

Université de Montréal

***Étude de l'expression de « Bcl-2 modifying factor » (Bmf) et
son implication dans la néphropathie diabétique***

Par Hasna Maachi

*Programme de pharmacologie
Faculté de médecine*

*Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences (M.sc)
en pharmacologie*

Décembre 2013

© *Hasna Maachi, 2013*

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Mémoire intitulé

Étude de l'expression de Bcl-2 modifyig factor (Bmf) et son implication dans la néphropathie diabétique

Présenté par :
Hasna Maachi

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. René Cardinal
Président rapporteur

Dr. John S.D.Chan
Directeur de recherche

Dr. Denis de Bois
Membre du jury

Résumé

Objectif : Étudier les mécanismes apoptotiques impliqués dans la néphropathie diabétique en identifiant les gènes responsables de l'apoptose et activés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules de tubules proximaux rénaux (RPTC) de différents modèles diabétiques.

Méthodes : Une hybridation par puce à AND a été réalisée sur les ARN extraits à partir de RPTC de souris heterozygotes db/m+, db/db and db/db catalase (CAT)-transgénique (Tg) de 20 semaines. Des expériences de PCR en temps réel et d'immunohistochimie réalisées sur ces modèles et sur le modèle où le diabète avait été induit par traitement au streptozotocin (STZ) ont permis de valider les gènes apoptotiques identifiés par puce à ADN. Des RPTC immortalisées de rat ont été utilisées pour montrer l'activité de ces gènes apoptotique et la régulation de leur expression. De plus, une étude additionnelle réalisée sur des sections rénales provenant de patients diabétiques et non diabétiques a démontré également une surexpression de ces gènes apoptotiques dans les IRPTC.

Résultats: L'expression de Bcl-2-modifying factor (Bmf), une protéine apoptotique, semble augmentée dans les RPTC de souris db/db comparé aux souris contrôles db/m+, ou aux souris db/db CAT-tg. La surexpression de Bmf a également été identifiée dans les RPTC du modèle diabétique STZ. La normalisation de l'hyperglycémie chez ces souris par traitement à l'insuline semble normaliser également l'expression de Bmf. *In vitro*, la surexpression du cDNA de Bmf dans les RPTC promouvoit l'apoptose et augmente l'activité de caspase 3. La stimulation de RPTC de Rat avec le glucose élevé (25mM de D-glucose) semble augmenter l'expression de Bmf et le traitement de ces cellules avec la roténone, les Diphénylène iodonium, la catalase et l'apocynine semble renverser cette stimulation. L'inhibition de Bmf avec un siRNA semble réduire l'apoptose induite par le glucose élevé. L'expression de Bmf a également été démontrée dans les RPTC de patients diabétiques.

Conclusion: Ces résultats ont démontré une surexpression de Bmf dans les RPTC de différents modèles diabétiques et suggèrent son potentiel rôle dans la régulation de l'apoptose et de l'atrophie tubulaire chez les diabétiques.

Mots-clés: Rein, système rénine-angiotensine, néphropathie diabétique, hypertension, ROS, souris transgéniques, Apoptose.

Abstract

Objective: To investigate the mechanisms underlying tubular apoptosis in diabetes by identifying pro-apoptotic genes that are differentially upregulated by reactive oxygen species in renal proximal tubular cells (RPTCs) in models of diabetes.

Research Design and Methods: Total RNAs isolated from renal proximal tubules (RPTs) of 20 week-old heterozygous db/m+, db/db and db/db catalase (CAT)-transgenic (Tg) mice were used for DNA chip microarray analysis. Real time-quantitative polymerase chain reaction assays, immunohistochemistry and mice rendered diabetic with streptozotocin were used to validate the pro-apoptotic gene expression in RPTs. Cultured rat RPTCs were used to confirm the apoptotic activity and regulation of pro-apoptotic gene expression. Additionally, studies in kidney tissues from patients with and without diabetes were employed to confirm enhanced pro-apoptotic gene expression in RPTs.

Results: Bcl-2-modifying factor (Bmf) was differentially upregulated ($p < 0.01$) in RPTs of db/db mice as compared to db/m+ and db/db CAT-Tg mice and in RPTs of streptozotocin-induced diabetic mice in which insulin reversed this finding. In vitro, Bmf cDNA overexpression in rat RPTCs co-immunoprecipitated with Bcl-2, enhanced caspase-3 activity and promoted apoptosis. High glucose (HG, 25 mM) induced Bmf mRNA expression in RPTCs, while rotenone, catalase, diphénylèneiodonium and apocynin decreased it. Knockdown of Bmf with small interference RNA reduced HG-induced apoptosis in RPTCs. Importantly, enhanced Bmf expression was detected in RPTs of kidneys from patients with diabetes.

Conclusion: These data demonstrate differential up-regulation of Bmf in diabetic RPTs and suggest a potential role for Bmf in regulating RPTC apoptosis and tubular atrophy in diabetes.

Key words: Kidney, renin-angiotensin system, diabetic nephropathy, hypertension, ROS, microarrays, transgenic mice, Apoptosis

Table des matières

<i>Liste des Figures</i>	xi
<i>Liste des Tableaux</i>	xii
<i>Remerciement</i>	xv
Chapitre 1 - Introduction	1
1.1 LE DIABÈTE.....	1
1.1.1 Statistiques : incidence du diabète dans le monde	1
1.1.2 Différentes formes de diabète	2
1.2 Le diabète et l'insuffisance rénale.....	4
1.2.1 L'insuffisance Rénale.....	4
1.2.2 Le rein.....	6
1.2.3 La néphropathie diabétique.....	8
1.3 Le diabète et l'hypertension	11
1.3.1 L'hypertension	11
1.3.2 Le Système RAS	12
1.3.3 Les inhibiteurs de RAS.....	16
1.3.4 Transforming Growth Factor- β	18
1.4 Le diabète et le stress oxydatif.....	19
1.4.1 Les espèces réactives de l'oxygène.....	19
1.4.2 L'apoptose	20
1.4.2.1 La famille de Bcl-2	22
1.4.2.2 Bmf	23
1.5 Modèles diabétiques	25
1.6 Plan Expérimental	27
Chapitre 2 - L'article: Bcl-2-Modifying Factor Induces Renal Proximal Tubular Cell Apoptosis in Diabetic Mice. 30	
2.1 Abstract.....	32
2.2 Introduction.....	33

2.3 Methods	34
2.4 Results	39
2.5 Discussion	42
2.6 Acknowledgements	45
2.7 Disclosure	46
2.8 References	47
Chapitre 3 - Résultats préliminaires non publiés	72
Chapitre 4 - Discussion	85
Chapitre 5 - Références	92

Liste des Figures

Figure 1. Schéma récapitulatif des conditions qui privilégient l'apparition du diabète.....	3
<i>Figure 2.</i> Anatomie générale du rein.....	6
<i>Figure 3.</i> Anatomie générale du néphron.....	7
<i>Figure 4.</i> Schématisation des voies de signalisation impliquées dans la ND.....	10
<i>Figure 5.</i> Le système rénine angiotensine (RAS).....	12
<i>Figure 6.</i> Schématisation de la fonction antagoniste de l'Ang II et de l'Ang 1-7.....	14
<i>Figure 7.</i> Schématisation de l'apoptose induite par la voie extrinsèque et intrinsèque.....	21
<i>Figure 8.</i> Les protéines de la famille Bcl-2.....	23
Figure 9. Différents isoformes du gène humain de Bmf obtenues à partir de l'épissage alternatif.....	24
Figure 10. Perte de signalisation de la leptine induit une insulino-résistance et une augmentation du tissu adipeux.	26
<i>Figure 11.</i> Schématisation du mécanisme d'activation de Bmf. Activation de Bmf par phosphorylation suite à l'activation de nombreuses kinases par le facteur TGF- β	71

Liste des Tableaux

Tableau 1. Description des cinq stades de l'insuffisance rénale chronique.....5

Liste des abréviations

ACE.....	Enzyme de conversion de l'angiotensinogène
ace2.....	Enzyme de conversion de l'angiotensinogène de type 2
ACEi.....	inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène
ADN.....	L'acide désoxyribonucléique
AGEs.....	Facteurs de glycation avancés
Agt.....	Angiotensinogène
Ang I.....	Angiotensine I
Ang II.....	Angiotensine II
Alb.....	Albumine
APAF-1.....	Apoptotic peptidase activating factor 1
ARB.....	Bloqueurs du récepteur AT1
ARN.....	Acideribonucléique
AVC.....	Les accidents vasculaires cérébraux
Bcl-2.....	B-cell lymphoma 2
Bmf.....	Bcl-2 modifying factor
CKD.....	Chronical kidney disease – maladie rénale chronique
DPI.....	Diphénylène iodonium
ECM.....	Extracellular matrix-protéines de la matrice extracellulaire
Et-1.....	L'endothéline 1
ERK.....	Extracellular signal-regulated kinases
FG.....	Filtration glomérulaire
FID.....	Fédération internationale du diabète
GFR.....	Glomerular filtration rate – taux de filtration glomérulaire
IGF.....	Insulin-like growth factor
INS.....	Insuline
IR.....	L'insuffisance rénale
JNK.....	c-Jun N-terminal kinases
KO.....	Knockout
L.....	Losartan

MAPK.	Mitogen-activated protein kinase
NADPH.	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ND.....	Néphropathie diabétique
NF-kB.....	Nuclear factor-k B
NO	L'oxyde nitrique
PAS.....	Periodic acid-Schiff
P.....	Perindopril
PKC.....	Phosphokinase C
RAS.....	Système rénine-angiotensine
ROS.	Espèces Réactives oxygénées
RPTC.....	Cellules des tubules proximaux rénaux
STZ.....	Streptozotocin
siRNA.....	Small interfering RNA
TGF-B.	Facteur de croissance transformant bêta
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α -tumor necrosis factor α
Tg.....	Transgénique
TUNEL.	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
VEGF	vascular endothelial growth factor

Remerciement

En préambule à ce mémoire, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de mes travaux de recherche ces deux dernières années.

Pour commencer, je tiens d'abord à remercier particulièrement mon superviseur Dr John SD Chan qui par sa qualité de superviseur, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de ces deux dernières années, ainsi que pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Je tiens également à adresser mes remerciements à Dr Shaoling Zhang, qui tout au long de mes travaux s'est toujours montré présente, d'une grande pertinence et d'une grande générosité dans son temps malgré sa charge de travail.

Aussi, je tiens à remercier particulièrement notre assistante de recherche Isabelle Chenier, avec qui j'ai toujours eu des argumentations parfois vives certes mais toujours des plus intéressantes et enrichissantes. Je tiens aussi à la remercier pour son temps et son engagement auprès des étudiants et plus particulièrement auprès de moi.

J'aimerais par la même occasion remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire que j'ai eu le plaisir de côtoyer et le plaisir de travailler avec ces deux dernières années et qui ont toujours été d'une grande aide et d'une bonne collaboration.

Finalement, en derniers mais non les moindres, j'aimerais du fond du cœur, remercier ma petite famille qui comprend mes parents et mon petit frère, qui sont très chers à mon cœur, pour leur contribution particulière et très importante à ce mémoire puisqu'ils m'ont soutenue, écouté et encouragé continuellement lors de mes travaux tout au long de ma maîtrise.

Alors merci à tous et par la même occasion, j'aimerais adresser un grand merci aux membres du jury qui vont prendre la peine de lire et corriger ce mémoire, ainsi que le CRCHUM, l'institution qui m'a accueillie ces deux dernières années et l'université de Montréal.

Merci.

Chapitre 1 - Introduction

1.1 LE DIABÈTE

1.1.1 Statistiques : incidence du diabète dans le monde

Le diabète est une maladie chronique grave qui affecte de plus en plus de personnes dans le monde. La Fédération internationale du diabète (FID) estimait en 2010, une prévalence mondiale s'élevant à 6,4%, ce qui représente près de 285 millions de personnes [1, 2]. Au Canada, le diabète est l'une des maladies les plus courantes. En 2008-2009 près de 2,4 million de canadiens âgés d'un an et plus étaient atteints de cette maladie, Ce qui représentait près de 6,8% de la population [3]. D'ici 2030, la FID prévoit que ces chiffres pourraient plus que doubler dans le monde entier avec une augmentation de près de 150% dans les pays en développement. La haute prévalence de cette maladie résulte principalement du vieillissement, de l'accroissement démographique de la population, ainsi que de la tendance croissante à l'obésité associée à une mauvaise alimentation et à la sédentarité [2].

Le diabète est une maladie cardiométabolique caractérisée par une hyperglycémie résultant soit d'un défaut dans la sécrétion de l'insuline ou de son action ou des deux combinés ensemble. Lorsque la glycémie est mal ou non contrôlée, il en résulte un taux de sucre élevé dans le sang, ce qui, à long terme, peut provoquer de nombreux dommages aux organes et aux tissus. Le diabète est une maladie potentiellement mortelle, car elle peut être associée à de nombreuses complications dont les maladies cardiovasculaires (les maladies coronariennes, les AVC, l'hypertension), la neuropathie, la rétinopathie, ainsi que la néphropathie [4]. On note annuellement quelques 3,2 millions de décès dus au diabète dans le monde. Ce qui fait qu'environ un décès sur 20 est imputable à cette maladie, soit 8700 décès par jour ou encore six décès par minute [2].

1.1.2 Différentes formes de diabète

On distingue principalement deux types de diabètes, type 1 et 2. Le diabète de type 1, dit insulinodépendant, est caractérisé par une déficience dans la sécrétion de l'insuline, due principalement à une destruction auto-immune des cellules β du pancréas. Ce diabète compte seulement 5-10 % des diabétiques et peut se manifester soit dès l'enfance, à l'adolescence ou chez le jeune adulte [4]. Il est important de noter que le taux de cellules β détruit est variable d'un individu à l'autre. Chez certains, en général les enfants, c'est un processus plus rapide alors que chez les adultes, le processus est généralement plus lent. La destruction auto-immune des cellules β a de multiples prédispositions génétiques, et est aussi reliée à certains facteurs environnementaux qui demeurent peu définis. Il est absolument impératif pour les patients atteints de ce type de diabète de réguler leur taux de glycémie via la prise régulière d'insuline.

Le diabète de type 2, quant à lui est une forme de diabète beaucoup moins sévère mais bien plus répandue que le type 1. Cette forme compte près de 90-95% des diabétiques [4, 5] et est caractérisée par une résistance à l'insuline causée principalement par une mauvaise alimentation, une inactivité physique, ainsi qu'à une certaine prédisposition génétique. Pour compenser la résistance à l'insuline, le pancréas essaie d'en produire plus, ce qui force les cellules β à augmenter leur activité et conduit progressivement à la destruction de celles-ci [6, 7]. La résistance à l'insuline résulterait de la surnutrition, qui engendre une multitude d'effets indésirables tels qu'une lipo- et une glycotoxicité, un stress oxydatif, des dépôts amyloïdes dans le pancréas ainsi qu'un dépôt ectopique de lipides dans de nombreux organes [8-12]. L'ensemble de ces facteurs peut soit induire une réponse inflammatoire, soit être empiré par l'inflammation. Il est important de noter que même si l'obésité mène au diabète, toutes les personnes obèses ne sont pas forcément diabétiques, ce qui s'explique en grande partie par le fait qu'il existe une différence interindividuel dans la réponse au stress métabolique.

Pour contrer cette maladie, il existe un vaste choix de médicaments qui visent différents mécanismes. Par exemple la classe des sulfonylurées, tels que glibenclamide, glipizide, rapaglinide, qui stimulent la sécrétion de l'insuline par les cellules β . Ou encore la classe des biguanides, qui réduisent la production hépatique de glucose en inhibant principalement la

néoglucogénèse (metformine). Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase, qui diminuent et retardent l'absorption des glucides par l'intestin (acarbose). Et les thiazolidinediones, une classe de médicaments plus récente, qui améliore la sensibilité périphérique à l'insuline (pioglitazone, rosiglitazone) [13, 14]. De nos jours, pour une meilleure efficacité, la stratégie thérapeutique semble tendre vers une combinaison de médicaments de différentes classes. Lorsque les traitements oraux sont inefficaces, alors les diabétiques de type 2 finissent par prendre de l'insuline aussi.

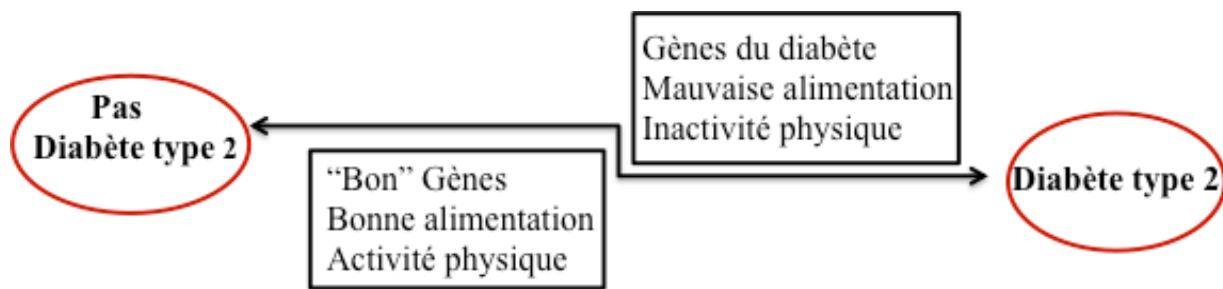


Figure 1. Schéma récapitulatif des conditions qui privilégient l'apparition du diabète.

1.2 Le diabète et l'insuffisance rénale

1.2.1 L'insuffisance Rénale

L'insuffisance rénale (IR) affecte une portion importante de la population dans le monde avec une prévalence de 7,2% chez les adultes de plus de 30 ans et 35,8% chez les personnes âgées de plus de 65 ans [15]. De nombreuses maladies peuvent conduire à IR, par exemple, les maladies glomérulaires et tubulaires du rein, les uropathies obstructives, les nombreux désordres vasculaires, ainsi que le diabète et l'hypertension. La **néphropathie diabétique** (ND), qui se développe chez près de 40% des patients diabétiques, est aujourd'hui la cause principale de l'insuffisance rénale [16]. L'Association américaine du diabète, ainsi que la Fondation nationale du rein s'entendent pour dire que l'insuffisance rénale est encore sous évaluée dans les populations diabétiques et que, malgré les nombreux traitements existants, cette maladie demeure irréversible. Les traitements visent donc d'avantage à retarder la progression de la maladie, plutôt qu'à la guérir. C'est la preuve même qu'à l'époque actuelle les mécanismes que sous tend cette maladie demeurent encore peu compris.

La fondation canadienne du rein définit l'insuffisance rénale, comme étant causée soit par un endommagement des reins ou une diminution de la fonction rénale pendant trois mois ou plus. On distingue cinq stades de cette maladie, qui se divisent selon le degré de détérioration de la fonction rénale. Le **débit de filtration glomérulaire** (GFR), ou encore le taux de liquide filtré par unité de temps, représente l'indicateur principal, qui permet de quantifier l'activité rénale et donc de classer le stade de la maladie (voir **Tableau 1**) [17].

Les cinq stades d'une maladie rénale chronique






	STADE 1	STADE 2	STADE 3	STADE 4	STADE 5
Pourcentage de la fonction rénale prévalant à chaque stade	Plus de 90 % 	60 à 89 % 	30 à 59 % 	15 à 29 % 	Moins de 15 % 
Description de chaque stade	Détérioration minime des reins. Fonction rénale normale ou supérieure à la normale.	Détérioration progressive. Fonction rénale inférieure à la normale.	Détérioration des reins avancée. Fonction rénale faible.	Détérioration des reins grave. Fonction rénale très faible.	Insuffisance rénale terminale. Atteinte très grave de la fonction rénale. Vie menacée.
Symptômes	Aucun symptôme manifeste. Taux d'urée et de créatinine normaux.	Aucun symptôme manifeste. Taux d'urée et de créatinine normaux ou légèrement élevés.	Apparition des premiers symptômes : fatigue, perte d'appétit et démangeaisons. Augmentation du taux de créatinine, excès d'urée et parfois début d'anémie.	Fatigue, perte d'appétit et démangeaisons persistantes.	Symptômes : insomnies, gêne respiratoire, démangeaisons et vomissements fréquents. Taux élevés de créatinine et d'urée.
DFGe (Débit de filtration glomérulaire estimatif)	90 ml/min ou plus	60 – 89 ml/min	30 – 59 ml/min	15 – 29 ml/min	15 ml/min ou moins
Options de traitement*	Identifier les causes et tenter d'y remédier.	Surveiller le taux de créatinine, la tension artérielle et l'état de santé et de bien-être général. Tenter d'empêcher ou de ralentir la détérioration de la fonction rénale.	Continuer à essayer d'empêcher ou de ralentir la détérioration de la fonction rénale. Le patient apprend à se familiariser avec la maladie et les options de traitement.	Prévoir et créer les conditions d'accès à la dialyse. Procéder aux examens nécessaires pour une éventuelle greffe de rein.	Instaurer un traitement rénal de suppléance : dialyse ou greffe.

Tableau 1. Description des cinq stades de l'insuffisance rénale chronique. [17]

1.2.2 Le rein

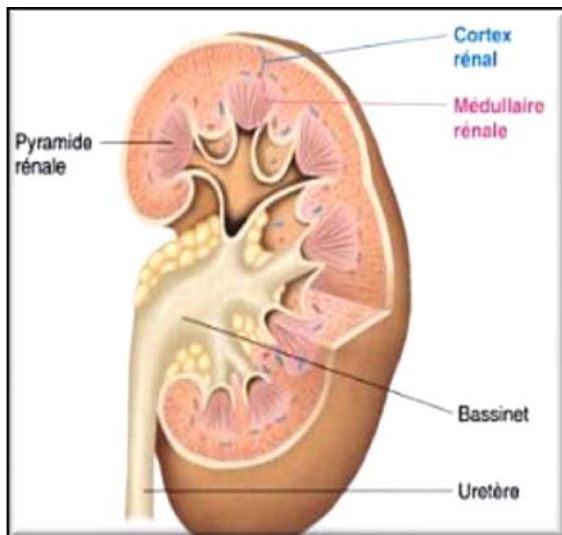


Figure 2. Anatomie générale du rein.
[19]

Le rein (figure 2) est un organe vital qui joue un rôle majeur dans l'homéostasie, en contribuant au maintien de la stabilité du volume et de la composition du milieu intérieur, ainsi qu'à la formation de l'urine [18]. Pour maintenir cet équilibre interne, le rein doit continuellement contrôler la quantité d'eau, mais aussi de solutés, éliminés dans l'urine. Il est également en mesure de s'ajuster aux grandes variations d'ingestion de liquides, de sels et autres électrolytes, en plus de compenser les grandes pertes anormales lors des diarrhées, vomissements ou hémorragies. En plus de son rôle primordial dans le maintien de

l'équilibre hydroélectrolytique, le rein est la principale voie d'élimination hors de l'organisme de déchets métaboliques toxiques tels que l'urée, l'acide urique, la créatinine ainsi que la bilirubine, et d'autres déchets hépatiques et substances étrangères tels que les médicaments, additifs alimentaires et pesticides [19]. Le rein possède également une importante fonction endocrine ou il synthétise de nombreux facteurs qui sont importants à sa propre fonction et d'autres qui ont une action périphérique tels que l'érythropoïétine, une hormone impliquée dans l'érythropoïèse et la rénine, une protéase, qui active la cascade qui convertit l'angiotensinogène plasmatique d'origine hépatique en angiotensine II, un puissant vasoconstricteur jouant un rôle majeur dans la régulation de la pression artérielle.

Le rein, est composé de près d'un million d'unités filtrantes connues sous le nom de **néphron** (figure 3). Chaque néphron est composé d'un filtre, le glomérule rénal, d'environ 200 μm de diamètre et d'un système tubulaire d'échange d'eau et de solutés divisé en segments sur la base de différence de structure et de fonction. On distingue : le tubule contournée proximal, l'anse médullaire (anse de Henlé) et le tubule contourné distal ainsi que le tubule collecteur [20].

