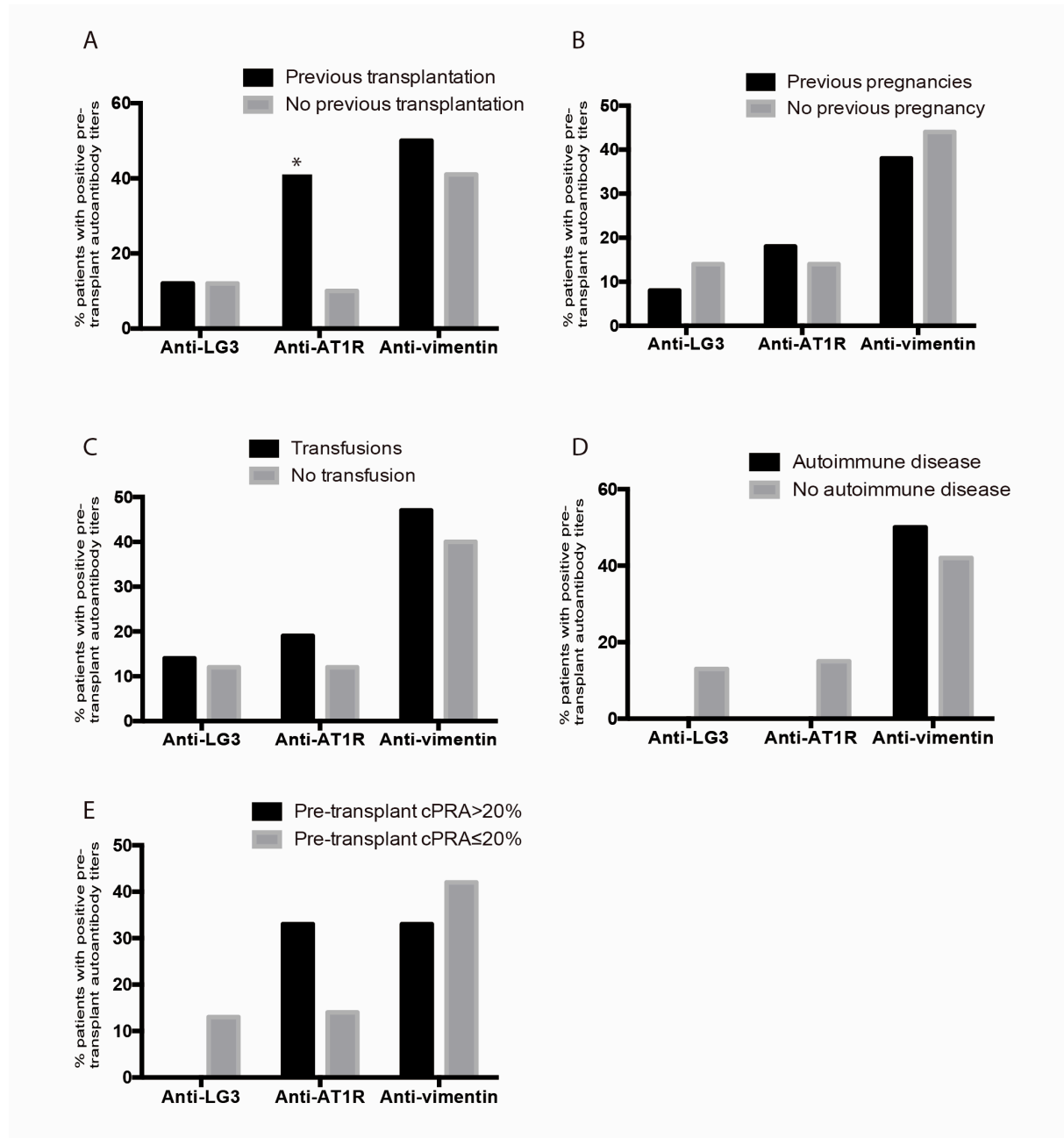


Figure S2

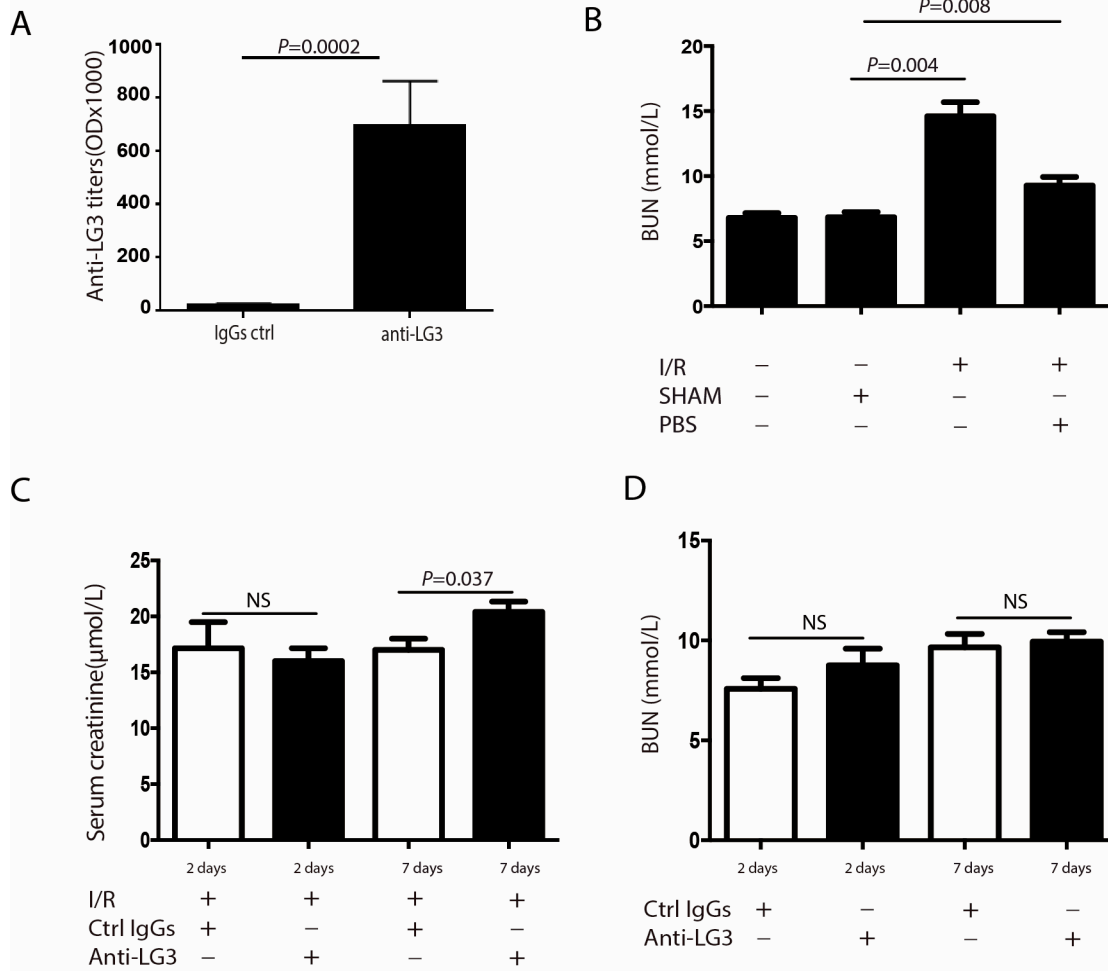


Figure S3

A. C4d staining in renal superficial cortex

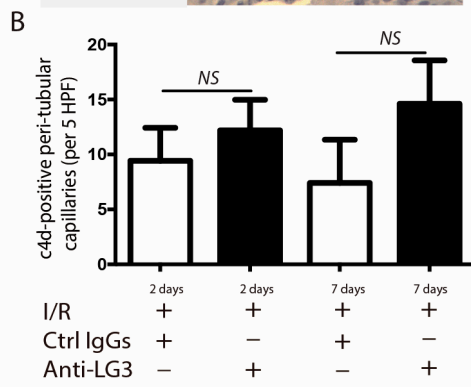
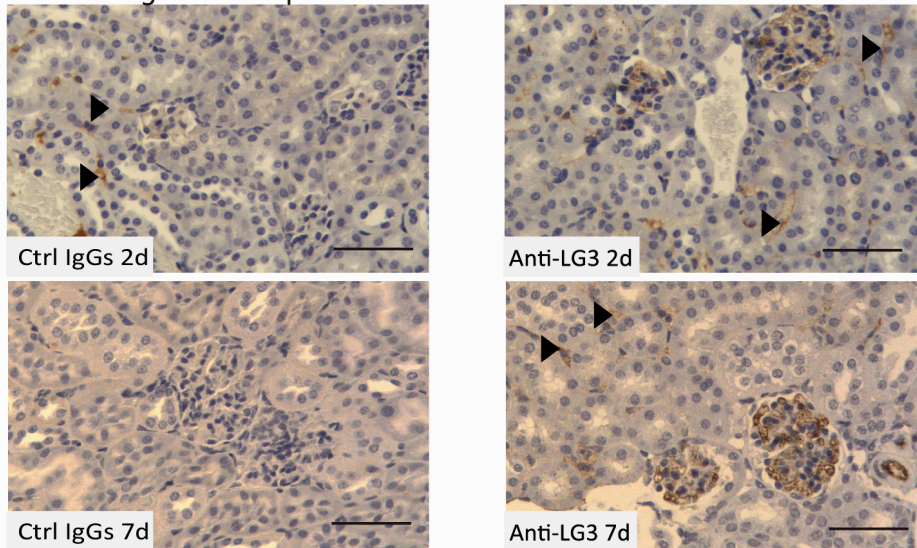


Figure S4

A. MAC staining in renal superficial cortex

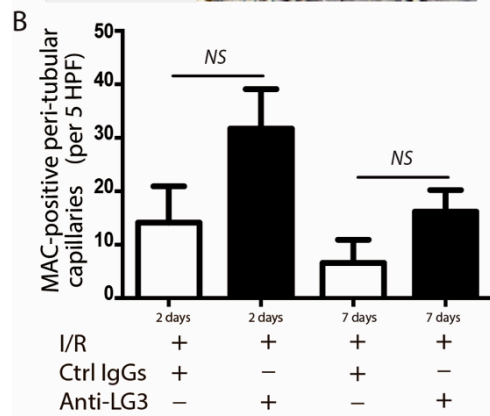
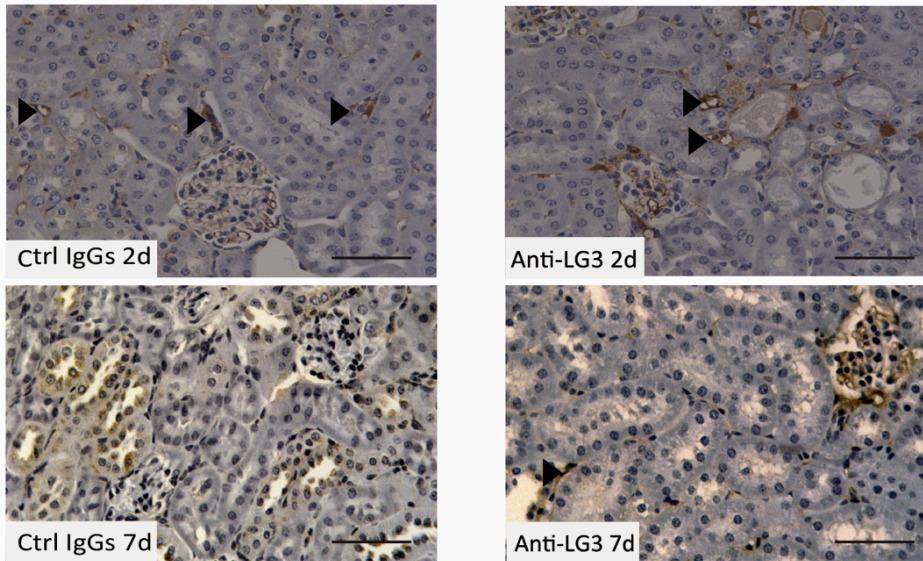


Table 1. Recipient and donor characteristics (n=172)

Mean age in years (standard deviation (SD))	50 (12)
Male gender (%)	107 (62)
Race (%)	
Caucasian	149 (86)
Black	13 (8)
Other	10 (6)
Cause of chronic kidney disease*	
Glomerular diseases (%)	51 (30)
Diabetes	25 (15)
Hypertension/vascular	9 (5)
Polycystic kidney diseases	39 (23)
Autoimmune diseases	8 (5)
Other	47 (27)
Pre-transplant CDC panel reactive antibodies >20% (%)	6 (4)
First transplantation (%)	148 (86)
Donor type	
Living donor (%)	69 (40)
Deceased donor	
Neurological determination of death (%)	96 (56)
Donor after cardiocirculatory arrest (%)	7 (4)
Mean cold ischemic time in hours (SD)	8 (5)
Mean donor age in years (SD)	47 (14)
Donor with hypertension or diabetes (%)	21 (12)
Mean donor height in meters (SD)	1.67 (0.1)
Induction*	
Thymoglobulin (%)	52 (30)
Anti-CD25 (%)	131 (76)

*Number of patients exceeds 172 in ‘cause of kidney disease’ and ‘induction’ as some patients had 2 listed causes for chronic kidney disease or received more than 1 type of induction

Table 2. Factors associated with delayed graft function

	Univariate OR 95% CI	Multivariate OR 95% CI
Positive pre-transplant anti-LG3 titers§	2.57 (1.03-6.38)*	2.77 (1.01-7.68)*
Female gender (versus male)	0.32 (0.15- 0.67)*	0.35 (0.16-0.79)*
Donor type (versus living donor)		
Donor after neurological determination of death	2.85 (1.35-6.02)*	2.89 (1.31- 6.36)*
Donor after cardiocirculatory arrest	11.88 (2.05-68.61)*	16.00 (2.32-110.75)*
Donor height (per 10-cm increase)	0.67 (0.48-0.94)	0.64 (0.44- 0.91)*
Acute rejection in the first 3 weeks post-transplant	1.66 (0.50-5.51)	-
Donor age >60 years	1.82 (0.77-4.28)	-
Cold ischemic time (per hour increase)	1.06 (1.00- 1.12)*	-
Recipient body mass index (per 1-unit increase)	1.07 (1.00- 1.16)	-
Positive pre-transplant anti-vimentin antibodies§	0.95 (0.48-1.89)	-
Positive pre-transplant anti-AT1R antibodies§	1.10 (0.42-2.91)	

OR: odds ratio, CI: confidence interval, * p<0.05, § pre-transplant anti-LG3 titers >225, pre-transplant anti-vimentin titers ≥ 1.31 sample positivity index and pre-transplant anti-AT1R antibodies > 17 U/ml

Table 3. Factors associated with graft function 1 year after transplantation in patients with delayed graft function

	Univariate β 95% CI	Multivariate β 95% CI
Positive pre-transplant anti-LG3 titers §	-14 (-25, -3)*	-15 (-24, -5)*
Donor age (per 10-year increase)	-2 (-5, 0)	-3 (-19, 0)*
Donor type (reference living donor)		
Donor after neurological determination of death	2 (-8, 13)	2 (-7, 12)
Donor after cardiocirculatory arrest	7 (-10, 24)	4 (-11, 18)
Donor height (per 10 cm increase)	4 (0, 8)*	4 (1, 8)*
Rejection in the first post-transplant year	-1 (-11, 8)	
Female gender	-3 (-13, 8)	
Cold ischemic time (per hour increase)	0 (-1, 0)	
Positive pre-transplant anti-vimentin antibodies §	-6 (-15, 2)	
Positive pre-transplant anti-AT1R antibodies §	0 (-12, 11)	

β : beta coefficient, CI: confidence interval, * $p < 0.05$, § pre-transplant anti-LG3 titers > 225 , pre-transplant anti-vimentin titers ≥ 1.31 sample positivity index and pre-transplant anti-AT1R antibodies > 17 U/ml

Article 3.

Autophagy drives fibroblast senescence through MTORC2 regulation

Auteurs: Monique Bernard[#], Bing Yang[#], Mélanie Dieudé, Guillaume Cardin, Marc-Alexandre Olivier, Mostafa El-Diwany, Katy Underwood, Francis Rodier* and Marie-Josée Hébert*

Les co-premiers auteurs

* Les co-auteurs correspondants

En préparation

Bing Yang et Monique Bernard ont contribué de manière égale dans cet article, elles ont élaboré les hypothèses de travail avec Marie-Josée Hébert et Francis Rodier. Elles ont planifié et réalisé les expériences de cet article. Elles ont analysé et interprété les résultats générés. Enfin, elles ont participé à la rédaction du manuscrit avec Marie-Josée Hébert et Francis Rodier.

Mélanie Dieudé a participé dans l'analyse des résultats et a également participé à la correction du manuscrit.

Guillaume Cardin et Marc-Alexandre Olivier ont réalisé les infections aux shARN p53 et shARN p16

Mostafa El-Diwany a compté les cellules de coloration SA-beta-galactosidase

Katy Underwood a réalisé de Western Blots

Marie-Josée Hébert et Francis Rodier ont dirigé et supervisé l'ensemble de ce travail, de la génération des hypothèses à la rédaction du manuscrit.

ABSTRACT

Sustained autophagy favors differentiation of fibroblasts into myofibroblasts. Autophagy induces mammalian target of rapamycin complex 2 (MTORC2) activity, leading to up-regulation of the pro-fibrotic cytokine connective tissue growth factor, but is also linked to cellular senescence. Here, we evaluate the relationship between senescence and myofibroblast differentiation in the context of sustained autophagy. We analyzed markers of cell cycle arrest/senescence in fibroblasts *in vitro*, where autophagy was triggered by serum starvation (SS). Autophagic fibroblasts expressed the senescence biomarkers CDKN1A (p21) and p16INK4a (p16) and exhibited increased senescence-associated beta-galactosidase activity. Inhibition of autophagy in serum-starved fibroblasts with 3-methyladenine, LY294002 or *autophagy gene 7* silencing prevented the expression of senescence-associated markers. Similarly, suppressing MTORC2 activation using rapamycin, Torin 1 or by silencing *RICTOR* also prevented senescence hallmarks. Reactive oxygen species (ROS) are known inducers of senescence, and indeed, exposing fibroblasts to N-acetyl-L-cysteine (NAC) decreased ROS production during SS, inhibited autophagy and significantly reduced the expression of senescence and myofibroblast differentiation markers. NAC also curbed the phosphorylation of AKT serine 473, a MTORC2 target, establishing the importance of ROS in fuelling MTORC2 activation. Inhibition of senescence by shRNAp53 and p16 increased myofibroblast differentiation marker. Using fluorescent microscopy, we found that senescence and myofibroblast differentiation markers occur in different cells, suggesting a negative regulation of senescence on myofibroblast differentiation by paracrine. Collectively, our results identify ROS production in association with sustained autophagy as novel inducers of MTORC2 signalling which in turn, concomitantly activate senescence and myofibroblast differentiation.

INTRODUCTION

Characterized by abnormal accumulation of myofibroblasts, fibrosis leads to extracellular matrix (ECM) protein overproduction, ECM thickening, loss of normal tissue architecture and organ functions. Fibrosis is considered a consequence of abnormal tissue repair.¹ Mounting evidence suggests that senescence is implicated in tissue repair^{2, 3} and that impaired senescence plays a central role in abnormal repair processes. Both enhanced and decreased cellular senescence have been linked to fibrosis, suggesting that timing of the senescence process, the cell types at play and the downstream pathways triggered by senescence induction weave a complex interplay of responses that may be either beneficial or detrimental to tissue repair.

In a murine model of liver injury, genetic invalidation of the central senescence gene *p53* significantly increased liver fibrosis after carbon tetrachloride treatment.⁴ In another model, mice with specific *CCNI* deletion in hepatocytes developed fibrosis concomitantly with a deficit in cellular senescence.⁵ CCN1 is a matricellular protein involved in tissue repair, and similarly during skin repair, *CCNI* knockout mice present decreased p16- and p53-pathway activation after injury and develop more pronounced fibrosis.⁶ However, increased p53 signaling levels, achieved by hepatocyte-specific *MDM2* deletion, induce connective tissue growth factor (CTGF) synthesis by mouse hepatocytes and result in liver fibrosis.⁷ In a model of pulmonary fibrosis, *caveolin-1* deficient mice were protected from bleomycin-induced fibrosis, correlating with senescence pathway down-regulation in the epithelium.⁸ Importantly, a recent model clearly reveal that senescent cells are induced in a controlled manner to functionally participate in efficient tissue repair.^{2,9}

Autophagy has also been linked with abnormal tissue repair and fibrosis.^{8, 10} Cross-talk between autophagy and senescence in fibroblasts has already been studied with context-dependent contradictory results.^{11,12} For example, in the context of chemotherapy- or oncogenic Ras-induced senescence, the inhibition of autophagy delayed the expression of senescence markers.^{13, 14} In contrast, primary human cells prematurely entered telomere- and stress-mediated replicative senescence when autophagy was perturbed.¹⁵ In addition to senescence-associated growth arrest, autophagy is also involved in regulating the pro-inflammatory secretome of senescent cells, and opposing effects of autophagy in this context

are probably explained by negative regulation during early senescence commitment, and positive regulation when cells become completely senescent.¹⁶⁻¹⁹

Here, we considered the interlaced relationship between autophagy and senescence from another angle. We showed recently that sustained autophagy evokes myofibroblast differentiation through MTORC2 activation, culminating in CTGF up-regulation.²⁰ We thus induced autophagy in this pure *in vitro* model: a well-known primary fibroblast culture in which autophagy was initiated using serum starvation, and sought to clarify whether autophagy-induced MTORC2 activation regulates senescence development concomitantly with the initiation of myofibroblast differentiation.

Results

Autophagy induced by prolonged serum starvation is central to senescence.

WI-38 human embryonic lung fibroblasts were exposed to serum-free (serum starvation) medium (SS) to evaluate the functional importance of growth factor deprivation in the simultaneous activation of autophagy, senescence and myofibroblast differentiation. CDKN1A/p21 protein, a marker of both cell-cycle arrest and senescence,²¹ increased rapidly in serum-starved fibroblasts for about 4 hours followed by a progressive decline, suggesting a role in immediate growth arrest (**Fig. 1A**). Alternatively, p16INK4a/p16 protein, another cell-cycle arrest and a reliable cell senescence and age biomarker,²²⁻²⁵ was stably induced in serum-starved fibroblasts (**Fig. 1B**). Similarly, senescence-associated-beta-galactosidase (SA- β -gal) activity²⁶ was also induced in fibroblasts serum starved for 7 days (**Fig. 1C**). As reported previously²⁰ prolonged serum starvation decreased SQSTM1 protein level, a marker of autophagy induction, and increased ACTA2/aSMA (actin, alpha 2, smooth muscle, aorta) protein level, a marker of myofibroblast differentiation (**Fig. 1A and 1B**). These results suggest that autophagy and myofibroblast differentiation are associated with the induction of senescence in long-term serum-starved fibroblasts.

We next evaluated whether markers of senescence were more directly modulated by autophagy. We used the class I phosphoinositide 3-kinase/class III phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns3K) inhibitors 3-methyladenine (3-MA) and LY294002 (LY), both of which are known to curtail PtdIns3K in starved cells²⁷⁻²⁹. PtdIns3K activity is necessary for autophagosome formation.³⁰ As expected,²⁰ 3-MA and LY prevented the enhancement of LC3-II/I ratios (**Fig. 2A and 2B**) and blocked ACTA2 up-regulation (**Fig. 2A and 2B**). 3-MA and LY also inhibited CDKN1A and p16INK4a up-regulation as well as SA- β -gal activity (**Fig. 2A, 2B, 2D, 2E**). To further assess the importance of sustained autophagy in the induction of senescence markers, we silenced *autophagy gene 7 (ATG7)*³¹ in serum starved fibroblasts. *siATG7* decreased LC3-II/I ratios (**Fig. 2C**) and prevented ACTA2 and p16INK4a expression (**Fig. 2C**). These results indicate that autophagy is instrumental in triggering pathways to senescence and myofibroblast differentiation.

Implication of MTORC2 in autophagy-induced senescence.