Le **glomérule** consiste en un peloton de capillaires d'où sort par filtration une partie de l'eau et des substances dissoutes dans le sang. Le liquide filtré, presque identique au plasma mais sans les protéines, passe ensuite dans la partie tubulaire du néphron où il est exposé à différents processus de réabsorption et d'excrétion avant de devenir l'urine définitive. Le filtrat qui sort des capillaires glomérulaires se retrouve dans la capsule de Bowman avant de passer dans le **tubule proximal** où se fait la majeure partie de la réabsorption de glucose, d'acides aminés, d'eau et de minéraux. Ce tubule d'environ 15 m de long et 55 μm de diamètre est sinueux sur la plus grande partie de sa longueur

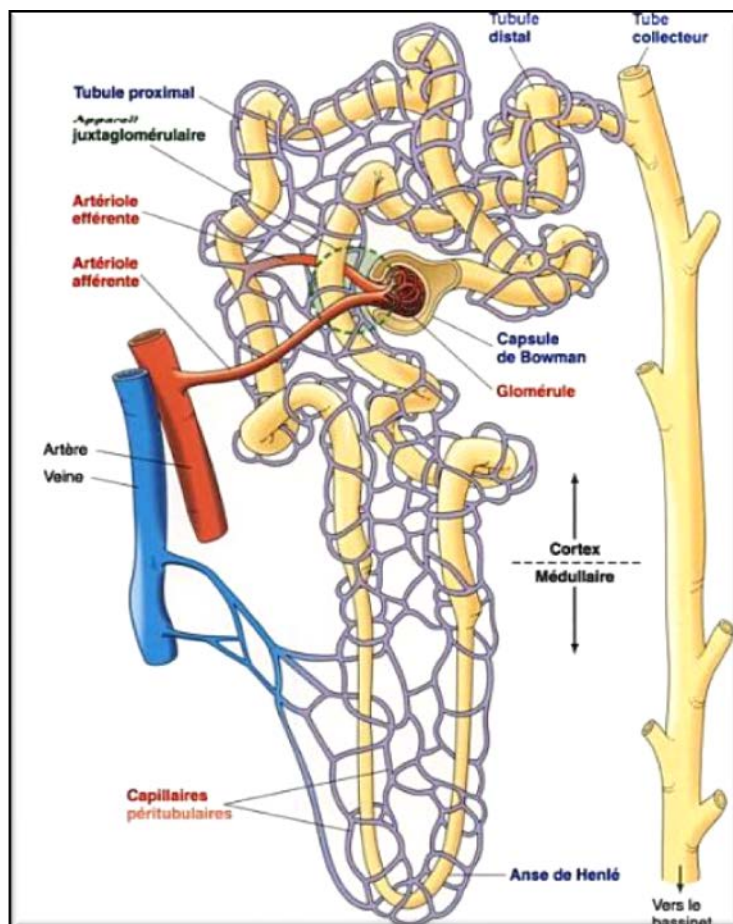


Figure 3. Anatomie générale du néphron. [19]

et est situé entièrement dans le cortex. Il est caractérisé par une bordure en brosse du côté luminal due à la présence de microvilles, qui augmentent la surface de contact et donc la capacité de réabsorption. Après son passage dans le tubule proximal, le filtrat se retrouve dans l'**anse de Henlé**, qui a la forme d'un U et dont la branche descendante part du cortex et s'enfonce dans la médulla. La branche ascendante rejoint ensuite le cortex en passant par une fourche formée par les artères afférentes et éfférentes. Le filtrat passe ensuite dans le **tubule contourné distal**, qui est aussi sinueux. Situé entièrement dans le cortex, il se prolonge jusqu'au **tubule collecteur** où le contenu c'est à dire le filtrat est l'urine proprement dite [18, 19].

1.2.3 La néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique (ND) est caractérisée comme étant une perte progressive et irréversible de la fonction rénale chez les patients diabétiques [21]. Les changements pathologiques associés à cette maladie sont, très grossièrement, une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire (ECM) et une infiltration des cellules inflammatoires dans le glomérule et les régions tubulointerstitielles [22].

Lorsque la glycémie est élevée, de nombreux changements s'opèrent au niveau de la structure rénale dont un épaissement de la membrane glomérulaire, une hypertrophie glomérulaire, une glomérulosclérose et une expansion des cellules mésangiales. On observe également une perte de podocytes, une atrophie tubulaire ainsi qu'une fibrose tubulo-interstitielle et de l'inflammation [23-26]. La concentration de glucose élevée cause l'activation de nombreuses voies de signalisation (dont la voie de l'aldose-sorbitol réductase, des hexosamines biosynthétiques, des protéines kinases C (PKC) et des « mitogen-activated protein kinase »; (MAPK)) qui sont impliquées dans la pathogénèse de la néphropathie diabétique et donc dans les changements hémodynamiques qui s'opèrent dans le rein (voir **Figure 4**) [27]. De plus, l'hyperglycémie augmente l'expression de certains facteurs de croissance et cytokines (tels que « transforming growth factor- β » ; (TGF- β), « vascular endothelial growth factor » ; (VEGF), « platelet-derived growth factor », « insulin-like growth factor » ; (IGF) et le facteur de nécrose tumorale « tumor necrosis factor α » ; (TNF- α)) qui vont être importants pour induire la fibrose et l'inflammation. Ces deux dernières jouent un rôle majeur dans la progression de la néphropathie diabétique.

Le processus qui mène à la ND commence par une hypertrophie rénale causée par une hyperfiltration, qui résulte d'une élévation du plasma rénal filtré. Chez les patients diabétiques de type 1 et 2, l'hyperglycémie mène à une augmentation d'environ 5 à 10 % de la filtration glomérulaire (FG) [16]. Cette augmentation serait associée à de nombreux facteurs dont une augmentation de la concentration des corps cétoniques, une augmentation de l'activité des hormones de croissance (IGF) ainsi qu'à un dysfonctionnement des prostaglandines rénales [28]. Une normalisation de la glycémie permet de normaliser la FG. L'hyperfiltration est suivie d'une perte de la charge négative de la barrière glomérulaire, permettant ainsi aux protéines chargées

négativement, telle que l'albumine (Alb) de traverser cette barrière pour se retrouver dans le filtrat et finir dans l'urine. Ce phénomène est connu sous le nom de microalbuminurie. On parle d'albuminurie lorsque le taux d'Alb excrété est entre 30 et 300 mg par 24h [21]. La forte concentration de ces protéines dans le filtrat et l'incapacité du tubule proximal à tout réabsorber mène à l'albuminurie. On parle de macroalbuminurie lorsqu'on excrète plus de 300 mg/24h et de protéinurie lorsqu'on excrète 3.5g/24h. La filtration glomérulaire et l'albuminurie sont généralement les deux indicateurs de dommages rénaux. Cependant, l'albuminurie demeure la première manifestation des maladies rénales chroniques [21, 22]

En général, lorsqu'il y a macroalbuminurie, le taux de FG commence à baisser en raison de l'occlusion progressive des capillaires interstitiels et mésangiaux [23, 24]. En conditions physiologiques, les protéines qui passent la barrière de filtration glomérulaire sont réabsorbées par les tubules rénaux et principalement par le tubule proximal, prévenant ainsi la protéinurie. Or, en conditions pathologiques, certaines protéines qui passent dans le filtrat sont réabsorbées par les tubules rénaux et s'accumulent dans les cellules épithéliales tubulaires. Cette accumulation induit la synthèse de cytokines inflammatoires et vasoactives qui endommagent les tubules. Ce qui conduit à l'atrophie tubulaire, ainsi qu'à une fibrose interstitielle [25-27]. La dysfonction tubulaire endommage davantage les reins et correspond à un signe de la progression de la ND vers l'IR. Prévenir la dysfonction tubulaire en prévenant l'atrophie ou la fibrose pourrait retarder voir atténuer la progression de cette maladie. Dans cette étude nous allons nous concentrer principalement sur les mécanismes que sous-tend l'atrophie tubulaire afin de pouvoir, dans les études futures, essayer de la prévenir.

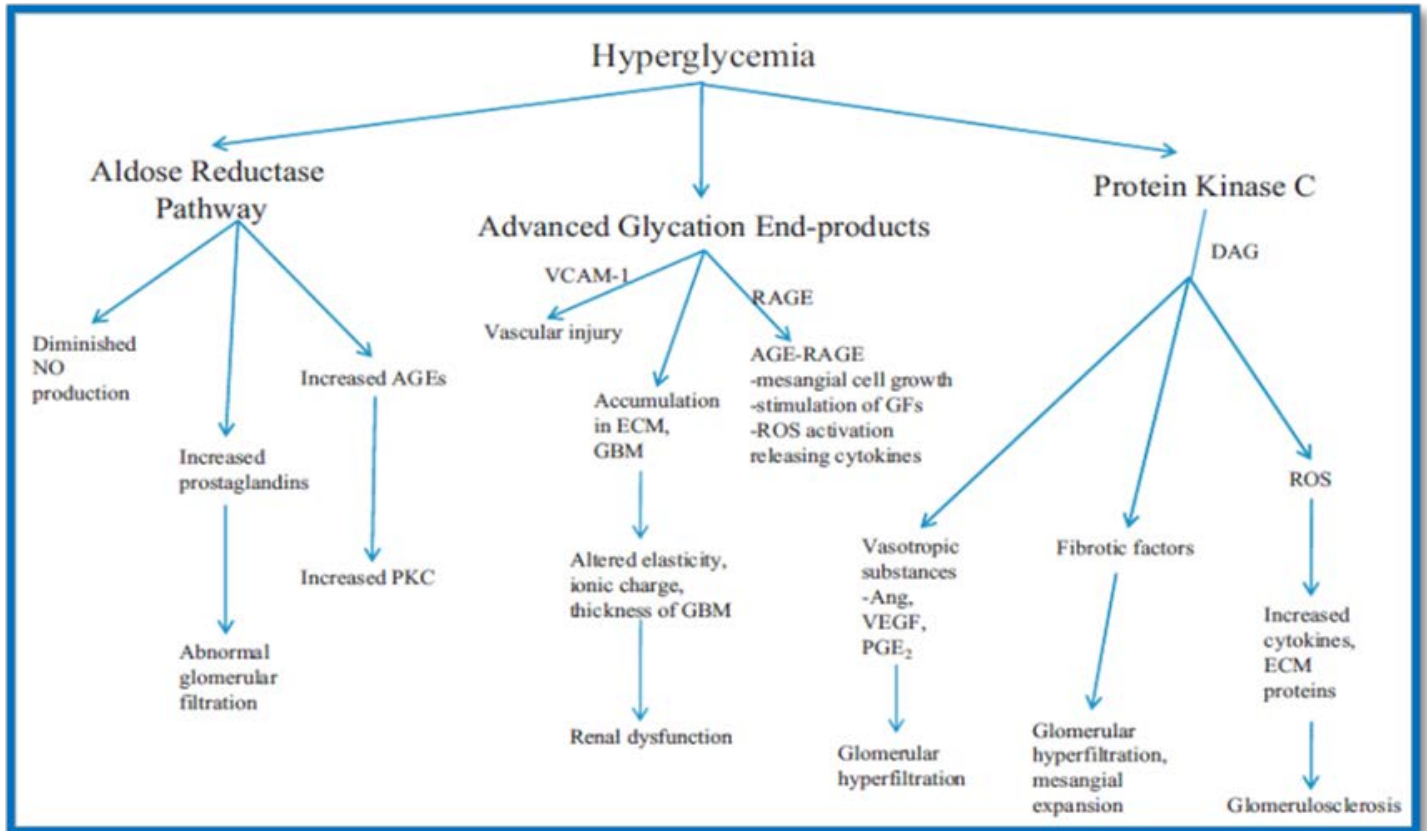


Figure 4. Schématisation des voies de signalisation impliquées dans la ND. (Aldose réductase, PKC et la glycation de nombreux produits) activées par l'hyperglycémie et impliqués dans les dommages rénaux. [21]

1.3 Le diabète et l'hypertension

1.3.1 L'hypertension

L'hypertension est une maladie cardiovasculaire plus prépondérante chez les patients diabétiques. Environ deux fois plus de personnes diabétiques développent cette maladie comparée au reste de la population. Chez les diabétiques de type 1, l'hypertension est souvent le résultat d'une dysfonction rénale, alors que chez les patients de type 2 l'hypertension est souvent préalable aux dommages rénaux, c'est-à-dire que, tout comme la résistance à l'insuline, elle est principalement due à l'obésité. En effet, près de 58% des patients nouvellement diagnostiqués comme étant diabétiques de type 2, ne souffrent pas de protéinurie, mais sont déjà hypertendus [29].

Les facteurs majeurs qui induisent l'hypertension chez les patients diabétiques, type 1 et 2 combinés, sont l'expansion du volume rénal causée par une augmentation de la réabsorption du sodium et la vasoconstriction périphérique causée par la dérégulation de facteurs qui contrôlent la résistance périphérique vasculaire. En effet, dans le rein, le diabète mène à de nombreux changements structuraux tels que l'épaississement de la membrane glomérulaire, l'expansion des cellules mésangiales, et l'accumulation de ECM, menant finalement à une augmentation de la pression sanguine dans la microcirculation rénale. [30]. Cette élévation de pression endommage davantage les vaisseaux sanguins ainsi que les néphrons. Il en résulte une rétention d'eau et une accumulation de sodium dans la circulation. À long terme, l'ensemble de ces changements endommageront les vaisseaux périphériques et mèneront donc à l'hypertension. Chez les patients diabétiques, il existe maintenant de nombreuses évidences qui démontrent une augmentation de l'activité du système rénine angiotensine (RAS) intrarénal, une augmentation de la synthèse de l'endothéline-1 (Et-1), une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une diminution de l'oxyde nitrique (NO), qui contribuent à l'élévation de la pression artérielle [29]. L'hypertension contribue à la progression des dommages rénaux et augmente l'incidence des maladies cardiovasculaires et donc l'incidence de mortalité et morbidité dans la population.

1.3.2 Le Système RAS

Le système Rénine-angiotensine est une cascade de régulation endocrinienne et enzymatique, qui permet d'exercer un contrôle sur le maintien du fluide extracellulaire et de la pression sanguine. La cascade commence la formation de la rénine à partir du clivage protéolytique de 43 acides aminés de son précurseur, la prorénine [31]. La rénine est emmagasinée, puis libérée des cellules juxtaglomérulaires du rein en réponse à une baisse de la pression rénale, de la concentration de Cl⁻ dans le fluide du tubule distal ou à une augmentation du système sympathique suite à une stimulation des β -adrénorécepteurs [32]. Il existe aussi d'autres facteurs, qui peuvent stimuler la libération de la rénine tels que : la vitamine D, l'acide urique, TGF- β et TNF α [33].

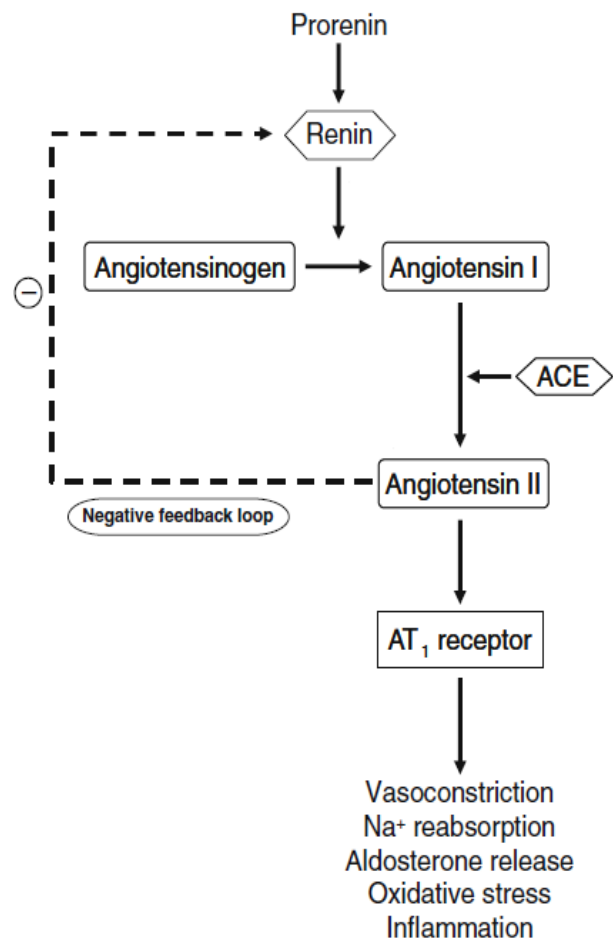


Figure 5. Le système rénine angiotensine (RAS). ACE, « Angiotensin-converting Enzyme ». [31]

La rénine clive l'angiotensinogène (Agt) circulant, produit à partir du foie, et forme l'angiotensine I (AngI). L'Ang I est clivé à son tour par l'enzyme de clivage de l'angiotensine (« angitensin-converting enzyme » ; ACE) pour former le peptide actif, l'angiotensine II (Ang II), un agoniste des récepteurs (AT1 et AT2) [32, 33]. AT1 est le récepteur le plus prédominant dans la plupart des tissus. Dans le rein, son transcrite a été localisé dans les tubules proximaux, le segment ascendant de l'anse de Henlé, le glomérule, les vaisseaux artériels et les cellules juxtaglomérulaires [33]. Le récepteur AT2, quant à lui, est exprimé principalement au cours du

développement embryonnaire, dans le mesangime rénal, chez l'humain et les rongeurs. Le rôle de ce récepteur dans la régulation de la fonction rénale demeure encore peu défini. Cependant, des études suggèrent, que son activation viendrait contrebalancer les effets de l'activation du récepteur AT1, via la production de la bradykinine et de l'oxyde nitrique, qui augmenteraient la concentration cytotolique de la guanosine monophosphate, dans le fluide interstitiel [34]. Après la naissance, l'expression du récepteur AT2 est réduite drastiquement [35], ce qui fait du récepteur AT1 le récepteur prédominant dans de nombreux tissus. Il est donc responsable de l'action physiologique (vasoconstriction, augmentation de la pression artérielle, contractilité du myocarde, rétention d'eau et de sodium) [36, 37] mais aussi pathologique de l'Ang II. En effet, certaines variantes de ce récepteur seraient associées à l'hypertension [38] et à la dysgénésie tubulaire dans les reins [39].

Récemment, il a été découvert, que certains organes comme le cœur, le cerveau, le pancréas, les tissus adipeux et les reins possédaient un système RAS propre à eux. Dans chacun de ces organes, l'Ang II semble jouer un rôle spécifique. Par exemple, nous savons aujourd'hui que l'Ang II, en plus de moduler la pression artérielle, est aussi un modulateur de l'immunité, une molécule pro-fibrotique, ou encore un inhibiteur de la sécrétion de l'insuline [40, 41]. Dans le rein, l'Ang II est responsable de l'activation de nombreuses voies de signalisations impliquées dans de nombreux processus inflammatoires et dans la dysfonction endothéliale, qui sont associés tous les deux à l'hypertension et aux maladies rénales chroniques [42]. Liée à son récepteur AT1, elle induit la contraction des cellules du muscle lisse vasculaire, l'augmentation de la réabsorption du sodium dans les tubules proximaux rénaux et stimule la libération de l'aldostérone. Un important inducteur de la fibrose tubulaire rénale, de l'inflammation vasculaire ainsi que du stress oxydatif [33, 43]. L'Ang II est aussi impliquée dans de nombreux processus inflammatoire. Par exemple, il existe de nombreuses évidences, qui démontrent que ce peptide active la transcription de NF-kB qui induit la synthèse de chimiokines et d'autres molécules de l'adhésion cellulaire responsables de l'inflammation [44]. Il active également TGF- β , qui est impliqué dans le remodelage tissulaire, la fibrose et la Néphropathie diabétique. TGF- β semble aussi avoir une rétroaction positive en stimulant la transcription de l'angiotensinogène [45].

Depuis environ près de 20 ans, on reconnaît l'existence de l'Ang 1-7, un peptide actif du système RAS. Décrit pour la première fois en 1988 par Santos et al [46], nous savons aujourd'hui, qu'il existe différentes voies enzymatiques impliquant les enzymes ACE et ace2, qui mènent à sa formation [47, 48]. L'Ang (1-7) est formé à partir du clivage par ACE ou NEP de l'Ang (1-9), qui est formé à son tour par le clivage de l'acide aminé Leucine au c-terminal de l'Ang I à l'aide de ace2 [49]. Ce peptide peut également être directement produit à partir du clivage de l'acide aminé phénylalanine au c-terminal de l'Ang II à l'aide de ACE. Cette dernière voie semble être physiologiquement et biologiquement la plus prédominante (figure 6) [50].

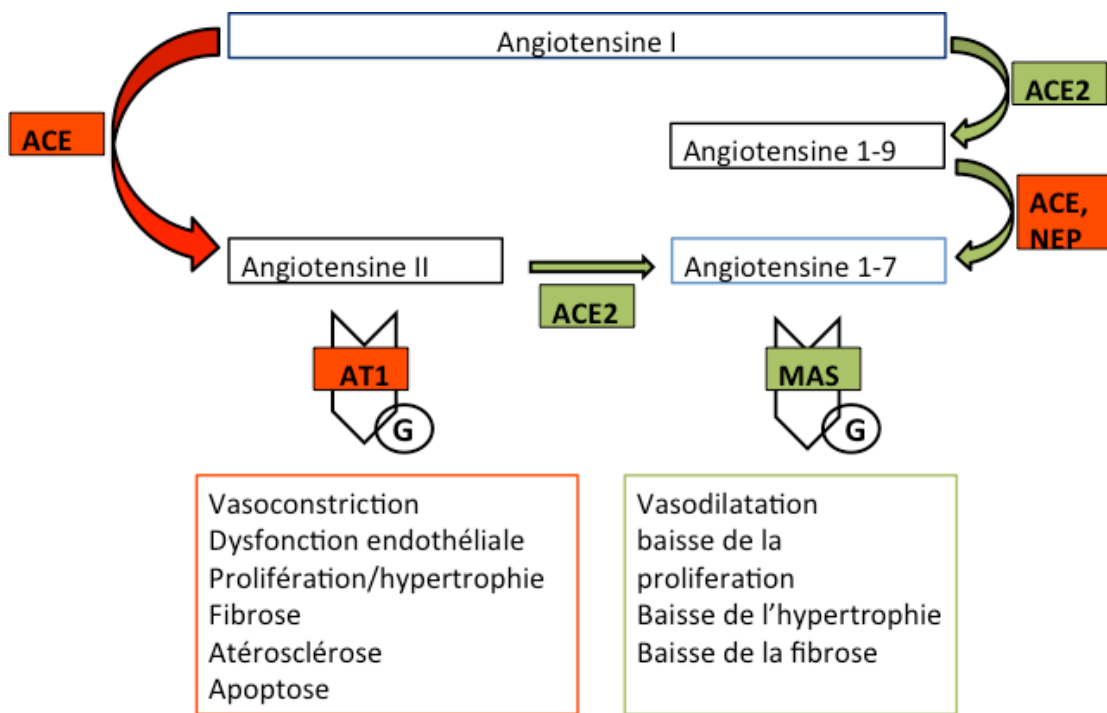
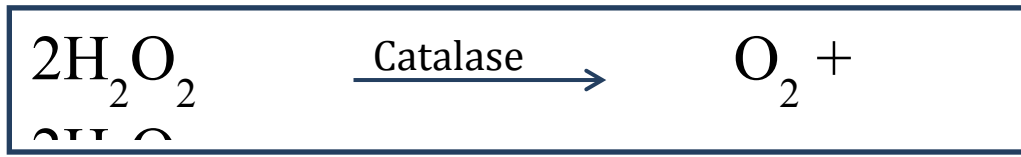


Figure 6. Schématisation de la fonction antagoniste de l'Ang II et de l'Ang 1-7. L'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ace2) joue un rôle majeur dans la cascade car elle convertit un peptide vasoconstricteur prolifératif, Ang II, en un peptide vasodilatateur antiprolifératif.

Contrairement à l'Ang II, un peptide vasoconstricteur et prolifératif, l'Ang (1-7) agit comme un peptide vasodilatateur et antiprolifératif. Via la stimulation de son récepteur Mas, il arrive à prévenir l'ensemble des effets néfastes de l'Ang II surtout en conditions pathologiques [51]. Dans le rein, en se basant sur des études physiologiques de l'homéostasie rénale, L'axe ace2/Ang(1-7)/Mas semble avoir un rôle important et controversé dans les maladies rénales [52]. En effet, il est aujourd'hui bien établi que les souris (« knockout » ; KO), avec une délétion génétique du récepteur Mas, développent un ensemble de dysfonctions rénales, impliquant un épaississement de la membrane glomérulaire, une augmentation du dépôt d'agents fibrotiques (fibronectine et le collagène IV et III) ainsi qu'une surexpression du récepteur AT1 et de TGF- β [53].