MTORC2 is responsible for AKT phosphorylation at Ser473.³² We showed previously that prolonged autophagy activates MTORC2 leading to AKT phosphorylation at Ser473.²⁰ Inhibiting MTORC2 with rapamycin (R),³² Torin 1³³ or by silencing *RICTOR*, an essential component of MTORC2³⁴ suppresses AKT phosphorylation at Ser473 in serum-starved fibroblasts.²⁰ These results motivated us to investigate whether the expression of senescence markers in fibroblasts exposed to prolonged SS is also under MTORC2 control.

Prolonged exposure of serum-starved fibroblasts to rapamycin prevented phosphorylation of the MTORC2 target AKT without reducing LC3-II/-I ratios (**Fig. 3A**). Serum-starved fibroblasts exposed to R showed lowered CDKN1A and p16INK4a protein levels and decreased SA- β -gal activity (**Fig. 3A and 3D**). Long-term R treatment of serum-starved fibroblasts also reduced ACTA2 expression (**Fig. 3A**). Exposing serum-starved fibroblasts to Torin 1 and *siRICTOR* also decreased the expression of senescence and myofibroblast differentiation markers (**Fig. 3B, 3C, 3E**). Collectively, these results suggest that autophagy-induced MTORC2 activation concomitantly controls the expression of senescence markers and myofibroblast differentiation.

Reactive oxygen species (ROS) are involved in MTORC2-signaling, senescence and myofibroblast differentiation during sustained autophagy.

ROS are well described inducers of autophagy³⁵ and senescence,³⁶ but depending on cell type and stress conditions, ROS are also known to participate in myofibroblast differentiation.³⁷ We sought to investigate the role played by ROS in autophagy-induced senescence and myofibroblast differentiation. First, we evaluated ROS production in serum-starved fibroblasts. ROS were increased in cells starved for 1 or 4 hours (**Fig 4A**). Incubating cells with N-acetyl-L-cysteine (NAC) during SS blocked ROS production in serum-starved cells (**Fig 4A**). NAC prevented the increment of LC3-II/-I ratios, obstructed CDKN1A and p16INK4a expression, and inhibited the up-regulation of CTGF and ACTA2 (**Fig 4B**). NAC also inhibited increased SA- β -gal activity (**Fig 4D**). We, therefore, undertook to verify if ROS are central to MTORC2 activation in serum-starved fibroblasts. Chelating ROS in serum-starved fibroblasts with NAC significantly reduced AKT phosphorylation at Ser473 (**Fig. 4C**). These results indicate that, in serum-starved fibroblasts, increased ROS production is a central trigger for autophagy induction which, in turn, activates MTORC2 and evokes downstream induction of senescence and myofibroblast differentiation.

Inhibition of senescence leads to upregulated myofibroblast differentiation.

To explore the relationship between senescence pathways and myofibroblast differentiation, we used RNA interference to stably suppress p16 and p53 expression in serum-starved fibroblasts. To avoid the possible compensation between two senescent pathways, we used two short hairpin RNA (shRNA), one is capable of suppressing p16 expression and the other is capable of suppressing p53 expression. These two shRNA was introduced into proliferating WI38 cells using retroviral vector.^{38, 39} Serum-starved fibroblasts transfected by shRNA p53 and shRNA p16 showed significant suppression of p16 and p21, as shown by WB (Figure 5A), and inhibition of senescence, as demonstrated by decreased SA- β -gal activity. (Fig 5B) We then evaluated myofibroblast differentiation in these cells, we found that serum-starved fibroblasts transfected by shRNA p53 and shRNA p16 have increased myofibroblast differentiation as shown by WB ACTA2, in absence of increased mTORC2 activity as shown by WB AKT phosphorylation at Ser473. (Fig 5A). These results suggest a negative regulation of senescence on myofibroblast differentiation

Cellular senescence and myofibroblast differentiation are not concomitantly activated in the same cells

We evaluate, in serum-starved fibroblasts, whether senescence and myofibroblast differentiation occur in the same cells. C12FDG (5-Dodecanoylamino fluorescein Di- β -D-Galactopyranoside) is a β -galactosidase substrate, its cleavage by β -galactosidase produces a fluorescent product that is well retained by the cells. By using C12FDG and immunofluorescent staining of ACTA2, we demonstrated that increased SA- β -gal activity and ACTA2 do not occur in the same cells. (Fig 6)

DISCUSSION

Previous work has shown that autophagy and senescence affect tissue repair and that abnormal tissue repair can result in fibrosis.^{2, 3, 10, 40} In the present study, we focus on fibroblasts and the links between autophagy and senescence that may participate myofibroblast differentiation, with myofibroblasts being major cellular determinants of ECM thickening seen in fibrosis. We found that ROS and sustained autophagy induce MTORC2 activity and that MTORC2 signaling concomitantly activates senescence and myofibroblast differentiation.

The role of autophagy in cellular senescence has been studied in the context of oncogene activation,^{13, 18} replicative senescence¹⁵ and telomere dysfunction.⁴¹ Autophagy has been shown to accelerate, delay or have no effect on senescence. Here, we first demonstrated its role in the induction of senescence markers in serum-starved WI-38 cells. Inhibiting autophagy with 3-MA, LY or *siATG7* lowered the expression of senescence markers and myofibroblast differentiation. Then, we identified a new signaling pathway linking autophagy to senescence. MTORC2 activity, induced by prolonged SS, is necessary for the expression of senescence markers. Inhibiting MTORC2 activity with rapamycin, Torin 1 or *siRICTOR* lowered the expression of senescence markers and myofibroblast differentiation. Thirdly, we demonstrated the importance of ROS in this process. We inhibited ROS production in serum-starved fibroblasts with NAC, a ROS scavenger. We showed that ROS scavenging curbed MTORC2 activation, concomitantly limiting senescence and myofibroblast differentiation.

ROS are essential for the regulation of many cellular processes. They are known inducers of autophagy.⁴² For example, they are essentials for ATG4 activation and autophagosome elongation.⁴³ ROS act as signaling molecules and many enzymatic activities are known to be regulated by their redox status. They also control protein phosphatases and protein kinases, such as PTEN and AKT.⁴⁴ MTORC2 activity is also sensitive to redox state.⁴⁵ Based on these observations and our present findings, it is plausible that MTORC2 re-activation, in fibroblasts serum-starved long-term, is linked with ROS levels in cells. This finding is in line with previously described roles of the mTOR pathway in regulating senescence-associated phenotypes.¹⁸ We noted that ROS production is rapidly and sustainably elevated in serum-starved fibroblasts. ROS chelation with NAC inhibits MTORC2 activity, differentiation and senescence but how ROS are produced after SS remains uncertain. Filomeni and al.⁴² reported that a large amount of data converge to point out that mitochondria represent the principal

source of ROS required for autophagy induction and that nutrient deprivation suddenly results in energetic stress which, in turn, increases ATP demand and causes mitochondrial overburden in the face of adverse conditions. As a consequence, electron leakage and ROS production increase.

Conversely, it is possible that long-term ROS production culminates in mitochondrial dysfunction. Indeed, high ROS levels are associated with oxidative stress, a known stimulus of senescence²² and with myofibroblast differentiation.^{37, 46} Oxidative stress harms cellular components, such as proteins, lipids and DNA. DNA damage is sensed by p53, which activates DNA damage response signaling that can potentially lead to senescence, often via p21/CDKN1A induction.^{36, 47}

In the present experimental setting, NAC inhibited senescence induction, pro-fibrotic cytokine CTGF production and myofibroblast differentiation. NAC also suppressed autophagy induction. These data highlight the dichotomic part played by autophagy in senescence. As mentioned earlier, oxidative stress causes damage. Mitochondrial DNA is also a victim. It is possible that cumulative mitochondrial DNA damage causes mitochondrial dysfunction and enhances ROS levels, with autophagy being insufficient to restrain it. ROS then continuously damage nuclear DNA. Finally, senescence and myofibroblast differentiation follow.

The link between cellular senescence and myofibroblast differentiation has not been fully understood. By using genetic inhibition of senescent pathways, we have demonstrated a negative regulation of senescence on myofibroblast differentiation, as inhibition of senescence significantly increased the expression of myofibroblast differentiation marker. These results are in line with the study showing that mice with CCN1-null hepatocytes have non-senescent Hepatic Stellate Cells (HSC) and increased fibrotic response. It has been also demonstrated in a murine skin wound closure model that senescent fibroblasts appear early in the wound and accelerate the wound closure by inducing myofibroblasts differentiation via secretion of platelet derived growth factor- AA (PDGF-AA).⁵ However, in the same study, depletion of senescent cells results in excessive fibrosis, suggesting a role of cellular senescence in limiting excessive myofibroblast differentiation, which is in line with our results.⁴⁹

In summary, our results suggest that in a nutrient-depleted environment, fibroblasts induce cell cycle arrest and the autophagic program attempts to adapt to stress. If these stressful conditions are sustained, ROS production will persist, favoring MTORC2 activation and

leading to long-term cell cycle arrest/senescence induction and myofibroblast differentiation. The cellular senescence has negative regulation on myofibroblast differentiation, which is probably a mechanism to avoid excessive fibrosis. Taking into consideration the importance of senescence and myofibroblast differentiation in tissue repair and fibrosis, our results highlight potential targets of intervention to control maladaptive tissue modeling.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

WI-38 human fibroblasts from normal embryonic lung tissue were purchased from the American Type Culture Collection (CCL-75), grown in fibroblast basal medium (Lonza, CC-3131) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (Wisent, 090150) (normal growth medium [N]) and used between passages 6 and 8. For growth factor deprivation, the fibroblasts were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS; Wisent, 311-425-CL) before being exposed to serum-free medium (SS). Media were replaced every other day. The cells were plated at a density of 20,000 cells/cm² in 6-well plates and exposed to experimental conditions or vehicle when they reached 80-90% confluency.

Immunoblotting

Cellular proteins were extracted, separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and probed, as described previously.^{20, 50-52} The antibodies used for Western blotting were anti-ACTA2/ α SMA (Sigma-Aldrich, A2547), anti-CTGF (Santa Cruz Biotechnology, sc-14939), anti-LC3B (Novus, NB600-1384), anti-human SQSTM1/p62 (Cell Signaling Technology, 8025), anti-phospho-AKT (Ser473; Cell Signaling Technology, 9271), anti-AKT (Cell Signaling Technology, 9272), anti-RICTOR (Cell Signaling Technology, 2114), anti-ATG7 (R&D Systems, MAB6608), anti-CDKN1A/p21 (BD Biosciences, BD556430) and anti-p16INK4a/p16 (BD Biosciences, BD551153). Membranes were stained with Ponceau S Red (Sigma, P-3504) as loading control, and after initial probing, they were stripped and re-probed with anti-alpha-tubulin (Calbiochem, CP06). Densitometric analyses were conducted with AlphaImager, version 3.2 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA). Data are expressed in arbitrary units.

SA- β -gal staining

Cytochemical SA- β -gal detection was done as described previously.²⁶ In brief, cells were washed with PBS, fixed in formalin (Sigma, HT5014), washed, and incubated overnight at 37°C with staining solution containing X-gal at 1mg/ml (Invitrogen, 15520-034), pH 6.0.

Analysis of ROS production

ROS generation was measured on adherent cells by fluorescent microplate reader after staining with CM-H2DCFDA (Molecular Probes, C6827), a dye which becomes fluorescent after oxidation by ROS. Briefly, cells were plated at 25,000 cells/well in 96-well dark-clear bottom plates. The next day, the wells were washed twice with PBS, and the cells were stained with 5 μ M CM-H2DCFDA in PBS at 37°C for 30 min. Then, the wells were washed once with PBS and incubated with treatment medium for the desired time period (1 or 4 h). The plates were read by fluorescent plate reader at excitation wavelength of 495 nm and emission wavelength of 525 nm.

Immunofluorescence microscopy

WI38 were grown in 96-well Fluorescence Black Plate, after serum-starved for 7 days, they were rinsed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. The slides were permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma, T9284) in PBS for 15 min. Plates were blocked with PBS/10% goat serum (Sigma, D9759)/1% BSA (Sigma, A9647)/0.1% Tween 20 (Sigma, P1379) for 15 min. For ACTA2 staining, cells were incubated with mouse monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, A2547) 2hr and then Alexa 594-labeled anti-mouse Ab (Molecular Probes, A21203) for 40 min at room temperature in blocking buffer. Plates were then incubated in 33mM C12FDG in PBS to determinate SA- β -gal activity. Nuclei were stained with TO-PRO 3 (Molecular Probes, T3605). The cells were then visualized under a zeiss fluorescence microscope and analyzed with Zeiss LAS AF software (Carl Zeiss Canada Ltd, Toronto, ON, Canada).

Small interfering RNAs

For *ATG7* silencing, fibroblasts grown in normal conditions were harvested by trypsinization and separated in aliquots of 1.5 million cells. Separate aliquots were transfected with *siATG7* (Dharmacon, L-020112-00), or siControl (Dharmacon, D-001810-03). We used the Amaxa Nucleofector electroporator (Amaxa, Gaithersburg, MD, USA) and Nucleofector electroporation kit for WI-38 cells (Lonza, VCA-1001) according to the manufacturer's guidelines. The final concentration of siRNA was 150 pmol of siRNA/reaction. After electroporation, each cellular aliquot was plated in 2 wells of a 6-well plate in normal medium

for 24 h. The media were then changed for the experimental condition (media without serum) after 2 washes with PBS. For 4 days in SS, the media were changed on day 2. For *RICTOR* silencing, fibroblasts were plated in 6-well plates at 20000 cells/cm², after grown in normal condition for 24hrs, transfection solution with oligofectamine (Invitrogen 12252-011) and siRNA was prepared in RPMI according to the manufacturer's guidelines, final concentrations of *siRICTOR* (Dharmacon, L-016984-00) or *siControl* (Dharmacon, D-001810-03) were 200nM, cells were washed with 2X PBS and incubated with RPMI-based transfection solution, for 4 days in SS, the transfection solution was changed on day 2.

Vectors infections

Lentivirus production and infection was done as described previously.⁵³ Briefly, packaging vector and lentivector containing p53 and p16 short-hairpin RNA (shRNA) were purchased from Dharmacon. The lentivector and packaging vectors were transfected into 293FT cells to produce infectious virus. The infectious virus was infected into proliferating WI38 at PD35. The infected population was selected using 100 µg/ml hygromycin B (Roche) for 2–3 days. The control group was infected with a lenti-shGFP virus.

Reagents

LY294002 (440202) and 3-methyladenine (189490) were purchased from Calbiochem, rapamycin (R0395) and N-acetyl-L-cysteine (A9165) from Sigma, zeocin (46-0509) from (Invitrogen). Torin 1 (4247) was obtained from Tocris Bioscience. All other reagents were from Sigma Chemicals.

Statistical analysis

The results, expressed as means±SEM, were analyzed by unpaired Student's t-test or the Mann-Whitney test as appropriate. $p < 0.05$ was considered significant for all tests.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-123436) to MJH, holder of the Shire Chair in Nephrology, Transplantation and Renal Regeneration of Université de Montréal. MJH is also supported by the Canadian Transplant Research Program (CNTRP). MB is the recipient of a fellowship from Fonds de la

recherche en santé du Québec (FRQS). FR is supported by a Fonds de Recherche Québec Santé junior II career award [33070]. The authors thank the J.-L. Lévesque Foundation for renewed support and members of the Rodier and Hébert laboratories for valuable comments and discussions.

REFERENCES

1. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:349-63.
2. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* 2014; 31:722-33. doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.012. Epub Dec 11.
3. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 2011; 192:547-56. doi: 10.1083/jcb.201009094. Epub 2011 Feb 14.
4. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 2008; 134:657-67. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.049.
5. Kim KH, Chen CC, Monzon RI, Lau LF. Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts. *Mol Cell Biol* 2013; 33:2078-90. doi: 10.1128/MCB.00049-13. Epub 2013 Mar 18.
6. Jun JI, Lau LF. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol* 2010; 12:676-85. doi: 10.1038/ncb2070. Epub 10 Jun 6.
7. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Shigekawa M, Tsunematsu H, et al. Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2011; 121:3343-56. doi: 10.1172/JCI44957. Epub 2011 Jul 11.
8. Shivshankar P, Brampton C, Miyasato S, Kasper M, Thannickal VJ, Le Saux CJ. Caveolin-1 deficiency protects from pulmonary fibrosis by modulating epithelial cell senescence in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 47:28-36. doi: 10.1165/rcmb.2011-0349OC. Epub 2012 Feb 23.
9. Cheng S, Rodier F. Manipulating senescence in health and disease: emerging tools.

Cell Cycle 2015; 14:1613-4. doi: 10.080/15384101.2015.1039359.

10. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Autophagy fuels tissue fibrogenesis. *Autophagy* 2012; 8:849-50. doi: 10.4161/auto.19947. Epub 2012 May 1.

11. Gewirtz DA. Autophagy and senescence: a partnership in search of definition. *Autophagy* 2013; 9:808-12. doi: 10.4161/auto.23922. Epub 2013 Feb 19.

12. Kang C, Elledge SJ. How autophagy both activates and inhibits cellular senescence. *Autophagy* 2016; 12:898-9. doi: 10.1080/15548627.2015.1121361.

13. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 2009; 23:798-803. doi: 10.1101/gad.519709. Epub 2009 Mar 11.

14. Goehle RW, Di X, Sharma K, Bristol ML, Henderson SC, Valerie K, et al. The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 343:763-78. doi: 10.1124/jpet.112.197590. Epub 2012 Aug 27.

15. Kang HT, Lee KB, Kim SY, Choi HR, Park SC. Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PLoS One* 2011; 6:e23367. doi: 10.1371/journal.pone.0023367. Epub 2011 Aug 8.

16. Kang C, Xu Q, Martin TD, Li MZ, Demaria M, Aron L, et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* 2015; 349:aaa5612. doi: 10.1126/science.aaa5612.

17. Narita M, Young AR, Arakawa S, Samarajiwa SA, Nakashima T, Yoshida S, et al. Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science* 2011; 332:966-70. doi: 10.1126/science.1205407. Epub 2011 Apr 21.

18. Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, Patil CK, Freund A, Zhou L, et al. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol* 2015; 17:1049-61. doi: 10.38/ncb3195. Epub 2015 Jul 6.

19. Malaquin N, Martinez A, Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol* 2016; 82:39-49. doi: 10.1016/j.exger.2016.05.010. Epub May 25.

20. Bernard M, Dieude M, Yang B, Hamelin K, Underwood K, Hebert MJ. Autophagy

fosters myofibroblast differentiation through MTORC2 activation and downstream upregulation of CTGF. *Autophagy* 2014; 10:2193-207. doi: 10.4161/15548627.2014.981786.

21. Itahana K, Dimri GP, Hara E, Itahana Y, Zou Y, Desprez PY, et al. A role for p53 in maintaining and establishing the quiescence growth arrest in human cells. *J Biol Chem* 2002; 277:18206-14. Epub 2002 Mar 5.

22. Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:472-6.

23. Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003; 113:703-16.

24. Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, Santos HA, Chen W, Daganzo SM, et al. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 2005; 8:19-30.

25. Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer* 2012; 130:1715-25. doi: 10.002/ijc.27316. Epub 2011 Dec 5.

26. Debaq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* 2009; 4:1798-806. doi: 10.038/nprot.2009.191. Epub .

27. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, et al. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 2010; 285:10850-61. doi: 10.1074/jbc.M109.080796. Epub 2010 Feb 1.

28. Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarova H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1997; 243:240-6.

29. Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* 2000; 275:992-8.

30. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*

2012; 8:445-544.

31. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 2005; 169:425-34. Epub 2005 May 2.
32. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006; 22:159-68. Epub 2006 Apr 6.
33. Dufour M, Dormond-Meuwly A, Demartines N, Dormond O. Targeting the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Cancer Therapy: Lessons from Past and Future Perspectives. *Cancers (Basel)* 2011; 3:2478-500. doi: 10.3390/cancers3022478.
34. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149:274-93. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017.
35. Gibson SB. Investigating the role of reactive oxygen species in regulating autophagy. *Methods Enzymol* 2013; 528:217-35.:10.1016/B978-0-12-405881-1.00013-6.
36. Gambino V, De Michele G, Venezia O, Migliaccio P, Dall'Olio V, Bernard L, et al. Oxidative stress activates a specific p53 transcriptional response that regulates cellular senescence and aging. *Aging Cell* 2013; 12:435-45. doi: 10.1111/accel.12060. Epub 2013 Mar 27.
37. Barnes JL, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int* 2011; 79:944-56. doi: 10.1038/ki.2010.516. Epub 1 Feb 9.
38. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes & development* 2002; 16:948-58.
39. Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003; 113:703-16.
40. Hernandez-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* 2012; 142:938-46. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.044. Epub 2 Jan 10.

41. Mar FA, Debnath J, Stohr BA. Autophagy-independent senescence and genome instability driven by targeted telomere dysfunction. *Autophagy* 2015; 11:527-37. doi: 10.1080/15548627.2015.1017189.
42. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ* 2015; 22:377-88. doi: 10.1038/cdd.2014.150. Epub Sep 26.
43. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 2007; 26:1749-60. Epub 2007 Mar 8.
44. Corcoran A, Cotter TG. Redox regulation of protein kinases. *FEBS J* 2013; 280:1944-65. doi: 10.1111/febs.12224. Epub 2013 Mar 21.
45. Nayak BK, Feliers D, Sudarshan S, Friedrichs WE, Day RT, New DD, et al. Stabilization of HIF-2alpha through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene* 2013; 32:3147-55. doi: 10.1038/onc.2012.333. Epub Aug 6.
46. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, et al. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med* 2009; 15:1077-81. doi: 10.38/nm.2005. Epub 9 Aug 23.
47. Muteliefu G, Shimizu H, Enomoto A, Nishijima F, Takahashi M, Niwa T. Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell senescence with upregulation of p53, p21, and prelamin A through oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; 303:C126-34. doi: 10.1152/ajpcell.00329.2011. Epub 2012 May 2.
48. Kim KH, Chen CC, Monzon RI, Lau LF. Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts. *Molecular and cellular biology* 2013; 33:2078-90.
49. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, et al. An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Developmental cell* 2014; 31:722-33.
50. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AM, Langelier Y, et al. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol* 2005; 174:5740-9.

51. Cailhier JF, Sirois I, Laplante P, Lepage S, Raymond MA, Brassard N, et al. Caspase-3 activation triggers extracellular cathepsin L release and endorepellin proteolysis. *J Biol Chem* 2008; 283:27220-9. doi: 10.1074/jbc.M801164200. Epub 2008 Jul 24.
52. Laplante P, Sirois I, Raymond MA, Kokta V, Beliveau A, Prat A, et al. Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis. *Cell Death Differ* 2010; 17:291-303. doi: 10.1038/cdd.2009.124. Epub Sep 4.
53. Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO Journal* 2003; 22:4212-22.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Serum starvation induces senescence in fibroblasts. **(A)** Left panel: Western blot showing SQSTM1, ACTA2, CDKN1A and TUBA (tubulin) protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to serum-free medium (SS). Right panel: Densitometric analysis of SQSTM1 (** $p=0.0016$, 4 h vs 2 d; ** $p=0.0032$, 4 h vs 4 d, representative of 5 independent experiments), ACTA2 (** $p=0.0006$, 2 d vs 4 d, representative of 5 independent experiments), CDKN1A (* $p=0.0187$, 0 vs 4 h, representative of 4 independent experiments) relative to tubulin. Data are presented as mean \pm s.e.m. **(B)** Western blot showing SQSTM1, ACTA2, p16INK4a and TUBA protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to SS medium or grown under normal conditions (N) (representative of 2 independent experiments). **(C)** Cytochemical evaluation of the senescence marker SA- β -gal activity of cells grown in normal medium (N) or maintained without serum (SS) for 1, 3 or 7 days. Zeocin (Zeo) in normal media (50 $\mu\text{g/ml}$) served as a positive control. Representative of 3 independent experiments. Data from one experiment are presented as % of SA- β -gal positive cells (mean \pm s.e.m). (* $p=0.0160$, 0 vs SS 7 d; **** $p<0.0001$, 0 vs zeocin 7 d).

Figure 2. Autophagy induces senescence in serum-starved fibroblasts. **(A)** Upper left panel: Western blot showing LC3B-I and -II protein levels in WI-38 fibroblasts starved in the presence of 3-methyladenine (1 mM; 3-MA) or vehicle (V) for 4 h. Upper right panel: Densitometric analysis of LC3B-II relative to LC3B-I (representative of 3 independent experiments, * $p=0.0462$). Lower left panel: Western blot showing ACTA2, CDKN1A, p16INK4a and TUBA protein levels in WI-38 fibroblasts starved and incubated with 3-MA (1 mM) or V for 4 days. Lower right panel: Densitometric analysis of ACTA2 (**** $p<0.0001$), CDKN1A (* $p=0.0116$) and p16INK4a (* $p=0.0115$) relative to tubulin (representative of 3 independent experiments). **(B)** Upper left panel: Western blot showing LC3B-I and -II protein levels in WI-38 fibroblasts starved in the presence of LY294002 (5 μM ; LY) or vehicle (V) for 4 h. Upper right panel: Densitometric analysis of LC3B-II relative to LC3B-I (representative of 3 independent experiments, ** $p=0.0045$). Lower left panel: Western blot showing ACTA2, CDKN1A, p16INK4a and TUBA protein levels in WI-38 fibroblasts serum-

starved and incubated with LY (5 μ M) or V for 4 days. Lower right panel: Densitometric analysis of ACTA2 (*p=0.0485), CDKN1A (*p=0.0350), p16INK4a (**p=0.0012) relative to tubulin (representative of 3 independent experiments). (C) Left panel: Western blot showing ATG7, LC3B-I and -II, ACTA2, p16INK4a and tubulin (TUBA) protein levels in WI-38 fibroblasts serum-starved for 4 days post-nucleofection with control siRNA (siCTL) or *ATG7* siRNA (*siATG7*). Right panel: Densitometric analysis of LC3B-I/-II ratios (*p=0.0229), ATG7 (**p=0.0002), ACTA2 (*p=0.0134) and p16INK4a (*p=0.0230) protein levels relative to tubulin (representative of 4 independent experiments) in WI-38 fibroblasts silenced for *ATG7* expression. (D) Cytochemical evaluation of the senescence marker SA- β -gal activity in cells serum-starved and incubated with 3-MA (1 mM) or V for 7 days. Representative of 3 independent experiments. Data from one experiment are presented as % of SA- β -gal positive cells (mean \pm s.e.m). (*p=0.0417). (E) Cytochemical evaluation of the senescence marker SA- β -gal activity in cells serum-starved and incubated with LY (5 μ M) or V for 7 days. Representative of 3 independent experiments. Data from one experiment are presented as % of SA- β -gal positive cells (mean \pm s.e.m). (**p=0.0010).

Figure 3. Senescence induced by serum starvation depends on MTORC2 signaling. (A) Left panel: Western blot showing LC3B-I and -II, ACTA2, AKT Ser473 phosphorylation (AKT p), total AKT (AKT t), CDKN1A, p16INK4a and TUBA protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to SS for 4 days in the presence of rapamycin (10 nM; R) or vehicle (V). Representative of 3 independent experiments. Right panel: Densitometric analysis of LC3B-II relative to LC3B-I (*p=0.0483), ACTA2 relative to tubulin (*p=0.0162), AKT p relative to AKT t (*p=0.0179), CDKN1A (*p=0.0202) and p16INK4a (**p=0.0061) relative to tubulin (representative of 3 independent experiments). (B) Left panel: Western blot showing LC3B-I and -II, ACTA2, CDKN1A, p16INK4a and TUBA protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to SS for 4 days in the presence of Torin 1 (250 nM; Torin) or V. Right panel: Densitometric analysis of LC3B-II relative to LC3B-I (*p=0.0345), ACTA2 relative to tubulin (**p=0.0003), CDKN1A (**p=0.003) and p16INK4a (p=0.08) relative to tubulin (representative of 4 independent experiments). (C) Left panel: Western blot showing RICTOR, ACTA2, CDKN1A, p16INK4a and TUBA protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to SS

for 4 days after transfection with control siRNA (siCTL) or *siRICTOR*. Right panel: Densitometric analysis of ACTA2 relative to tubulin (*p=0.0297), CDKN1A (*p=0.0147) and p16INK4a (*p=0.0162) relative to tubulin (representative of 3 independent experiments). **(D)** Cytochemical evaluation of the senescence marker SA-β-gal activity in cells serum-starved and incubated with rapamycin (10 nM; R) or vehicle (V) for 7 days. Representative of 3 independent experiments. Data from one experiment are presented as % of SA-β-gal positive cells (mean ± s.e.m) (****p<0.0001). **(E)** Cytochemical evaluation of the senescence marker SA-β-gal activity in cells serum-starved and incubated with Torin 1 (250 nM; Torin) or vehicle (V) for 7 days. Representative of 3 independent experiments. Data from one experiment are presented as % of SA-β-gal positive cells (mean ± s.e.m) (****p<0.0001). **(F)** Cytochemical evaluation of the senescence marker SA-β-gal activity in cells serum-starved and transfected with control siRNA (siCTL) or *siRICTOR* for 7 days. Representative of 3 independent experiments. Data from one experiment are presented as % of SA-β-gal positive cells (mean ± s.e.m) (*p=0.0109).

Figure 4. ROS are required for autophagy-induced MTORC2 activation leading to senescence. **(A)** Upper panel: Starvation elicits ROS generation in WI-38 fibroblasts. Cells were stained with CM-H2DCFDA and cultured for 1 h in the normal condition (N), without serum (SS) or without serum but with 10 mM N-acetyl-L-cysteine (NAC) or 500 μM hydrogen peroxide (H₂O₂) (as positive control). Fluorescence was measured by plate reader. *p<0.05 N vs SS, NAC vs SS and H₂O₂ vs SS, in triplicate. Lower panel: Stained cells were incubated for 4 h in the conditions described in A before fluorescence was measured. *p<0.05 N vs SS, NAC vs SS and H₂O₂ vs SS, in triplicate. **(B)** Left panel: Evaluation of LC3B-I and -II, ACTA2, CTGF, CDKN1A, p16INK4a and tubulin (TUBA) protein levels by Western blotting of WI-38 fibroblasts exposed to NAC 10 mM or vehicle (V) for 4 days. Right panels: Densitometric analysis of LC3B-II relative to LC3B-I (*p=0.0309), ACTA2 (*p=0.0286), CTGF (*p=0.0294), CDKN1A (**p=0.0025) and p16INK4a (**p=0.0056) relative to tubulin. Data are presented as mean ± s.e.m. Representative of 4 independent experiments. **(C)** Left panel: Evaluation of AKT Ser473 phosphorylation (AKT p) and total AKT (AKT t) by Western blotting in WI-38 fibroblasts exposed to SS for 2 days with N-acetyl-L-cysteine 10 mM (NAC)

or vehicle (V) for 2 days. Right panel: Densitometric analysis of AKT p relative to AKT t (*p=0.0028) Data are presented as mean \pm s.e.m. Representative of 3 independent experiments. (D) Cytochemical evaluation of the senescence marker SA- β -gal activity in serum-starved cells (SS) or starved and incubated with NAC (10 mM) for 7 days. Representative of 3 independent experiments. Data from one experiment are presented as % of SA- β -gal positive cells (mean \pm s.e.m). (**p=0.0019).

Figure 5. Inhibition of senescence leads to upregulated myofibroblast differentiation. (A) Left panel: Western blot showing ACTA2, AKT Ser473 phosphorylation (AKT p), total AKT (AKT t), CDKN1A, p16INK4a and TUBA protein levels in WI-38 transfected fibroblasts exposed to SS for 4 days. Representative of 5 independent experiments. Right panels: Densitometric analysis of AKT p relative to AKT t (p=0.57) ,ACTA2 relative to tubulin (**p=0.0061), CDKN1A (**p=0.0098) and p16INK4a (**p=0.0008) relative to tubulin (representative of 5 independent experiments). (B) Cytochemical evaluation of the senescence marker SA- β -gal activity in transfected cells serum-starved for 7 days. Representative of 3 independent experiments. Data from one experiment are presented as % of SA- β -gal positive cells (mean \pm s.e.m) (**p<0.001).

Figure 6. Cellular senescence and myofibroblast differentiation are not concomitantly activated in the same cells

Representative photo of C12FGD (green) and ACTA2 (red) costaining, showing SA- β -gal activity and ACTA2 production occur in different cells.

Figure 1

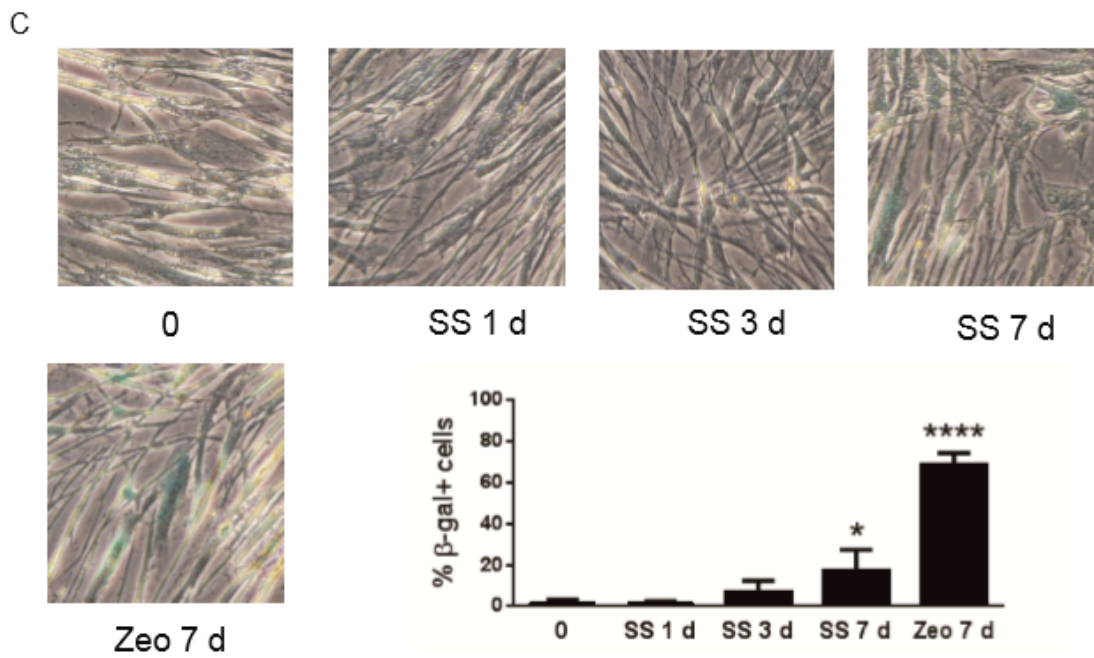
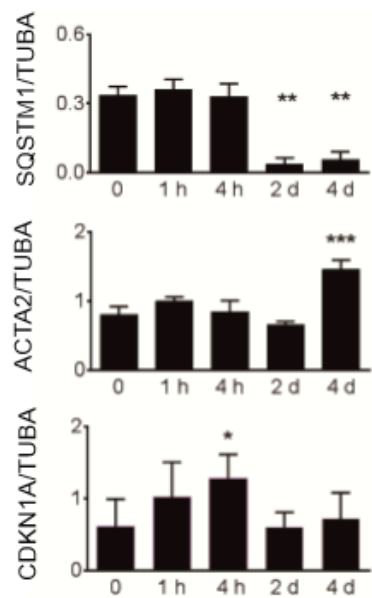
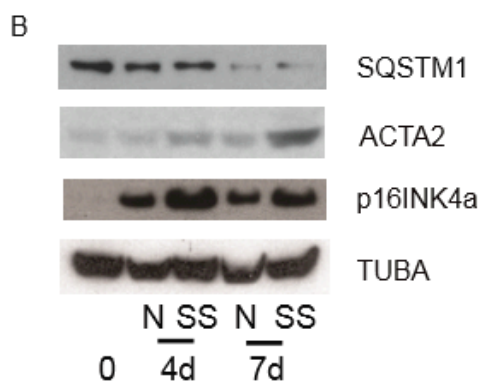
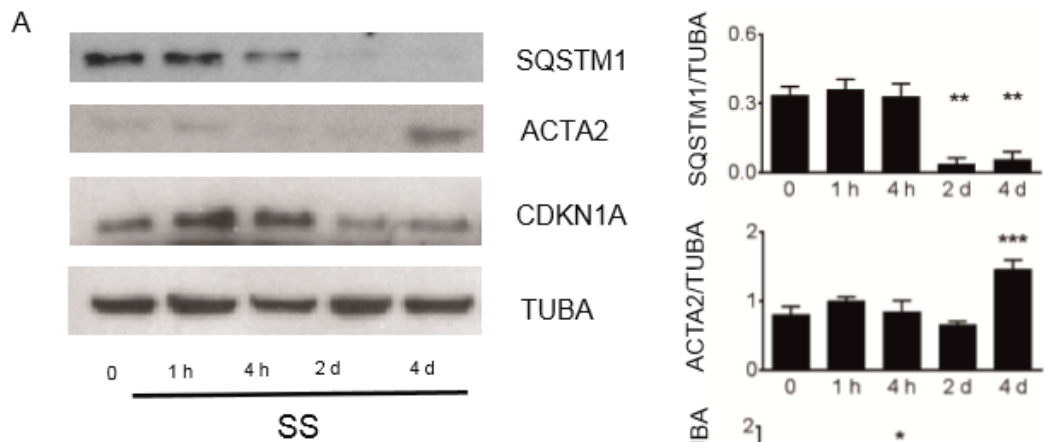