Afin de mieux caractériser l'implication du système RAS dans la néphropathie diabétique, l'équipe du Dr Chan a généré des souris transgéniques, qui surexpriment spécifiquement l'Agt de rat dans les cellules de tubules proximaux (RPTC) dans le rein. Ils ont ainsi démontré que ces souris sont plus prônes à développer l'hypertension, l'albuminurie, et des dommages rénaux [54]. Bloquer le système RAS, avec des inhibiteurs de ACE ou des bloqueurs du récepteur AT1, semble normaliser l'ensemble de ces paramètres, permettant ainsi une amélioration des conditions rénales [55, 56]. De plus chez ces mêmes souris Tg, On a démontré une surexpression des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont associées à la fibrose et l'apoptose tubulaire dans les RPTC [54]. Il faut noter que l'Ang II est un important inducteur du stress oxydatif. Via l'activation de la NADPH oxydase et de la xantine oxydase, elle induit de nombreux ROS dont l'anion superoxyde, le peroxynitrite et le peroxyde d'hydrogène, qui contribuent au dysfonctionnement endothélial et à l'atrophie tubulaire dans les reins [27, 42]

Cette même équipe a démontré que traiter les souris Agt transgéniques avec l'apocynine, un inhibiteur de la NADPH oxydase, permettait de prévenir l'apoptose dans les RPTC et donc aidait à minimiser la progression des la néphropathie diabétique [57]. De plus, ils ont également démontré que la surexpression de la catalase, une enzyme de détoxification qui dégrade le H₂O₂ en H₂O permettait aussi de prévenir la fibrose, ainsi que l'apoptose tubulaire [58]. Ce qui est tout à fait en accord avec la littérature. Finalement, dans des études plus antérieures, 2002, l'équipe du Dr Chan a démontré in vitro que les ROS avaient une rétroaction positive sur la stimulation du système RAS en induisant l'expression de l'Agt via l'activation des p38 MAPK [59-61].



1.3.3 Les inhibiteurs de RAS

Une hyperactivité du système RAS est décrite comme étant l'évènement le plus important contribuant à l'hypertension glomérulaire [62, 63]. Il existe un mécanisme physiologique impliquant la vasoconstriction de la vasculature glomérulaire, qui vise à maintenir la pression hydrostatique glomérulaire constante malgré l'élévation de la pression artérielle. Cependant en absence de traitement, la pression artérielle étant constamment élevée, le mécanisme d'autorégulation endogène fini par céder, et il en résulte une élévation de la pression hydrostatique glomérulaire, une hyperfiltration, ainsi qu'une protéinurie [64]. Les médicaments qui visent à inhiber le système RAS tels que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACEi) et les antagonistes du récepteur AT1 (ARB) sont des médicaments de premier choix dans le traitement de l'hypertension chez les patients souffrant de maladies rénales chroniques [32, 65]. En plus de leur effet hypotenseur, ces médicaments semblent avoir un effet rénoprotecteur. C'est-à-dire qu'ils permettent d'interrompre ou de retarder la progression des lésions rénales.

Le traitement à base d'hypotenseurs mène à une réduction plasmatique et intrarénale de la concentration d'Ang II [66]. De nombreuses études cliniques, par exemple Lewis et al ont démontré que l'administration du captopril permettait de doubler la concentration de créatinine dans le sérum chez ces patients comparés au placebo [67], et en ont conclu que cette drogue protégeait contre la détérioration de la fonction rénale chez les patients insulino-dépendants souffrant de ND. Ils ont aussi montré, chez ces même patients, qu'une combinaison (insuline-hypotenseur) avait un meilleur effet sur la fonction rénale que le traitement à base d'hypotenseurs seulement [67]. Raggenti et al, quant à eux, ont démontré que les patients souffrant de néphropathie chronique traités au ramipril montraient une amélioration voire même une

diminution du GFR au fil du temps [68]. De plus, dans une autre étude clinique Raggenti et al ont aussi démontré que les ACEi permettaient de prévenir la micro albuminurie et de normaliser l'excrétion de l'albumine urinaire chez les patients diabétiques de type 2 souffrant d'hypertension [69]. D'autres études cliniques ont montré que le traitement au captopril de patients diabétiques de type 1 avec néphropathie montraient une réduction de 50% de patients en dialyse ou de transplantation ainsi qu'une réduction du nombre de décès associés aux complications de cette maladie [70].

Bloquer le récepteur AT1 Avec les ARB semble avoir un effet similaire que les ACEi. C'est-à-dire que de nombreuses études ont montré une amélioration de la fonction rénale. Viberti et al ont démontré par exemple dans une étude clinique que le valsartan permettait de réduire l'excrétion urinaire d'albumine chez les patients diabétiques de type 2 avec microalbuminurie, ainsi que chez les patients hypertensifs et normotensifs [71]. Dans une étude portant sur 590 patients diabétiques de type 2, il a été démontré que l'administration d'irbesartan permettait d'avoir aussi un effet reno-protecteur [72]. Une autre étude réalisée par Lewis et al a montré que le traitement avec l'irbesartan de patients diabétiques de type 2 souffrant de néphropathie réduisait les risques de morbidité et mortalité ainsi que la progression vers l'insuffisance rénale de 20% [73]. Une autre étude portant sur le losartan, un autre ARB montrait une baisse d'environ 28% du risque de progression vers l'insuffisance rénale et une baisse de 16% du taux de mortalité associé à cette maladie comparé au placebo [74]. Ces études cliniques et de nombreuses autres, démontrent qu'en plus de normaliser la pression artérielle, les ACEi et les ARB semblent améliorer la fonction rénale et prévenir donc la progression de néphropathie diabétique.

Ces deux classes de médicaments semblent être cliniquement équivalents pour prévenir la néphropathie diabétique. Afin d'optimiser leur action une combinaison de ces deux médicaments a été proposée pour une meilleure action thérapeutique. Des études cliniques ont démontré qu'une combinaison par exemple de candesartan et de lisonopril semblait plus efficace pour normaliser l'hypertension et la microalbuminurie chez les patients diabétiques de type 2 [75]. Ou encore qu'une combinaison de telmisartan et enalapril semblait meilleure pour prévenir la néphropathie diabétique [76]. Une combinaison de ramipril et candesartan semblait avoir un effet additif positif. C'est-à-dire en plus de réduire l'hypertension et l'albuminurie, elle réduisait aussi

l'expression urinaire de TGF- β [77]. Donc l'ensemble de ces études cliniques ont démontré que l'inhibition du système RAS normalisait non seulement la pression artérielle mais aussi permettait de prévenir les dommages rénaux et de prévenir les dommages cardiovasculaires. Nous avons même observé qu'une combinaison de médicament avait un meilleur effet thérapeutique que la monothérapie.

1.3.4 Transforming Growth Factor- β

Transforming growth factor- β (TGF- β) est une cytokine fibrogénique, qui régule un grand nombre de processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la migration, l'adhésion, l'apoptose ainsi que la production d'ECM dans différentes cellules y compris les cellules mesangiales et les RPTC du rein [27]. De nombreuses études ont démontré une nette augmentation de la synthèse de cette cytokine ainsi que de son ARNm dans les glomérules et le tubulointerstitium de reins de patients et d'animaux diabétiques [27]. Dans les reins, TGF- β stimule la synthèse de fibronectine dans les cellules mesangiales [32] ainsi que VEGF, impliqué dans la pathogénèse de la néphropathie diabétique. Il promeut également le dépôt de composantes de la matrice extracellulaire telles que collagène I, et collagène IV, ainsi que de protéines qui induisent la fibrose et l'apoptose dans les RPTC [33]. TGF- β est aussi responsable de l'hypertrophie des cellules mésangiales et joue un important rôle dans la progression de la fibrose rénale via l'activation de la voie de signalisation Smad2/3 [35, 37]. De plus, il contribue à l'albuminurie en réduisant la recapture de l'albumine via la réduction du nombre de récepteurs de l'albumine dans les cellules mésangiales et induit la production de ROS en augmentant l'activité de la NADPH oxydase ces mêmes cellules en condition d'hyperglycémie [78]. L'inhibition de TGF- β semble réduire la fibrose et l'apoptose tubulaire dans différents modèles d'animaux diabétiques [79].

1.4 Le diabète et le stress oxydatif

1.4.1 Les espèces réactives de l'oxygène

Le stress oxydatif est induit par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont des radicaux libres. L'un des radicaux les plus réactifs est l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), qui peut soit induire des dommages cellulaires par lui-même ou être converti en d'autres radicaux libres. Dans le rein, la NADPH oxydase est la source majeure de l'anion superoxyde [27]. Cette enzyme transfère des électrons de la membrane à l'intérieur de la cellule pour les coupler à une molécule d'oxygène produisant ainsi l'anion superoxyde [80]. De nombreux travaux ont démontré que la NADPH oxydase était surexprimée dans les reins diabétiques de rats et que les ROS, qu'elle engendrait, jouaient un rôle majeur dans l'induction de l'hypertrophie rénale [81]. Par ailleurs, il a été démontré que l'administration d'apocynine, un inhibiteur de la NADPH oxydase, aux rats Otsuka long evans Tokushima fatty (OLETF), souffrant de néphropathie diabétique, réduisait le stress oxydatif et donc la peroxydation lipidique, l'expression glomérulaire de VEGF et l'albuminurie [82], améliorant ainsi la fonction rénale. De plus il a été démontré que la NADPH oxydase jouait un rôle important dans l'action des méthylglyoxales, qui induisent la fibrose via la génération des superoxydes. L'administration de la taurine, un autre inhibiteur de la NADPH oxydase, a également démontré une atténuation de l'albuminurie, de la glomérulopathie et un effet néphron protecteur chez le lapin diabétique [83]. Finalement l'administration du Thé vert, un anti oxydant, fraîchement préparé, semble aussi atténuer le développement de la néphropathie chez le rat diabétique spontanément hypertensif [84].

Chez les patients diabétiques, il existe maintenant de plus en plus d'évidences qui démontrent que le stress oxydatif joue un rôle important dans la progression de la néphropathie diabétique [85]. Il serait responsable de l'augmentation de l'expression rénale de fibronectine, et collagénase-1 qui induiraient l'inflammation et la fibrose rénale [27]. Les ROS seraient aussi responsables de l'expansion des cellules mésangiales et de l'atrophie tubulaire. Les mécanismes qui expliqueraient l'atrophie tubulaire demeurent encore peu définis. Cependant, de nombreux travaux tendent à démontrer que les ROS chez les diabétiques, semblent induire l'apoptose dans les tubules proximaux, inhibant ainsi leur fonction [86, 87]. L'apoptose a été détectée dans les

tubules proximaux de souris et de rats diabétiques [88-90] ainsi que de patients diabétiques [91]. Ce qui suggère que l'apoptose tubulaire pourrait précéder l'atrophie tubulaire. L'ensemble de ces données suggère fortement que ce sont les ROS qui induisent l'apoptose de cellules des tubules proximaux, cependant, on ignore encore quels sont les gènes impliqués dans ce mécanisme. L'étude qui suit, visera à étudier le gène codant pour la protéine « bcl-2 modifying factor » (Bmf), qui a été identifiée comme étant modulée par le stress oxydatif et qui induirait l'apoptose des tubules proximaux dans différents modèles diabétiques.

1.4.2 L'apoptose

L'apoptose ou encore la mort cellulaire programmée est un processus très conservé dans de nombreux organismes multicellulaires, qui joue un rôle majeur dans le développement embryonnaire ainsi que l'homéostasie tissulaire [92]. L'apoptose consiste en un ensemble de réactions enzymatiques spécifiques et contrôlées activées par un récepteur de mort cellulaire ou un signal cytotoxique. Il en résulte une activation de nombreuses protéases et autres enzymes protéolytiques conduisant à la protéolyse, la fragmentation de l'ADN, ainsi que la condensation de la chromatine [93].

Dépendamment du stimulus, l'apoptose peut être activée par la voie extrinsèque ou intrinsèque. La voie extrinsèque implique l'activation par un signal extérieur via un ligand (cytokines, « Tumor necrosis factor » (TNF), glucocorticoïdes, ligand FAS) qui une fois lié à son récepteur entraîne une signalisation intra-cellulaire qui active caspase-8 qui active à son tour caspase-3 et donc l'apoptose [94]. Quant à la voie intrinsèque, suite à un signal de stress cellulaire (radiation UV, perte de l'attachement cellulaire, cytotoxicité), il y a activation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (bax et bak), qui provoquent une perméabilisation de la membrane mitochondriale, et donc une libération dans le cytosol du cytochrome c qui promeut la formation de l'apoptosome avec « apoptosis protease activating factor 1 (APAF1) » et caspase-9. L'apoptosome clive caspase-3 et active donc l'apoptose (Voir figure 7) [95]. Chacune de ces voies mène à l'activation des caspases, qui sont responsables de l'apoptose.

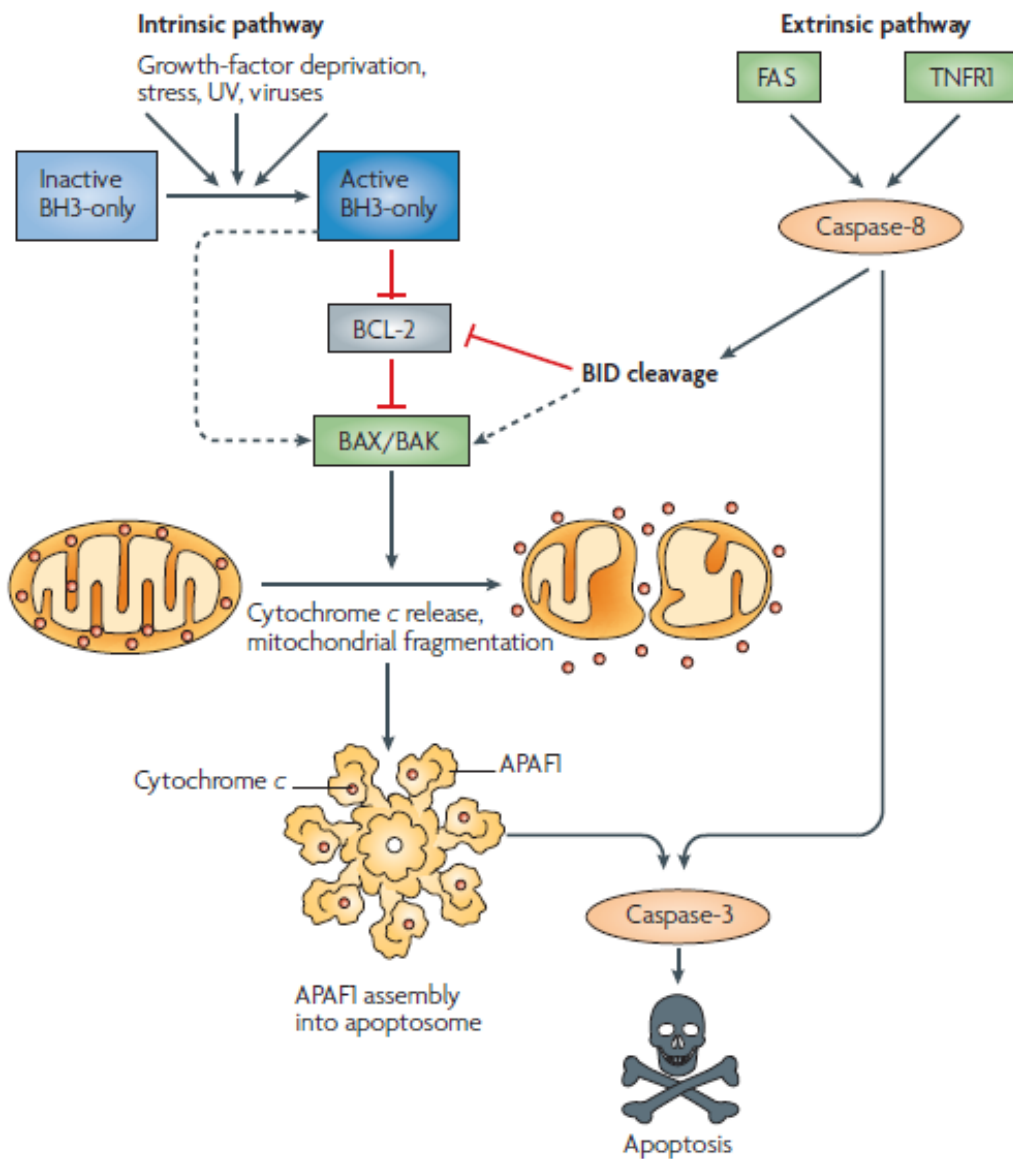


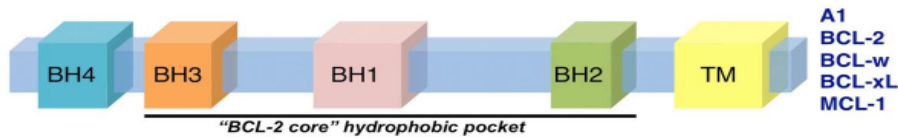
Figure 7. Schématisation de l'apoptose induite par la voie extrinsèque et intrinsèque. [84]

1.4.2.1 La famille de Bcl-2

L'apoptose activée par la famille «B-cell lymphoma 2» (Bcl-2) joue un rôle crucial dans l'homéostasie tissulaire, le développement embryonnaire ainsi que la maturation des cellules sanguines. Ces protéines sont également impliquées dans de nombreuses maladies telles que les infections, les maladies auto-immunes et neurodégénératives [96]. De plus, une altération de la fonction de certaines protéines de cette famille mène au développement de tumeurs, ce qui fait des Bcl-2 une cible importante dans les thérapies anticancéreuses. En raison de leurs fonctions biologiques, ainsi que de leur potentiel thérapeutique, la famille Bcl-2 a été ciblée par de nombreuses recherches ces 25 dernières années. Et durant cette période, près de 20 membres de cette famille ont été identifiés et classifiés d'après leur fonction apoptotique [96].

Les protéines de la famille Bcl-2 sont caractérisées par un domaine d'homologie structural, «Bcl-2 homology » (BH), et se divisent principalement en trois grandes familles [97]. Les protéines anti-apoptotiques ou pro-survie, telles que Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w et Mcl-1, qui comprennent quatre domaines d'homologie (BH1-4) et ont pour principale fonction d'empêcher l'apoptose en empêchant la liaison des protéines apoptotiques à la mitochondrie. Les protéines apoptotiques Bax et Bak caractérisées par trois domaines d'homologie (BH1-3) qui sont responsables de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Finalement, il existe la famille des protéines à un seul domaine BH3, qui sont considérées comme les sentinelles de la cellule [98]. C'est-à-dire, qu'en conditions normales, ces protéines sont inactives ou peu exprimées dans la cellule. Cependant, en présence de stimuli apoptotiques, Elles sont activées par des modifications post-traductionnelles ou par une augmentation de leur expression pour induire l'apoptose. Cette famille se divise en protéines qui peuvent activer directement l'apoptose tels que (Bid et Bim) ou en protéines qui activent indirectement l'apoptose (Bmf, Bad, NOXA). Elle agissent en séquestrant les protéines de pro-survie Bcl-2, empêchant ainsi leur fonction protectrice (voir figure 8) [99].

Anti-apoptotic BCL-2 proteins



Pro-apoptotic BCL-2 proteins

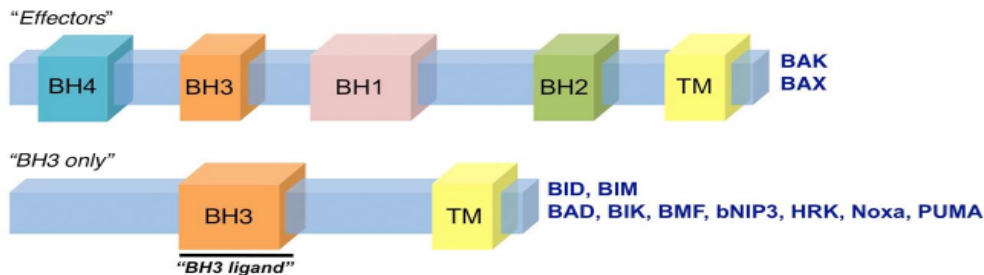


Figure 8. Les protéines de la famille Bcl-2. Cette famille se divise en protéine pro- et anti-apoptotiques. Les protéines (A1, Bcl-2, Bcl-w, BclxL, Mcl-1) sont anti-apoptotiques et sont caractérisées par quatre domaines d'homologie BH1-4. Les protéines pro-apoptotiques se divisent en deux groupes. Les effecteur (Bax et Bak) caractérisés par quatre domaines d'homologie aussi et les protéines à un seul domaine BH3 tels que Bim, Bid, Bad, Bmf. [98]

1.4.2.2 Bmf

Le facteur qui modifie Bcl-2 (Bmf) a été initialement identifiée en 2001 par Puthalakath et al comme étant une protéine à un domaine BH3, qui induit l'apoptose en se liant à Bcl-2/Bcl-xL [100]. Lorsque ces protéines sont séquestrées, elles ne peuvent plus avoir un rôle protecteur sur la mitochondrie, c'est alors que bax/bak sont transloquées à la membrane mitochondriale où elles dimérisent pour former un pore permettant la libération des cytochromes C. Lorsque les cytochromes C sont libérés dans le cytosol, il y a formation de l'apoptosome avec caspase 9 et APAF 1, qui va par la suite cliver l'ensemble des caspases, dont caspase 3 et activer ainsi l'apoptose [96]. L'activité apoptotique de Bmf est post-traductionnelle et est régulée par sa liaison au complexe moteur actin-myosine V (the myosin V actin motor complex) par son domaine de liaison aux chaînes légères de dyneine 2 (DLC2). En absence d'un signal de stress Bmf est rattaché au cytosquelette par ce domaine, puis suite à un stress cellulaire tel que : radiations UV, perte de l'adhérence cellulaire « Anoikis », inhibition des protéines Cap-dépendantes, Bmf est libérée du cytosquelette pour activer l'apoptose [101]. La région d'homologie BH3 est très importante à la fonction de Bmf, puisqu'elle permet la dimérisation avec les protéines de pro-survie.