Figure 2

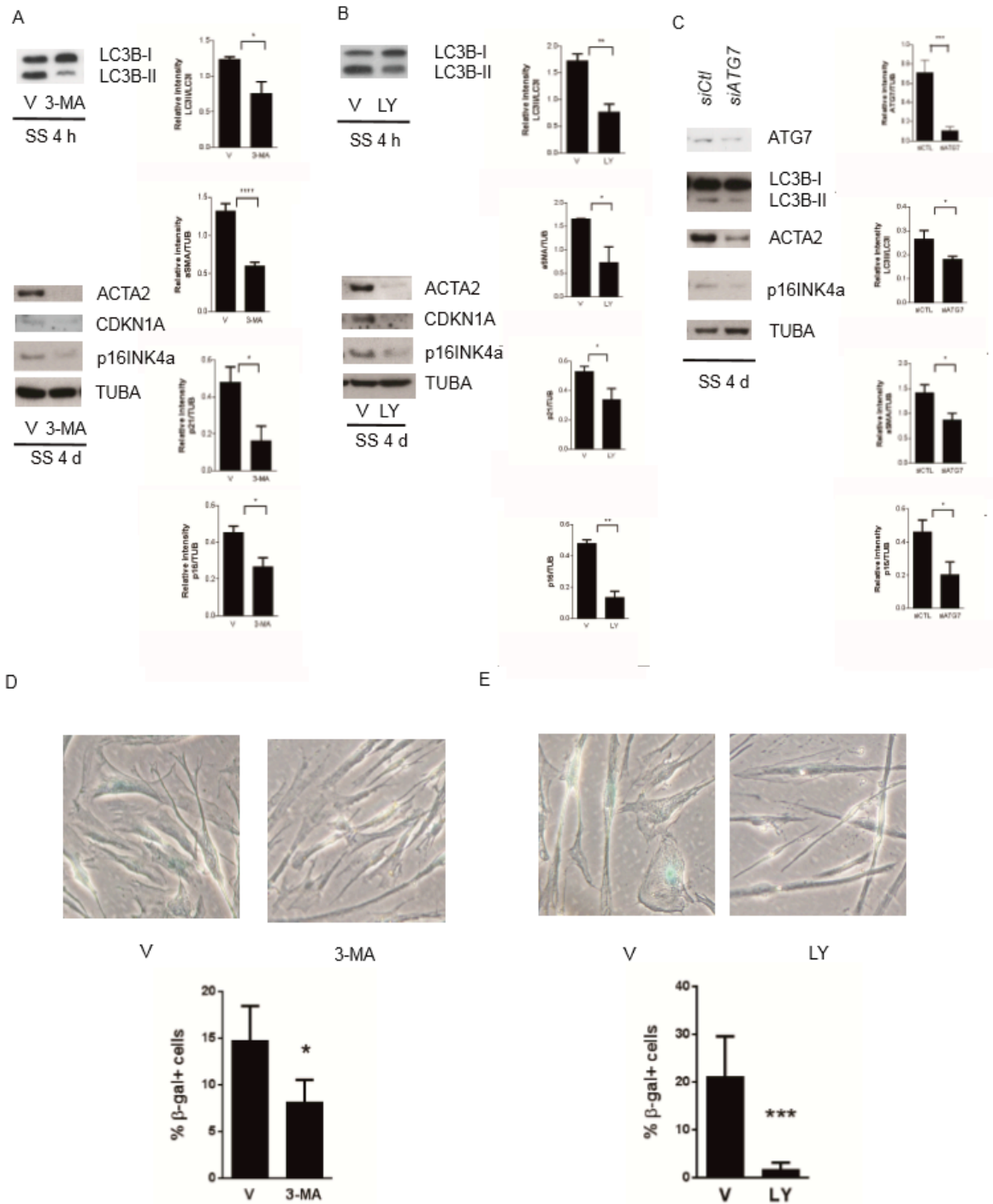


Figure 3

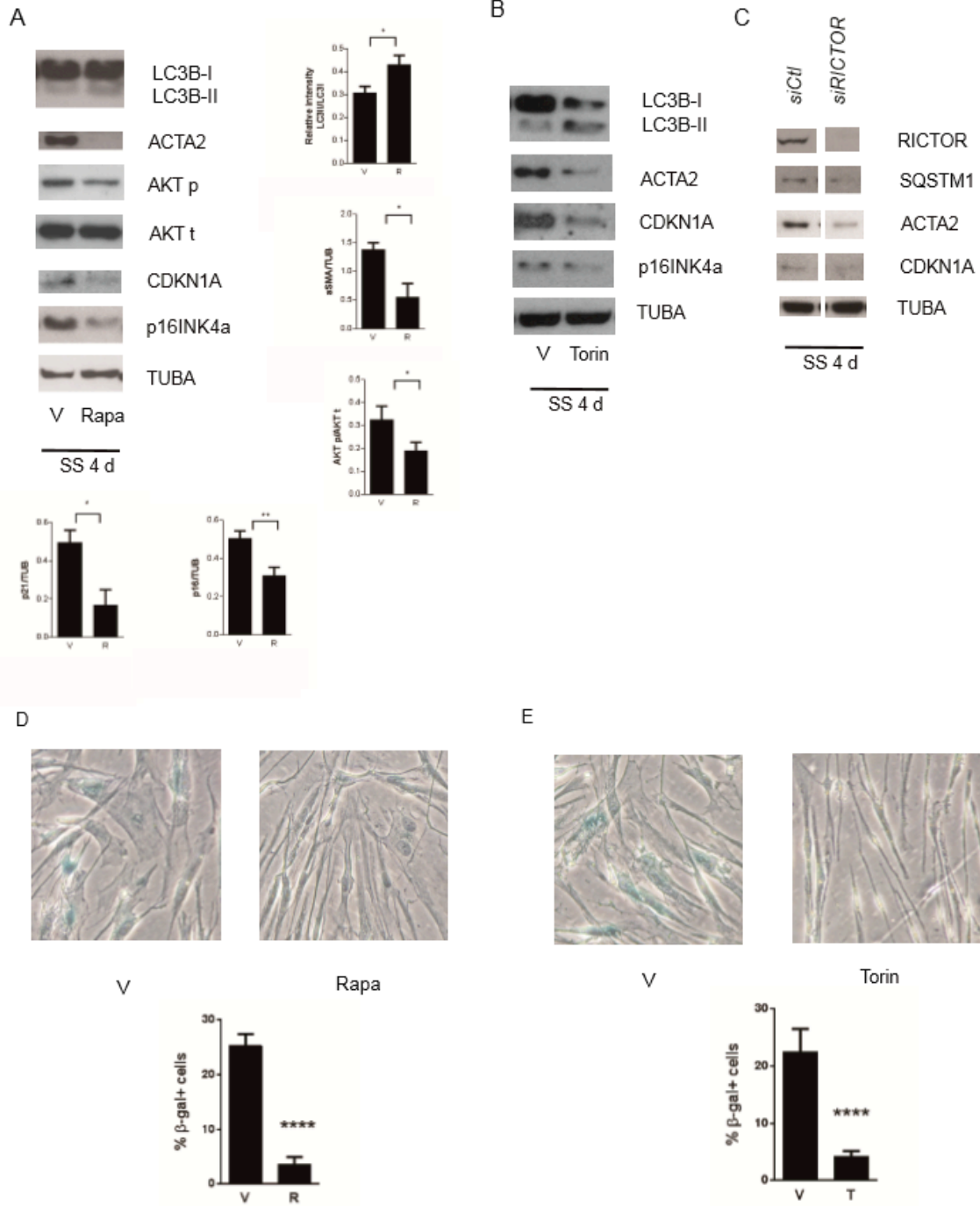


Figure 4

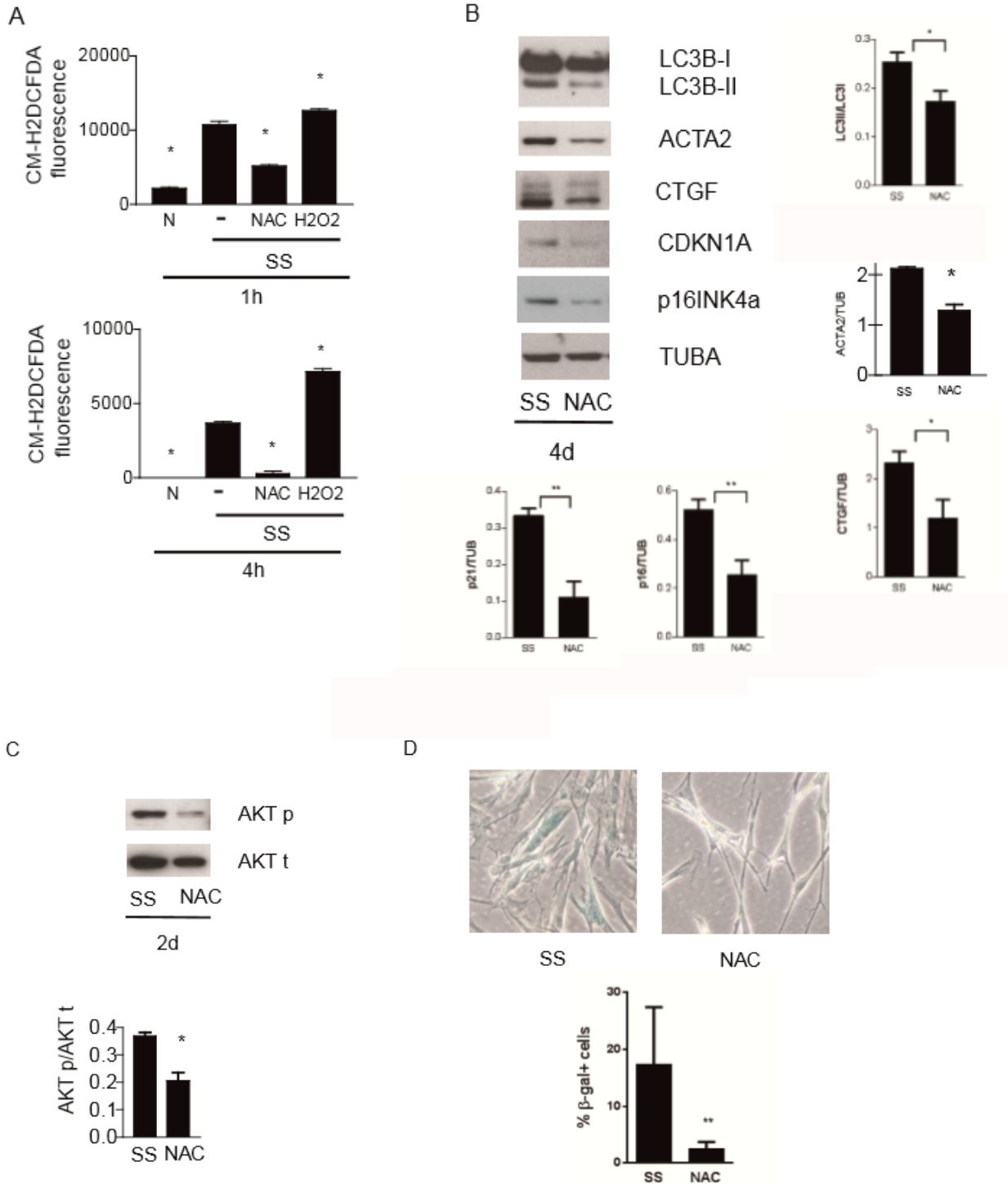


Figure 5

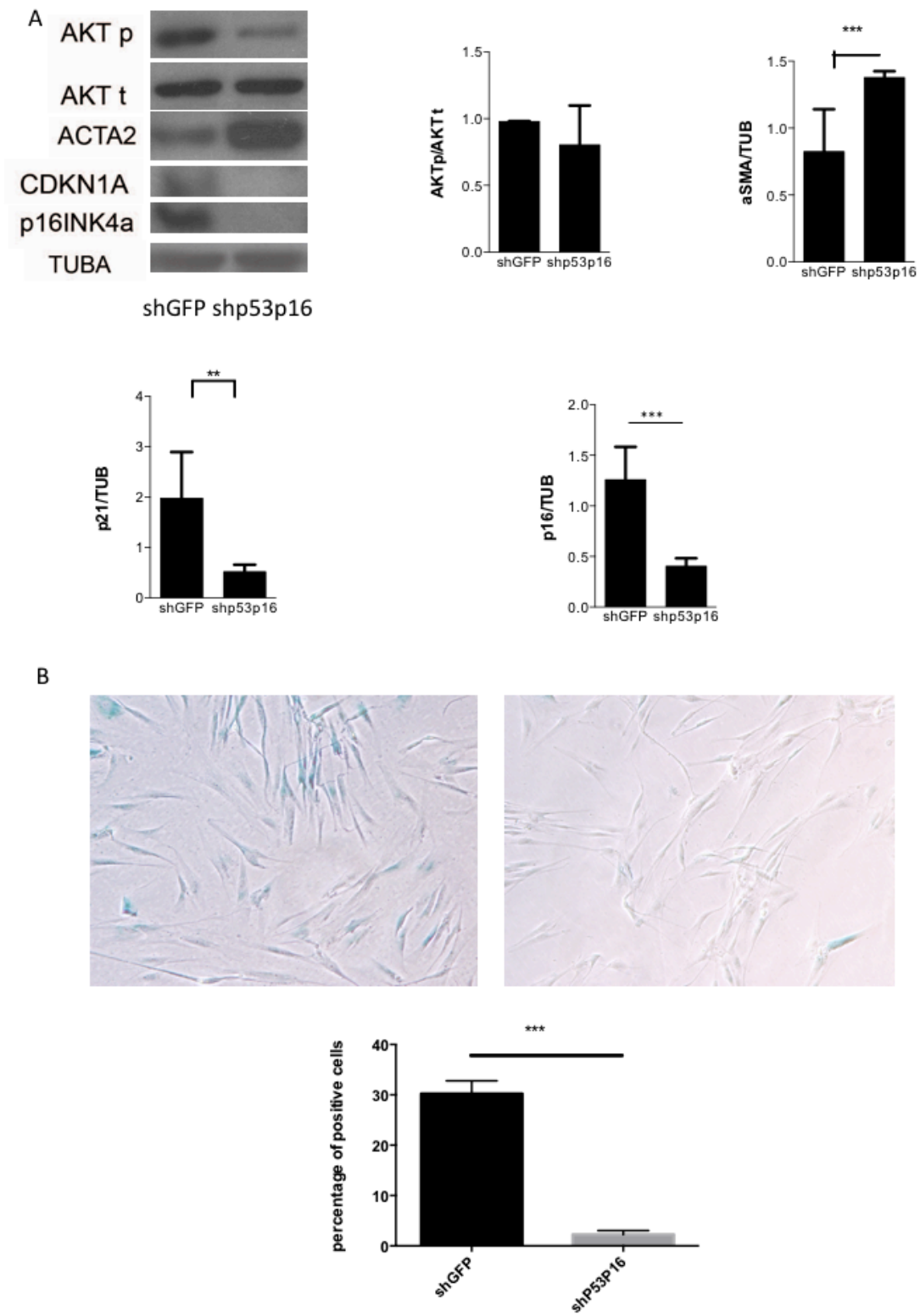
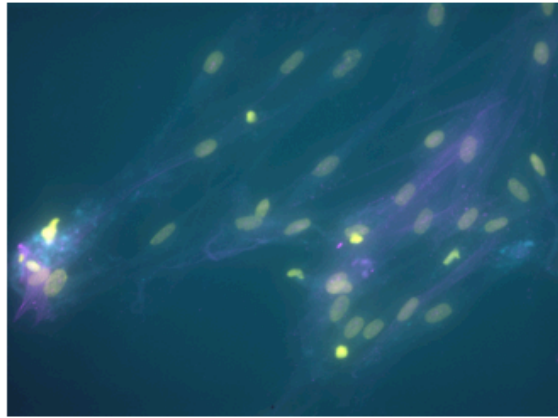


Figure 6



Discussion

En résumé, nous avons démontré que, dans la phase aiguë, différentes voies de mort cellulaire sont impliquées dans les dommages tubulaires et microvasculaires. La nécroptose joue un rôle prédominant dans les dommages des cellules épithéliales, et les ECs meurent principalement par les voies apoptotiques de façon caspase-3-dépendante. En présence des auto-anticorps anti-LG3, l'autoantigène LG3, libéré par des ECs apoptotiques, est reconnu par les anti-LG3. Ceci entraîne l'activation du système du complément et une inflammation microvasculaire. Cette inflammation induit une aggravation des dommages tubulaires et microvasculaires, formant une boucle de rétroaction, qui entraîne une dysfonction rénale accentuée.

Dans la phase chronique, la raréfaction microvasculaire, qui est causée par les dommages microvasculaire de la phase aiguë, est la force motrice pour la fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire. La déprivation des facteurs de croissance (SS), un stress expérimental que nous avons choisi pour mimer l'effet de la raréfaction microvasculaire *in vitro*, active la différenciation myofibroblastique. Dans l'exploration des mécanismes, nous avons montré que la SS induit la production de ROS, qui active la sénescence de façon autophagie mTORC2 – dépendante. Contrairement à notre hypothèse initiale, nous avons trouvé une régulation négative de la sénescence sur la différenciation myofibroblastique.

1. Un rôle prédominant de l'apoptose dans les insultes microvasculaires induites par l'IRI

Dans le contexte de l'IRA causée par l'IRI, nous avons initialement émis l'hypothèse que l'apoptose est la mort cellulaire prédominante, et qu'une déficience en caspase-3 aurait des effets protecteurs. En utilisant un modèle murin d'IRA, nous montrons que pendant la phase aiguë de l'IRI, l'absence de caspase-3 aggrave la dysfonction rénale. Au niveau des dommages tissulaires, nous observons une diminution des dommages microvasculaires mais une augmentation des dommages tubulaires liée à une aggravation de la nécroptose dans les cellules tubulaires. Ces résultats indiquent que les ECs et les cellules épithéliales tubulaires

possèdent une programmation différente de la mort cellulaire et que l'apoptose caspase-3-dépendente joue un rôle prédominant dans les insultes microvasculaires induites par l'IRI pendant la phase aigüe de l'IRA.

L'IRI est l'une des causes les plus fréquentes de l'IRA. La nécrose tubulaire est considérée classiquement comme une caractéristique clé de l'IRA. Il y a de plus en plus de preuves qui suggèrent que les dommages microvasculaires contribuent de manière importante à la dysfonction rénale (Brodsky, Yamamoto et al. 2002, Sutton, Fisher et al. 2002, Sutton, Mang et al. 2003, Bonventre 2007, Chatauret, Badet et al. 2014, Gilbert W. Moeckel 2015, Verma and Molitoris 2015). Nos résultats suggèrent que les dommages tubulaires ont un effet prédominant sur la dysfonction rénale dans la phase aigüe. Il a été démontré dans de nombreuses études que la mort cellulaire programmée joue un rôle crucial dans les dommages tubulaires et microvasculaires induits par l'IRI (Voir introduction 2.1.2.1 Les mécanismes des dommages tubulaires et 2.1.3.2 Les mécanismes des dommages microvasculaires). Les différentes morts cellulaires impliquées dans les dommages microvasculaires n'ont cependant pas été clairement identifiées. Nos travaux sont en accord avec les études d'autres groupes qui identifient la nécroptose comme le type de mort cellulaire prédominant pendant la phase aigüe de l'IRI et qui est responsable des dommages tubulaires (Linkermann, Brasen et al. 2012, Linkermann, Brasen et al. 2013, Linkermann, Chen et al. 2014, Linkermann 2016). Ces résultats fournissent un nouvel argument en faveur d'un rôle crucial de l'apoptose dans les dommages microvasculaires pendant la phase aigüe.

Il serait intéressant de confirmer l'effet de l'apoptose sur les dommages microvasculaires en utilisant des souris avec la délétion de la caspase-3 spécifique aux ECs (Knock-out conditionel, CKO) (Rongvaux, Jackson et al. 2014). Nous extrapolons que les souris CKO auraient une diminution de la dysfonction rénale, des dommages microvasculaires et tubulaires, ainsi que qu'une baisse de la fibrose interstitielle, comparativement aux souris WT. La déficience en caspase-3 dans les types cellulaires autre que l'endothélium (surtout les fibroblastes) aurait potentiellement des effets sur le processus pro-fibrotique. Il serait également très intéressant de comparer les souris CKO et *casp3*^{-/-} à 21 jours, qui nous permettrait de distinguer la contribution ces cellules dans la fibrose post-IRI.

Une étude a rapporté que les souris *ripk3*^{-/-} sont protégées de la dysfonction rénale induite par l'IRI à la phase aigüe. Cette étude est en accord avec nos travaux ayant rapporté que la nécrose est la forme prédominante de mort cellulaire dans les TECs (Lau, Wang et al. 2013). Il pourrait être intéressant de valider les résultats de cette thèse chez les souris *rip3*^{-/-}. On s'attend à ce que la déficience en *ripk3* ne protège pas contre les dommages microvasculaires induits par l'IRI.

2. Un rôle important de l'apoptose des ECs dans l'inflammation microvasculaire induite par l'IRI

Nous avons mis en évidence que les anticorps anti-LG3 n'affectent pas la fonction des reins sains. Cependant, lorsqu'ils sont présents au moment de l'IRI, ils aggravent la dysfonction rénale et activent le système du complément au niveau de la microvascularisation. Ces résultats suggèrent que les insultes tissulaires causées par l'IRI créent un microenvironnement permissif pour les autoanticorps anti-LG3, qui initie une boucle de rétroaction entre l'inflammation et les insultes tissulaires, entraînant une dysfonction rénale et une raréfaction microvasculaire accentuées.

En utilisant un système *in vitro* de ECs humaines de veine ombilicale (HUVECs), notre équipe a démontré que l'activation de la caspase-3 induit la libération extracellulaire de cathepsine L qui protéolyse l'endorépelline entraînant ainsi la libération du LG3 (Cailhier, Sirois et al. 2008). Nous avons aussi démontré que l'IRI induit la production du LG3 dans les nanovésicules exosome-like circulantes (appelé nanovésicules ci-après) (Dieudé, Bell et al. 2015). De plus, les résultats de cette thèse ont démontré un rôle aggravant des autoanticorps anti-LG3 dans l'IRA induite par l'IRI mais pas chez les souris saines.

Sur la base de ces résultats, il serait donc intéressant d'étudier le rôle de la caspase-3 dans la production de LG3 post-IRI, et dans l'aggravation de l'IRI causée par les anti-LG3. Afin d'évaluer le rôle de la caspase-3 dans la production du LG3, on pourra utiliser le même modèle d'IRI. Les nanovésicules seront isolées et le LG3 dans les nanovésicules seront dosées. On s'attend qu'il y ait moins de LG3 dans les nanovésicules provenant des souris *casp3*^{-/-}.

Afin d'étudier le rôle de la caspase-3 dans l'aggravation de l'IRI causée par les anti-LG3, des anticorps anti-LG3 ou des anticorps contrôle seraient injectés dans les souris WT et *casp3*^{-/-} avant la chirurgie d'IRI. Les souris seraient sacrifiées à 2,7 ou 21 jours post-chirurgie. Nous pensons que les souris *casp3*^{-/-} ayant reçu des anti-LG3 auraient moins de dysfonction rénale, moins des dommages microvasculaires et tubulaires, et moins de fibrose à long-terme (21 jours) comparativement aux souris WT injectées avec anti-LG3.

Il est possible de valider ces hypothèses aussi dans une étude clinique. Nous pourrions réaliser une étude de cohorte chez des patients qui ont reçu une chirurgie cardiaque avec un pontage cardio-pulmonaire. L'IRA est une complication fréquente des chirurgies cardiaques avec un pontage cardio-pulmonaire, et l'IRI joue un rôle prédominant dans ce contexte (Mao, Katz et al. 2014, Kramer, Herron et al. 2015, Thiele, Isbell et al. 2015). Les nanovésicules du sérum des patients 1 jour post-chirurgie seront isolées, le niveau du LG3 dans les nanovésicules sera dosé de façon semi-quantitative en utilisant la méthode western blot. Nous nous attendons à ce que, en comparaison avec les patients qui n'ont pas eu d'IRA, il y ait une augmentation des niveaux de LG3 chez les patients qui ont eu de l'IRA. On pourrait également évaluer si des anti-LG3 élevés pré-op prédisent l'IRA post pontage cardio-pulmonaire.

3. Un rôle central des insultes microvasculaires dans la phase chronique de l'IRA induite par l'IRI

Contrairement à nos observations lors de la phase aiguë, nos résultats démontrent que, pendant la phase chronique, les souris *casp3*^{-/-} sont protégées de la raréfaction microvasculaire et elles ont moins de dommages tubulaires. La fibrose, une des caractéristiques clé de l'IRC, est diminuée aussi chez les *casp3*^{-/-} suggérant que les dommages microvasculaires sont des forces motrices qui entraînent l'IRC. De plus, dans l'IRI, les anti-LG3 pré-existant causent l'activation intra-vasculaire de la voie classique du système du complément. Cette inflammation microvasculaire entraîne des dommages microvasculaires accentués et un développement de la fibrose accéléré. Cela confirme également le rôle central des insultes microvasculaires dans la pathophysiologie de l'IRA induite par l'IRI.

L'IRC est un problème majeur de santé publique. Les mécanismes impliqués dans la transition de l'IRA en l'IRC ne sont pas clairs. Plusieurs études ont décrit une boucle de rétroaction entre la raréfaction microvasculaire et la régénération tubulaire altérée, et elles ont identifié cette boucle comme le processus physiopathologique clé dans la transition de l'IRA en IRC (Coca, Singanamala et al. 2012, Rifkin, Coca et al. 2012, Heung and Chawla 2014, Tanaka, Tanaka et al. 2014, Venkatachalam, Weinberg et al. 2015, Hsu and Hsu 2016). Avec des dommages microvasculaires diminués et des dommages tubulaires augmentés pendant la phase aigüe, les souris *casp3*^{-/-} nous permettent de créer un modèle unique pour distinguer les contributions de ces deux compartiments. Les résultats de cette thèse ont démontré que les insultes microvasculaires jouent un rôle clé dans la transition de l'IRA en IRC, et l'inflammation dans la microvascularisation pourrait accélérer ce processus. Ces résultats ajoutent un nouvel argument expérimental pour la nécessité d'évaluer la raréfaction microvasculaire chez les patients en IRC.

À fin de confirmer le rôle de la raréfaction microvasculaire chez les patients transplantés du rein, nous pourrions réaliser une étude de cohorte rétrospective des patients transplantés. Le niveau d'expression de CD31, dans des biopsies des greffons rénaux pré-greffe et 6 mois post-greffe serait évalué par immunohistochimie. La raréfaction microvasculaire serait présentée par le ratio de CD31-6 mois sur pré-greffe. Les niveaux des anti-LG3 pré-greffe seraient quantifiés en utilisant la méthode ELISA. La créatinine sérique serait dosée à 6 mois, 12 mois et 24 mois, et les taux de filtration glomérulaire seraient estimés avec l'équation à quatre variables du MDRD créatinine sérique (qui est une formule pour calculer la fonction rénale). La reprise de fonction du greffon retardée (DGF) est définie comme décrit dans la section matériels et méthodes de l'article 2. Les résultats attendus sont : 1. Chez les patients avec DGF, il y a une corrélation entre la raréfaction microvasculaire et des anti-LG3 élevés pré-greffe; 2. Pour tous les patients, la raréfaction microvasculaire prédit une dysfonction du greffon à 12 mois ou 24 mois, mais cette raréfaction pourrait être plus marquée chez les patients avec DGF.

4. Les mécanismes impliqués dans la fibrose rénale post-IRI

Peu importe l'étiologie, la fibrose interstitielle est une caractéristique anatomopathologique commune de l'IRC. La différenciation de fibroblastes en myofibroblastes (appelé la différenciation myofibroblastique ci-après) est une étape cruciale dans le développement de la fibrose (Grgic, Duffield et al. 2012, Humphreys 2017). De nombreuses études ont identifié un rôle important des ROS dans la différenciation myofibroblastique ainsi que dans la fibrose des organes (Sampson, Koziel et al. 2011, Cheresh, Kim et al. 2013, Samarakoon, Overstreet et al. 2013, Siani and Tirelli 2014, Zhang, He et al. 2014, Andersson-Sjoland, Karlsson et al. 2016, He, Xiong et al. 2016). Il a été démontré, dans plusieurs contextes pathologiques, que la sénescence participe dans la réparation tissulaire et la fibrose. (Voir l'introduction 2.2.4 La fibrose post ischémie-reperfusion) L'âge du donneur est un facteur prédictif indépendant de la fibrose post-transplantation rénale ou hépatique, suggérant un rôle pro-fibrotique de la sénescence (Rayhill, Wu et al. 2007, De Vusser, Lerut et al. 2013). Il est à noter que les ROS sont des déclencheurs puissants de la sénescence et de l'autophagie (Plohnke, Hamann et al. 2014, Filomeni, De Zio et al. 2015, Li, Tan et al. 2015, Davalli, Mitic et al. 2016). Afin de mieux comprendre les relations entre les ROS, l'autophagie, la sénescence et la différenciation myofibroblastique, nous avons choisi un système *in vitro* de fibroblastes (les WI38). La déprivation de sérum (SS) a été utilisée comme stimulus expérimental pour mimer le stress tissulaire causé par la raréfaction microvasculaire. Notre hypothèse initiale était que la SS induirait la production de ROS, qui induiraient l'autophagie et la sénescence, ces dernières activant la différenciation myofibroblastique. Nous avons démontré que la SS induit la production de ROS, qui active la sénescence dépendante de l'autophagie mTORC2. Étonnament, l'inhibition génétique des voies de la sénescence entraîne une augmentation de la différenciation, suggérant des effets négatifs de la sénescence sur la différenciation myofibroblastique.

Nos résultats ont identifié une nouvelle voie de signalisation impliquée dans l'activation de la sénescence. Le rôle de la sénescence dans la fibrose est nébuleux, les conclusions des

différentes études sont controversées. Cela est probablement dû aux effets opposés de la sénescence sur les différents types cellulaires. Nos résultats ont fourni de nouvelles connaissances sur le rôle de la sénescence fibroblastique dans la différenciation myofibroblastique. Nous suggérons que d'autres études sur le rôle de la sénescence sur la fibrose soient effectuées de manière spécifique au type cellulaire.

Il serait très intéressant de confirmer ces résultats dans un système *in vivo* ainsi que dans une étude clinique. Pour le système *in vivo*, il est possible d'utiliser notre modèle murin d'IRI. La sénescence des fibroblastes serait visualisée par la double-coloration immunohistochimique de p16 et ER-TR7 (anticorps anti-fibroblastes). On s'attend à ce qu'il y ait une augmentation de la sénescence des fibroblastes chez les souris post-IRI comparativement aux souris non-opérées. Si cette hypothèse se valide, les rôles des ROS et l'autophagie dans l'activation de la sénescence post-IRI pourrait être ensuite évalués en utilisant un modèle d'IRI chez les souris LC3-GFP. La protéine associée aux microtubules 1A / 1B chaîne légère 3A (LC3) est une protéine soluble d'une masse moléculaire d'environ 17 kDa. Pendant l'autophagie, la forme cytosolique de LC3 (LC3-I) est conjuguée à la phosphatidyléthanolamine pour former la LC3 conjuguée (LC3-II), qui est recrutée sur les membranes autophagosomiques (Kabeya, Mizushima et al. 2000). Les souris GFP-LC3 sont une colonie transgénique où la LC3 est fusionnée avec une protéine fluorescente verte (GFP). Cette fusion n'interfère pas avec le processus autophagique et nous permet de voir la structure en forme d'anneau des autophagosomes par la microscopie à fluorescence (Mizushima, Yamamoto et al. 2004). Afin de déterminer l'effet des ROS, un groupe de souris recevra l'injection intra-péritonéale de la N-acétylcystéine (NAC), qui est un inhibiteur de ROS (Kim, Jang et al. 2010). Afin d'étudier le rôle de l'autophagie, un autre groupe de souris recevra l'injection intra-péritonéale de la 3-méthyladenine (Zhao, Sun et al. 2015). Les anticorps ER-TR7 et anti-p16 seront appliqués pour marquer les fibroblastes sénescents en utilisant la méthode d'immunofluorescence. Les résultats attendus sont : 1. Comparées avec les souris non-opérées, il y aura une augmentation de l'autophagie dans les fibroblastes rénaux. 2. Chez les souris post-IRI, l'injection de 3-méthyladenine diminuera la sénescence des fibroblastes. 3. Chez les souris post-IRI, l'injection de NAC diminuera l'autophagie et la sénescence des fibroblastes.

L'étude clinique sera réalisée dans la même cohorte rétrospective que décrit ci-dessus. On s'attend à ce qu'il y ait une corrélation entre la raréfaction microvasculaire et la sénescence des fibroblastes à 6 mois post-transplantation. On s'attend aussi à ce qu'il y ait une corrélation inverse entre la sénescence des fibroblastes à 6 mois et la fibrose interstitielle à 12 mois ou à 24 mois post-transplantation.

5. Identification des marqueurs des dommages microvasculaires dans le contexte de l'IRA induite par l'IRI

Contrairement aux biomarqueurs de dommage tubulaire qui sont bien caractérisés, il n'y a pas de biomarqueurs fiables de dommage microvasculaire dans l'IRA induite par l'IRI. Étant donné que les dommages microvasculaires jouent un rôle crucial dans la physiopathologie de l'IRA et dans son pronostic, il serait nécessaire d'identifier des biomarqueurs spécifiques aux dommages microvasculaires (Ince 2014).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons créé un modèle unique où il y a plus de dommages tubulaires, mais moins de dommages microvasculaires dans la phase aigüe de l'IRI. Ce modèle serait particulièrement utile pour la recherche de biomarqueurs spécifiques aux dommages microvasculaires. En utilisant les approches protéomiques, on irait d'abord vérifier les biomarqueurs discutés ci-dessous, qui sont des marqueurs de dommages microvasculaires identifiés dans d'autres contextes des maladies. Ensuite on identifierait potentiellement d'autres biomarqueurs qui sont présentement inconnus. Étant donné que les anti-LG3 causent plus de dommages microvasculaires chez les patients avec DGF, on peut ensuite vérifier si les biomarqueurs identifiés sont plus élevés chez les patients qui ont de titres élevés d'anti-LG3 pré-transplantation. On pourrait aussi vérifier si les biomarqueurs ci-dessous corrélerent avec la raréfaction microvasculaire à 6 mois post-transplantation.

5.1 L'E-sélectine soluble

La famille des sélectines comprend trois récepteurs de glycoprotéines transmembranaires de type I. Ils sont nommés en fonction de leurs sites d'expression principaux: E-sélectine-endothélium, P-sélectine- plaquettes et ECs activées, L-sélectine-lymphocytes. Ce sont des initiateurs importants de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium (Telen 2014, McEver 2015). La forme soluble de l'E-sélectine est générée principalement par un clivage enzymatique dans les ECs endommagées. L'E-sélectine soluble est l'un des biomarqueurs les plus prometteurs. Son niveau sérique augmente de façon significative dans plusieurs maladies où les dommages endothéliaux sont des manifestations principales, incluant les accidents vasculaires cérébraux et le diabète (Garcia-Unzueta, Berrazueta et al. 2005, Prugger, Luc et al. 2013).

5.2 Le PAI-1 et l'uPA

L'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) est une sérine protéase impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire. On croit que uPA joue un rôle essentiel dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF (Yang, Liu et al. 2011). L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) est l'inhibiteur le plus puissant de l'uPA. Il était démontré que l'uPA corrèle avec la sévérité de la septicémie et le PAI-1 est augmenté de façon significative chez les patients atteints de syndrome métabolique (Yang, Liu et al. 2011, Ahirwar, Jain et al. 2015).

5.3 La thrombomoduline

La thrombomoduline est une glycoprotéine transmembranaire de surface cellulaire endothéliale. Elle possède des activités anticoagulantes dans les conditions normales. Quand les ECs sont endommagées, elle est clivée, possiblement par des enzymes dérivées de neutrophiles, produisant une forme soluble. Une corrélation entre la thrombomoduline soluble et la sévérité de l'insuffisance rénale chronique a été décrite (Sharain, Hoppensteadt et al. 2013).

5.4 L'angiopoïétine-2 et des autres médiateurs de l'angiogenèse

L'angiopoïétine-2 (Ang-2) est un ligand antagoniste du récepteur Tie2. Elle est exprimée par les ECs. Dans les contextes physiologiques, où les ECs sont quiescentes, elle est stockée dans les corps Weibel-Palade (WPB). Lorsque les ECs sont endommagées/activées, l'Ang-2 sera libérée rapidement (Fiedler, Scharpfenecker et al. 2004). L'augmentation de l'Ang-2 circulante a été documentée dans différentes maladies qui ont des dommages microvasculaires, incluant le diabète, l'artériosclérose de l'allogreffe cardiaque, le syndrome coronarien aigu (Nykanen, Krebs et al. 2003, Lee, Lip et al. 2004, Lim, Lip et al. 2005). Il a aussi été démontré qu'elle agit comme un prédicteur indépendant de la mortalité chez les receveurs de greffe rénale (Molnar, Kümpers et al. 2014).

Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) est le médiateur central de l'angiogenèse. L'endocane est un protéoglycane soluble sécrété par les ECs. La tyrosine kinase-1 de type fms soluble (sFlt-1 ou VEGFR-1) est un variant d'épissage du récepteur -1 du VEGF. Les deux médiateurs jouent un rôle important dans les voies de signalisation du VEGF. Il a été démontré que leur taux augmente dans différentes maladies qui causent des dommages microvasculaires (Chapal, Neel et al. 2013, Kose, Emet et al. 2014, Hammadah, Georgiopolou et al. 2016, Bicer, Guler et al. 2017).

6. Les thérapies visant à limiter la raréfaction microvasculaire

Comme il est mentionné ci-dessus, les résultats de cette thèse suggèrent fortement que la raréfaction microvasculaire joue un rôle prédominant dans la progression de l'IRA induite par l'IRI. Les traitements actuels sont des traitements de soutiens qui n'interfère pas la réparation microvasculaire. Il serait très intéressant de développer des thérapies visant à limiter la raréfaction microvasculaire. Dans ce but, on propose de cibler deux processus physiopathologiques, l'angiogenèse et la réparation microvasculaire. Les mécanismes impliqués dans ces deux processus seront discutés ci-dessous.

6.1 L'angiogenèse

L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par la germination et l'allongement des vaisseaux existants. Le processus de l'angiogenèse est illustré dans la figure 7. Les thérapies ciblant l'angiogenèse ont été développées dans plusieurs contextes de maladie, qui sont plutôt anti-angiogéniques incluant notamment les cancers (El-Kenawi and El-Remessy 2013, Vasudev and Reynolds 2014, Neuzillet, Tijeras-Raballand et al. 2015). Mais dans le contexte de l'IRA induite par l'IRA, les traitements pro-angiogéniques peuvent être potentiellement utiles. L'angiogenèse est régulée par de nombreuses cytokines qui pourraient servir potentiellement comme des cibles thérapeutiques (Ribatti and Crivellato 2012).

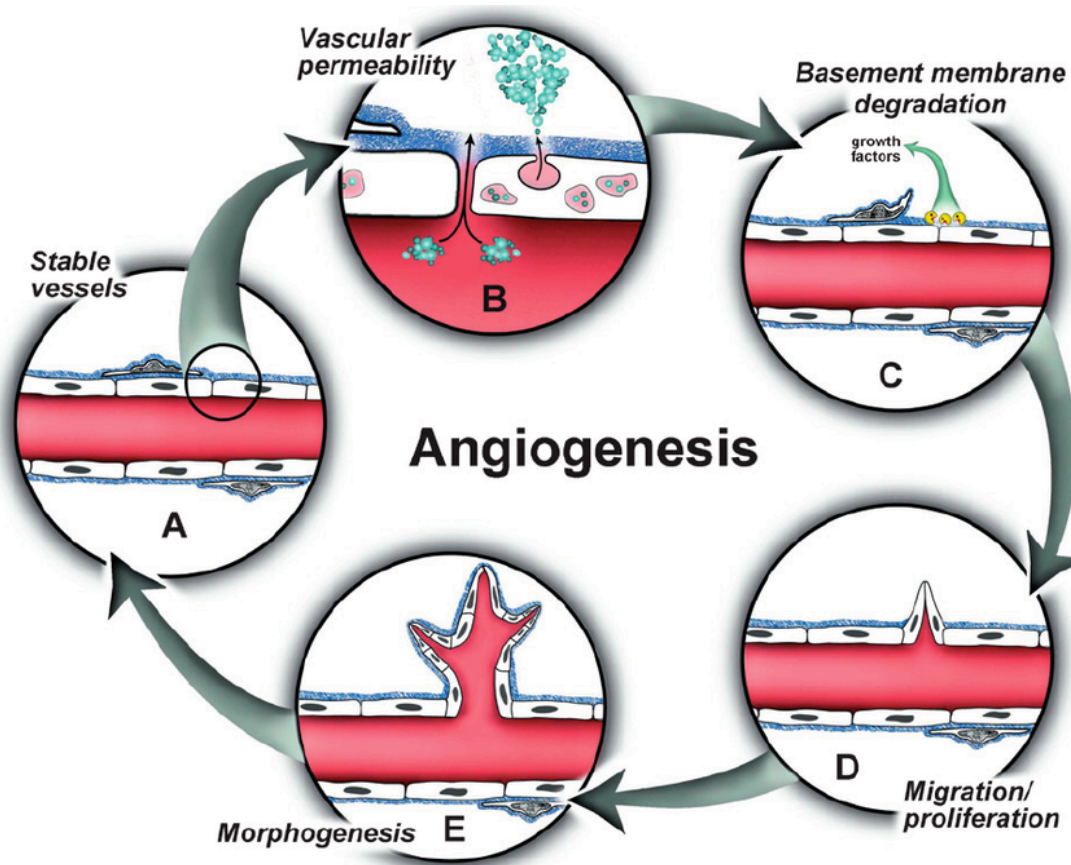


Figure 7. Illustration de l'angiogenèse

citée de (Bryan and D'Amore 2007) Reprinted by permission

A. En réponse à des stimuli angiogéniques, les jonctions intracellulaires entre les ECs se relâchent. B et C. L'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la dégradation de la matrice extracellulaire par les protéinases conduit à la libération locale des facteurs angiogéniques. D. Stimulées par les facteurs angiogéniques, les ECs migrent dans la matrice extracellulaire. E. La formation du lumen se fait à proximité du front migrant. En parallèle, la synthèse de la nouvelle membrane basale et le recrutement de péricytes pour stabiliser les ECs.

6.1.1 Les facteurs hypoxiques inductibles

Dans les reins, différentes voies de réponse moléculaire sont activées par l'hypoxie. Les médiateurs centraux de ces voies sont les facteurs hypoxiques inductibles (HIF-1 α). Les HIFs appartiennent à un groupe de facteurs de transcription qui sont caractérisés par une structure de l'hélice-boucle-hélice-PAS. La famille de HIF est constituée d'une sous-unité α labile (HIF-1 α , HIF-2 α ou HIF-3 α) et d'une sous-unité β (ARNT) stable commune qui s'hétérodimérise pour former un complexe transcriptionnel fonctionnel. L'activité de HIF est principalement régulée par la dégradation oxygène-dépendante de la sous-unité HIF- α par les protéasomes. Dans des conditions hypoxiques, l'hétérodimère de HIF peut migrer vers le noyau. La liaison de HIF aux éléments de réponse d'hypoxie mène à l'activation transcriptionnelle des gènes inductibles par l'hypoxie, y compris d'une série de facteurs pro-angiogéniques (Deshmukh, Patel et al. 2012, Rhim, Lee et al. 2013, Shoji, Tanaka et al. 2014).

L'activation des HIFs a été démontrée dans plusieurs maladies rénales, incluant la néphropathie diabétique, la glomérulonéphrite à IgA et la néphropathie à allogreffe chronique (Fine and Norman 2008). L'effet de l'activation des HIFs sur la progression des maladies rénales est encore débattu. Il a été rapporté dans un modèle murin de l'IRA induite par l'IRI que l'augmentation des HIFs a un effet protecteur contre l'IRI (Hill, Shukla et al. 2008).

6.1.2 Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)

La famille de VEGF comprend plusieurs facteurs angiogéniques, dont le VEGF-A qui est le plus puissant. Dans des conditions hypoxiques, l'expression de VEGF-A est principalement

augmentée par les HIFs au niveau transcriptionnel (Nakagawa, Sato et al. 2013, Tanaka and Nangaku 2013).

Deux récepteurs de tyrosine kinases (RTK) ont été identifiés pour le VEGF, le VEGF-R1 (Flt-1) et le VEGF-R2 (KDR / Flk-1). VEGF-A régule l'angiogenèse en se liant au récepteur VEGF 2. Le rôle de VEGFR-1 dans l'angiogenèse n'est pas encore complètement élucidé. Le VEGFR-1 a une activité faible de tyrosine kinase. Il est considéré classiquement comme un récepteur anti-angiogénique parce qu'il agit comme un récepteur leurre pour le VEGF-A. Cependant, il a été démontré que la signalisation intracellulaire VEGFR-1 stimule l'angiogenèse dans certains types cellulaires, incluant les ECs et les cellules stromales (Schwartz, Rowinsky et al. 2010). Il est généralement accepté que le VEGFR-2 joue un rôle prédominant dans la transduction des signaux pro-angiogéniques induits par VEGF-A. Une fois que le VEGFR-2 est stimulé, les cellules de pointe (tip cell) augmentent l'expression de la protéine 4 de type Delta (DLL4) et activent la voie de signalisation de Notch dans les cellules tiges (stalk cells). L'activation de Notch entraîne une diminution des VEGFR-1 dans les cellules tiges, permettant aux cellules de pointe de diriger la germination et l'allongement du vaisseau (Phng, Potente et al. 2009).

Il a été démontré, dans un modèle animal d'IRA induite par l'IRI, que le VEGF-A est diminué post-IRI (Basile, Fredrich et al. 2008). L'administration de VEGF-A préserve la microvascularisation post-IRI (Leonard, Friedrich et al. 2008).

6.1.3 La voie de signalisation angiopoïétines - Tie-2

Les angiopoïétines (Ang) appartiennent à une famille de glycoprotéines sécrétoires, dont quatre formes ont été identifiées: l'Ang-1, l'Ang-2, l'Ang-3 et l'Ang-4 (Davis, Aldrich et al. 1996, Nishimura, Miki et al. 1999, Valenzuela, Griffiths et al. 1999). Le Tie-2 (Tyrosine kinase avec des domaines de type immunoglobuline et EGF) est un récepteur des angiopoïétines qui est exprimé exclusivement dans les ECs. Il est généralement accepté que l'Ang-1 est un agoniste pour le Tie-2, et l'Ang-2 est un antagoniste interférant dans la phosphorylation du Tie-2 induite par l'Ang-1 (Scholz, Plate et al. 2015). Dans les contextes physiologiques, en stimulant le Tie-2, l'Ang-1 stabilise les capillaires en favorisant la survie

des ECs et réduisant la perméabilité vasculaire. Dans le contexte des dommages microvasculaires, les ECs endommagées secrètent plus d'Ang-2 qui inhibent la voie de signalisation de l'Ang-1 - Tie-2 de manière compétitive entraînant ainsi une déstabilisation des vaisseaux. Le devenir des ECs de ces vaisseaux dépendent de la présence du VEGF. En présence du VEGF, les ECs commencent à migrer et proliférer afin de former de nouveaux vaisseaux. Elles meurent en absence du VEGF (Lobov, Brooks et al. 2002).

Il a été démontré que, chez les patients avec IRC, le taux sérique d'Ang-1 est diminué (Futrakul, Butthep et al. 2008). Dans un modèle animal d'IRA induite par l'IRI, l'utilisation de traitement qui augmente l'Ang-1 apporte des effets protecteurs contre l'IRI (Jung, Kim et al. 2009).

Il serait donc intéressant d'évaluer ces voies de signalisation dans la cohorte des patients greffés qui est mentionnée ci-dessus. On s'attend à ce que, chez les patients avec DGF, ceux qui ont des présences de titres élevés d'anti-LG3 pré-transplantation aient moins de VEGF-A et Ang-1 dans le sérum post-transplant. Nous pensons aussi que cette diminution pourrait corrélérer avec la raréfaction microvasculaire à 6 mois post-transplantation.

Il serait aussi intéressant d'évaluer si le niveau de VEGF-A et Ang-1 dans le perfusât des greffons rénaux prédit le DGF. Si c'est vrai, l'application de traitements augmentant le VEGF-A et l'Ang-1 pourrait être bénéfique pour les patients.

6.2 Les cellules progénitrices endothéliales et la réparation microvasculaire

Après les dommages, la microvascularisation commence à se réparer. Les ECs endommagées pourraient être remplacées par des cellules qui sont origine de deux sources : 1. L'activation et la prolifération des ECs voisines ; 2. Les cellules progénitrices endothéliales (EPCs) circulantes. Il est maintenant de plus en plus accepté que les EPC sont impliqués dans l'initiation de la réparation microvasculaire (Reinders, Rabelink et al. 2006).

La moelle osseuse est la source principale des EPCs. Suite aux signaux libérés par les dommages microvasculaire, les EPCs migrent dans la circulation vers les sites endommagés et favorisent la réparation microvasculaire et la reperfusion tissulaire (Schatteman, Dunnwald et al. 2007). L'effet protecteur dans l'IRA des EPCs a été démontré par plusieurs études (Reinders, Rabelink et al. 2006, Schatteman, Dunnwald et al. 2007, Jung, Kim et al. 2009). Cependant, les EPCs de patients atteints d'IRC présentent des dysfonctions incluant une adhérence altérée, un potentiel de croissance endothéliale réduit et une fonction anti-thrombotique réduite. Ces travaux suggèrent que l'effet protecteur des EPCs exige non seulement le nombre des EPCs circulants, mais aussi un microenvironnement permissif (Krenning, Dankers et al. 2009).

Il est possible d'évaluer le nombre et les dysfonctions des EPCs pré-transplantation dans la cohorte mentionnée ci-dessus pour savoir s'ils corrèlent avec la raréfaction microvasculaire à 6 mois post-transplantation.

Conclusion

Nous avons démontré que la mort cellulaire joue un rôle crucial dans la physiopathologie de l'IRA induite par l'IRI.

Dans la première partie de cette thèse, en utilisant un modèle murin d'IRA, nous montrons que pendant la phase aiguë de l'IRI, l'absence de caspase-3 aggrave la dysfonction rénale. Nous observons une diminution des dommages microvasculaires, mais une augmentation des dommages tubulaires, liée à une aggravation de la nécroptose dans les cellules tubulaires. Cette différence de sévérité de dommages entre les deux compartiments indique que les cellules endothéliales et les cellules épithéliales tubulaires possèdent une programmation différente de la mort cellulaire. Cela montre aussi le rôle prédominant de la caspase-3 jouée dans les insultes microvasculaires induites par l'IRI pendant la phase aiguë de l'IRA. Il a été démontré par différentes études que les deux compartiments jouent des rôles importants dans le contexte d'IRA induite par l'IRI, mais les contributions de chaque de ces deux compartiments sont pas encore claires. Nous avons créé un modèle murin unique, qui nous permet de distinguer les rôles des dommages microvasculaires et des dommages tubulaires. Nos résultats identifient les dommages microvasculaires comme la force motrice dans la raréfaction microvasculaire, la fibrose, et la dysfonction chronique. Notre modèle sera également très utile pour étudier les biomarqueurs spécifiques aux dommages microvasculaires dans le contexte de l'IRA induite par l'IRI.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons exploré les mécanismes impliqués dans les dommages microvasculaires causés par l'activation de caspase-3. L'activation de la caspase-3 peut déclencher la production de certains auto-antigènes, qui peuvent ensuite accentuer l'inflammation par l'induction de l'auto-immunité. Un de ces auto-antigènes, le LG3, a été identifié par notre laboratoire. Nous avons démontré que le LG3 est libéré par les cellules endothéliales apoptotiques de façon caspase-3-dépendente. Nos résultats au cours de cette thèse ont montré que les anticorps anti-LG3 n'affectent pas la fonction des reins sains. Cependant, s'il existe des lésions dues à l'ischémie reperfusion, les anti-LG3 activent le système du complément et aggravent la dysfonction rénale. Ces résultats indiquent que les

dommages microvasculaires et l'activation de la caspase-3 causées par l'IRI créent un microenvironnement permissif pour les autoanticorps anti-LG3, qui initie une boucle de rétroaction entre l'inflammation et les insultes tissulaires, entraînant une dysfonction rénale et une raréfaction microvasculaire accentuées. Il semblerait intéressant de valider l'hypothèse selon laquelle l'accentuation de l'inflammation induite par les anti-LG3 entraîne une raréfaction microvasculaire chez les patients transplantés, aboutissant à une moins bonne fonction du greffon.

Dans la dernière partie de cette thèse, nous avons exploré les mécanismes impliqués dans la raréfaction microvasculaire et la fibrose. Les fibroblastes sont la source prédominante des myofibroblastes, ces derniers sont des acteurs clés dans la fibrose. Nous avons donc choisi un système *in vitro* de fibroblastes (les WI38). La déprivation de sérum (SS) a été utilisée comme stimulus expérimental pour mimer le stress tissulaire causé par la raréfaction microvasculaire. Nous avons démontré que la SS induit la production de ROS, qui active la sénescence dépendante de l'autophagie mTORC2. Étonnamment, l'inhibition génétique des voies de la sénescence entraîne une augmentation de la différenciation, suggérant des effets négatifs de la sénescence sur la différenciation myofibroblastique. Il serait intéressant de confirmer ces résultats dans un modèle animal de l'IRA induite par l'IRI.

Au total, nos résultats ont démontré des rôles importants de différents types de mort cellulaire dans la physiopathologie de l'IRA induite par l'IRI, ainsi que le rôle crucial des dommages microvasculaires au cours de l'IRI dans la fibrose et la dysfonction rénale chronique. Actuellement, il n'y a pas de traitement qui cible les dommages microvasculaires ou la raréfaction microvasculaire dans le contexte de l'IRA induite par l'IRI, ni dans d'autres maladies rénales. Il serait intéressant d'étudier les altérations des voies de l'angiogenèse au cours de l'IRA induite par l'IRI, à des fins thérapeutiques. La possibilité d'un traitement par des cellules endothéliales progénitrices semble également intéressant pour des études ultérieures.

Bibliographie

- Aachoui, Y., V. Sagulenko, E. A. Miao and K. J. Stacey (2013). "Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection." Current Opinion in Microbiology **16**(3): 319-326.
- Abreu, J. G., N. I. Ketpura, B. Reversade and E. M. De Robertis (2002). "Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta." Nat Cell Biol **4**(8): 599-604.
- Acloque, H., M. S. Adams, K. Fishwick, M. Bronner-Fraser and M. A. Nieto (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease." J Clin Invest **119**(6): 1438-1449.
- Adiyanti, S. S. and T. Loho (2012). "Acute Kidney Injury (AKI) biomarker." Acta Med Indones. **44**(3): 246-255.
- Ahirwar, A. K., A. Jain, A. Singh, B. Goswami, M. K. Bhatnagar and J. Bhattacharjee (2015). "The study of markers of endothelial dysfunction in metabolic syndrome." Horm Mol Biol Clin Investig **24**(3): 131-136.
- Andersson-Sjoland, A., J. C. Karlsson and K. Rydell-Tormanen (2016). "ROS-induced endothelial stress contributes to pulmonary fibrosis through pericytes and Wnt signaling." Lab Invest **96**(2): 206-217.
- Angaswamy, N., C. Klein, V. Tiriveedhi, J. Gaut, S. Anwar, A. Rossi, D. Phelan, J. R. Wellen, S. Shenoy, W. C. Chapman and T. Mohanakumar (2014). "Immune responses to collagen-IV and fibronectin in renal transplant recipients with transplant glomerulopathy." Am J Transplant **14**(3): 685-693.
- Angelotti, M. L., E. Ronconi, L. Ballerini, A. Peired, B. Mazzinghi, C. Sagrinati, E. Parente, M. Gacci, M. Carini, M. Rotondi, A. B. Fogo, E. Lazzeri, L. Lasagni and P. Romagnani (2012). "Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury." Stem Cells **30**(8): 1714-1725.
- Angioi, A., F. C. Fervenza, S. Sethi, Y. Zhang, R. J. Smith, D. Murray, J. Van Praet, A. Pani and A. S. De Vriese (2016). "Diagnosis of complement alternative pathway disorders." Kidney Int **89**(2): 278-288.

Awad, A. S. and A. A. El-Sharif (2011). "Curcumin immune-mediated and anti-apoptotic mechanisms protect against renal ischemia/reperfusion and distant organ induced injuries." Int Immunopharmacol. **11**(8): 992-996. doi: 910.1016/j.intimp.2011.1002.1015. Epub 2011 Feb 1024.

Bakin, A. V., A. K. Tomlinson, N. A. Bhowmick, H. L. Moses and C. L. Arteaga (2000). "Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration." J Biol Chem **275**(47): 36803-36810.

Barger, A. C. and J. A. Herd (1971). "The renal circulation." N Engl J Med. **284**(9): 482-490.

Barnes, J. L. and Y. Gorin (2011). "Myofibroblast Differentiation During Fibrosis: Role of NAD(P)H Oxidases." Kidney international **79**(9): 944-956.

Basile, D. P. (2004). "Rarefaction of peritubular capillaries following ischemic acute renal failure: a potential factor predisposing to progressive nephropathy." Curr Opin Nephrol Hypertens **13**(1): 1-7.

Basile, D. P. (2007). "The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function." Kidney Int. **72**(2): 151-156. Epub 2007 May 2002.

Basile, D. P., D. Donohoe, K. Roethe and J. L. Osborn (2001). "Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function." Am J Physiol Renal Physiol **281**(5): F887-899.

Basile, D. P., D. Donohoe, K. Roethe and J. L. Osborn (2001). "Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function." Am J Physiol Renal Physiol. **281**(5): F887-899.

Basile, D. P., K. Fredrich, B. Chelladurai, E. C. Leonard and A. R. Parrish (2008). "Renal ischemia reperfusion inhibits VEGF expression and induces ADAMTS-1, a novel VEGF inhibitor." Am J Physiol Renal Physiol **294**(4): F928-936.

Basile, D. P., J. L. Friedrich, J. Spahic, N. Knipe, H. Mang, E. C. Leonard, S. Changizi-Ashtiyani, R. L. Bacallao, B. A. Molitoris and T. A. Sutton (2011). "Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury." Am J Physiol Renal Physiol **300**(3): F721-733.