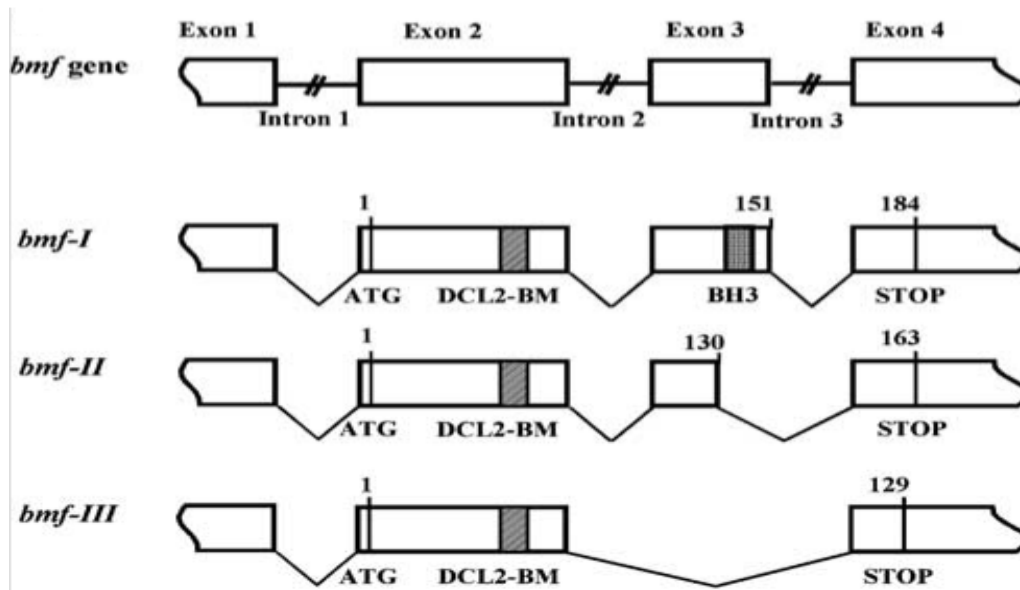
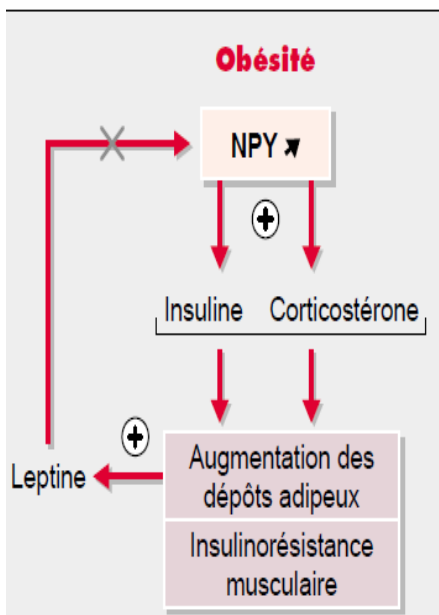


Figure 9. Différents isoformes du gène humain de Bmf obtenues à partir de l'épissage alternatif. La région de liaison aux chaîne légères de dynéine DLC-2BM est conservée alors que le domaine BH3 perdu. [102]

Chez l'humain, on distingue deux autres isoformes (Bmf II et III), qui ont été identifiés dans les lymphocytes B de patients leucémiques [102]. Résultant de l'épissage alternatif, les deux isoformes ont perdu le domaine BH3 et ne sont caractérisées que par le domaine DLC2. Ce qui explique leur différence de fonction. En effet, l'isoforme I, qui possède le domaine BH3, induit l'apoptose alors que Bmf II et III, qui en sont démunis, ne semblent montrer aucune fonction apoptotique. Bmf II et III semblent jouer un rôle dans la prolifération et promouvoir la survie cellulaire. L'ARNm de Bmf a été identifié dans de nombreuses lignées cellulaires dont les lymphocytes B et T (lymphoid), les cellules myéloïdes et les fibroblastes à différents stades du développement embryonnaire chez la souris. La protéine Bmf a été identifiée dans de nombreux organes chez la souris adulte et plus abondamment dans le pancréas, le foie, le rein et les tissus hématopoïétiques [103]. Dans l'étude qui va suivre, nous allons étudier l'expression de Bmf spécifiquement dans les reins et son implication dans la néphropathie diabétique.

1.5 Modèles diabétiques

Afin de mieux comprendre le diabète et en raison de la gravité des nombreuses complications et autres maladies cardiovasculaires auxquelles il est associé, l'utilisation de modèles expérimentaux devient primordiale à l'étude et la compréhension de la genèse et des complications de cette pathologie. Plusieurs de ces modèles sont utilisés pour étudier une complication en particulier du diabète qui est la néphropathie diabétique. Il existe une grande variété de modèles génétiques et chimiques. Cependant nous allons nous concentrer sur trois modèles seulement. Dont un modèle génétique du diabète de type 2 et deux modèles du diabète de type 1, un chimique et un génétique.



Le modèle $LepR^{db}/LepR^{db}$ (db/db) est un modèle génétique du diabète de type 2. Une mutation autosomale récessive de la G en T est apparue spontanément dans le gène db du récepteur de la leptine [104, 105], conduisant à une perte de signalisation de la leptine. Ce défaut affecte la réponse hypothalamique et conduit au développement de l'hyperphagie, de l'obésité, de l'hyperlipidémie, de l'hyperinsulinémie, de la résistance à l'insuline et du diabète. Suite à l'apparition du diabète, tout comme chez l'humain, ces souris développent des atteintes rénales progressivement. Les souris db/m sont des souris normales (contrôle) puisqu'elles n'ont la mutation que sur un des allèles du gène du récepteur de la leptine

Figure 10. Perte de signalisation de la leptine induit une insulino-résistance et une augmentation du tissu adipeux.

La mutation $LepR^{db/db}$ a été initialement identifiée dans des souris avec le background génétique C57BLKS/J, qui ont été croisées pour générer des souris db avec des background C57BL/6J [106] et FVB/NJ [107]. Dans chacun de ces deux background le diabète est plus sévère chez les mâles que chez les femelles. Ces souris développent rapidement de l'hyperglycémie ($>16\text{mmol/l}$, 6-10 semaines) de l'albuminurie en 10-12 semaines et un déclin de

la fonction rénale entre 15-18 semaines [108, 109]. Les souris db/db ($Lepr^{db/db}$), sont un bon modèle d'étude de la néphropathie induite par le diabète de type 2, puisqu'elles ont des lésions rénales, qui sont similaires à celles observées chez les patients diabétiques de type 2 [110, 111]. Tout comme chez l'humain, on observe chez ces souris de l'albuminurie, une expansion de la matrice mésangiale, une glomérulosclérose, une hypertrophie tubulaire et glomérulaire ainsi que l'expression de gènes de la MEC qui induisent la fibrose [112, 113]. On observe également, l'accumulation et l'activation de macrophages, ainsi que de l'atrophie tubulaire.

Le modèle STZ, est un modèle de diabète de type 1 où le diabète est induit par traitement au streptozotocin (STZ), un antibiotique toxique qui détruit les cellules β du pancréas [114, 115]. Les souris ont été traitées avec une dose de 50 mg/kg de STZ pendant 5 jours d'affilé puis ont été étudiée au cours des 4 semaines qui ont suivies la dernière injection. Après le traitement, les souris souffrent très vite d'hyperglycémie et manifestent une perte de poids significative due principalement à un manque d'insuline. On observe également des atteintes rénales reflétées par une albuminurie ainsi que de nombreux changements hémodynamiques dans la structure rénale tels que: un épaissement de la membrane glomérulaire, une expansion des cellules mésangiales et un développement de sclérose mésangiale [116].

Le modèle Akita ($Ins2Akita$) est un modèle génétique du diabète de type 1. Ces souris sont porteuses d'une mutation autosomale dominante au niveau du gène 2 de l'insuline et sont caractérisées par une réduction des îlots de cellules β du pancréas. Des l'âge de 3-4 semaine, elles manifestent une hyperglycémie, une hypoinsulinémie, polydipsie et polyurie [117]. À l'âge de 16 semaines, ces souris souffrent d'importants dommages rénaux et d'une ND bien avancée. Cette mutation est survenue chez les souris avec un background génétique C57BL/6 et C3H/He. Il faut noter que les souris mâles ont une hyperglycémie plus sévère que les femelles [116]. Contrairement au modèle chimique, ce modèle offre l'avantage de ne pas avoir de toxicité rénale causée par le STZ. Donc les dommages observés au rein sont imputables à l'hyperglycémie.

1.6 Plan Expérimental

de plus en plus d'études démontrent la présence d'atrophie tubulaire chez les patients souffrant de néphropathie diabétique [118]. Il apparait même, que cette atrophie pourrait être un meilleur indicateur de la progression de la néphropathie vers l'insuffisance rénale [119]. Or le mécanisme, qui expliquerait cette atrophie demeure encore peu défini. L'une des hypothèses, qui pourrait l'expliquer, est l'apoptose. En effet, l'apoptose des cellules des tubules proximaux a déjà été identifiée chez les souris [58, 88, 120] et les rats [89, 90] diabétiques, où le diabète avait été induit par traitement au STZ. Mais également chez les patients souffrant de néphropathie diabétique [91, 121]. Ce qui suggère que l'apoptose tubulaire préviendrait l'atrophie tubulaire et donc pour mieux comprendre cette atrophie, il faudrait comprendre les mécanismes régissant cette apoptose.

Il est maintenant bien établi, que le stress oxydatif serait impliqué dans de nombreuses pathologies associées au diabète, y compris la néphropathie diabétique [85]. Nous savons, que dans le rein, la concentration élevée de glucose induit directement l'expression de ROS, qui induisent l'apoptose des podocytes, ainsi que des cellules mésangiales et tubulaires [122-124]. De plus, il a également été déjà démontré, que le glucose, via l'activation du système rénine angiotensine, induit l'expression de l'angiotensine II, qui stimule la production de ROS en activant la NADPH oxydase dans les reins [125]. Donc en résumé, nous savons que la concentration élevée de glucose induit les ROS et que les ROS causent l'apoptose, cependant, on ignore encore par quel mécanisme les ROS induisent l'apoptose dans les tubules rénaux via l'activation du RAS.

Pour montrer l'implication des ROS dans les dommages rénaux, notre équipe a surexprimé la catalase (Cat), une enzyme de détoxification, qui dégrade le H_2O_2 , dans les tubules proximaux de la souris db/db. Comparé au modèle diabétique db/db, le modèle db/db Cat-tg, montre une nette amélioration de la fonction rénale, qui se traduit par une baisse de la pression ainsi que de la fibrose et de l'atrophie tubulaire [126]. Afin d'identifier les gènes responsables de cette amélioration, nous avons réalisé une hybridation par puce à ADN, qui a permis d'identifier une grande variété de gènes dont cinq apoptotiques. Nous avons concentré nos travaux sur le

gène codant pour la protéine Bmf, parce qu'il semblait être le plus surexprimé chez le modèle db/db et complètement normalisé chez le modèle db/db cat-tg.

Notre hypothèse initiale était que le diabète induisait l'expression de Bmf dans les tubules proximaux via les ROS. Dans un premier temps, nous avons voulu confirmer les résultats de l'hybridation par puce à ADN en réalisant des expériences de qPCR et immunohistochimies quantifiées par image j, puis nous avons utilisé un autre modèle diabétique, où le diabète avait été induit chez des souris saines par traitement au STZ, pour montrer que c'est l'induction du diabète qui induit l'expression de Bmf dans les tubules proximaux. La normalisation de la glycémie par traitement à l'insuline, a permis de normaliser également l'expression de cette protéine. Ce qui est venu confirmer notre hypothèse. Par la suite, *in vitro*, nous avons voulu montrer que le traitement de cellules IRPTC avec des doses élevées de glucose (25mM de D-Glucose) augmentait l'expression de Bmf comparé aux cellules non traitées ou aux cellules traitées avec des doses faibles de glucose (5mM de D-Glucose), et que la normalisation des ROS par différents inhibiteurs en condition de glucose élevé, permettait de normaliser également l'expression de cette protéine. Donc *in vivo* et *in vitro* l'hyperglycémie semble induire l'expression de Bmf via la production de ROS.

Pour expliquer comment le glucose induit l'expression de Bmf, nous avons émis l'hypothèse que c'était via l'activation du système rénine angiotensine. Il est aujourd'hui bien établi que le glucose induit l'expression de l'angiotensine II qui active TGF- β via le récepteur AT1. TGF- β active à son tour la production des ROS et d'autres voies impliquées dans la néphropathie. Nous avons donc voulu démontrer que l'expression de Bmf était dose dépendante de TGF- β et que l'inhibition de TGF- β avec un siRNA permettait aussi d'inhiber l'expression de cette protéine. Par la suite, nous avons montré le rôle apoptotique de Bmf par des expériences de TUNEL et de mesure de l'activité de caspase 3. Finalement pour conclure notre première étude nous avons démontré l'expression de cette protéine ainsi que son rôle apoptotique chez l'humain. Donc l'ensemble de cette première étude a permis de mettre en évidence à la fois l'expression et la fonction apoptotique de Bmf dans les tubules proximaux de souris et de patients souffrant de néphropathie.

La deuxième partie du projet a consisté à démontrer *in vitro* que l'expression de Bmf était dose dépendante de l'angiotensine II et que l'inhibition du système rénine angiotensine *in vivo* avec une combinaison d'hypotenseurs (losartan, perindopril), un traitement de première ligne chez les patients diabétiques souffrant d'hypertension, permettait de prévenir en partie les dommages rénaux et donc l'expression de Bmf. Nous avons utilisé le modèle Akita, parce que tout comme chez l'humain, ces souris développent de l'hypertension suite au diabète. Des études physiologiques ont permis de démontrer que le contrôle de la pression réduisait l'expression de Bmf ainsi que l'apoptose dans les tubules proximaux. Finalement, pour montrer le rôle et l'importance de cette protéine *in vivo*, nous avons généré des souris transgéniques, qui sur expriment Bmf humaine dans les tubules proximaux grâce au promoteur KAP2.

Ma contribution à l'article a consisté en grande partie à réaliser la figure 3 A et b, la figure 4 D ainsi que l'ensemble du travail sur la protéine Bmf humaine, c'est à dire la figure 6. Mon travail a aussi consisté à répondre aux questions des reviewers de Diabetes qui ont demandé plus d'expériences dont la mesure des ROS mitochondrie figure supplémentaire 2 et la réécriture d'une partie de l'article.

Chapitre 2 - L'article: Bcl-2-Modifying Factor Induces Renal Proximal Tubular Cell Apoptosis in Diabetic Mice.

Garnet J. Lau, M.Sc.,*† Nicolas Godin, Ph.D.,*† Hasna Maachi, B.Sc.,*† Chao-Sheng Lo, Ph.D.,* Shyh-Jong Wu, Ph.D.,*†† Jian-Xin Zhu, Ph.D.,* Marie-Luise Brezniceanu, Ph.D.,* Isabelle Chénier, M.Sc.,* Joelle Fragasso-Marquis, M.D.,* Jean-Baptiste Lattouf, M.D.,* Jean Ethier, M.D.,* Janos G. Filep, M.D.,** Julie R. Ingelfinger, M.D.,*** Viji Nair, M.Sc.,**** Matthias Kretzler, M.D.,**** Clemens D. Cohen, M.D.,***** Shao-Ling Zhang, Ph.D.,*John S.D. Chan, Ph.D.*†††

*Université de Montréal
Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)
Hôtel-Dieu Hospital
Pavillon Masson
3850 Saint Urbain Street
Montreal, QC H2W 1T8
Canada

** Maisonneuve-Rosemont Hospital
Research Centre
5415 boul. de l'Assomption
Montreal, QC H1T 2M4
Canada

*** Harvard Medical School
Massachusetts General Hospital
Pediatric Nephrology Unit
15 Parkman Street, WAC 709
Boston, MA 02114-3117
USA

**** University of Michigan
Nephrology/Internal Medicine
Center for Computational Medicine and Bioinformatica
Ann Arbor, MI
USA

***** University of Zurich
Division of Nephrology
Institute of Physiology
University Hospital of Zurich
Zurich, Switzerland

† Garnet J. Lau, Nicolas Godin and Hasna Maachi contributed equally to this study.

††Current address (SJW): Faculty of Biomedical Laboratory Science, Kaohsiung Medical University, 100 Shi-chuan 1st Rd., Kaohsiung, Taiwan, R.O.C.

†††To whom correspondence should be addressed

Telephone: (514) 890-8000 ext. 15080, Fax: (514) 412-7204



Running Title: Bmf Expression in the Diabetic Kidney

Keywords: Bmf, microarray, transgenic mice, db/db mice, tubular apoptosis

Subject categories: Pathophysiology of renal disease and progression

Abstract: 247 words; Text: 3,874

2.1 Abstract

Objective: To investigate the mechanisms underlying tubular apoptosis in diabetes by identifying pro-apoptotic genes that are differentially upregulated by reactive oxygen species in renal proximal tubular cells (RPTCs) in models of diabetes.

Research Design and Methods: Total RNAs isolated from renal proximal tubules (RPTs) of 20 week-old heterozygous db/m+, db/db and db/db catalase (CAT)-transgenic (Tg) mice were used for DNA chip microarray analysis. Real time-quantitative polymerase chain reaction assays, immunohistochemistry and mice rendered diabetic with streptozotocin were used to validate the pro-apoptotic gene expression in RPTs. Cultured rat RPTCs were used to confirm the apoptotic activity and regulation of pro-apoptotic gene expression. Additionally, studies in kidney tissues from patients with and without diabetes were employed to confirm enhanced pro-apoptotic gene expression in RPTs.

Results: Bcl-2-modifying factor (Bmf) was differentially upregulated ($p < 0.01$) in RPTs of db/db mice as compared to db/m+ and db/db CAT-Tg mice and in RPTs of streptozotocin-induced diabetic mice in which insulin reversed this finding. *In vitro*, Bmf cDNA overexpression in rat RPTCs co-immunoprecipitated with Bcl-2, enhanced caspase-3 activity and promoted apoptosis. High glucose (HG, 25 mM) induced Bmf mRNA expression in RPTCs, while rotenone, catalase, diphénylèneiodonium and apocynin decreased it. Knockdown of Bmf with small interference RNA reduced HG-induced apoptosis in RPTCs. Importantly, enhanced Bmf expression was detected in RPTs of kidneys from patients with diabetes.

Conclusion: These data demonstrate differential up-regulation of Bmf in diabetic RPTs and suggest a potential role for Bmf in regulating RPTC apoptosis and tubular atrophy in diabetes.

2.2 Introduction

While the classic view of diabetic nephropathy (DN) has focused on events leading to glomerular dysfunction, the gradual decline of renal function in later stages of DN is invariably associated with tubulointerstitial fibrosis and tubular atrophy (1). Indeed, tubulointerstitial fibrosis and tubular atrophy appear to be better predictors of late-stage renal disease progression than glomerular pathology (2-5). For example, examination of nephrons from proteinuric diabetic patients shows that 71% of glomeruli display glomerulo-tubular junction abnormalities and 8-17% of glomeruli are atubular glomeruli (AG) (6, 7).

The mechanisms underlying tubular atrophy are incompletely delineated. Studies have shown that high glucose (HG) concentrations are associated with increased reactive oxygen species (ROS) production, which inhibits proximal tubular function and induces apoptosis (8-10). Apoptosis has been detected in renal proximal tubular cells (RPTCs) of diabetic mice (11, 12) and rats (13, 14), as well as in RPTCs of diabetic patients (15-17), suggesting that tubular apoptosis may precede tubular atrophy in AG. While the link between ROS and tubular apoptosis seems clear, little is known about the genes involved in HG-induced RPTC apoptosis or ROS generation.

We previously reported that HG enhances angiotensinogen (Agt) gene expression via ROS generation in rat RPTCs *in vitro* (18,19) and that *in vivo* overexpression of rat Agt in RPTCs induces hypertension, albuminuria and RPTC apoptosis in diabetes (20). Conversely, we also reported that RPTC-selective overexpression of catalase (CAT) attenuates ROS generation, tubulointerstitial fibrosis and tubular apoptosis as well as pro-apoptotic gene expression in diabetic mouse kidneys *in vivo* (21, 22). These data suggest that ROS generation may be directly or indirectly responsible for RPTC apoptosis in diabetes.

We now report that Bcl-2-modifying factor (Bmf), a pro-apoptotic gene, which we identified via DNA chip microarray analysis, is differentially upregulated in RPTCs of db/db mice; we also validated this observation by immunohistochemistry and real time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). We further show enhanced Bmf expression in the RPTCs of mice with

streptozotocin-induced diabetes as well as in the kidneys of patients with diabetes. Finally, we found that Bmf overexpression enhances RPTC apoptosis and that HG *in vitro* induces Bmf mRNA expression via ROS generation and TGF- β 1 expression.

2.3 Methods

Chemicals and Constructs

D-glucose, D-mannitol, DPI (diphénylèneiodonium, an inhibitor of NADPH oxidase), rotenone (an inhibitor of mitochondrial electron transport chain complex I), apocynin (an inhibitor of NADPH oxidase), catalase (CAT) and monoclonal antibodies against β -actin were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada). Normal glucose (5 mM) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, catalogue No. 12320), 100 \times penicillin/streptomycin, fetal bovine serum (FBS), and the expression vector pcDNA 3.1 were from InVitrogen, Inc. (Burlington, ON, Canada). The Caspase-3 activity assay kit was purchased from BD Biosciences Pharmingen, Mississauga, ON, Canada. Anti-Bmf and anti-c-Myc polyclonal antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Active human transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) was purchased from R & D Systems (Hornby, ON, Canada). Scrambled Silencer[®] Negative Control # 1 siRNA and siRNAs for TGF- β 1 and Bmf were procured from Qiagen Inc., Toronto, ON, Canada and Ambion Inc., Austin, TX, USA, respectively. Oligonucleotides were synthesized by InVitrogen, Inc. Restriction enzymes were from either InVitrogen Inc. or La Roche Biochemicals (Laval, QC, Canada).

CAT cDNA was a gift from Dr. Paul E. Epstein (University of Louisville, Louisville, KY, USA). pKAP2 plasmid containing the kidney-specific androgen-regulated protein (KAP) promoter responsive to testosterone stimulation was obtained from Dr. Curt Sigmund (University of Iowa, Iowa, IA, USA) and has been described elsewhere (23).

Full-length rat Bmf cDNA was cloned from immortalized Wistar rat RPTCs (24) by conventional RT-PCR. Sense and antisense primers corresponding to nucleotides N+242 to N+265 (5'-ATG GAG CCA CCT CAG TGT GTG-3') and N+799 to N+779 (5'-TCA CCA GGG

ACC CAC CCC TTC-3') of rat Bmf cDNA (NM_139258.1) were employed in RT-PCR. Rat Bmf cDNA was subcloned into the pCMV-Myc mammalian expression vector (Clontech), which fused an N-terminal c-Myc epitope.

Generation of db/db rCAT-Tg Mice

Tg mice (C57Bl/6 background) overexpressing rCAT in RPTCs (line #688) and homozygous db/db rCAT-transgenic (Tg) mice were created in our lab (J.S.D.C.) and have been described previously (21, 22). Db/db and db/db CAT-Tg mice, at 20 weeks of age were utilized. Non-Tg, age- and sex-matched db/m+ littermates served as controls. The physiological parameters of db/m+, db/db and db/db CAT-Tg mice are displayed in Supplemental Table III. All animals received standard mouse chow and water ad libitum. Animal care and all procedures were approved by the Animal Committee of the CHUM.

Mouse RPT Isolation and DNA Microarray Analysis

Animals were euthanized at age 20 weeks. The left and right kidneys were harvested immediately for immunohistochemistry and renal proximal tubule (RPT) isolation by Percoll gradient (25), respectively, as previously described (26).

Aliquots of freshly-isolated mouse RPTs were immediately processed for total RNA isolation and gene chip microarray analysis. Briefly, total RNAs from 3 individual mice from each group were purified and reverse-transcribed into cDNA, which, in turn, served as template for the generation of biotin-labeled cRNA (Enzo kit, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), and then hybridized to Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 microarray chips (Affymetrix Inc.) according to the manufacturer's protocol. Affymetrix Mouse 430 A 2.0 chips contain around 45,000 probe sets, corresponding to more than 39,000 mouse transcripts. The data were analyzed by computer with R statistical language (version 2.51). AffylmGUI (Version 1.10.5) software and the LIMMA package (version 2.10.5) of the Bioconductor Library (release 2.0) were used for data analysis (27-30). The GCRMA algorithm was employed for background correction of the data (31), and a linear model fit was undertaken on different contrasts representing the desired group comparisons (i.e., db/db vs heterozygous db/m+ mice, db/db mice vs db/db CAT-Tg mice). A list of normalized data (genes linked to the apoptotic pathway) from all probe sets represented

on the chips was produced and classification was performed by filtering based on $p < 0.05$. The Gene Ontology database (32) for the different probe sets served to further select genes involved in the apoptosis process with $p < 0.01$.

RT-qPCR Assays for Gene Expression

Total RNA was used in RT-qPCR to quantify the amount of Bmf mRNA expressed in mRPTs according to previously-described methods (20). Forward (5'-CCCTTGGGGAGCAGCCCCCTG-3') and reverse (5'-GCCGATGGAACTGGTCTGCAA-3') primers of Bmf (NM_139258) and forward (5'-ATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGC-3') and reverse (5'-AGCATTTGCGGTGCACGATGG-3') primers of β -actin (NM_031144) were used.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical (IHC) staining for Bmf was performed by standard avidin-biotin-peroxidase complex method (ABC Staining System, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) as previously described (20-22).

Induction of Diabetes

Adult male mice (C57Bl/6 background) were rendered diabetic with streptozotocin as previously described (20, 21). Blood glucose was monitored twice weekly; mice were euthanized at 4 weeks post-STZ administration. Both kidneys were removed, decapsulated and weighed together. The physiological parameters of non-diabetic and diabetic mice are displayed in Supplemental Table IV. Left and right kidneys were processed for immunohistochemistry and RPT isolation, respectively (20-22).