Basile, D. P., J. L. Friedrich, J. Spahic, N. Knipe, H. Mang, E. C. Leonard, S. Changizi-

Ashtiyani, R. L. Bacallao, B. A. Molitoris and T. A. Sutton (2011). "Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury." Am J Physiol Renal Physiol. **300**(3): F721-733. doi: 710.1152/ajprenal.00546.02010. Epub 02010 Dec 00541.

Beeuwkes, R., 3rd (1980). "The vascular organization of the kidney." Annu Rev Physiol **42**: 531-542.

Bellance, N., P. Lestienne and R. Rossignol (2009). "Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis." Front Biosci (Landmark Ed) **14**: 4015-4034.

Beltrame, M. H., S. J. Catarino, I. Goeldner, A. B. Boldt and I. J. de Messias-Reason (2014). "The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease." Front Pediatr **2**: 148.

Bernard, M., M. Dieudé, B. Yang, K. Hamelin, K. Underwood and M.-J. Hébert (2014). "Autophagy fosters myofibroblast differentiation through MTORC2 activation and downstream upregulation of CTGF." Autophagy **10**(12): 2193-2207.

Besarani, D., L. Cerundolo, J. D. Smith, J. Procter, M. C. Barnardo, I. S. Roberts, P. J. Friend, M. L. Rose and S. V. Fuggle (2014). "Role of anti-vimentin antibodies in renal transplantation." Transplantation **98**(1): 72-78.

Bicer, M., A. Guler, G. Unal Kocabas, C. Imamoglu, A. Baloglu, O. Bilgir, A. Yuksel, G. Bozkaya and M. Calan (2017). "Endocan is a predictor of increased cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome." Endocr Res **42**(2): 145-153.

Bohle, A., J. Jahnecke, D. Meyer and G. E. Schubert (1976). "Morphology of acute renal failure: comparative data from biopsy and autopsy." Kidney Int Suppl. **6**: S9-16.

Bonegio, R. and W. Lieberthal (2002). "Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure." Curr Opin Nephrol Hypertens. **11**(3): 301-308.

Bonventre, J. V. (2007). "Pathophysiology of acute kidney injury: roles of potential inhibitors of inflammation." Contrib Nephrol **156**: 39-46.

Boor, P., T. Ostendorf and J. Floege (2010). "Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets." Nat Rev Nephrol **6**(11): 643-656.

Botos, I., D. M. Segal and D. R. Davies (2011). "The structural biology of Toll-like receptors." Structure. **19**(4): 447-459. doi: 410.1016/j.str.2011.1002.1004.

Brenner, D., H. Blaser and T. W. Mak (2015). "Regulation of tumour necrosis factor signalling:

live or let die." Nat Rev Immunol **15**(6): 362-374.

Brodsky, S. V., T. Yamamoto, T. Tada, B. Kim, J. Chen, F. Kajiyama and M. S. Goligorsky (2002). "Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells." Am J Physiol Renal Physiol **282**(6): F1140-1149.

Broekema, M., M. C. Harmsen, M. J. van Luyn, J. A. Koerts, A. H. Petersen, T. G. van Kooten, H. van Goor, G. Navis and E. R. Poppa (2007). "Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the renal interstitial myofibroblast population and produce procollagen I after ischemia/reperfusion in rats." J Am Soc Nephrol **18**(1): 165-175.

Bryan, B. A. and P. A. D'Amore (2007). "What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis." Cell Mol Life Sci **64**(16): 2053-2065.

Bubeck, D. (2014). "The making of a macromolecular machine: assembly of the membrane attack complex." Biochemistry **53**(12): 1908-1915.

Burne, M. J., F. Daniels, A. El Ghandour, S. Mauiyyedi, R. B. Colvin, M. P. O'Donnell and H. Rabb (2001). "Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure." J Clin Invest **108**(9): 1283-1290.

Burne-Taney, M. J., D. B. Ascon, F. Daniels, L. Racusen, W. Baldwin and H. Rabb (2003). "B cell deficiency confers protection from renal ischemia reperfusion injury." J Immunol **171**(6): 3210-3215.

Burt, L. E., M. S. Forbes, B. A. Thornhill, S. C. Kiley and R. L. Chevalier (2007). "Renal vascular endothelial growth factor in neonatal obstructive nephropathy. I. Endogenous VEGF." Am J Physiol Renal Physiol **292**(1): F158-167.

Cailhier, J. F., I. Sirois, P. Laplante, S. Lepage, M. A. Raymond, N. Brassard, A. Prat, R. V. Iozzo, A. V. Pshezhetsky and M. J. Hebert (2008). "Caspase-3 activation triggers extracellular cathepsin L release and endorepellin proteolysis." J Biol Chem **283**(40): 27220-27229.

Cambar, J., C. Dorian and J. C. Cal (1987). "[Chronobiology and renal physiopathology]." Pathol Biol (Paris) **35**(6): 977-984.

Cardinal, H., M. Dieude, N. Brassard, S. Qi, N. Patey, M. Soulez, D. Beillevaire, F. Echeverry, C. Daniel, Y. Durocher, F. Madore and M. J. Hebert (2013). "Antiperlecan antibodies are novel accelerators of immune-mediated vascular injury." Am J Transplant **13**(4): 861-874.

Chandraker, A., M. Takada, K. C. Nadeau, R. Peach, N. L. Tilney and M. H. Sayegh (1997).

"CD28-b7 blockade in organ dysfunction secondary to cold ischemia/reperfusion injury." Kidney Int **52**(6): 1678-1684.

Chapal, M., M. Neel, F. Le Borgne, E. Meffray, O. Carceles, M. Hourmant, M. Giral, Y. Foucher, A. Moreau and F. Fakhouri (2013). "Increased soluble Flt-1 correlates with delayed graft function and early loss of peritubular capillaries in the kidney graft." Transplantation **96**(8): 739-744.

Chatauret, N., L. Badet, B. Barrou and T. Hauet (2014). "Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury." Prog Urol **24 Suppl 1**: S4-12.

Chawla, L. S., R. L. Amdur, S. Amodeo, P. L. Kimmel and C. E. Palant (2011). "The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease." Kidney Int. **79**(12): 1361-1369. doi: 1310.1038/ki.2011.1342. Epub 2011 Mar 1323.

Chen, J., R. John, J. A. Richardson, J. M. Shelton, X. J. Zhou, Y. Wang, Q. Q. Wu, J. R. Hartono, P. D. Winterberg and C. Y. Lu (2011). "Toll-like receptor 4 regulates early endothelial activation during ischemic acute kidney injury." Kidney Int. **79**(3): 288-299. doi: 210.1038/ki.2010.1381. Epub 2010 Oct 1036.

Cheng, Y., X. Ren, W. N. Hait and J.-M. Yang (2013). "Therapeutic Targeting of Autophagy in Disease: Biology and Pharmacology." Pharmacological Reviews **65**(4): 1162.

Cheresh, P., S. J. Kim, S. Tulasiram and D. W. Kamp (2013). "Oxidative stress and pulmonary fibrosis." Biochim Biophys Acta **1832**(7): 1028-1040.

Chertow, G. M., E. Burdick, M. Honour, J. V. Bonventre and D. W. Bates (2005). "Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients." J Am Soc Nephrol **16**(11): 3365-3370.

Clements, M. E., C. J. Chaber, S. R. Ledbetter and A. Zuk (2013). "Increased cellular senescence and vascular rarefaction exacerbate the progression of kidney fibrosis in aged mice following transient ischemic injury." PLoS One **8**(8): e70464.

Coca, S. G., S. Singanamala and C. R. Parikh (2012). "Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis." Kidney Int **81**(5): 442-448.

Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." Biochem J **326 (Pt 1)**: 1-16.

Conrad, M., J. P. Angeli, P. Vandenabeele and B. R. Stockwell (2016). "Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities." Nat Rev Drug Discov **15**(5): 348-366.

Conte, D., P. Liston, J. W. Wong, K. E. Wright and R. G. Korneluk (2001). "Thymocyte-targeted overexpression of xiap transgene disrupts T lymphoid apoptosis and maturation." Proc Natl Acad Sci U S A. **98**(9): 5049-5054. Epub 2001 Apr 5017.

Cruz, D. N., Z. Ricci and C. Ronco (2009). "Clinical review: RIFLE and AKIN--time for reappraisal." Crit Care **13**(3): 211.

Davalli, P., T. Mitic, A. Caporali, A. Lauriola and D. D'Arca (2016). "ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases." Oxid Med Cell Longev **2016**: 3565127.

Davis, S., T. H. Aldrich, P. F. Jones, A. Acheson, D. L. Compton, V. Jain, T. E. Ryan, J. Bruno, C. Radziejewski, P. C. Maisonpierre and G. D. Yancopoulos (1996). "Isolation of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, by Secretion-Trap Expression Cloning." Cell **87**(7): 1161-1169.

Day, Y. J., L. Huang, H. Ye, J. Linden and M. D. Okusa (2005). "Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages." Am J Physiol Renal Physiol. **288**(4): F722-731. Epub 2004 Nov 2023.

de Diego, J. L., G. Gerold and A. Zychlinsky (2007). "Sensing, presenting, and regulating PAMPs." Ernst Schering Found Symp Proc(3): 83-95.

de Ramon, L., E. Ripoll, A. Merino, M. Lucia, J. M. Aran, S. Perez-Rentero, N. Lloberas, J. M. Cruzado, J. M. Grinyo and J. Torras (2015). "CD154-CD40 T-cell co-stimulation pathway is a key mechanism in kidney ischemia-reperfusion injury." Kidney Int **88**(3): 538-549.

de Vries, B., J. Kohl, W. K. Leclercq, T. G. Wolfs, A. A. van Bijnen, P. Heeringa and W. A. Buurman (2003). "Complement factor C5a mediates renal ischemia-reperfusion injury independent from neutrophils." J Immunol. **170**(7): 3883-3889.

De Vusser, K., E. Lerut, D. Kuypers, Y. Vanrenterghem, I. Jochmans, D. Monbaliu, J. Pirenne and M. Naesens (2013). "The predictive value of kidney allograft baseline biopsies for long-term graft survival." J Am Soc Nephrol **24**(11): 1913-1923.

Degterev, A., Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G. D. Cuny, T. J. Mitchison, M. A. Moskowitz and J. Yuan (2005). "Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury." Nat Chem Biol **1**(2): 112-119.

DeLuca, H. F. (1976). "Vitamin D endocrinology." Ann Intern Med **85**(3): 367-377.

Demaria, M., N. Ohtani, S. A. Youssef, F. Rodier, W. Toussaint, J. R. Mitchell, R.-M. Laberge, J. Vijg, H. Van Steeg, M. E. T. Dollé, J. H. J. Hoeijmakers, A. de Bruin, E. Hara and J. Campisi (2014). "An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA." Developmental cell **31**(6): 722-733.

Deshmukh, A. B., J. K. Patel, A. R. Prajapati and S. Shah (2012). "Perspective in chronic kidney disease: targeting hypoxia-inducible factor (HIF) as potential therapeutic approach." Ren Fail **34**(4): 521-532.

Desmouliere, A., C. Chaponnier and G. Gabbiani (2005). "Tissue repair, contraction, and the myofibroblast." Wound Repair Regen **13**(1): 7-12.

Deveraux, Q. L., N. Roy, H. R. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zhou, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1998). "IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases." EMBO J. **17**(8): 2215-2223.

Di Lullo, G. A., S. M. Sweeney, J. Korkko, L. Ala-Kokko and J. D. San Antonio (2002). "Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen." J Biol Chem **277**(6): 4223-4231.

Diaz-Flores, L., R. Gutierrez, J. F. Madrid, H. Varela, F. Valladares, E. Acosta, P. Martin-Vasallo and L. Diaz-Flores, Jr. (2009). "Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche." Histol Histopathol **24**(7): 909-969.

Dieudé, M., C. Bell, J. Turgeon, D. Beillevaire, L. Pomerleau, B. Yang, K. Hamelin, S. Qi, N. Pallet, C. Béland, W. Dhahri, J.-F. Cailhier, M. Rousseau, A.-C. Duchez, T. Lévesque, A. Lau, C. Rondeau, D. Gingras, D. Muruve, A. Rivard, H. Cardinal, C. Perreault, M. Desjardins, É. Boilard, P. Thibault and M.-J. Hébert (2015). "The 20s proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection." Science Translational Medicine **7**(318): 318ra200.

Dinarello, C. A. (1999). "Interleukin-18." Methods. **19**(1): 121-132.

DiRocco, D. P., J. Bisi, P. Roberts, J. Strum, K. K. Wong, N. Sharpless and B. D. Humphreys (2014). "CDK4/6 inhibition induces epithelial cell cycle arrest and ameliorates acute kidney injury." Am J Physiol Renal Physiol **306**(4): F379-388.

Dobaczewski, M., M. Bujak, N. Li, C. Gonzalez-Quesada, L. H. Mendoza, X. F. Wang and N.

G. Frangogiannis (2010). "Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction." Circ Res **107**(3): 418-428.

Dong, X., S. Swaminathan, L. A. Bachman, A. J. Croatt, K. A. Nath and M. D. Griffin (2007). "Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury." Kidney Int **71**(7): 619-628.

Dragun, D., D. N. Müller, J. H. Bräsen, L. Fritsche, M. Nieminen-Kelhä, R. Dechend, U. Kintscher, B. Rudolph, J. Hoebeke, D. Eckert, I. Mazak, R. Plehm, C. Schönemann, T. Unger, K. Budde, H.-H. Neumayer, F. C. Luft and G. Wallukat (2005). "Angiotensin II Type 1– Receptor Activating Antibodies in Renal-Allograft Rejection." New England Journal of Medicine **352**(6): 558-569.

Eckardt, K. U., W. M. Bernhardt, A. Weidemann, C. Warnecke, C. Rosenberger, M. S. Wiesener and C. Willam (2005). "Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease." Kidney Int Suppl(99): S46-51.

El-Kenawi, A. E. and A. B. El-Remessy (2013). "Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales." Br J Pharmacol **170**(4): 712-729.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.

Erslev, A. J. (1975). "Renal biogenesis of erythropoietin." Am J Med **58**(1): 25-30.

Falke, L. L., S. Gholizadeh, R. Goldschmeding, R. J. Kok and T. Q. Nguyen (2015). "Diverse origins of the myofibroblast-implications for kidney fibrosis." Nat Rev Nephrol **11**(4): 233-244.

Feldman, H. A. and I. Singer (1975). "Endocrinology and metabolism in uremia and dialysis: a clinical review." Medicine (Baltimore) **54**(5): 345-376.

Ferenbach, D. A. and J. V. Bonventre (2015). "Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD." Nat Rev Nephrol. **11**(5): 264-276. doi: 210.1038/nrneph.2015.1033. Epub 2015 Feb 1033.

Ferenbach, D. A., T. A. Sheldrake, K. Dhaliwal, T. M. Kipari, L. P. Marson, D. C. Kluth and J. Hughes (2012). "Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice." Kidney Int. **82**(8): 928-933. doi:

910.1038/ki.2012.1207. Epub 2012 Jun 1036.

Fernandes-Alnemri, T., J. W. Yu, P. Datta, J. Wu and E. S. Alnemri (2009). "AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA." Nature **458**(7237): 509-513.

Fiedler, U., M. Scharpfenecker, S. Koidl, A. Hegen, V. Grunow, J. M. Schmidt, W. Kriz, G. Thurston and H. G. Augustin (2004). "The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies." Blood **103**(11): 4150-4156.

Filomeni, G., D. De Zio and F. Cecconi (2015). "Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs." Cell Death Differ **22**(3): 377-388.

Fine, L. G. and J. T. Norman (2008). "Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics." Kidney Int **74**(7): 867-872.

Ford, M. L., A. B. Adams and T. C. Pearson (2014). "Targeting co-stimulatory pathways: transplantation and autoimmunity." Nat Rev Nephrol **10**(1): 14-24.

Franchi, L., T. Eigenbrod, R. Munoz-Planillo and G. Nunez (2009). "The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis." Nat Immunol **10**(3): 241-247.

Futrakul, N., P. Butthep and P. Futrakul (2008). "Altered vascular homeostasis in chronic kidney disease." Clin Hemorheol Microcirc **38**(3): 201-207.

Gabbiani, G. (1992). "The biology of the myofibroblast." Kidney Int **41**(3): 530-532.

Galluzzi, L., J. M. Bravo-San Pedro, I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, E. S. Alnemri, L. Altucci, D. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, E. H. Baehrecke, N. G. Bazan, M. J. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, D. E. Bredesen, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, F. Cecconi, F. K. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K. M. Debatin, N. Di Daniele, V. M. Dixit, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, G. M. Fimia, R. A. Flavell, S. Fulda, C. Garrido, M. L. Gougeon, D. R. Green, H. Gronemeyer, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, M. O. Hengartner, H. Ichijo, B. Joseph, P. J. Jost, T. Kaufmann, O. Kepp, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. Lopez-Otin, E. Lugli, F. Madeo, W. Malorni, J. C. Marine, S. J.

Martin, J. C. Martinou, J. P. Medema, P. Meier, S. Melino, N. Mizushima, U. Moll, C. Munoz-Pinedo, G. Nunez, A. Oberst, T. Panaretakis, J. M. Penninger, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, K. S. Ravichandran, R. Rizzuto, C. M. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, Y. Shi, H. U. Simon, B. R. Stockwell, G. Szabadkai, S. W. Tait, H. L. Tang, N. Tavernarakis, Y. Tsujimoto, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, A. Villunger, E. F. Wagner, H. Walczak, E. White, W. G. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, G. Melino and G. Kroemer (2015). "Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015." Cell Death Differ **22**(1): 58-73.

Galluzzi, L., O. Kepp, S. Krautwald, G. Kroemer and A. Linkermann (2014). "Molecular mechanisms of regulated necrosis." Semin Cell Dev Biol **35**: 24-32.

Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H. U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino and G. Kroemer (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." Cell Death Differ **19**(1): 107-120.

Garcia-Criado, F. J., N. Eleno, F. Santos-Benito, J. J. Valdunciel, M. Reverte, F. S. Lozano-Sanchez, M. D. Ludena, A. Gomez-Alonso and J. M. Lopez-Novoa (1998). "Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion." Transplantation. **66**(8): 982-990.

Garcia-Unzueta, M. T., J. R. Berrazueta, C. Pesquera, S. Obaya, M. D. Fernandez, C. Sedano and J. A. Amado (2005). "Levels of plasma total adrenomedullin are related with two acute phase inflammatory reactants (fibrinogen and sialic acid) but not with markers of endothelial dysfunction in Type 1 diabetes Adrenomedullin and vascular risk factors in Type 1 DM." J Diabetes Complications. **19**(3): 147-154.

Garred, P., N. Genster, K. Pilely, R. Bayarri-Olmos, A. Rosbjerg, Y. J. Ma and M. O. Skjoedt (2016). "A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond." Immunol Rev **274**(1): 74-97.

Gastman, B. R. (2001). "Apoptosis and its clinical impact." Head Neck **23**(5): 409-425.

Gilbert W. Moeckel , M. K., Lorraine C. Racusen (2015). Heptinstall's pathology of the kidney., Lippincott Williams & Wilkins.

Giral, M., Y. Foucher, A. Dufay, J. P. Van Huyen, K. Renaudin, A. Moreau, A. Philippe, B. Hegner, R. Dechend, H. Heidecke, S. Brouard, A. Cesbron, S. Castagnet, A. Devys, J. P. Soulillou and D. Dragun (2013). "Pretransplant sensitization against angiotensin II type 1 receptor is a risk factor for acute rejection and graft loss." Am J Transplant **13**(10): 2567-2576.

Goers, T. A., S. Ramachandran, A. Aloush, E. Trulock, G. A. Patterson and T. Mohanakumar (2008). "De novo production of K-alpha1 tubulin-specific antibodies: role in chronic lung allograft rejection." J Immunol **180**(7): 4487-4494.

Graves, F. T. (1954). "The anatomy of the intrarenal arteries and its application to segmental resection of the kidney." Br J Surg. **42**(172): 132-139.

Green, D. R. and G. Kroemer (2005). "Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight?" J Clin Invest **115**(10): 2610-2617.

Grgic, I., J. S. Duffield and B. D. Humphreys (2012). "The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease." Pediatr Nephrol **27**(2): 183-193.

Gupta, S., C. Verfaillie, D. Chmielewski, Y. Kim and M. E. Rosenberg (2002). "A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure." Kidney Int **62**(4): 1285-1290.

Hammadah, M., V. V. Georgiopoulou, A. P. Kalogeropoulos, M. Weber, X. Wang, M. A. Samara, Y. Wu, J. Butler and W. H. Tang (2016). "Elevated Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 and Placental-Like Growth Factor Levels Are Associated With Development and Mortality Risk in Heart Failure." Circ Heart Fail **9**(1): e002115.

Han, W. K., V. Bailly, R. Abichandani, R. Thadhani and J. V. Bonventre (2002). "Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury." Kidney Int. **62**(1): 237-244.

Hassan, M., H. Watari, A. AbuAlmaaty, Y. Ohba and N. Sakuragi (2014). "Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer." Biomed Res Int **2014**: 150845.

Hawfield, A., S. S. Iskandar and R. J. Smith (2013). "Alternative pathway dysfunction in kidney disease: a case report and review of dense deposit disease and C3 glomerulopathy." Am J Kidney Dis **61**(5): 828-831.

He, T., J. Xiong, L. Nie, Y. Yu, X. Guan, X. Xu, T. Xiao, K. Yang, L. Liu, D. Zhang, Y. Huang,

- J. Zhang, J. Wang, K. Sharma and J. Zhao (2016). "Resveratrol inhibits renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy by regulating AMPK/NOX4/ROS pathway." J Mol Med (Berl) **94**(12): 1359-1371.
- Hernandez-Gea, V., Z. Ghiassi-Nejad, R. Rozenfeld, R. Gordon, M. I. Fiel, Z. Yue, M. J. Czaja and S. L. Friedman (2012). "Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues." Gastroenterology **142**(4): 938-946.
- Heung, M. and L. S. Chawla (2014). "Acute kidney injury: gateway to chronic kidney disease." Nephron Clin Pract **127**(1-4): 30-34.
- Hill, P., D. Shukla, M. G. Tran, J. Aragonés, H. T. Cook, P. Carmeliet and P. H. Maxwell (2008). "Inhibition of hypoxia inducible factor hydroxylases protects against renal ischemia-reperfusion injury." J Am Soc Nephrol **19**(1): 39-46.
- Holers, V. M. (2014). "Complement and its receptors: new insights into human disease." Annu Rev Immunol **32**: 433-459.
- Horbelt, M., S. Y. Lee, H. E. Mang, N. L. Knipe, Y. Sado, A. Kribben and T. A. Sutton (2007). "Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury." Am J Physiol Renal Physiol **293**(3): F688-695. Epub 2007 Jul 2011.
- Hsu, R. K. and C. Y. Hsu (2016). "The Role of Acute Kidney Injury in Chronic Kidney Disease." Semin Nephrol **36**(4): 283-292.
- Huang, C., C. Huang, D. Hestin, P. C. Dent, P. Barclay, M. Collis and E. J. Johns (2002). "The effect of endothelin antagonists on renal ischaemia-reperfusion injury and the development of acute renal failure in the rat." Nephrol Dial Transplant. **17**(9): 1578-1585.
- Huang, J., S. Yu, C. Ji and J. Li (2015). "Structural basis of cell apoptosis and necrosis in TNFR signaling." Apoptosis **20**(2): 210-215.
- Huang, K. and D. C. Fingar (2014). "Growing knowledge of the mTOR signaling network." Semin Cell Dev Biol **36**: 79-90.
- Hudson, B. G., K. Tryggvason, M. Sundaramoorthy and E. G. Neilson (2003). "Alport's Syndrome, Goodpasture's Syndrome, and Type IV Collagen." New England Journal of Medicine **348**(25): 2543-2556.
- Humphreys, B. D. (2017). "Mechanisms of Renal Fibrosis." Annu Rev Physiol.
- Humphreys, B. D., S. L. Lin, A. Kobayashi, T. E. Hudson, B. T. Nowlin, J. V. Bonventre, M. T.

Valerius, A. P. McMahon and J. S. Duffield (2010). "Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis." Am J Pathol **176**(1): 85-97.

Humphreys, B. D., M. T. Valerius, A. Kobayashi, J. W. Mugford, S. Soeung, J. S. Duffield, A. P. McMahon and J. V. Bonventre (2008). "Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury." Cell Stem Cell **2**(3): 284-291.

Ichimura, T., C. C. Hung, S. A. Yang, J. L. Stevens and J. V. Bonventre (2004). "Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury." Am J Physiol Renal Physiol. **286**(3): F552-563. Epub 2003 Nov 2004.

In, J. W., H. Park, E. Y. Rho, S. Shin, K. U. Park, M. H. Park and E. Y. Song (2014). "Anti-angiotensin type 1 receptor antibodies associated with antibody-mediated rejection in patients without preformed HLA-donor-specific antibody." Transplant Proc **46**(10): 3371-3374.

Ince, C. (2014). "The central role of renal microcirculatory dysfunction in the pathogenesis of acute kidney injury." Nephron Clin Pract **127**(1-4): 124-128. doi: 110.1159/000363203. Epub 000362014 Sep 000363224.

Ionescu-Tirgoviste, C. (1969). "[Endocrine function of the kidney. Renal renin]." Med Interna (Bucur) **21**(8): 927-936.

Ishani, A., J. L. Xue, J. Himmelfarb, P. W. Eggers, P. L. Kimmel, B. A. Molitoris and A. J. Collins (2009). "Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly." J Am Soc Nephrol. **20**(1): 223-228. doi: 210.1681/ASN.2007080837. Epub 2007082008 Nov 2007080819.

Jamison, R. J. (1987). "The renal concentrating mechanism." Kidney Int Suppl **21**: S43-50.

Jang, H. R., M. T. Gandolfo, G. J. Ko, L. Racusen and H. Rabb (2009). "The effect of murine anti-thymocyte globulin on experimental kidney warm ischemia-reperfusion injury in mice." Transpl Immunol **22**(1-2): 44-54.

Jang, H. R., M. T. Gandolfo, G. J. Ko, S. R. Satpute, L. Racusen and H. Rabb (2010). "B Cells Limit Repair after Ischemic Acute Kidney Injury." Journal of the American Society of Nephrology : JASN **21**(4): 654-665.

Jo, S. K., S. A. Sung, W. Y. Cho, K. J. Go and H. K. Kim (2006). "Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats." Nephrol Dial Transplant. **21**(5): 1231-1239. Epub 2006 Jan 1212.

Jones, E. A. and D. A. Shoskes (2000). "The effect of mycophenolate mofetil and polyphenolic bioflavonoids on renal ischemia reperfusion injury and repair." J Urol **163**(3): 999-1004.

Jun, C., L. Qingshu, W. Ke, L. Ping, D. Jun, L. Jie and M. Su (2015). "Protective Effect of CXCR3(+)/CD4(+)/CD25(+)/Foxp3(+) Regulatory T Cells in Renal Ischemia-Reperfusion Injury." Mediators Inflamm **2015**: 360973.

Jung, Y. J., D. H. Kim, A. S. Lee, S. Lee, K. P. Kang, S. Y. Lee, K. Y. Jang, M. J. Sung, S. K. Park and W. Kim (2009). "Peritubular capillary preservation with COMP-angiopoietin-1 decreases ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury." Am J Physiol Renal Physiol **297**(4): F952-960.

Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." The EMBO Journal **19**(21): 5720-5728.

Kalache, S., R. Dinavahi, S. Pinney, A. Mehrotra, M. W. Cunningham and P. S. Heeger (2011). "Anticardiac myosin immunity and chronic allograft vasculopathy in heart transplant recipients." J Immunol **187**(2): 1023-1030.

Kalogeris, T., C. P. Baines, M. Krenz and R. J. Korthuis (2012). "Cell biology of ischemia/reperfusion injury." Int Rev Cell Mol Biol **298**:229-317.(doi): 10.1016/B1978-1010-1012-394309-394305.300006-394307.

Kalogeris, T., C. P. Baines, M. Krenz and R. J. Korthuis (2016). "Ischemia/Reperfusion." Compr Physiol. **7**(1): 113-170. doi: 110.1002/cphy.c160006.

Kang, D. H., J. Kanellis, C. Hugo, L. Truong, S. Anderson, D. Kerjaschki, G. F. Schreiner and R. J. Johnson (2002). "Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease." J Am Soc Nephrol **13**(3): 806-816.

Kawai, T. and S. Akira (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." Immunity. **34**(5): 637-650. doi: 610.1016/j.immuni.2011.1005.1006.

Kaye, K. W. and M. E. Goldberg (1982). "Applied anatomy of the kidney and ureter." Urol Clin North Am **9**(1): 3-13.

Kelly, K. J., W. W. Williams, Jr., R. B. Colvin and J. V. Bonventre (1994). "Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury." Proc Natl Acad

Sci U S A. **91**(2): 812-816.

Kelly, K. J., W. W. Williams, Jr., R. B. Colvin, S. M. Meehan, T. A. Springer, J. C. Gutierrez-Ramos and J. V. Bonventre (1996). "Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury." J Clin Invest. **97**(4): 1056-1063.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer. **26**(4): 239-257.

Kida, Y. and J. S. Duffield (2011). "Pivotal role of pericytes in kidney fibrosis." Clin Exp Pharmacol Physiol **38**(7): 467-473.

Kim, B. S., S. W. Lim, C. Li, J. S. Kim, B. K. Sun, K. O. Ahn, S. W. Han, J. Kim and C. W. Yang (2005). "Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys." Transplantation. **79**(10): 1370-1377.

Kim, J., H.-S. Jang and K. M. Park (2010). "Reactive oxygen species generated by renal ischemia and reperfusion trigger protection against subsequent renal ischemia and reperfusion injury in mice." American Journal of Physiology - Renal Physiology **298**(1): F158.

Kim, K. H., C. C. Chen, R. I. Monzon and L. F. Lau (2013). "Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts." Mol Cell Biol **33**(10): 2078-2090.

Kim, K. H. and M. S. Lee (2014). "Autophagy--a key player in cellular and body metabolism." Nat Rev Endocrinol **10**(6): 322-337.

Kim, M. G., C. S. Boo, Y. S. Ko, H. Y. Lee, W. Y. Cho, H. K. Kim and S. K. Jo (2010). "Depletion of kidney CD11c+ F4/80+ cells impairs the recovery process in ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury." Nephrol Dial Transplant **25**(9): 2908-2921.

Kimura, T., Y. Takabatake, A. Takahashi, J. Y. Kaimori, I. Matsui, T. Namba, H. Kitamura, F. Niimura, T. Matsusaka, T. Soga, H. Rakugi and Y. Isaka (2011). "Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury." J Am Soc Nephrol **22**(5): 902-913.

Kinsey, G. R., L. Li and M. D. Okusa (2008). "Inflammation in acute kidney injury." Nephron Exp Nephrol **109**(4): e102-107.

Kitamura, S., Y. Yamasaki, M. Kinomura, T. Sugaya, H. Sugiyama, Y. Maeshima and H.

Makino (2005). "Establishment and characterization of renal progenitor like cells from S3 segment of nephron in rat adult kidney." Faseb j **19**(13): 1789-1797.

Klos, A., A. J. Tenner, K. O. Johswich, R. R. Ager, E. S. Reis and J. Kohl (2009). "The role of the anaphylatoxins in health and disease." Mol Immunol **46**(14): 2753-2766.

Knoll, T., S. Schult, R. Birck, C. Braun, M. S. Michel, S. Bross, K. P. Juenemann, M. Kirchengast and P. Rohmeiss (2001). "Therapeutic administration of an endothelin-A receptor antagonist after acute ischemic renal failure dose-dependently improves recovery of renal function." J Cardiovasc Pharmacol. **37**(4): 483-488.

Knowles, R. G. and S. Moncada (1994). "Nitric oxide synthases in mammals." Biochem J. **298**(Pt 2): 249-258.

Kobayashi, A., M. T. Valerius, J. W. Mugford, T. J. Carroll, M. Self, G. Oliver and A. P. McMahon (2008). "Six2 defines and regulates a multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development." Cell stem cell **3**(2): 169-181.

Kose, M., S. Emet, T. S. Akpınar, M. Kocaaga, R. Cakmak, M. Akarsu, G. Yuruyen, Y. Arman and T. Tukek (2014). "Serum Endocan Level and the Severity of Coronary Artery Disease: A Pilot Study." Angiology **66**(8): 727-731.

Kramer, R. S., C. R. Herron, R. C. Groom and J. R. Brown (2015). "Acute Kidney Injury Subsequent to Cardiac Surgery." J Extra Corpor Technol **47**(1): 16-28.

Krenning, G., P. Y. Dankers, J. W. Drouven, F. Waanders, C. F. Franssen, M. J. van Luyn, M. C. Harmsen and E. R. Popa (2009). "Endothelial progenitor cell dysfunction in patients with progressive chronic kidney disease." Am J Physiol Renal Physiol **296**(6): F1314-1322.

Krishnamurthy, J., C. Torrice, M. R. Ramsey, G. I. Kovalev, K. Al-Regaiey, L. Su and N. E. Sharpless (2004). "Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging." J Clin Invest **114**(9): 1299-1307.

Kroemer, G. (2014). "Regulated necrosis." Semin Cell Dev Biol **35**: 1.

Kroemer, G. (2015). "Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease." J Clin Invest **125**(1): 1-4.

Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B.

Zhivotovsky and G. Melino (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.

Kusaba, T., M. Lalli, R. Kramann, A. Kobayashi and B. D. Humphreys (2014). "Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(4): 1527-1532.

Kuwata, K., I. Nakamura, M. Ide, H. Sato, S. Nishikawa and M. Tanaka (2015). "Comparison of changes in urinary and blood levels of biomarkers associated with proximal tubular injury in rat models." J Toxicol Pathol. **28**(3): 151-164. doi: 110.1293/tox.2014-0039. Epub 2015 Jun 1291.

Kwan, W. H., W. van der Touw, E. Paz-Artal, M. O. Li and P. S. Heeger (2013). "Signaling through C5a receptor and C3a receptor diminishes function of murine natural regulatory T cells." J Exp Med **210**(2): 257-268.

Kwon, O., C. L. Phillips and B. A. Molitoris (2002). "Ischemia induces alterations in actin filaments in renal vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Renal Physiol. **282**(6): F1012-1019.

Lamkanfi, M., T. D. Kanneganti, P. Van Damme, T. Vanden Berghe, I. Vanoverberghe, J. Vandekerckhove, P. Vandenabeele, K. Gevaert and G. Nunez (2008). "Targeted peptidecentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes." Mol Cell Proteomics **7**(12): 2350-2363.

Laplante, P., I. Sirois, M. A. Raymond, V. Kokta, A. Beliveau, A. Prat, A. V. Pshezhetsky and M. J. Hebert (2010). "Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis." Cell Death Differ **17**(2): 291-303.

Lau, A., S. Wang, J. Jiang, A. Haig, A. Pavlosky, A. Linkermann, Z. X. Zhang and A. M. Jevnikar (2013). "RIPK3-mediated necroptosis promotes donor kidney inflammatory injury and reduces allograft survival." Am J Transplant **13**(11): 2805-2818.

Le Clef, N., A. Verhulst, P. C. D'Haese and B. A. Vervaet (2016). "Unilateral Renal Ischemia-Reperfusion as a Robust Model for Acute to Chronic Kidney Injury in Mice." PLoS One **11**(3): e0152153.

Lech, M., R. Grobmayr, M. Ryu, G. Lorenz, I. Hartter, S. R. Mulay, H. E. Susanti, K. S. Kobayashi, R. A. Flavell and H. J. Anders (2014). "Macrophage phenotype controls long-term

AKI outcomes--kidney regeneration versus atrophy." J Am Soc Nephrol **25**(2): 292-304.

Lee, D. H., J. M. Wolstein, B. Pudasaini and M. Plotkin (2012). "INK4a deletion results in improved kidney regeneration and decreased capillary rarefaction after ischemia-reperfusion injury." Am J Physiol Renal Physiol **302**(1): F183-191.

Lee, K. W., G. Y. Lip and A. D. Blann (2004). "Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, angiopoietin receptor tie-2, and vascular endothelial growth factor levels in acute coronary syndromes." Circulation **110**(16): 2355-2360.

Leemans, J. C., G. Stokman, N. Claessen, K. M. Rouschop, G. J. Teske, C. J. Kirschning, S. Akira, T. van der Poll, J. J. Weening and S. Florquin (2005). "Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney." J Clin Invest. **115**(10): 2894-2903.

Leonard, E. C., J. L. Friedrich and D. P. Basile (2008). "VEGF-121 preserves renal microvessel structure and ameliorates secondary renal disease following acute kidney injury." Am J Physiol Renal Physiol **295**(6): F1648-1657.

Li, J., J. Ren, X. Liu, L. Jiang, W. He, W. Yuan, J. Yang and C. Dai (2015). "Rictor/mTORC2 signaling mediates TGF β 1-induced fibroblast activation and kidney fibrosis." Kidney International **88**(3): 515-527.

Li, L., L. Huang, S. S. Sung, A. L. Vergis, D. L. Rosin, C. E. Rose, Jr., P. I. Lobo and M. D. Okusa (2008). "The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury." Kidney Int. **74**(12): 1526-1537. doi: 1510.1038/ki.2008.1500. Epub 2008 Oct 1528.

Li, L. and M. D. Okusa (2010). "Macrophages, dendritic cells, and kidney ischemia-reperfusion injury." Semin Nephrol **30**(3): 268-277.

Li, L., J. Tan, Y. Miao, P. Lei and Q. Zhang (2015). "ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms." Cell Mol Neurobiol **35**(5): 615-621.

Lim, A. I., S. C. Tang, K. N. Lai and J. C. Leung (2013). "Kidney injury molecule-1: more than just an injury marker of tubular epithelial cells?" J Cell Physiol. **228**(5): 917-924. doi: 910.1002/jcp.24267.

Lim, H. S., G. Y. Lip and A. D. Blann (2005). "Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in diabetes mellitus: relationship to VEGF, glycaemic control, endothelial damage/dysfunction and atherosclerosis." Atherosclerosis **180**(1): 113-118.

Lin, F., K. Cordes, L. Li, L. Hood, W. G. Couser, S. J. Shankland and P. Igarashi (2003). "Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice." J Am Soc Nephrol **14**(5): 1188-1199.

Lindgren, D., A. K. Bostrom, K. Nilsson, J. Hansson, J. Sjolund, C. Moller, K. Jirstrom, E. Nilsson, G. Landberg, H. Axelson and M. E. Johansson (2011). "Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules." Am J Pathol **178**(2): 828-837.

Linkermann, A. (2016). "Nonapoptotic cell death in acute kidney injury and transplantation." Kidney Int. **89**(1): 46-57. doi: 10.1016/j.kint.2015.1010.1008.

Linkermann, A., J. H. Brasen, M. Darding, M. K. Jin, A. B. Sanz, J. O. Heller, F. De Zen, R. Weinlich, A. Ortiz, H. Walczak, J. M. Weinberg, D. R. Green, U. Kunzendorf and S. Krautwald (2013). "Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury." Proc Natl Acad Sci U S A. **110**(29): 12024-12029. doi: 12010.11073/pnas.1305538110. Epub 1305532013 Jul 1305538111.

Linkermann, A., J. H. Brasen, N. Himmerkus, S. Liu, T. B. Huber, U. Kunzendorf and S. Krautwald (2012). "Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury." Kidney Int. **81**(8): 751-761. doi: 710.1038/ki.2011.1450. Epub 2012 Jan 1011.

Linkermann, A., G. Chen, G. Dong, U. Kunzendorf, S. Krautwald and Z. Dong (2014). "Regulated cell death in AKI." J Am Soc Nephrol **25**(12): 2689-2701.

Linkermann, A., J. O. Heller, A. Prokai, J. M. Weinberg, F. De Zen, N. Himmerkus, A. J. Szabo, J. H. Brasen, U. Kunzendorf and S. Krautwald (2013). "The RIP1-kinase inhibitor necrostatin-1 prevents osmotic nephrosis and contrast-induced AKI in mice." J Am Soc Nephrol **24**(10): 1545-1557.

Liu, S., B. Hartleben, O. Kretz, T. Wiech, P. Igarashi, N. Mizushima, G. Walz and T. B. Huber (2012). "Autophagy plays a critical role in kidney tubule maintenance, aging and ischemia-reperfusion injury." Autophagy **8**(5): 826-837.

Liu, S., S. W. Xu, L. Kennedy, D. Pala, Y. Chen, M. Eastwood, D. E. Carter, C. M. Black, D. J. Abraham and A. Leask (2007). "FAK is required for TGFbeta-induced JNK phosphorylation in fibroblasts: implications for acquisition of a matrix-remodeling phenotype." Mol Biol Cell **18**(6): 2169-2178.

- Liu, Y. (2011). "Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis." Nature reviews. Nephrology **7**(12): 684-696.
- Lo, L. J., A. S. Go, G. M. Chertow, C. E. McCulloch, D. Fan, J. D. Ordonez and C. Y. Hsu (2009). "Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease." Kidney Int. **76**(8): 893-899. doi: 810.1038/ki.2009.1289. Epub 2009 Jul 1029.
- Lobov, I. B., P. C. Brooks and R. A. Lang (2002). "Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11205-11210.
- Lukitsch, I., J. Kehr, L. Chaykovska, G. Wallukat, M. Nieminen-Kelha, V. Batuman, D. Dragun and M. Gollasch (2012). "Renal ischemia and transplantation predispose to vascular constriction mediated by angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies." Transplantation **94**(1): 8-13.
- Mahesh, B., H. S. Leong, A. McCormack, P. Sarathchandra, A. Holder and M. L. Rose (2007). "Autoantibodies to vimentin cause accelerated rejection of cardiac allografts." Am J Pathol **170**(4): 1415-1427.
- Malek, M. and M. Nematbakhsh (2015). "Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment." J Renal Inj Prev **4**(2): 20-27.
- Mao, H., N. Katz, W. Ariyanon, L. Blanca-Martos, Z. Adybelli, A. Giuliani, T. H. Danesi, J. C. Kim, A. Nayak, M. Neri, G. M. Virzi, A. Brocca, E. Scalzotto, L. Salvador and C. Ronco (2014). "Cardiac surgery-associated acute kidney injury." Blood Purif **37 Suppl 2**: 34-50.
- Marketos, S. G., A. G. Eftychiadis and A. Diamandopoulos (1993). "Acute renal failure according to ancient Greek and Byzantine medical writers." J R Soc Med. **86**(5): 290-293.
- McEver, R. P. (2015). "Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall." Cardiovasc Res **107**(3): 331-339.
- McGlynn, L. M., K. Stevenson, K. Lamb, S. Zino, M. Brown, A. Prina, D. Kingsmore and P. G. Shiels (2009). "Cellular senescence in pretransplant renal biopsies predicts postoperative organ function." Aging Cell **8**(1): 45-51.
- McIlwain, D. R., T. Berger and T. W. Mak (2013). "Caspase Functions in Cell Death and Disease." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **5**(4): a008656.
- McLuskey, K. and Jeremy C. Mottram (2015). "Comparative structural analysis of the caspase

family with other clan CD cysteine peptidases." Biochemical Journal **466**(Pt 2): 219-232.

Mederacke, I., C. C. Hsu, J. S. Troeger, P. Huebener, X. Mu, D. H. Dapito, J. P. Pradere and R. F. Schwabe (2013). "Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology." Nat Commun **4**: 2823.

Megyesi, J., L. Andrade, J. M. Vieira, Jr., R. L. Safirstein and P. M. Price (2001). "Positive effect of the induction of p21WAF1/CIP1 on the course of ischemic acute renal failure." Kidney Int **60**(6): 2164-2172.

Mehlen, P. and D. E. Bredesen (2011). "Dependence receptors: from basic research to drug development." Sci Signal. **4**(157): mr2. doi: 10.1126/scisignal.2001521.

Melnikov, V. Y., S. Faubel, B. Siegmund, M. S. Lucia, D. Ljubanovic and C. L. Edelstein (2002). "Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice." J Clin Invest. **110**(8): 1083-1091.

Metalidis, C., S. H. van Vuuren, R. Broekhuizen, E. Lerut, M. Naesens, S. J. Bakker, J. F. Wetzels, R. Goldschmeding and D. R. Kuypers (2013). "Urinary connective tissue growth factor is associated with human renal allograft fibrogenesis." Transplantation **96**(5): 494-500.

Mi, H., V. Carter, A. Gupta, J. Asher, B. K. Shenton, S. Stamp, Y. T. Wong, M. A. Gok and D. Talbot (2005). "Anti-vimentin antibody detection in recipients of heart-beating and non-heart beating donor kidneys." Transplant Proc **37**(8): 3269-3271.

Mills, C. D. (2012). "M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease." Crit Rev Immunol **32**(6): 463-488.

Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori and Y. Ohsumi (2004). "In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker." Mol Biol Cell **15**(3): 1101-1111.

Molitoris, B. A., P. C. Dagher, R. M. Sandoval, S. B. Campos, H. Ashush, E. Fridman, A. Brafman, A. Faerman, S. J. Atkinson, J. D. Thompson, H. Kalinski, R. Skaliter, S. Erlich and E. Feinstein (2009). "siRNA targeted to p53 attenuates ischemic and cisplatin-induced acute kidney injury." J Am Soc Nephrol. **20**(8): 1754-1764. doi: 1710.1681/ASN.2008111204. Epub 2008112009 May 2008111221.

Molitoris, B. A. and J. Marris (1999). "The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure." Am J Med. **106**(5): 583-592.

Molnar, M. Z., P. Kümpers, J. T. Kielstein, M. Schiffer, M. E. Czira, A. Ujszaszi, C. P. Kovesdy and I. Mucsi (2014). "Circulating Angiopoietin-2 levels predict mortality in kidney transplant recipients: a 4-year prospective case-cohort study." Transplant International **27**(6): 541-552.

Moresco, E. M., D. LaVine and B. Beutler (2011). "Toll-like receptors." Curr Biol. **21**(13): R488-493. doi: 410.1016/j.cub.2011.1005.1039.

Morgun, A., N. Shulzhenko, C. S. Unterkircher, R. V. Diniz, A. B. Pereira, M. S. Silva, S. K. Nishida, D. R. Almeida, A. C. Carvalho, M. Franco, M. M. Souza and M. Gerbase-DeLima (2004). "Pre- and post-transplant anti-myosin and anti-heat shock protein antibodies and cardiac transplant outcome." J Heart Lung Transplant **23**(2): 204-209.

Mori, T., S. Kawara, M. Shinozaki, N. Hayashi, T. Kakinuma, A. Igarashi, M. Takigawa, T. Nakanishi and K. Takehara (1999). "Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model." J Cell Physiol **181**(1): 153-159.

Munoz-Espin, D. and M. Serrano (2014). "Cellular senescence: from physiology to pathology." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(7): 482-496.

Munshi, R., C. Hsu and J. Himmelfarb (2011). "Advances in understanding ischemic acute kidney injury." BMC Med. **9:11**.(doi): 10.1186/1741-7015-1189-1111.

Nakagawa, T., W. Sato, T. Kosugi and R. J. Johnson (2013). "Uncoupling of VEGF with endothelial NO as a potential mechanism for abnormal angiogenesis in the diabetic nephropathy." J Diabetes Res **2013**: 184539.

Nangaku, M. (2006). "Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure." J Am Soc Nephrol **17**(1): 17-25.

Nath, D. S., H. Ilias Basha, V. Tiriveedhi, C. Alur, D. Phelan, G. A. Ewald, N. Moazami and T. Mohanakumar (2010). "Characterization of immune responses to cardiac self-antigens myosin and vimentin in human cardiac allograft recipients with antibody-mediated rejection and cardiac allograft vasculopathy." J Heart Lung Transplant **29**(11): 1277-1285.

Nath, D. S., V. Tiriveedhi, H. I. Basha, D. Phelan, N. Moazami, G. A. Ewald and T. Mohanakumar (2011). "A role for antibodies to human leukocyte antigens, collagen-V, and K-alpha1-Tubulin in antibody-mediated rejection and cardiac allograft vasculopathy."