Cell Culture

Immortalized rat RPTCs at passages 13-18 were used in the present study using culture conditions reported previously (18, 19). Briefly, the cells were synchronized for 24 h in serum-free 5 mM glucose DMEM at 80-90% confluence, pre-incubated in 5 mM glucose DMEM containing 1% depleted FBS for 30 min, and then 20 mM D-mannitol (for normalization of osmolality) or 20 mM D (+)-glucose were added in the absence or presence of rotenone (1×10^{-7}

⁶ M), DPI (5×10^{-6} M), apocynin (10^{-5} M) or CAT (300 U/ml) and the cells were cultured for an additional 24 h. Cells were then harvested and RNA was isolated for subsequent analysis for Bmf and β -actin mRNA quantification by RT-qPCR. To analyze ROS and hydrogen peroxide (H_2O_2) generation, cells were harvested and subjected to the lucigen assay (18, 19) and H_2O_2 measurement kit (Hydrogen peroxide Assay Kit, National Diagnostics, Atlanta, GA, USA).

Transfections, Apoptosis and Caspase-3 Activity Assays

The pCMV-Myc mammalian expression vector containing N-terminally-Myc-tagged rat Bmf (Supplemental Figure 1) was transiently transfected into RPTCs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells were then incubated for 24 h in 5 mM D-glucose plus 20 mM D-mannitol (normal glucose) or 25 mM D-glucose (HG) medium and then analyzed for apoptosis by TUNEL assay followed by DAPI staining (TUNEL kit, La Roche Diagnostics). The percentage of apoptotic RPTCs was estimated semi-quantitatively. For each group, 8-9 fields (200x magnification) were randomly selected and the captured TUNEL and DAPI. Images were overlaid using NIH ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) software. Cells labeled with both TUNEL and DAPI were noted as TUNEL positive. The total number of TUNEL positive cells was divided by the number of DAPI stained cells and multiplied by 100 to derive the % of apoptotic cells per field. In some experiments, cells were harvested for caspase-3 activity assay and anti-Myc immunoblotting to confirm fusion gene expression. Caspase-3 activity was quantified fluorimetrically (20-22). Raw data were then normalized by cell lysate protein concentrations.

Co-Immunoprecipitation of Myc-Bmf with Bcl-2 and Western Blotting

Co-immunoprecipitation (co-IP) of Myc-Bmf with Bcl-2 was performed according to previously described methods (33).

Bmf Immunostaining of Kidney Biopsy Samples of Diabetic and Non-Diabetic Patients

Six kidney biopsy samples (paraffin sections) for immunostaining were obtained from the Department of Pathology of the CHUM. These studies were approved by the Ethics Committee of the CHUM, and all patients consent the informed studies.

DNA Gene Chip Analysis of Human Diabetic and Non-diabetic Kidneys

Human renal biopsy samples were obtained from a multicenter study, the European Renal cDNA Bank-Kröner-Fresenius-Biopsy Bank (ERCB-KFB); all patient provided informed consent according to guidelines of each respective local ethics committee. DNA gene chip analysis was performed as previously described (34-36). Twenty-five individual biopsy samples, stratified by a reference pathologist at the ERCB, were analyzed (18 pre-implantation kidney biopsies from healthy living donors as control samples and 7 samples for each region of the kidney (tubules, glomeruli, etc.) from a total of 9 DN patients with type II DM). Samples were processed as described, and microarrays from microdissected renal compartments were hybridized to an Affy 133plus chip (34-36). Image files were processed and normalized using the ExpressionFileCreator module in GenePattern pipeline (<http://genepattern.broadinstitute.org>). A custom CDF annotation file from Brainarray (<http://brainarray.mbni.med.umich.edu>) was used to map the probes to the respective genes based on the updated genome annotation. The normalized log transformed data was analyzed using Significance Analysis of Microarray (SAM) method implemented in TM4 suite (<http://www.tm4.org/mev/>) to detect the differentially regulated genes between the LDs and the DN samples with a False Discovery Rate (FDR) of <1%. The value “q” is a multiple testing corrected p-value for false positives (briefly, the “q” value method first looks at the distribution of the “p” values, identifies at which value the “p” value gets flattened and then incorporates this information into the calculation of the adjusted “p” value).

Statistical Analysis

Unless otherwise noted, the data are expressed as means \pm SEM. Statistical analysis was performed by the t-test provided by Graphpad Software, Prism 5.0 (<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>). P values \leq 0.05 were considered statistically significant.

2.4 Results

Microarray Analysis

Normalized data of the different probe sets by setting $p < 0.05$ on the chips generated a list of 21 upregulated and 25 downregulated genes associated with apoptosis in RPTs of db/db mice as compared to heterozygous db/m⁺ or db/db CAT-Tg mice (**Supplemental Tables I & II**). Our raw and normalized data are available in the public domain GEO NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE19640>).

The Gene Ontology database was used to screen for probe sets involved in apoptotic processes. Classification was further filtered by setting $p < 0.01$, compiling a list of 5 upregulated (**Table I**) and 6 downregulated pro-apoptotic genes (**Table II**) in db/db mice, compared to db/m⁺ and db/db CAT-Tg mice. We chose Bmf in the present study because its expression is at least 3-fold higher in RPTCs of db/db mice as compared to db/m⁺ and db/db CAT-Tg mice.

Validation of Bmf mRNA Expression in Mouse RPTs by RT-PCR

To validate the results obtained by DNA microarray, RT-qPCR was performed using primers specific for mouse Bmf mRNA. **Figure 1A** displays the results of Bmf mRNA expression in freshly isolated RPTs from db/m⁺, db/db, and db/db CAT-Tg mice. The baseline expression of Bmf mRNA in db/db mice was 6-fold higher than in db/m⁺ mice ($p < 0.005$). This increase was significantly attenuated in db/db CAT-Tg mice ($p < 0.05$).

Validation of Bmf Expression by Immunohistochemistry

We previously reported TUNEL staining on kidney sections of db/m⁺, db/m⁺-Cat-Tg, db/db and db/db-Cat-Tg mice and showed that apoptotic cells were found in RPTCs of db/db mice but not in db/m⁺, db/m⁺-Cat and db/db-Cat-Tgs (22). To validate whether Bmf expression was increased in RPTCs of 20-week-old type 2 diabetic db/db mice, immunohistochemical analysis was performed using an anti-Bmf antibody. Increased immunostaining for Bmf was

observed in the RPTCs of diabetic db/db mice (Figure 1B, b), when compared to the RPTCs of non-diabetic db/m+ control mice (Figure 1B, a). CAT overexpression effectively attenuated Bmf expression, as observed in RPTs of db/db CAT-Tg mice (Figure 1B, c). No immunostaining was observed with non-immune control serum in db/db mice (Figure 1B, d). Quantification of Bmf immunostaining confirmed enhanced Bmf expression in RPTCs of db/db mice (Figure 1C). Similarly, kidneys from adult mice with STZ-induced diabetes also exhibited enhanced Bmf immunostaining in RPTCs (Figure 2A, b and Figure B) as compared with non-diabetic littermates (Figure 2A, a and Figure B). Treatment of diabetic mice with insulin reduced Bmf expression to control levels (Figure 2A, c and Figure 2B). No immunostaining was observed in sections treated with non-immune control serum ((Figure 2A, d). These results were further validated by performing RT-qPCR for Bmf using RNA isolated from RPTCs of STZ-induced diabetic mice. Figure 2C shows a significant increase ($p < 0.05$) in Bmf mRNA expression levels in STZ-induced diabetic mice, when compared to control and insulin-treated STZ-injected mice.

High Glucose (HG) Induces ROS Generation and Bmf mRNA Expression in RPTCs in Vitro

Immortalized rat RPTCs were cultured in normal glucose or HG medium with or without rotenone, CAT, DPI or apocynin. Cells were then harvested to assess ROS generation with the lucigenin assay and RNA was isolated for RT-qPCR analysis. RPTCs cultured in HG produced significantly higher amounts of ROS than RPTCs cultured in normal glucose (Figure 3A) and these increases could be markedly attenuated or inhibited by rotenone, CAT, DPI or apocynin. Furthermore, RPTCs cultured in HG medium exhibited 4-fold higher Bmf mRNA expression than RPTCs cultured in normal glucose medium ($p \leq 0.01$) (Figure 3B). The HG-stimulated increases in Bmf mRNA expression were inhibited by rotenone, CAT, DPI and apocynin.

TGF- β 1 Upregulates Bmf mRNA Expression in Rat RPTCs

To investigate the mechanism(s) of HG-stimulation of Bmf expression, RPTCs were cultured with active human TGF- β 1 in normal glucose medium. TGF- β 1 increased Bmf mRNA expression in a concentration-dependent manner (Figure 3C). Conversely, knockdown of

TGF- β 1 with siRNA attenuated HG-stimulation of Bmf mRNA expression in RPTCs (Figure 3D).

Cloning and Amino Acid Sequence of Rat Bmf

We cloned Bmf cDNA from rat RPTCs (Wistar strain) by conventional RT-PCR. The rat and mouse Bmf consist of 185 amino acids and are 98.9% homologous. Rat Bmf cDNA was then subcloned into the pCMV-Myc mammalian expression vector, which fused an N-terminal c-Myc epitope tag (**Supplemental Figures 1A and 1B**).

Bmf Overexpression Leads to Activation of Caspase-3 and RPTC Apoptosis

To study the role of Bmf in apoptosis, rat RPTCs were transiently transfected with N-terminally-Myc-tagged Bmf or an empty vector, and caspase-3 activity was determined in cell lysates. Expression of the fusion protein was confirmed by RT-PCR (Figure 4A) and anti-Myc immunoblotting (Figure 4B). Caspase-3 activity was significantly increased in lysates from cells transiently transfected with the Bmf fusion protein as compared to lysates from cells transiently transfected with empty vector ($P < 0.005$). Caspase-3 activity was further augmented when RPTCs were cultured in HG medium ($P < 0.005$) (Figure 4C). Knockdown of Bmf with siRNA reduced HG-induced apoptosis (TUNEL assay) in RPTCs, compared to scramble siRNA (Figure 4D). RPTCs transiently transfected with N-terminally-Myc-tagged Bmf exhibited 4-fold increase in TUNEL-positive cells as compared with empty vector-transfected cells ($P < 0.005$) (Figure 5A, B). Parallel assays with lysates from transfected cells confirmed the expression of Myc-tagged Bmf (Figure 5C).

Bmf Interacts with Bcl-2 in rat IRPTCs

To investigate Bmf interaction with Bcl-2, co-immunoprecipitation experiments of Myc-Bmf with Bcl-2 were performed. Significant increases in co-immunoprecipitated Bcl-2 (Figure 5D, a) but not Myc-Bmf (Figure 5D, b) were observed in rat IRPTCs over-expressing of Myc-Bmf cultured in HG medium.

Bmf Expression in Diabetic Human Kidneys

The clinical characteristics of the patients are shown in Supplemental Table VI. All had kidney cancer, which was the reason for the nephrectomies; some had type 2 diabetes, while others did not. Immunohistochemistry revealed Bmf expression in the distal renal tubules but not in the renal proximal tubules (RPTs) of the normal portions of human nephrectomy specimens from non-diabetic patients with kidney cancer (Figure 6A, a, b and c). However, increased immunostaining for Bmf was observed in RPTs of the normal portions of nephrectomy specimens from patients with kidney cancer who also had diabetes (Figure 6A, d, e and f). Interestingly, double immunostaining revealed frequent co-localization of Bmf overexpression in TUNEL-positive apoptotic RPTCs in diabetic kidney but not in non-diabetic kidney (Figure 6B). DNA gene chip microarray analysis (Affymetrix GeneChip HGU 133plus 2 chip) of microdissected nephrons from 7 patients with type 2 diabetes mellitus revealed modestly but significantly enhanced Bmf expression in both glomeruli (1.48-fold increase) and tubulointerstitium (1.39-fold increase) (N=7) as compared to 18 control biopsies from kidneys from living donors taken at the time of transplantation ($q < 0.01$, where q value is a multiple testing corrected p -value). Supplemental Table VII summarizes the clinical characteristics of the patients in the gene microarray analysis.

2.5 Discussion

The present study documents enhanced Bmf expression in RPTCs of db/db mice, STZ-induced diabetic mice and kidneys from patients with diabetes mellitus and shows that Bmf overexpression enhances RPTC apoptosis, indicating a potential role for Bmf in mediating tubular atrophy in the diabetic kidney.

To identify the pro-apoptotic genes regulated by ROS in db/db mice RPTCs, we employed gene chip microarrays as an initial screen (37). A combination of high p -values, fold changes and Gene Ontology annotation (32) allowed us to obtain an overview of the genetic regulation of RPTC apoptosis occurring in murine models of type 2 diabetes.

We identified Bmf as one of 5 putative pro-apoptotic genes that were differentially upregulated ($p < 0.01$, and greater than 1.5-fold increase) in RPTs of db/db mice as compared to db/m+ and db/db CAT-Tg mice. The up-regulation of Bmf mRNA and protein expression in RPTCs of db/db mice was confirmed by RT-qPCR and immunostaining.

To confirm enhanced Bmf expression, we employed another model of diabetes, STZ-induced diabetes in mice (20). Our results document significant up-regulation of Bmf expression in RPTCs of STZ-induced diabetes and its reversal by insulin.

There is evidence that HG induces apoptosis in RPTCs via ROS generation (20, 38). Our present data show that HG also stimulates Bmf mRNA expression that can be inhibited by rotenone, CAT, DPI and apocynin. Cellular H_2O_2 and mitochondrial ROS levels were also significantly higher in RPTCs incubated in HG medium than in RPTCs cultured in normal glucose and were normalized in the presence of CAT (**Supplemental Figures 2a and 2b**). These observations indicate that ROS derived from mitochondrial oxidative metabolism may mediate, at least in part, HG-induced Bmf expression, which in turn would promote RPTC apoptosis.

To provide evidence that Bmf can directly induce RPTC apoptosis, we overexpressed Bmf in rat RPTCs. Transient transfection of RPTCs with rat Bmf cDNA resulted in activation of caspase-3 parallel with increases in the number of apoptotic cells, similar to that observed in transfected fibroblasts and cancer cells (39). We were unable to detect increases in endogenous rat Bmf expression in RPTCs by immunoblotting or immunofluorescence (data not shown) using the same anti-Bmf antibodies employed for immunohistochemistry. Of note, Schmelzle et al. also noted that commercially-available anti-Bmf antibodies do not work in immunoblotting as opposed to immunohistochemistry of Bmf (40).

The precise mechanism(s) by which HG evokes Bmf expression in RPTC apoptosis remains unclear. Our present data show that TGF- β 1 stimulates Bmf mRNA expression and that knockdown of TGF- β 1 with siRNA attenuates Bmf mRNA expression in RPTCs in HG. These observations are consistent with findings of Ramjaun et al (41) showing that TGF- β 1 stimulates Bmf gene expression. ROS could induce phosphorylation of Bmf via c-Jun N-terminal kinase (c-JNK) (42) or other signaling pathways. Phosphorylated Bmf would then translocate from the cytoskeleton to bind anti-apoptotic proteins, i.e., Bcl-2 and Bcl-xL, which are located on the mitochondria, to interfere with Bcl-2/Bcl-XL mitochondrial gate-keeping and thus allow enhanced Bax binding to the mitochondrion. This would result in the collapse of the

mitochondrial transmembrane potential and thus activation of the intrinsic pathway of apoptosis. Our findings that Myc-Bmf co-immunoprecipitates Bcl-2 in rat RPTCs lend further support to this notion.

We have searched the publicly accessible data bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE1009>) on microarray studies performed on biopsies from patients with DN (**Supplemental Table V**) to confirm our findings in db/db mice. Bmf was not detectable, however, in human kidneys from patients with diabetes when the first generation of chips (Affymetrix Human Genome U95 Version 2 Array) was used, since a Bmf probeset was not present in these chips. Bmf expression was found to be upregulated, however, in living donor kidney allografts as compared to at implantation prior to revascularization (0 months), using the Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affy 133plus chip), which contains the Bmf probeset. These findings indicate that Bmf expression may be upregulated in human kidneys under pathological conditions, including DN. Indeed, this possibility is supported by our immunohistochemistry studies that show increased Bmf expression in RPTs taken from non-malignant portions of kidneys removed from diabetic patients due to kidney cancer as compared to those taken from non-diabetic patients with kidney cancer. Interestingly, RPTCs overexpressing Bmf frequently stained positive for TUNEL in diabetic human kidney. Furthermore, the Affy 133plus chip assay revealed significantly upregulated Bmf expression ($q < 0.01$, where q value is a multiple testing corrected p -value) in microdissected glomeruli (1.48-fold increase) and tubulointerstitium (1.39-fold increase) from patients with type 2 diabetes as compared to non-diabetic patients (kidney donors). The 1.39-fold vs. 3-fold increases in Bmf expression in human diabetic tubulointerstitium and db/db mice RPTs, respectively, are difficult to reconcile. It is possible that Bmf mRNA expression in human tubulointerstitium might have been underestimated because of the use of a mixture of tubules and interstitium as opposed to the $> 90\%$ purity of our db/db mouse RPT fraction. Clearly, additional qPCR studies are needed to compare Bmf expression in human RPTs with or without diabetes.

Our results may have clinical implications for patients with diabetes. Since tubular apoptosis is one of the characteristic morphological changes in human diabetic kidneys (15-17) and tubular atrophy appears to be a better indicator of disease progression than glomerular pathology (2-4), we suggest that RPTC apoptosis may be an initial mechanism for tubular

atrophy in diabetes. Our present data point towards Bmf as one of the mediators of this process. However, whether enhanced Bmf expression directly or indirectly induces RPTC apoptosis in human diabetes remains to be investigated.

In summary, the present study suggests an important role for Bmf in mediating RPTC apoptosis in the diabetic mouse kidney *in vivo*, and, likely, in diabetic human kidneys. Our observations raise the possibility that selective targeting of this pro-apoptotic protein may provide a novel approach in preventing or reversing the pathological manifestations of DN, particularly tubular atrophy.

ABBREVIATIONS

AG, atubular glomeruli; Agt, angiotensinogen; Bmf, Bcl-2-modifying factor; CAT, catalase; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DN, diabetic nephropathy; DPI, diphénylèneiodonium; IRPTCs, immortalized renal proximal tubular cells; FBS, fetal bovine serum; RAS, renin-angiotensin system; rCAT, rat catalase; ROS, reactive oxygen species; RPTs, renal proximal tubules; RPTCs, renal proximal tubular cells; RT-qPCR, real time-quantitative polymerase chain reaction; Tg, transgenic; TGF- β 1, transforming growth factor-beta 1; TUNEL, terminal transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling assay.

2.6 Acknowledgements

This work was supported, in part, by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 84363 and MOP 106688 to J.S.D.C.), the Kidney Foundation of Canada (KFOC80015 to J.S.D.C.), and the National Institutes of Health (NIH) of USA (HL-48455 to J.R.I.). MK and VN are supported by P30 DK081943-01 (Applied System Biology Core, O'Brien Renal Center, University of Michigan) and Else Kröner-Fresenius Foundation to CDC.

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

G.L. researched data, contributed to discussion, and wrote the manuscript. N.G. researched data, contributed to discussion, and wrote manuscript. H.M. researched data. C-S. L. researched data. S-J.W. researched data. J-X.Z. researched data. M-L.B. researched data. I.C. researched data. J.F-M. researched data. J-B.L. researched data. J.E. researched data, and contributed to discussion. J.G.F. contributed to discussion, and reviewed/edited manuscript. J.R.I. contributed to discussion, and reviewed/edited manuscript. V.N. researched data. M.K. researched data, and contributed to discussion. C.D.C. researched data. S-L.Z. researched data, and contributed to discussion. J.S.D.C. contributed to discussion, wrote manuscript, and reviewed/edited manuscript.

We thank all participating centers of the European Renal cDNA Bank-Kroener-Fresenius biopsy bank (ERCB-KFB) and their patients for their cooperation. Active members at the time of the study: C. D. Cohen, H. Schmid, M. Fischereeder, L. Weber, M. Kretzler, D. Schlöndorff, Munich/Zurich/AnnArbor/New York; J. D. Sraer, P. Ronco, Paris; M. P. Rastaldi, G. D'Amico, Milano; P. Doran, H. Brady, Dublin; D. Mönks, C. Wanner, Würzburg; A. J. Rees, Aberdeen; F. Strutz, G. A. Müller, Göttingen; P. Mertens, J. Floege, Aachen; N. Braun, T. Risler, Tübingen; L. Gesualdo, F. P. Schena, Bari; J. Gerth, G. Wolf, Jena; R. Oberbauer, D. Kerjaschki, Vienna; B. Banas, B. K. Krämer, Regensburg; M. Saleem, Bristol; R. P. Wüthrich, Zurich; W. Samtleben, Munich; H. Peters, H. H. Neumayer, Berlin; M. Daha, Leiden; K. Ivens, B. Grabensee, Düsseldorf; F. Mampaso(†), Madrid; J. Oh, F. Schaefer, M. Zeier, H.-J. Gröne, Heidelberg; P. Gross, Dresden; G. Tonolo; Sassari; V. Tesar, Prague; H. Rupprecht, Bayreuth; H.-P. Marti, Bern. This manuscript or any significant part of it is under consideration for publication elsewhere. The data, however, has been presented in part as free communication at the annual meeting of the American Society of Nephrology, Philadelphia, PA, USA on Nov. 4-9, 2008. This manuscript has no financial arrangement with commercial companies.

2.7 Disclosure

None

2.8 References

1. Nangaku M: Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Intern Med* 2004; 43: 9-17
2. Gilbert RE, Cooper ME: The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? *Kidney Int* 1999; 56: 1627-1637
3. Marcussen N: Tubulointerstitial damage leads to atubular glomeruli: significance and possible role in progression. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (Suppl 6): 74-75
4. Drummond K, Mauer M: The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 1580-1587
5. Beyenbach KW: Kidneys sans glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: F811-F827
6. Najafian B, Kim Y, Crosson JT, Mauer M: Atubular glomeruli and glomerulotubular junction abnormalities in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 908-917
7. Najafian B, Crosson JT, Kim Y, Mauer M: Glomerulotubular junction abnormalities are associated with proteinuria in type 1 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17 (Suppl 2): S53-S60
8. Han HJ, Lee YJ, Park SH, Lee JH, Taub M: High glucose-induced oxidative stress inhibits Na⁺/glucose cotransporter activity in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F988-F996
9. Thevenod F: Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol* 2003; 93: 87-93
10. Rogers LK, Bates CM, Welty SE, Smith CV: Diquat induces renal proximal tubule injury in glutathione reductase-deficient mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 217: 289-298
11. de Haan JB, Stefanovic N, Nikolic-Paterson D, Scurr LL, Croft KD, Mori TA, Hertzog P, Kola I, Atkins RC, Tesch GH: Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F544-F551
12. Zhang Y, Wada J, Hashimoto I, Eguchi J, Yasuhara A, Kanwar YS, Shikata K, Makino H: Therapeutic approach for diabetic nephropathy using gene delivery of translocase of

- inner mitochondrial membrane 44 by reducing mitochondrial superoxide production. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1090-1101
13. Kumar D, Zimpelmann J, Robertson S, Burns KD: Tubular and interstitial cell apoptosis in the streptozotocin-diabetic rat kidney. *Nephron Exp Nephrol* 2004; 96: e77-e88
 14. Kelly DJ, Stein-Oakley A, Zhang Y, Wassef L, Maguire J, Koji T, Thomson N, Wilkinson-Berka JL, Gilbert RE: Fas-induced apoptosis is a feature of progressive diabetic nephropathy in transgenic (mRen-2)²⁷ rats: attenuation with renin-angiotensin blockade. *Nephrology (Carlton)* 2004; 9: 7-13
 15. Susztak K, Ciccone E, McCue P, Sharma K, Böttinger EP: Multiple metabolic hits converge on CD36 as novel mediator of tubular epithelial apoptosis in diabetic nephropathy. *PLoS Med* 2005; 2: e45
 16. Kumar D, Robertson S, Burns KD: Evidence of apoptosis in human diabetic kidney. *Mol Cell Biochem* 2004; 259: 67-70
 17. Verzola D, Gandolfo MT, Ferrario F, Rastaldi MP, Villaggio B, Gianiorio F, Giannoni M, Rimoldi L, Lauria F, Miji M, Deferrari G, Garibotto G: Apoptosis in the kidneys of patients with type II diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2007; 72: 1262-1272
 18. Hsieh TJ, Zhang SL, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JSD: High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 2002; 143(8): 2975-2985
 19. Hsieh TJ, Fustier P, Zhang S-L, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Fantus IG, Hamet P, Chan JSD: High glucose stimulates angiotensinogen gene expression and cell hypertrophy via activation of the hexosamine biosynthesis pathway in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 2003; 144: 4338-4349
 20. Liu F, Brezniceanu M-L, Wei C-C, Chénier I, Sachetelli S, Zhang SL, Filep JG, Ingelfinger JR, Chan JSD: Overexpression of angiotensinogen increases tubular apoptosis in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 269-280
 21. Brezniceanu M.L, Liu F, Wei C-C, Tran S, Sachetelli S, Zhang SL, Guo DF, Filep JG, Ingelfinger JR, Chan JSD: Catalase overexpression attenuates angiotensinogen expression and apoptosis in diabetic mice. *Kidney Int* 2007; 71: 912-923
 22. Brezniceanu M-L, Liu F, Wei C-C, Chénier I, Godin N, Zhang SL, Filep JG, Ingelfinger JR, Chan JSD: Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db

- transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. *Diabetes* 2008; 57: 1-9
23. Ding Y, Davisson RL, Hardy DO, Zhu LJ, Merrill DC, Catterall JF, Sigmund CD: The kidney androgen-regulated protein promoter confers renal proximal tubule cell-specific and highly androgen-responsive expression on the human angiotensinogen gene in transgenic mice. *J Biol Chem* 1997; 272: 28142-28148
 24. Ingelfinger JR, Jung F, Diamant D, Haveran L, Lee E, Brem A, Tang SS: Rat proximal tubule cell line transformed with origin-defective SV40 DNA: autocrine ANG II feedback. *Am J Physiol* 1999; 276: F218-F227
 25. Vinay P, Gougoux A, Lemieux G: Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. *Am J Physiol* 1981; 241: F403-F411
 26. Brezniceanu ML, Wei C-C, Zhang S-L, Hsieh TJ, Guo DF, Hébert MJ, Ingelfinger JR, Filep JG, Chan JSD: Transforming growth factor-beta 1 stimulates angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells. *Kidney Int* 2006; 69: 1977-1985
 27. Smyth GK: Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; 3: Iss. 1, Article3. Epub 2004 Feb 12. **DOI:** 10.2202/1544-6115.1027
 28. Smyth GK, Michaud J, Scott HS: Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 2005; 21: 2067-2075
 29. Wettenhall JM, Simpson KM, Scatterley K, Smyth GK: affyLmGUI: a graphical user interface for linear modeling of single channel microarray data. *Bioinformatics* 2006; 22: 897-899
 30. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J: Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; 5: R80.1-R80.16
 31. Wu Z, Irizarry R, Gentleman R, Francisco Martinez-Murillo, Forrest Spencer: A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *J Am Stat Assoc* 2004; 99: 909-917

32. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G: Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000; 25: 25-29
33. Liu F, Wei C-C, Wu S-J, Chenier I, Zhang SL, Filep JG, Ingelfinger JR, Chan JSD: Apocynin attenuates tubular apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in transgenic mice independent of hypertension. *Kidney Int* 2009; 75: 156-166
34. Cohen CD, Frach K, Schlondorff D, Kretzler M: Quantitative gene expression analysis in renal biopsies: a novel protocol for a high-throughput multicenter application. *Kidney Int* 2009; 61:133–140
35. Lindenmeyer MT, Kretzler M, Boucherot A, Berra S, Yasuda Y, Henger A, Eichinger F, Gaiser S, Schmid H, Rastaldi MP, Schrier RW, Schlondorff D, Cohen CD: Interstitial vascular rarefaction and reduced VEGF-A expression in human diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1765–1776
36. Schmid H, Boucherot A, Yasuda Y, Henger A, Brunner B, Eichinger F, Nitsche A, Kiss E, Bleich M, Grone HJ, Nelson PJ, Schlondorff D, Cohen CD, Kretzler M: European Renal c DNABC: modular activation of nuclear factor-kappaB transcriptional programs in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006; 55:2993–3003
37. Susztak K, Bottinger EP: Diabetic nephropathy: a frontier for personalized medicine. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 361-367
38. Allen DA, Harwood S, Varagunam M, Raftery MJ, Yaqoob MM: High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases. *FASEB J* 2003; 17: 908-910
39. Morales AA, Olsson A, Celsing F, Osterborg A, Jondal M, Osorio LM: Expression and transcriptional regulation of functionally distinct Bmf isoforms in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2004; 18: 41-47
40. Schmelzle T, Mailleux AA, Overholtzer M, Carroll JS, Solimini NL, Lightcap ES, Veiby OP, Brugge JS: Functional role and oncogene-regulated expression of the BH3-only factor Bmf in mammary epithelial anoikis and morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci (U S A)* 2007; 104: 3787-3792

41. Ramjaun AR, Tomlinson S, Eddaoudi A, Downward J: Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGF beta-induced apoptosis. *Oncogene* 2007; 26: 970-981
42. Lei K, Davis RJ: JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2003; 10: 2432-2437.

TABLE I

Probe Set ID	Gene Title	Fold-change (db/db vs db/m+)	p-value (db/db vs db/m+)	Fold-change (db/db vs db/db-CAT Tg)	p-value (db/db vs db/db-CAT Tg)
1450231_a_at	baculoviral IAP repeat-containing 4	1.28	0.0039	1.29	0.0038
1454880_s_at	Bcl2-modifying factor	3.07	0.0099	3.07	0.0098
1449297_at	caspase 12	1.82	0.0069	1.81	0.0070
1431875_a_at	E2F transcription factor 1	1.19	0.0065	1.19	0.0064
1423602_at	Tnf receptor-associated factor 1	1.99	0.0073	1.97	0.0074
1445452_at					

TABLE II

Probe Set ID	Gene Title	Fold-change (db/db vs dB/m+)	p-value (db/db vs db/m+)	Fold-change (db/db vs db/db-CAT Tg)	p-value (db/db vs db/db-CAT Tg)
1417962_s_at	growth hormone receptor	-2.92	0.0031	-3.44	0.0024
1419592_at	unc-5 homolog C (C. elegans)	-1.53	0.0058	-1.39	0.0090
1435369_at	U box domain-containing 5	-2.10	0.0012	-1.84	0.0016
1451845_a_at	peptidyl-tRNA hydrolase 2	-1.88	0.0018	-1.32	0.0087
1452172_at	FAST kinase domains 2	-2.10	0.0013	-1.60	0.0027
1460671_at	glutathione peroxidase 1	-1.41	0.0091	-1.51	0.0063

Legends

Table I. List of pro-apoptotic genes upregulated in microarray chips of db/db vs db/m⁺ and db/db vs db/db-CAT Tg mice overexpressing CAT. The GO annotation package was used to select genes involved in the apoptosis process. The probe sets were selected with p<0.01.

Table II. List of pro-apoptotic genes downregulated in microarray chips of db/db vs db/m⁺ and db/db vs db/db-CAT Tg mice overexpressing CAT. The GO annotation package was used to select genes involved in the apoptosis process. The probe sets were selected with p<0.01.

Figure 1. Bmf Expression is Elevated in RPTs of db/db Diabetic Mice. (A) RT-qPCR for Bmf mRNA levels in freshly-isolated RPTs from db/m, db/db, and db/db-CAT-Tg mice. Values were corrected to β -actin. (B) Bmf-Immunohistochemical staining (IHC) in kidney sections (magnification, 600X) from (a) db/m⁺, (b) db/db, and (c) db/db-CAT-Tg mice; (d) presents a non-immune rabbit serum control; PT: proximal tubule, G: Glomerulus. (C) Quantification of Bmf-IHC. Values are the mean +/- SEM, n=5 to 7 for each group. (*p<0.05; ***p<0.005; N.S., non-significance)

Figure 2. Bmf Expression is Upregulated in RPTs from STZ-induced Diabetic Mouse Kidneys. (A) Bmf-IHC in kidney sections (600X) from non-diabetic control (a), STZ-induced diabetic (b), and insulin-treated STZ-injected mice (c); non-immune rabbit serum control is also presented (d). (B) Quantification of Bmf-IHC. Values are the mean +/- SEM, n= 4 to 12. (C) RT-qPCR for Bmf mRNA levels in freshly-isolated RPTs from control, STZ-induced diabetic, and insulin-treated STZ-injected mice. Values were corrected to β -actin (*p<0.05; **p<0.01; N.S., non-significance)

Figure 3. High Glucose Stimulates ROS Generation and Bmf mRNA Expression in rat RPTCs *in vitro*. (A) ROS generation of RPTCs cultured in normal glucose (5 mM D-glucose plus 20 mM D-mannitol) and HG (25 mM D-glucose) media with various inhibitors, as indicated. Values are corrected to lysate protein levels. (B) RT-qPCR for Bmf mRNA levels in RPTCs *in vitro* following treatment with normal or HG and various inhibitors, as indicated. (C) RT-qPCR for Bmf mRNA levels in RPTCs in response to active human TGF- β 1. (D) RT-qPCR for Bmf mRNA levels in RPTCs *in vitro* following transfection with siRNA of TGF- β 1 or scrambled siRNA in normal glucose (open bars) and HG (black bars) media. Values are corrected to β -actin levels. (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.005; N.S., non-significance)

Figure 4. Overexpression of Rat Bmf Induces Caspase-3 Activity in rat RPTCs *in vitro*. (A) RPTCs were transiently-transfected by Lipofectamine 2000 with the empty vector, pCMV-Myc or plasmid containing N-terminally-tagged rat Bmf cDNA (pCMV-Myc rat Bmf). Expression of the Myc-rat Bmf mRNA was confirmed by conventional RT-PCR and quantified by densitometry. (B) Anti-Myc immunoblotting was also performed. Non-specific band serves as loading control. (C) Caspase 3 activity in RPTCs transfected with empty vector (pCMV-Myc) or pCMV-Myc rat Bmf in normal glucose (open bars) and HG (black bars) media. Values are corrected to lysate protein levels. Values are the mean \pm SEM, $n=4$ to 8. (*** p <0.005; N.S., non-significance). (D) TUNEL images (a-d) and Quantification of apoptotic cells (e) *in vitro*. Following transfection with scramble siRNA (a and c) or Bmf siRNA (b and d) in RPTCs cultured either in normal glucose (NG, a and b) or high glucose (HG, c and d), medium, cells were fixed and subjected to TUNEL (green) and DAPI (blue) staining (200x). White arrows

indicate TUNEL positive cells. Quantification of TUNEL positive cells is shown in (e). n=3 experiments. **p<0.01; N.S., non-significance

Figure 5. Overexpression of Rat Bmf Increases TUNEL-positive Cells and Co-immunoprecipitates (Co-IP) with Bcl-2 in rat RPTCs *in vitro*. (A) RPTCs were transiently transfected with the empty vector, pCMV-Myc or pCMV-Myc rat Bmf. Cells were incubated for 24 h in 25 mM D-glucose, then fixed and subjected to TUNEL and DAPI staining. TUNEL (green) and DAPI (blue) staining (200x) are shown for RPTCs transfected with empty vector and pCMV-Myc rat Bmf. White arrows indicate TUNEL positive cells. DNase treated cells serve as TUNEL positive controls. Cells left untreated with terminal transferase serve as a TUNEL negative control. (B) Quantification of TUNEL positive cells per field is shown. Values are presented as percentages of TUNEL positive cells/total cells per field +/- SEM, n=8 or 9. (**p<0.005; N.S., non-significance) (C) Expression of the Myc-rat Bmf fusion protein was confirmed by anti-Myc immunoblotting. β -actin serves as loading control. (D) Interaction of Myc-Bmf with Bcl-2 in rat RPTCs. (a) Immunoblotting for Bcl-2 in cytosolic fractions of rat RPTCs before (total lysate, TL) and after co-IP with anti-Myc. (b) Immunoblotting for Myc in cytosolic fractions of rat RPTCs on the same membrane following immunoblotting for anti-Bcl-2 in (a). The relative density of Bcl-2 or Myc in RPTCs cultured normal glucose (5 mM D-glucose plus 20 mM D-mannitol DMEM) was expressed as controls (100 arbitrary unit). Rabbit purified immunoglobulin (IgG, 3 μ g) was used as control for co-immunoprecipitation experiments. Values are the mean +/- SEM for 4 independent experiments. ***p<0.005; N.S., non-significance.

Figure 6. Enhanced Bmf Expression in RPTs from Human Kidneys from Patients with Diabetes. (A) Bmf-IHC in human kidney sections (200x) from three non-diabetic cancer patients (a, patient with papillary variant carcinoma; b, patient with clear cell carcinoma; and c, patient with thyroid-like renal carcinoma) and three diabetic cancer patients (d, patient with papillary variant carcinoma and evidence of diabetic nephropathy (nodular with tubular atrophy and interstitial fibrosis); e, patient with clear cell carcinoma and no evidence of diabetic nephropathy; and f, patient with clear cell carcinoma and nephro-angiosclerosis with evidence of diabetic nephropathy (secondary focal glomerulosclerosis, tubular atrophy and interstitial fibrosis). G, glomerulus; DT, distal tubule; and PT, proximal tubule. (B) Co-localization of Bmf expression and TUNEL-positive cells in human kidneys. Non-diabetic human kidney (patient I.D. # c,) and diabetic human kidney with nephropathy (patient I.D. # d) were sectioned and subjected to TUNEL assay to visualize apoptotic cells (green) and then incubated with anti-Bmf antibody followed by anti-goat AlexaFluor 594 to demonstrate Bmf expression (red). Cells staining positively for TUNEL and Bmf appear yellow (merged image). Magnification 200X. Arrows indicate cells that stained positively for TUNEL and Bmf. G, glomerulus; DT, distal tubule; and PT, proximal tubule.