Transplantation **91**(9): 1036-1043.

Nauta, A. J., M. R. Daha, C. van Kooten and A. Roos (2003). "Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins." Trends Immunol **24**(3): 148-154.

Neuzillet, C., A. Tijeras-Raballand, R. Cohen, J. Cros, S. Faivre, E. Raymond and A. de Gramont (2015). "Targeting the TGFbeta pathway for cancer therapy." Pharmacol Ther **147**: 22-31.

Nicholson, D. W. (2000). "From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents." Nature. **407**(6805): 810-816.

Nishimura, M., T. Miki, R. Yashima, N. Yokoi, H. Yano, Y. Sato and S. Seino (1999). "Angiopietin-3, a novel member of the angiopietin family¹The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to GenBank with accession number AF074332.1." FEBS Letters **448**(2): 254-256.

Noiri, E., K. Doi, R. Inagi, M. Nangaku and T. Fujita (2009). "Contribution of T lymphocytes to rat renal ischemia/reperfusion injury." Clin Exp Nephrol **13**(1): 25-32.

Noris, M. and G. Remuzzi (2013). "Overview of complement activation and regulation." Semin Nephrol **33**(6): 479-492.

Nykanen, A. I., R. Krebs, A. Saaristo, P. Turunen, K. Alitalo, S. Yla-Herttuala, P. K. Koskinen and K. B. Lemstrom (2003). "Angiopietin-1 protects against the development of cardiac allograft arteriosclerosis." Circulation **107**(9): 1308-1314.

Obermuller, N., H. Geiger, C. Weipert and A. Urbschat (2014). "Current developments in early diagnosis of acute kidney injury." Int Urol Nephrol. **46**(1): 1-7. doi: 10.1007/s11255-11013-10448-11255. Epub 12013 May 11215.

Ohashi, R., H. Kitamura and N. Yamanaka (2000). "Peritubular capillary injury during the progression of experimental glomerulonephritis in rats." J Am Soc Nephrol **11**(1): 47-56.

Ohashi, R., A. Shimizu, Y. Masuda, H. Kitamura, M. Ishizaki, Y. Sugisaki and N. Yamanaka (2002). "Peritubular capillary regression during the progression of experimental obstructive nephropathy." J Am Soc Nephrol **13**(7): 1795-1805.

Olof, P., A. Hellberg, O. Kallskog and M. Wolgast (1991). "Red cell trapping and postischemic renal blood flow. Differences between the cortex, outer and inner medulla." Kidney Int **40**(4): 625-631.

Ostermann, M. and M. Joannidis (2016). "Acute kidney injury 2016: diagnosis and diagnostic workup." Crit Care **20**(1): 299.

Ovchinnikov, D. A. (2008). "Macrophages in the embryo and beyond: much more than just giant phagocytes." Genesis **46**(9): 447-462. doi: 410.1002/dvg.20417.

Parikh, C. R., E. Abraham, M. Ancukiewicz and C. L. Edelstein (2005). "Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit." J Am Soc Nephrol **16**(10): 3046-3052. Epub 2005 Sep 3047.

Parsons, J. T., K. H. Martin, J. K. Slack, J. M. Taylor and S. A. Weed (2000). "Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement." Oncogene **19**(49): 5606-5613.

Parzych, K. R. and D. J. Klionsky (2014). "An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation." Antioxid Redox Signal **20**(3): 460-473.

Perrelli, M. G., P. Pagliaro and C. Penna (2011). "Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species." World J Cardiol **3**(6): 186-200. doi: 110.4330/wjc.v4333.i4336.4186.

Phng, L. K., M. Potente, J. D. Leslie, J. Babbage, D. Nyqvist, I. Lobov, J. K. Ondr, S. Rao, R. A. Lang, G. Thurston and H. Gerhardt (2009). "Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis." Dev Cell **16**(1): 70-82.

Plohnke, N., A. Hamann, A. Poetsch, H. D. Osiewacz, M. Rogner and S. Rexroth (2014). "Proteomic analysis of mitochondria from senescent *Podospora anserina* casts new light on ROS dependent aging mechanisms." Exp Gerontol **56**: 13-25.

Prugger, C., G. Luc, B. Haas, P. E. Morange, J. Ferrieres, P. Amouyel, F. Kee, P. Ducimetiere and J. P. Empana (2013). "Multiple biomarkers for the prediction of ischemic stroke: the PRIME study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(3): 659-666. doi: 610.1161/ATVBAHA.1112.300109. Epub 302013 Jan 300117.

Rabb, H., F. Daniels, M. O'Donnell, M. Haq, S. R. Saba, W. Keane and W. W. Tang (2000). "Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice." Am J Physiol Renal Physiol **279**(3): F525-531.

Rahal, A., A. Kumar, V. Singh, B. Yadav, R. Tiwari, S. Chakraborty and K. Dhama (2014). "Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay." Biomed Res Int **2014**: 761264.

Ramesh, G. and W. B. Reeves (2004). "Inflammatory cytokines in acute renal failure." Kidney Int Suppl.(91): S56-61.

Rayhill, S. C., Y. M. Wu, D. A. Katz, M. D. Voigt, D. R. Labrecque, P. A. Kirby, F. A. Mitros, R. S. Kalil, R. A. Miller, A. H. Stolpen and W. N. Schmidt (2007). "Older donor livers show early severe histological activity, fibrosis, and graft failure after liver transplantation for hepatitis C." Transplantation **84**(3): 331-339.

Reinders, M. E., T. J. Rabelink and D. M. Briscoe (2006). "Angiogenesis and endothelial cell repair in renal disease and allograft rejection." J Am Soc Nephrol **17**(4): 932-942.

Rhim, T., D. Y. Lee and M. Lee (2013). "Hypoxia as a target for tissue specific gene therapy." J Control Release **172**(2): 484-494.

Ribatti, D. and E. Crivellato (2012). "'Sprouting angiogenesis', a reappraisal." Dev Biol **372**(2): 157-165.

Rifkin, D. E., S. G. Coca and K. Kalantar-Zadeh (2012). "Does AKI truly lead to CKD?" J Am Soc Nephrol **23**(6): 979-984.

Rodier, F. and J. Campisi (2011). "Four faces of cellular senescence." The Journal of Cell Biology **192**(4): 547-556.

Rodriguez, F., B. Bonacasa, F. J. Fenoy and M. G. Salom (2013). "Reactive oxygen and nitrogen species in the renal ischemia/reperfusion injury." Curr Pharm Des **19**(15): 2776-2794.

Rongvaux, A., R. Jackson, C. C. Harman, T. Li, A. P. West, M. R. de Zoete, Y. Wu, B. Yordy, S. A. Lakhani, C. Y. Kuan, T. Taniguchi, G. S. Shadel, Z. J. Chen, A. Iwasaki and R. A. Flavell (2014). "Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA." Cell **159**(7): 1563-1577.

Rose, M. L. (2013). "Role of anti-vimentin antibodies in allograft rejection." Human Immunology **74**(11): 1459-1462.

Sadler, J. E. (1997). "Thrombomodulin structure and function." Thromb Haemost. **78**(1): 392-395.

Safa, A. R. and K. E. Pollok (2011). "Targeting the Anti-Apoptotic Protein c-FLIP for Cancer Therapy." Cancers (Basel). **3**(2): 1639-1671. doi: 1610.3390/cancers3021639.

Sakr, M., G. Zetti, C. McClain, J. Gavalier, M. Nalesnik, S. Todo, T. Starzl and D. Van Thiel (1992). "The protective effect of FK506 pretreatment against renal ischemia/reperfusion injury

in rats." Transplantation **53**(5): 987-991.

Samarakoon, R., J. M. Overstreet and P. J. Higgins (2013). "TGF-beta signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities." Cell Signal **25**(1): 264-268.

Sampaio, F. J. and A. H. Aragao (1990). "Anatomical relationship between the intrarenal arteries and the kidney collecting system." J Urol. **143**(4): 679-681.

Sampson, N., R. Koziel, C. Zenzmaier, L. Bubendorf, E. Plas, P. Jansen-Durr and P. Berger (2011). "ROS signaling by NOX4 drives fibroblast-to-myofibroblast differentiation in the diseased prostatic stroma." Mol Endocrinol **25**(3): 503-515.

Sarabu, N. and M. Rahman (2016). "Nephrology Update: Acute Kidney Injury." FP Essent **444**: 11-17.

Sasai, M. and M. Yamamoto (2013). "Pathogen recognition receptors: ligands and signaling pathways by Toll-like receptors." Int Rev Immunol. **32**(2): 116-133. doi: 110.3109/08830185.08832013.08774391.

Schatteman, G. C., M. Dunnwald and C. Jiao (2007). "Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(1): H1-18.

Scherz-Shouval, R. and Z. Elazar (2011). "Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology." Trends Biochem Sci **36**(1): 30-38.

Schneider, R., U. Raff, N. Vornberger, M. Schmidt, R. Freund, M. Reber, L. Schramm, S. Gambaryan, C. Wanner, H. H. Schmidt and J. Galle (2003). "L-Arginine counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats." Kidney Int. **64**(1): 216-225.

Scholz, A., K. H. Plate and Y. Reiss (2015). "Angiopoietin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation." Ann N Y Acad Sci **1347**: 45-51.

Schutze, S., V. Tchikov and W. Schneider-Brachert (2008). "Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization." Nat Rev Mol Cell Biol. **9**(8): 655-662. doi: 610.1038/nrm2430. Epub 2008 Jun 1011.

Schwartz, J. D., E. K. Rowinsky, H. Youssoufian, B. Pytowski and Y. Wu (2010). "Vascular endothelial growth factor receptor-1 in human cancer: concise review and rationale for development of IMC-18F1 (Human antibody targeting vascular endothelial growth factor

receptor-1)." Cancer **116**(4 Suppl): 1027-1032.

Seron, D., E. Alexopoulos, M. J. Raftery, B. Hartley and J. S. Cameron (1990). "Number of interstitial capillary cross-sections assessed by monoclonal antibodies: relation to interstitial damage." Nephrol Dial Transplant **5**(10): 889-893.

Seva Pessoa, B., N. van der Lubbe, K. Verdonk, A. J. Roks, E. J. Hoorn and A. H. Danser (2013). "Key developments in renin-angiotensin-aldosterone system inhibition." Nat Rev Nephrol **9**(1): 26-36.

Sharain, K., D. Hoppensteadt, V. Bansal, A. Singh and J. Fareed (2013). "Progressive increase of inflammatory biomarkers in chronic kidney disease and end-stage renal disease." Clin Appl Thromb Hemost. **19**(3): 303-308. doi: 310.1177/1076029612454935. Epub 1076029612452012 Aug 1076029612454933.

Sharfuddin, A. A. and B. A. Molitoris (2011). "Pathophysiology of ischemic acute kidney injury." Nat Rev Nephrol. **7**(4): 189-200. doi: 110.1038/nrneph.2011.1016. Epub 2011 Mar 1031.

Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." Mol Cell. **9**(3): 459-470.

Shin, Y. J., S. H. Han, D. S. Kim, G. H. Lee, W. H. Yoo, Y. M. Kang, J. Y. Choi, Y. C. Lee, S. J. Park, S. K. Jeong, H. T. Kim, S. W. Chae, H. J. Jeong, H. R. Kim and H. J. Chae (2010). "Autophagy induction and CHOP under-expression promotes survival of fibroblasts from rheumatoid arthritis patients under endoplasmic reticulum stress." Arthritis Res Ther **12**(1): R19.

Shoji, K., T. Tanaka and M. Nangaku (2014). "Role of hypoxia in progressive chronic kidney disease and implications for therapy." Curr Opin Nephrol Hypertens **23**(2): 161-168.

Siani, A. and N. Tirelli (2014). "Myofibroblast differentiation: main features, biomedical relevance, and the role of reactive oxygen species." Antioxid Redox Signal **21**(5): 768-785.

Skrypnyk, N. I., R. C. Harris and M. P. de Caestecker (2013). "Ischemia-reperfusion model of acute kidney injury and post injury fibrosis in mice." J Vis Exp(78).

Slee, E. A., C. Adrain and S. J. Martin (2001). "Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis." J Biol Chem **276**(10): 7320-7326.

Sonnen, A. F. and P. Henneke (2014). "Structural biology of the membrane attack complex." Subcell Biochem **80**: 83-116.

Strutz, F. and G. A. Muller (2006). "Renal fibrosis and the origin of the renal fibroblast." Nephrol Dial Transplant **21**(12): 3368-3370.

Strutz, F. and M. Zeisberg (2006). "Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease." J Am Soc Nephrol **17**(11): 2992-2998.

Sutton, T. A., C. J. Fisher and B. A. Molitoris (2002). "Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure." Kidney Int. **62**(5): 1539-1549.

Sutton, T. A., H. E. Mang, S. B. Campos, R. M. Sandoval, M. C. Yoder and B. A. Molitoris (2003). "Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia." Am J Physiol Renal Physiol. **285**(2): F191-198. Epub 2003 Apr 2008.

Takada, M., K. C. Nadeau, G. D. Shaw, K. A. Marquette and N. L. Tilney (1997). "The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand." J Clin Invest. **99**(11): 2682-2690.

Tanaka, S., T. Tanaka and M. Nangaku (2014). "Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition." Am J Physiol Renal Physiol **307**(11): F1187-1195.

Tanaka, T. (2017). "A mechanistic link between renal ischemia and fibrosis." Med Mol Morphol **50**(1): 1-8.

Tanaka, T. and M. Nangaku (2013). "Angiogenesis and hypoxia in the kidney." Nat Rev Nephrol **9**(4): 211-222.

Tannous, P., H. Zhu, J. L. Johnstone, J. M. Shelton, N. S. Rajasekaran, I. J. Benjamin, L. Nguyen, R. D. Gerard, B. Levine, B. A. Rohermel and J. A. Hill (2008). "Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(28): 9745-9750.

Telen, M. J. (2014). "Cellular adhesion and the endothelium: E-selectin, L-selectin, and pan-selectin inhibitors." Hematol Oncol Clin North Am **28**(2): 341-354.

Thiele, R. H., J. M. Isbell and M. H. Rosner (2015). "AKI associated with cardiac surgery." Clin J Am Soc Nephrol **10**(3): 500-514.

Thornton, M. A., R. Winn, C. E. Alpers and R. A. Zager (1989). "An evaluation of the neutrophil as a mediator of in vivo renal ischemic-reperfusion injury." Am J Pathol. **135**(3):

509-515.

- Thurman, J. M., D. Ljubanovic, C. L. Edelstein, G. S. Gilkeson and V. M. Holers (2003). "Lack of a functional alternative complement pathway ameliorates ischemic acute renal failure in mice." J Immunol. **170**(3): 1517-1523.
- Tiriveedhi, V., A. E. Gelman and T. Mohanakumar (2012). "HIF-1 α signaling by airway epithelial cell K- α 1-tubulin: Role in fibrosis and chronic rejection of human lung allografts." Cellular Immunology **273**(1): 59-66.
- Trapp, T., L. Korhonen, M. Besselmann, R. Martinez, E. A. Mercer and D. Lindholm (2003). "Transgenic mice overexpressing XIAP in neurons show better outcome after transient cerebral ischemia." Mol Cell Neurosci. **23**(2): 302-313.
- Tristao, V. R., P. F. Goncalves, M. A. Dalboni, M. C. Batista, S. Durao Mde, Jr. and J. C. Monte (2012). "Nec-1 protects against nonapoptotic cell death in cisplatin-induced kidney injury." Ren Fail **34**(3): 373-377.
- Vaidya, V. S., S. S. Waikar, M. A. Ferguson, F. B. Collings, K. Sunderland, C. Gioules, G. Bradwin, R. Matsouaka, R. A. Betensky, G. C. Curhan and J. V. Bonventre (2008). "Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans." Clin Transl Sci. **1**(3): 200-208. doi: 210.1111/j.1752-8062.2008.00053.x.
- Valenzuela, D. M., J. A. Griffiths, J. Rojas, T. H. Aldrich, P. F. Jones, H. Zhou, J. McClain, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, T. Huang, N. Papadopoulos, P. C. Maisonpierre, S. Davis and G. D. Yancopoulos (1999). "Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 1904-1909.
- Vanden Berghe, T., A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet, H. Walczak and P. Vandenabeele (2014). "Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(2): 135-147.
- Vanmassenhove, J., N. Veys and W. Van Biesen (2016). "Prevention and conservative management of acute kidney injury." Minerva Urol Nefrol **68**(1): 58-71.
- Vasudev, N. S. and A. R. Reynolds (2014). "Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions." Angiogenesis **17**(3): 471-494.
- Venereau, E., C. Ceriotti and M. E. Bianchi (2015). "DAMPs from Cell Death to New Life." Front Immunol. **6**:422.(doi): 10.3389/fimmu.2015.00422. eCollection 02015.

Venkatachalam, M. A., J. M. Weinberg, W. Kriz and A. K. Bidani (2015). "Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression." J Am Soc Nephrol **26**(8): 1765-1776.

Verma, S. K. and B. A. Molitoris (2015). "Renal endothelial injury and microvascular dysfunction in acute kidney injury." Semin Nephrol. **35**(1): 96-107. doi: 110.1016/j.semnephrol.2015.1001.1010.

Vescarelli, E., A. Pilloni, F. Dominici, P. Pontecorvi, A. Angeloni, A. Polimeni, S. Ceccarelli and C. Marchese (2017). "Autophagy activation is required for myofibroblast differentiation during healing of oral mucosa." J Clin Periodontol **44**(10): 1039-1050.

Villa-Morales, M. and J. Fernandez-Piqueras (2012). "Targeting the Fas/FasL signaling pathway in cancer therapy." Expert Opin Ther Targets **16**(1): 85-101.

Waikar, S. S. and J. V. Bonventre (2008). "Biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury." Nephron Clin Pract **109**(4): c192-197. doi: 110.1159/000142928. Epub 000142008 Sep 000142918.

Waikar, S. S., K. D. Liu and G. M. Chertow (2008). "Diagnosis, epidemiology and outcomes of acute kidney injury." Clin J Am Soc Nephrol. **3**(3): 844-861. doi: 810.2215/CJN.05191107. Epub 05192008 Mar 05191112.

Wajant, H. (2002). "The Fas signaling pathway: more than a paradigm." Science. **296**(5573): 1635-1636.

Wang, W., S. Falk Sa Fau - Jittikanont, P. E. Jittikanont S Fau - Gengaro, C. L. Gengaro Pe Fau - Edelstein, R. W. Edelstein Cl Fau - Schrier and R. W. Schrier "Protective effect of renal denervation on normotensive endotoxemia-induced acute renal failure in mice." (1931-857X (Print)).

Wang, W., A. Mitra, B. Poole, S. Falk, M. S. Lucia, S. Tayal and R. Schrier (2004). "Endothelial nitric oxide synthase-deficient mice exhibit increased susceptibility to endotoxin-induced acute renal failure." Am J Physiol Renal Physiol. **287**(5): F1044-1048.

Wang, Y. and N. Tjandra (2013). "Structural Insights of tBid, the Caspase-8-activated Bid, and Its BH(3) Domain." The Journal of Biological Chemistry **288**(50): 35840-35851.

Waring, P. and A. Mullbacher (1999). "Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology." Immunol Cell Biol **77**(4): 312-317.

Wechsler, L. R. (2011). "Intravenous thrombolytic therapy for acute ischemic stroke." N Engl J Med. **364**(22): 2138-2146. doi: 2110.1056/NEJMct1007370.

Wei, Q., G. Dong, J. K. Chen, G. Ramesh and Z. Dong (2013). "Bax and Bak have critical roles in ischemic acute kidney injury in global and proximal tubule-specific knockout mouse models." Kidney Int. **84**(1): 138-148. doi: 110.1038/ki.2013.1068. Epub 2013 Mar 1036.

Wilhelm, S. M., M. S. Simonson, A. V. Robinson, N. T. Stowe and J. A. Schulak (1999). "Endothelin up-regulation and localization following renal ischemia and reperfusion." Kidney Int. **55**(3): 1011-1018.

Woodson, B. W., L. Wang, S. Mandava and B. R. Lee (2013). "Urinary cystatin C and NGAL as early biomarkers for assessment of renal ischemia-reperfusion injury: a serum marker to replace creatinine?" J Endourol **27**(12): 1510-1515.

Wu, C. C. and S. B. Bratton (2013). "Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species." Antioxid Redox Signal **19**(6): 546-558.

Wu, H., G. Chen, K. R. Wyburn, J. Yin, P. Bertolino, J. M. Eris, S. I. Alexander, A. F. Sharland and S. J. Chadban (2007). "TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury." J Clin Invest. **117**(10): 2847-2859.

Xue, C., Y. Liu, C. Li, Y. Li, T. Yang, L. Xie and P. Zhou (2014). "Powerful protection against renal ischemia reperfusion injury by T cell-specific NF-kappaB inhibition." Transplantation **97**(4): 391-396.

Yamada, K., T. Miwa, J. Liu, M. Nangaku and W. C. Song (2004). "Critical protection from renal ischemia reperfusion injury by CD55 and CD59." J Immunol. **172**(6): 3869-3875.

Yamamoto, T., T. Tada, S. V. Brodsky, H. Tanaka, E. Noiri, F. Kajiya and M. S. Goligorsky (2002). "Intravital videomicroscopy of peritubular capillaries in renal ischemia." Am J Physiol Renal Physiol. **282**(6): F1150-1155.

Yang, K. Y., K. T. Liu, Y. C. Chen, C. S. Chen, Y. C. Lee, R. P. Perng and J. Y. Feng (2011). "Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 levels predict outcomes of pneumonia-related septic shock patients: a prospective observational study." Crit Care **15**(1): R11.

Yellon, D. M. and D. J. Hausenloy (2007). "Myocardial reperfusion injury." N Engl J Med. **357**(11): 1121-1135.

Yue, L., Q. Xia, G. Luo and Y. Lu (2010). Urinary connective tissue growth factor is a biomarker in a rat model of chronic nephropathy. Transplantation proceedings, Elsevier.

Zhang, L., Y. L. He, Q. Z. Li, X. H. Hao, Z. F. Zhang, J. X. Yuan, Y. P. Bai, Y. L. Jin, N. Liu, G. Chen, X. Yun and S. Q. Yao (2014). "N-acetylcysteine alleviated silica-induced lung fibrosis in rats by down-regulation of ROS and mitochondrial apoptosis signaling." Toxicol Mech Methods **24**(3): 212-219.

Zhang, Z. X., K. Shek, S. Wang, X. Huang, A. Lau, Z. Yin, H. Sun, W. Liu, B. Garcia, S. Rittling and A. M. Jevnikar (2010). "Osteopontin expressed in tubular epithelial cells regulates NK cell-mediated kidney ischemia reperfusion injury." J Immunol **185**(2): 967-973.

Zhang, Z. X., S. Wang, X. Huang, W. P. Min, H. Sun, W. Liu, B. Garcia and A. M. Jevnikar (2008). "NK cells induce apoptosis in tubular epithelial cells and contribute to renal ischemia-reperfusion injury." J Immunol **181**(11): 7489-7498.

Zhao, J., Y. Sun, P. Shi, J. N. Dong, L. G. Zuo, H. G. Wang, J. F. Gong, Y. Li, L. L. Gu, N. Li, J. S. Li and W. M. Zhu (2015). "Celastrol ameliorates experimental colitis in IL-10 deficient mice via the up-regulation of autophagy." Int Immunopharmacol **26**(1): 221-228.

Zhao, L. and W. Lu (2014). "Defensins in innate immunity." Curr Opin Hematol. **21**(1): 37-42. doi: 10.1097/MOH.0000000000000005.

Zhou, W., C. A. Farrar, K. Abe, J. R. Pratt, J. E. Marsh, Y. Wang, G. L. Stahl and S. H. Sacks (2000). "Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury." J Clin Invest. **105**(10): 1363-1371.

Zou, A. P., N. Li and A. W. Cowley, Jr. (2001). "Production and actions of superoxide in the renal medulla." Hypertension. **37**(2 Pt 2): 547-553.