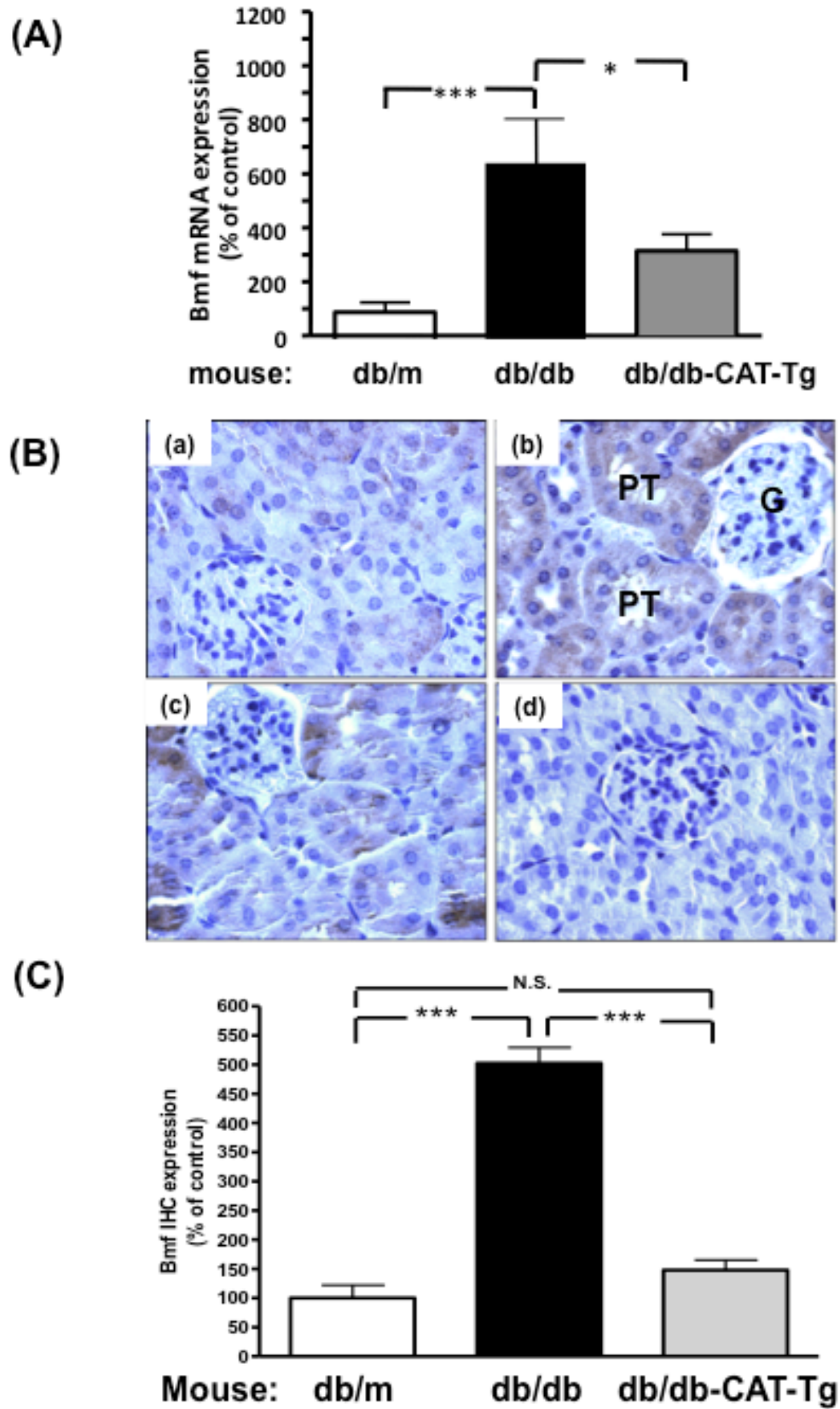


Figure 1

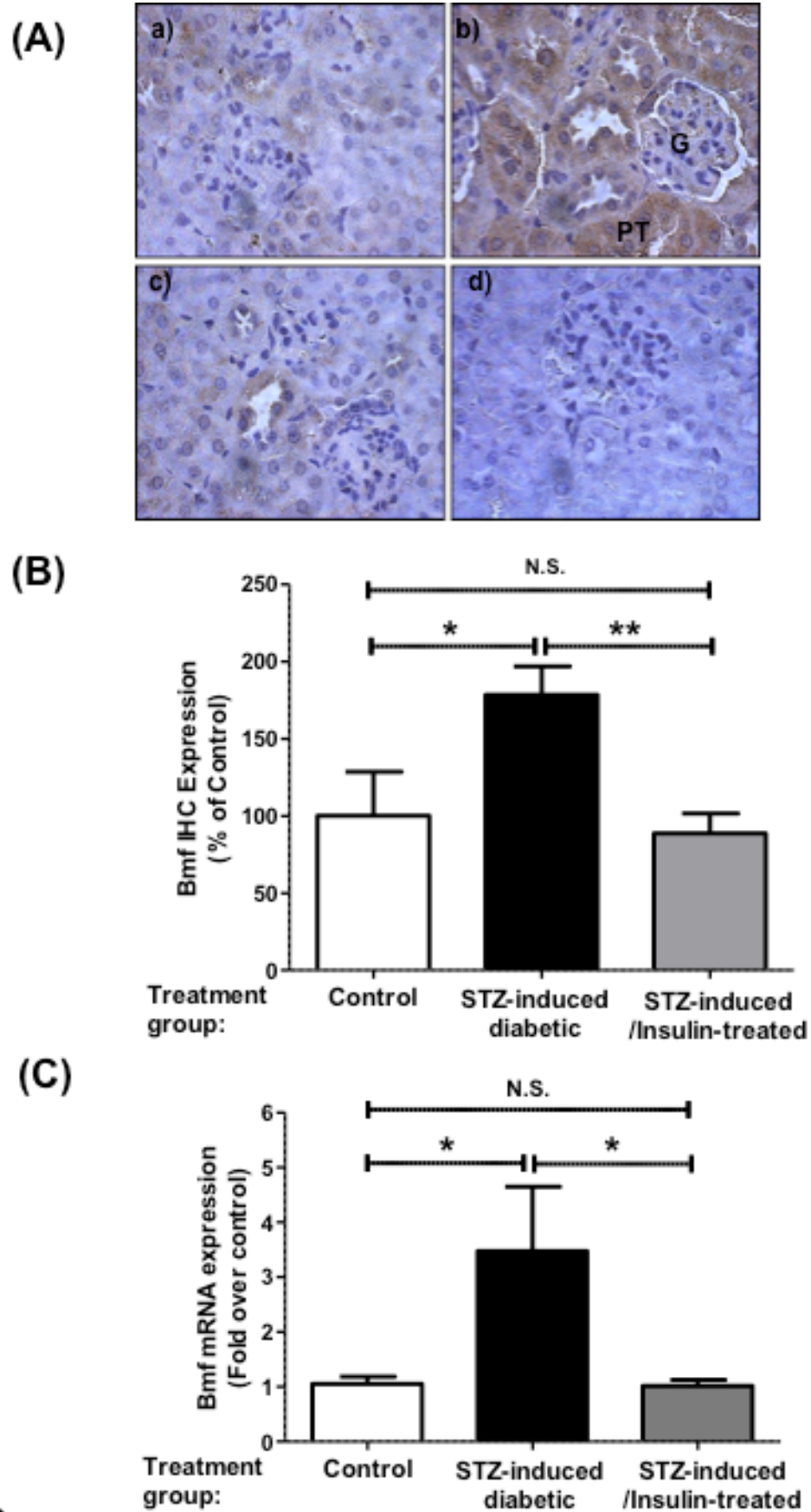


Figure 2

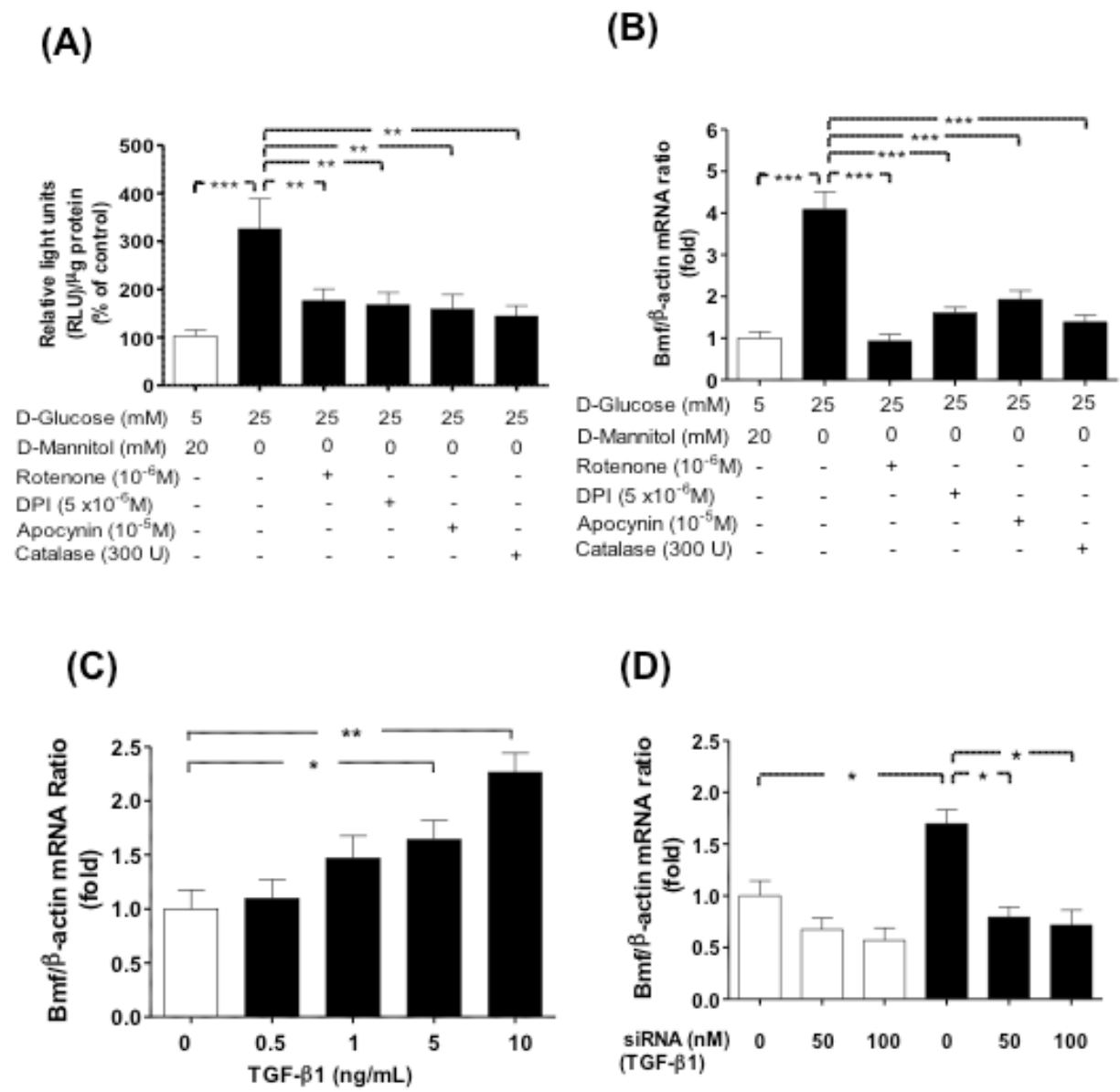


Figure 3

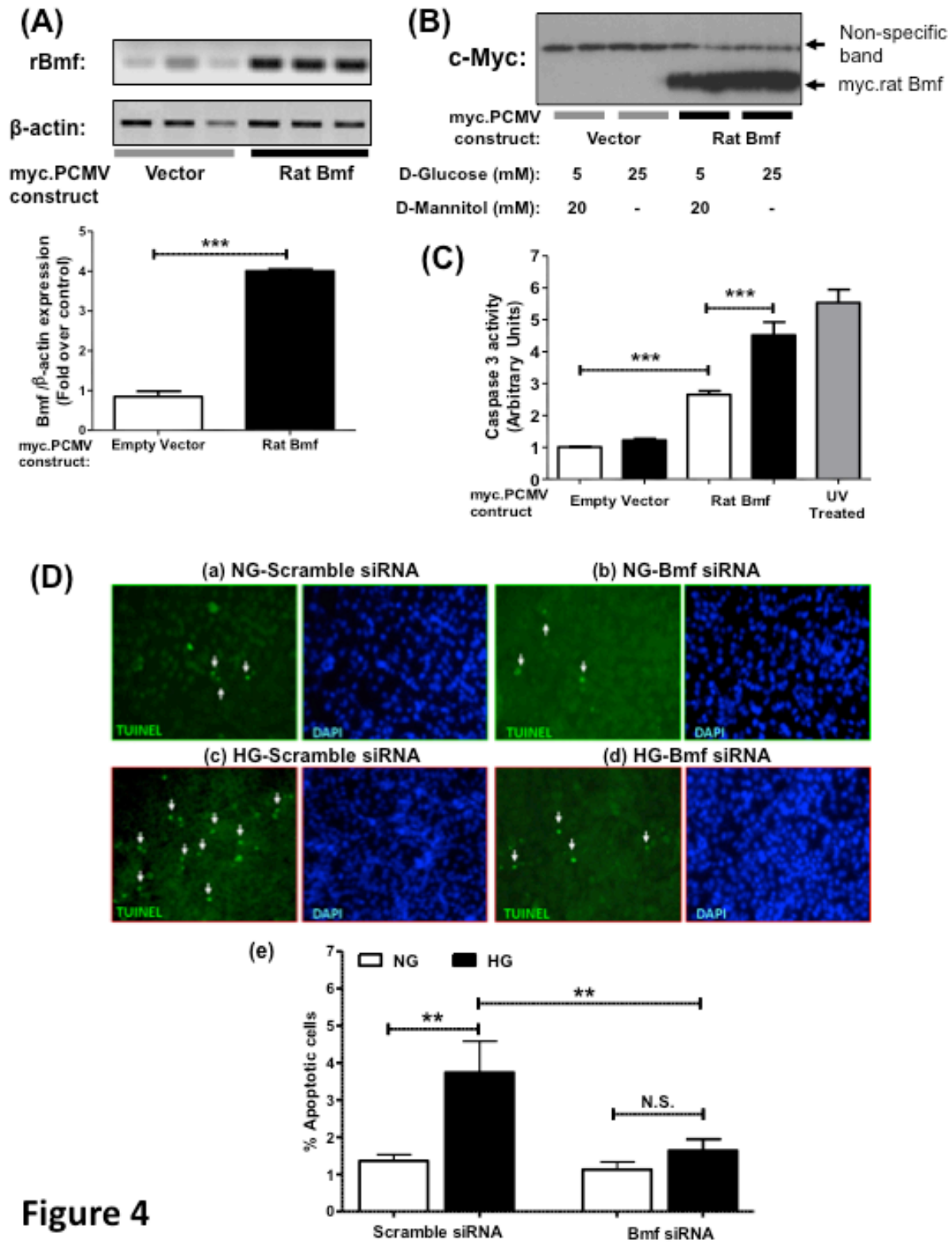


Figure 4

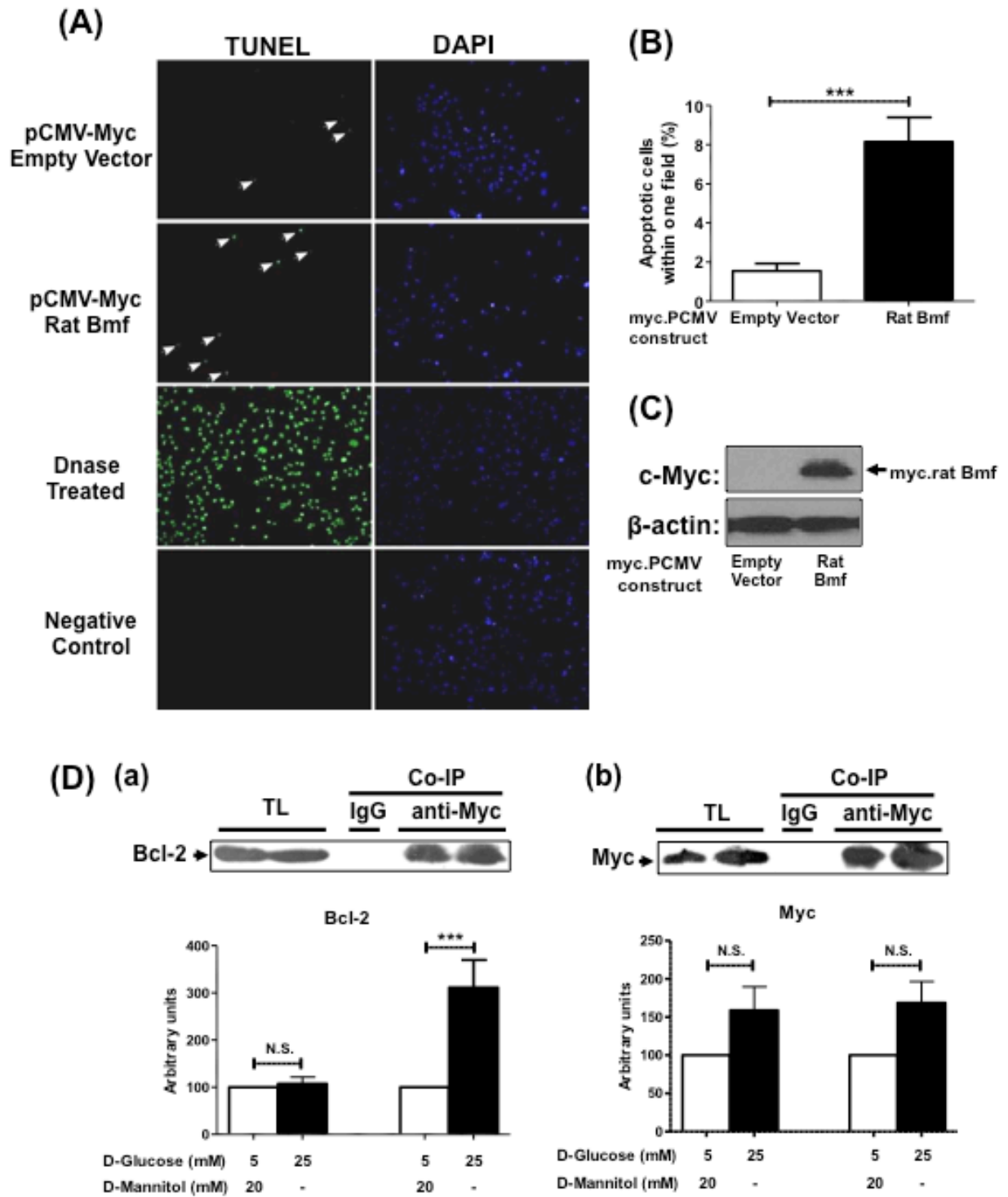


Figure 5

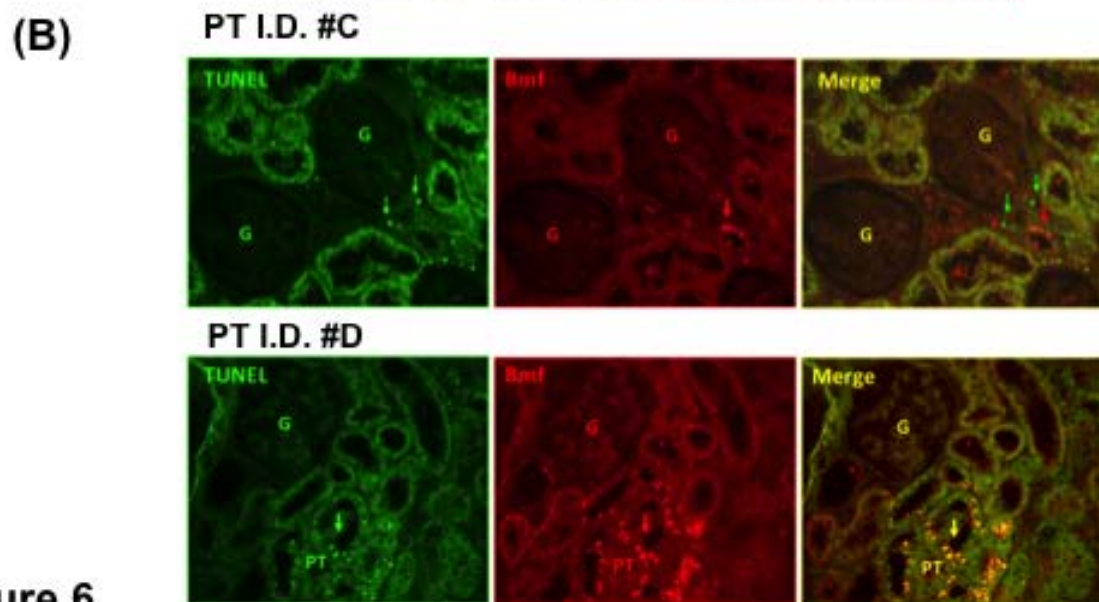
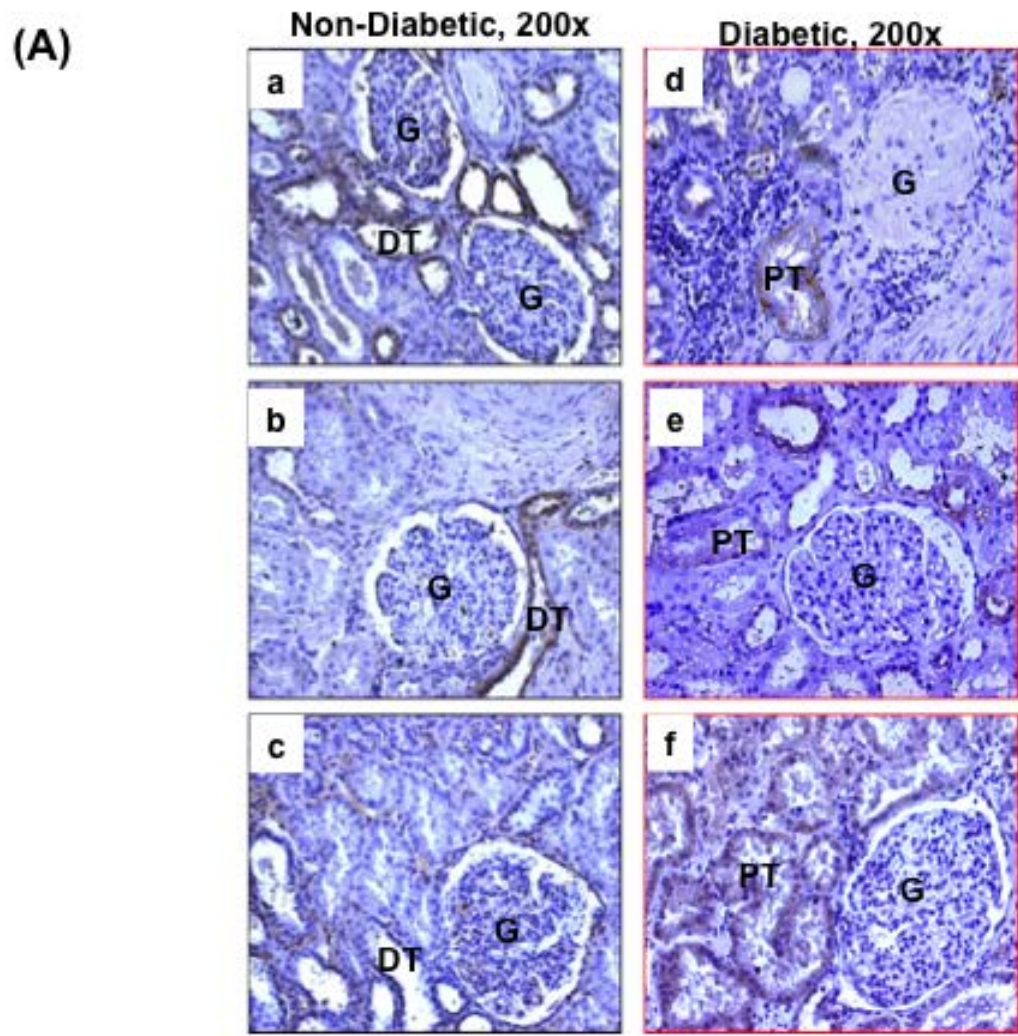


Figure 6

SUPPLEMENTARY TABLE I

Upregulated Genes Associated with Apoptosis in RPTs of db/db Mice

Gene Symbol	Probe Set id	Gene Title	Fold (WT-DB)	p-value (WT-DB)	Fold (DB-DBcat)	p-value (DB-DBcat)
Ank2	1434264_at	ankyrin 2, brain	4,24	0,0387	4,82	0,0300
Bag4	1418707_at	BCL2-associated athanogene 4	2,66	0,0219	2,29	0,0269
	1449186_at					
Bfar	1440533_at	bifunctional apoptosis regulator	2,28	0,0491	2,27	0,0472
Birc4	1450231_a_at	baculoviral IAP repeat-containing 4	1,28	0,0039	1,29	0,0038
Bmf	1454880_s_at	Bcl2 modifying factor	3,07	0,0099	3,07	0,0098
Casp12	1449297_at	caspase 12	1,82	0,0069	1,81	0,0070
Dapk2	1451453_at	death-associated kinase 2	1,28	0,0274	1,28	0,0270
E2f1	1431875_a_at	E2F transcription factor 1	1,19	0,0065	1,19	0,0064
Igf1	1452014_a_at	insulin-like growth factor 1	3,73	0,0126	3,91	0,0115
Itn2b	1417999_at	integral membrane protein 2B	1,37	0,0180	1,40	0,0153
Nr4a1	1416505_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	3,57	0,0181	2,71	0,0289
P2rx1	1460719_a_at	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	2,30	0,0172	2,59	0,0151
	1429794_a_at					
Pea15	1416407_at	phosphoprotein enriched in astrocytes 15	6,71	0,0132	4,97	0,0188
Rnf7	1447203_at	ring finger protein 7	1,20	0,0389	1,18	0,0437
Samd4	1436356_at	sterile alpha motif domain containing 4	2,28	0,0317	2,53	0,0230
Sphk1	1451596_a_at	sphingosine kinase 1	1,63	0,0477	1,62	0,0471
Tia1	1416814_at	cytotoxic granule-associated RNA binding protein 1	3,05	0,0230	2,30	0,0412
Tial1	1455676_x_at	Tial1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1	1,40	0,0114	1,56	0,0067
Tnfrsf1a	1417291_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	1,80	0,0167	1,57	0,0284
Traf1	1423602_at	Tnf receptor-associated factor 1	1,99	0,0073	1,97	0,0074
	1445452_at					
Unc5b	1453269_at	unc-5 homolog B (C. elegans)	2,21	0,0241	2,12	0,0251

SUPPLEMENTARY TABLE II

Downregulated Genes Associated with Apoptosis in RPTs of db/db Mice

Gene Symbol	Probe Set id	Gene Title	Fold (WT-DB)	p-value (WT-DB)	Fold (DB-DBcat)	p-value (DB-DBcat)
1700020C11Rik	1424223_at	RIKEN cDNA 1700020C11 gene	-1,96	0,0119	-1,73	0,0182
2810421I24Rik	1452172_at	RIKEN cDNA 2810421I24 gene	-2,10	0,0013	-1,60	0,0027
Bid	1447873_x_at	BH3 interacting domain death agonist	-2,14	0,0256	-1,90	0,0296
	1417045_at					
Bik	1420362_a_at	Bcl2-interacting killer	-2,04	0,0087	-1,70	0,0155
Cflar	1449317_at	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	-2,16	0,0344	-2,64	0,0196
Cideb	1418976_s_at	cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector B	-2,27	0,0179	-2,44	0,0143
Cse1l	1448809_at	chromosome segregation 1-like (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,91	0,0035	-1,32	0,0194
Cycc	1445484_at	cytochrome c, somatic	-2,37	0,0364	-2,26	0,0386
Gas2	1450112_a_at	growth arrest specific 2	-2,46	0,0157	-2,20	0,0202
Ghr	1417962_s_at	growth hormone receptor	-2,92	0,0031	-3,44	0,0024
Gpx 1	1460671_at	glutathione peroxidase 1	-1,41	0,0091	-1,51	0,0063
Pdcd6ip	1415937_s_at	programmed cell death 6 interacting protein	-1,49	0,0140	-1,87	0,0056
Perp	1416271_at	PERP, TP53 apoptosis effector	-2,22	0,0125	-1,81	0,0229
Pik3ca	1429434_at	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	-1,59	0,0271	-1,82	0,0147
Pmaip1	1418203_at	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	-7,00	0,0099	-5,98	0,0116
Pten	1454722_at	phosphatase and tensin homolog	-1,91	0,0196	-1,78	0,0240
Pth2	1451845_a_at	peptidyl-L-prolyl isomerase 2	-1,88	0,0018	-1,32	0,0087
Sgpp1	1420822_s_at	sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	-1,68	0,0402	-2,59	0,0104
Siah2	1448170_at	seven in absentia 2	-2,49	0,0386	-2,24	0,0484
Stx 8	1454974_at	syntaxin 8	-3,73	0,0268	-4,05	0,0219
Tbfg4	1442793_s_at	transforming growth factor beta regulated gene 4	-1,61	0,0342	-1,88	0,0179
Traf4	1460642_at	Tnf receptor associated factor 4	-1,44	0,0360	-1,64	0,0180
Trp53bp2	1433937_at	transformation related protein 53 binding protein 2	-1,53	0,0491	-1,87	0,0197
Ubox 5	1435369_at	U box domain containing 5	-2,10	0,0012	-1,84	0,0016
Unc5c	1419592_at	unc-5 homolog C (<i>C. elegans</i>)	-1,53	0,0058	-1,39	0,0090

SUPPLEMENTARY TABLE III

Physiological Measurements in db/m+, db/db, db/m+ Cat-Tg and db/db Cat-Tg Mic

	db/m	db/db	db/m-Cat	db/db-Cat
Body weight (g)	30,04 ±0,75	56,40 ±0,81 ***	30,85 ±1,54	58,94 ±1,26 ***
Blood glycemias (mmol/L)	11,50 ±0,49	24,05 ±1,87 ***	12,65 ±0,59	28,83 ±4,17 ***
Kidney weight (mg)	368 ±18,5	448 ±14,2 **	398 ±10,2	520 ±5,78 ***
ACR (µg/mg)	0,54 ±0,12	34,49 ±4,47 ***	0,71 ±0,26	12,91 ±4,63 * £

* p < 0,05 compared with db/m

** p < 0,01 compared with db/m

*** p < 0,005 compared with db/m

£ p < 0,01 compared with db/db

SUPPLEMENTARY TABLE IV

Physiological Measurements in STZ-induced Diabetic Mice

Parameter	Control	STZ-Diabetic	STZ-Diabetic treated with insulin
Body weight (g)	29.40 ±0.89	26.70 ±0,48 *	26.27 ±0.61 *
Blood glycemia (mmol/L)	8.52 ±0,58	30.74 ±1,16 ***	11.57 ±2.10 £
Kidney weight (mg)	337.5 ±13.3	403.9 ±9.5 ***	328.3 ±12.5 £
ACR (µg/mg)	0.26 ±0.01	0.72 ±0.01 **	0.31 ±0.09 £

* p < 0,05 compared with Control

** p < 0,01 compared with Control

*** p < 0,005 compared with Control

£ p < 0,01 compared with STZ-Diabetic

SUPPLEMENTARY TABLE V

Microarray Studies Performed on Biopsies From Patients with DN or Renal Allogr

ID of the study	Description and link	Array used	Status
GSE1009	Gene expression profiling in glomeruli from human kidneys with diabetic nephropathy - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE1009	Affymetrix Human Genome U95 Version 2 Array	Bmf probeset is not included in this array
GSE1563	Kidney Transplant Rejection and Tissue Injury by Gene Profiling of Biopsies and Peripheral Blood Lymphocytes - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE1563	Affymetrix Human Genome U95 Version 2 Array	Bmf probeset is not included in this array
GSE21374	Expression data from human renal allograft biopsies - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE21374	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	Since this is a very big study (284 samples), the processed results were taken and analyzed by ANOVA between rejected and non-rejected samples. Bmf probeset expression did not change significantly in this analysis.
GSE 20300	Whole blood gene expression analysis of stable and acute rejection pediatric kidney transplant patients - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/query/acc.cgi?acc=GSE20300	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	The results of the analysis were inconclusive. In fact, the samples were later used to illustrate a new analysis technique to overcome the issue of blood analysis.
GSE7392	Molecular Evidence of Injury and Inflammation in Normal and Fibrotic Renal Allografts One Year Post-Transplant - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/query/acc.cgi?acc=GSE7392	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	The analysis did not find a significant difference between the expression of the bmf probeset between normal and fibrotic allograft one year post-transplant.
GSE11166	Local regulation and clinical impact of complement gene expression in deceased and living donor kidney allografts - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE11166	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	The analysis from samples of living donors (majority of samples) showed a significant increase in the expression of the bmf probeset at 3 months following transplant, which remained elevated in 2 years of observation.
E-MEXP-2559	Transcription profiling of human diabetic skeletal muscle - http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/browse.html?accession=E-MEXP-2559&detailedview=on	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	The analysis of the skeletal muscles samples between normal, diabetic and relatives of diabetic patients did not show a difference in the expression of the bmf probeset.

SUPPLEMENTARY TABLE VII

Patient Characteristics

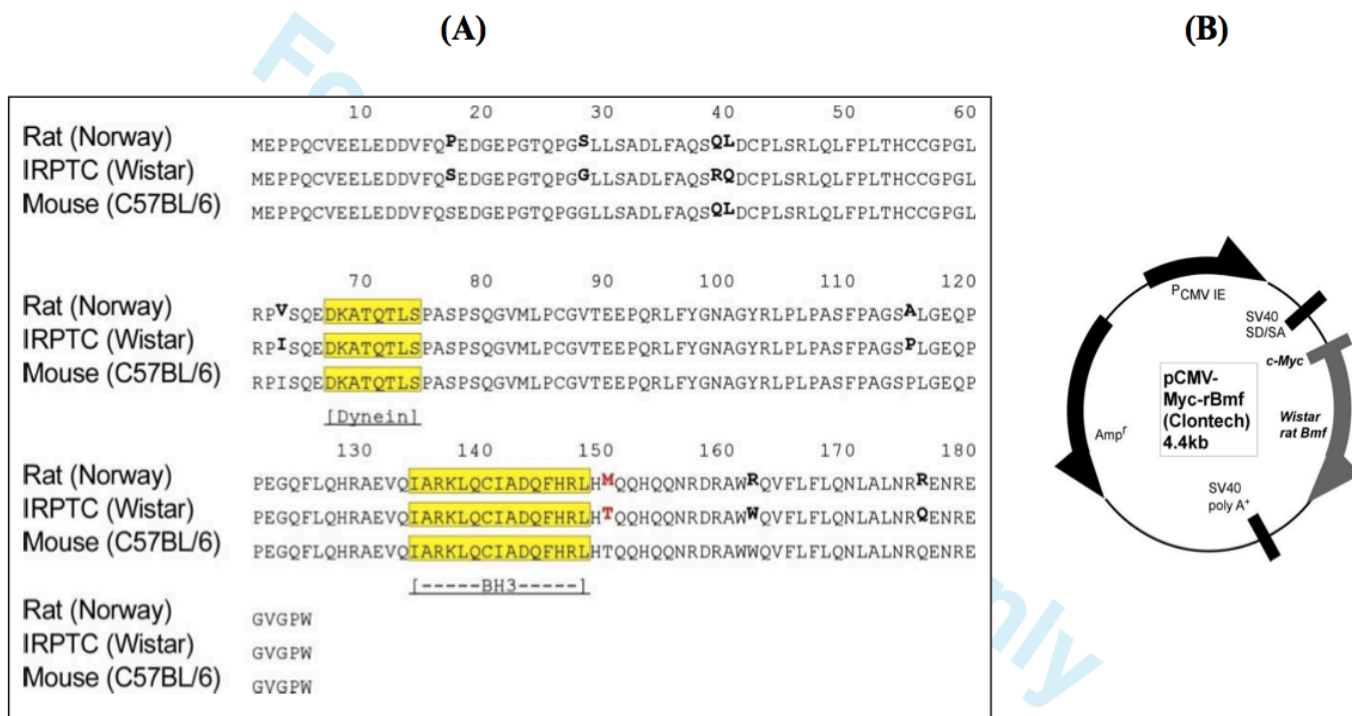
Kidney biopsies were used for gene chip microarrays

	Gender	Age	Proteinuria (g/d)	GFRMDRD (ml/min/m ²)
LD	9F:9M	46.8±2.95	<0.2	>90
DN	3F:6M	58.1 ± 2.76	3.27 ± 0.79	46 ± 11.04

Data represented as Mean±SEM; LD, living donors; DN, diabetic nephropathy patients

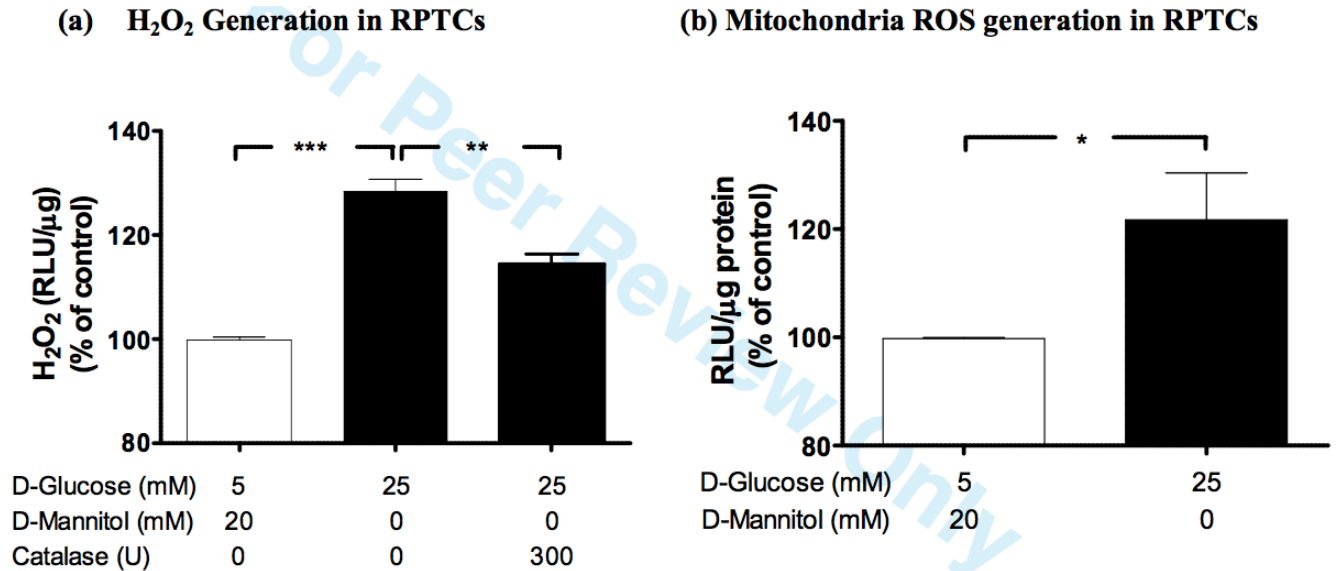
Proteinuria and glomerular filtration rate (GFR) of patients from whom kidney biopsies were used in microarray analysis of Bmf. A total of 9 DN patients were selected. However, only 7 out of 9 DN patients were used for each compartment (glomerulus and tubulointerstitium) DNA gene chip microarray analysis.

SUPPLEMENTARY FIGURE I



Cloning Rat Bmf. A. Sequence alignment for mouse and rat (Norway and Wistar) Bmf. Predicted dynein and BH3 domains are highlighted. Bold fonts highlight differences in amino acids between rat homologues. **B.** Wistar rat Bmf was cloned into the pCMV-Myc Vector (Clontech) fusing an N-Terminal c-Myc epitope tag.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2



(a) H₂O₂ generation in cellular lysate was measured by Hydrogen peroxide Assay Kit (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA).
(b) Cells were harvested and fractionated into mitochondrial fraction and cellular lysate by Mitochondrial Isolation Kit (Mitochondrial/Cytosol Fractionation Kit, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA). Mitochondrial ROS generation was measured by lucigenin assay.

Chapitre 3 - Résultats préliminaires non publiés

A) Effet de L'angiotensine II sur l'expression de Bmf

La première section de l'article a permis de montrer en grande partie, que des concentrations de glucose élevées induisent l'expression de Bmf *in vivo* et *in vitro*. Il a également été démontré que l'activation de cette protéine se faisait via la production de ROS et TGF- β . Aujourd'hui, de nombreux travaux ont bien établie que la synthèse des ROS provient en partie de l'activation du système rénine angiotensine par le glucose. Afin d'étudier l'effet direct de l'Ang II sur l'expression de Bmf, des IRPTC ont été traitées *in vitro* avec différentes doses d'Ang II pendant 24h, puis, l'expression de Bmf a été quantifiée par qPCR par la suite. Les résultats présentés à la figure 1 démontrent clairement que l'Ang II stimule l'expression de Bmf selon une courbe en cloche. C'est à dire que dans un premier temps, plus la dose d'Ang II augmente plus l'expression de Bmf augmente jusqu'à une dose maximale de 10^{-9} M où Bmf est exprimée environ 5 fois plus que la normale. Par la suite même si l'Ang II augmente, l'expression de Bmf diminue, ce qui pourrait s'expliquer en parti par un phénomène de désensibilisation du récepteur AT1 à l'Ang II. Bien que le rat et la souris soient un bon modèle d'étude du diabète et de la néphropathie diabétique, il est toujours important de transposer les découvertes *in vitro* chez l'humain. Donc pour démontrer que l'activation du système rénine angiotensine II induit également l'expression de Bmf chez l'humain, nous avons fait une étude de promoteur, qui consistait à traiter des cellules HEK293 comportant le clone stable PGL-4-hBmf avec TGF- β , l'angiotensine II et l'insuline. Les résultats obtenus et présentés à la figure 2 sont consistants avec nos travaux *in vitro* dans les IRPTC. En effet, nous avons démontré que 25 mM de glucose stimulait d'environ 1,5 fois l'expression de hBmf alors que le traitement avec 10^{-9} M d'Ang II et 10ng/ml de TGF- β stimulaient d'environ 2 fois l'expression de cette protéine. Nous avons également démontré que l'insuline 10^{-7} M a inhibé l'expression de celle-ci en condition de glucose élevé. Donc normaliser la glycémie prévient l'expression de la protéine apoptotique Bmf dans les tubules proximaux chez l'Homme.

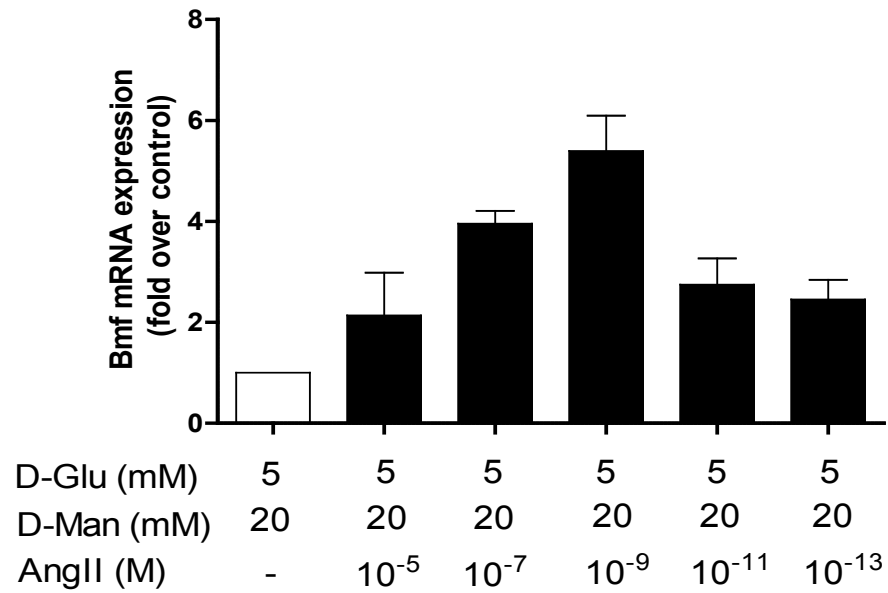


Figure 1. L'angiotensine II stimule l'expression de Bmf. Des IRPTC ont été traitées avec différentes doses d'angiotensine II pendant 24h. L'ARN a ensuite été extrait et l'expression de Bmf a été mesurée par RT-qPCR. L'ARNm de Bmf a été normalisé avec la β -actine. L'ensemble des données correspondent à une moyenne \pm écart type, N= 5 (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,005)

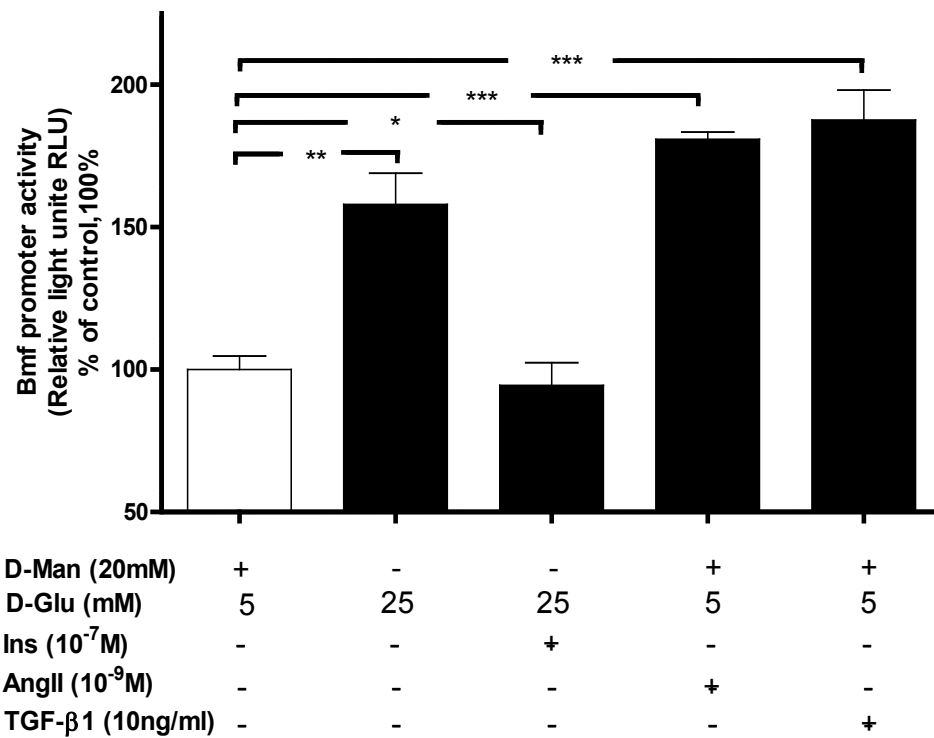
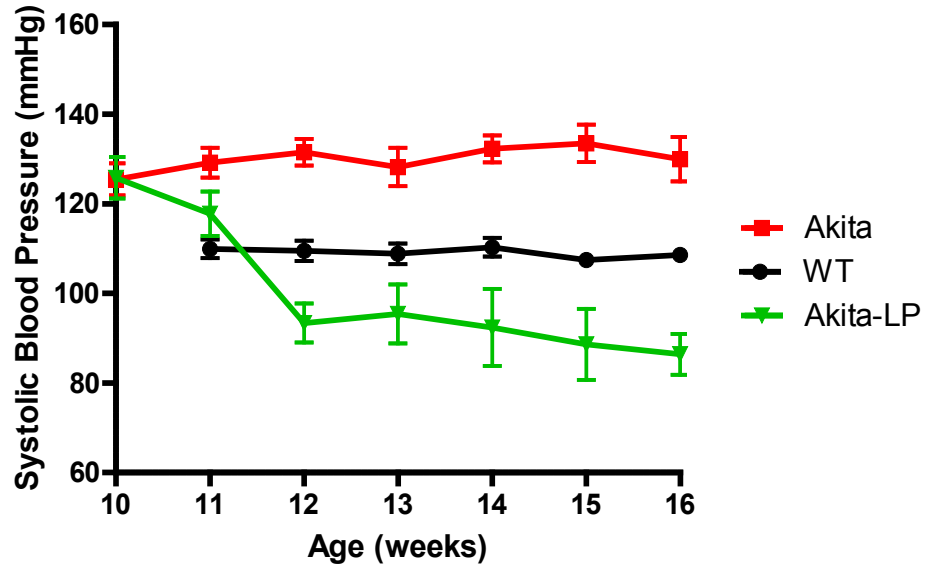


Figure 2. L'activité du promoteur de PGL-4-hBmf. Un clone stable du promoteur PGL-4-hBmf a été cultivé en condition de bas glucose (5mM) ou de glucose élevé (25mM) en présence ou en absence d'Ins, d'Ang II et de TGF-β. Après 24h les cellules ont été récoltées puis l'activité du promoteur a été mesurée. Le clone stable du promoteur PGL-4 vide a servi de contrôle. Le dosage des protéines a permis de normaliser les données. L'activité du promoteur de Bmf en condition de bas glucose est considérée comme 100%. INS = insuline. L'ensemble des données correspondent à une moyenne ± écart type, N= 5 (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,005)

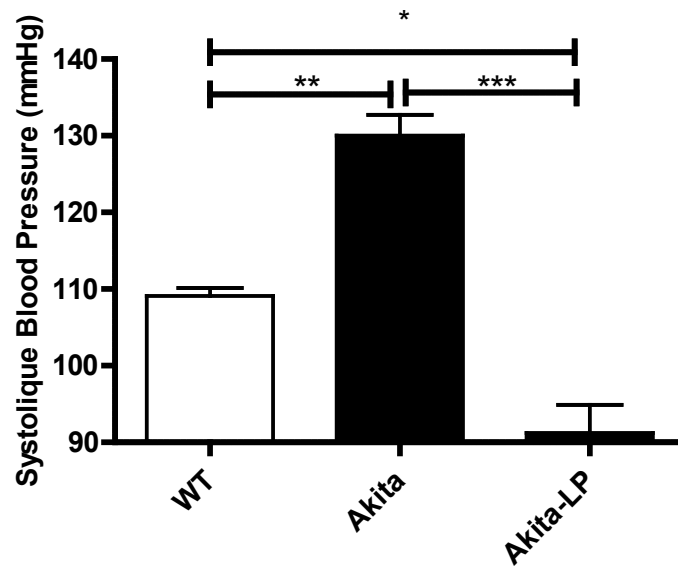
B) Effet de l'inhibition du RAS sur la pression artérielle et les marqueurs de l'apoptose.

Afin d'étudier l'importance du RAS dans l'induction de l'apoptose, nous avons traité des souris Akita caractérisées par une hyperglycémie dès l'âge de 4 semaines et une hypertension dès l'âge de 10-11 semaines avec une combinaison d'inhibiteurs du RAS (losartan 30 mg·kg⁻¹·day⁻¹ et Perindopril 4 mg·kg⁻¹·day⁻¹). La figure 3a, b montre que la pression artérielle est élevée chez les souris Akita de 30 mmHg et que le traitement à base de LP permet de la normaliser. Nous avons également observé que le traitement a permis d'atténuer l'hypertrophie rénale et cardiaque (figure 3c, d). Par contre, les inhibiteurs du RAS ne semblent pas améliorer le taux de filtration glomérulaire donc la fonction rénale (figure 3e). Ce qui est en partie logique puisque même si les souris Akita traitées ne souffrent plus d'hypertension, elles demeurent diabétiques et donc susceptibles aux dommages rénaux par des voies autres que celles du RAS. Maintenant que l'inhibition du système RAS *in vivo* a été démontrée, nous avons voulu confirmer notre hypothèse c'est-à-dire, montrer *in vivo* que Bmf est induite par les ROS/TGF-β via l'activation du RAS. Des expériences d'immunofluorescence (figure 4) montrent clairement que Bmf est surexprimée environ 4 fois plus chez la souris Akita comparé au WT et que cette surexpression semble normalisée chez les souris Akita traitées au LP. Dans une même perspective que nos travaux *in vitro*, nous avons démontré également une surexpression de TGF-β, des ROS et de l'apoptose chez les souris Akita, qui était normalisée chez les Akita LP (Figure5). Ce qui va de paire avec l'expression de Bmf et vient donc confirmer *in vivo*, nos résultats *in vitro*.

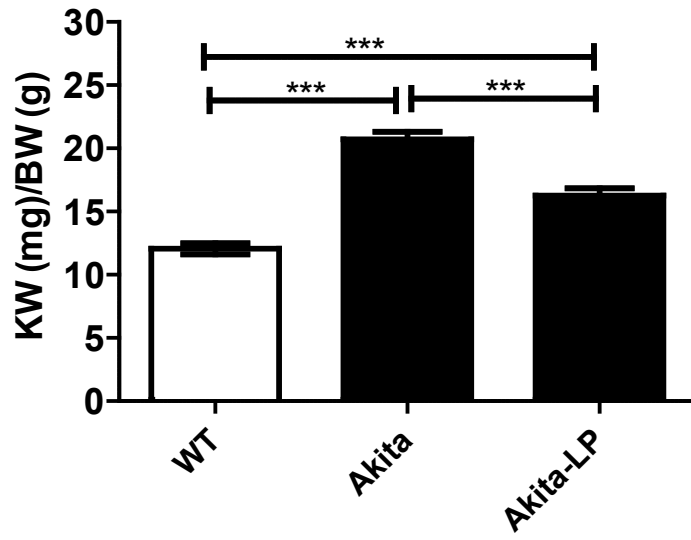
a)



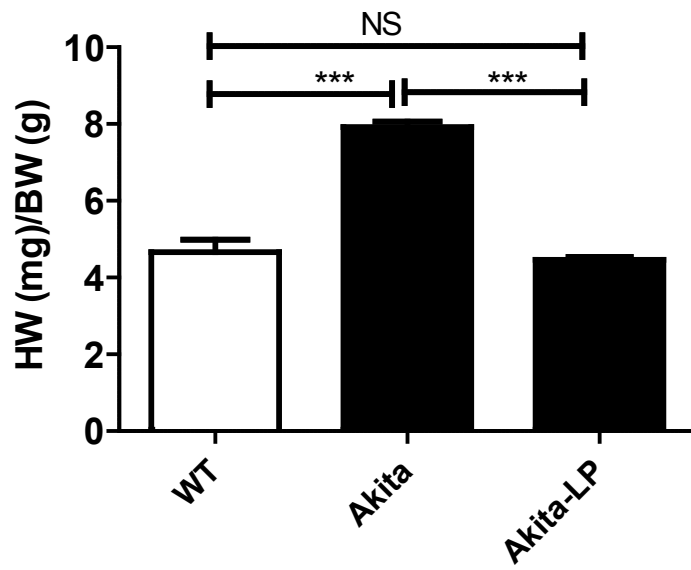
b)



c)



d)



e)

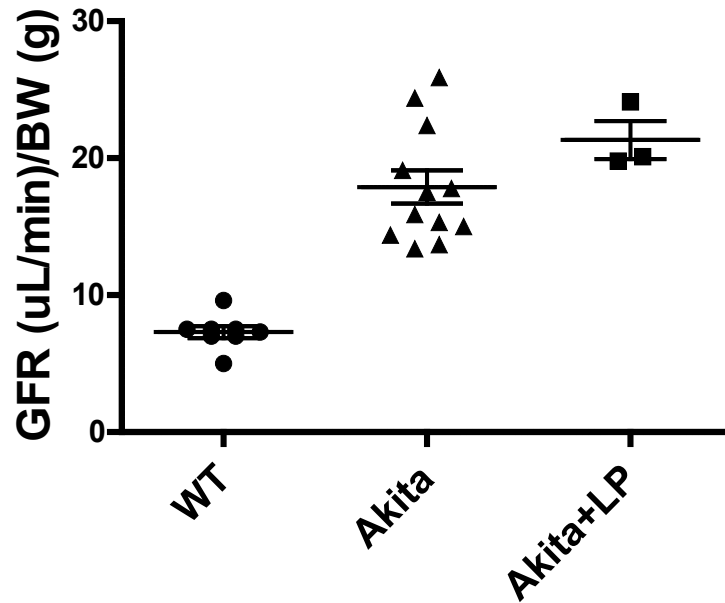
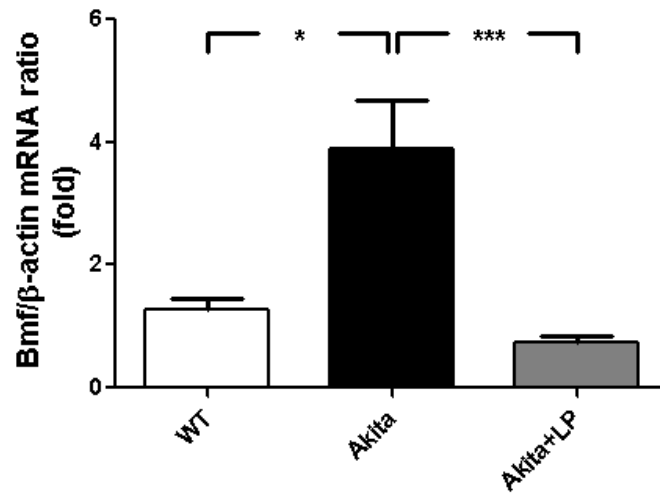


Figure 3. Données physiologiques des souris Akita mâles traitées ou pas avec les inhibiteurs du système rénine angiotensine (RAS) de l'âge de 11-16 semaines (a) Changements longitudinaux de la mesure de moyenne de la pression artérielle en fonction de l'âge en semaines chez des souris mâles tg Akita (■), Akita LP (▼) et WT (●) de l'âge de 10 à 16 semaines. (b) Variation transversale de la mesure de la pression artérielle (mesurée 2-3 fois / animal par semaine, le matin sans que les souris soient à jeun ; 16 semaines) chez les souris non Akita WT, Akita, Akita LP. (c) Ratio du poids rénal (sans le sang) sur le poids corporel. (d) Ratio du poids du cœur (sans le sang) sur le poids corporel. (e) mesure du taux de filtration glomérulaire par la mesure de la clairance de l'inuline. LP = losartan-Périndopril. L'ensemble des données correspondent à une moyenne \pm écart type, N= 5 (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,005)

a)



b)

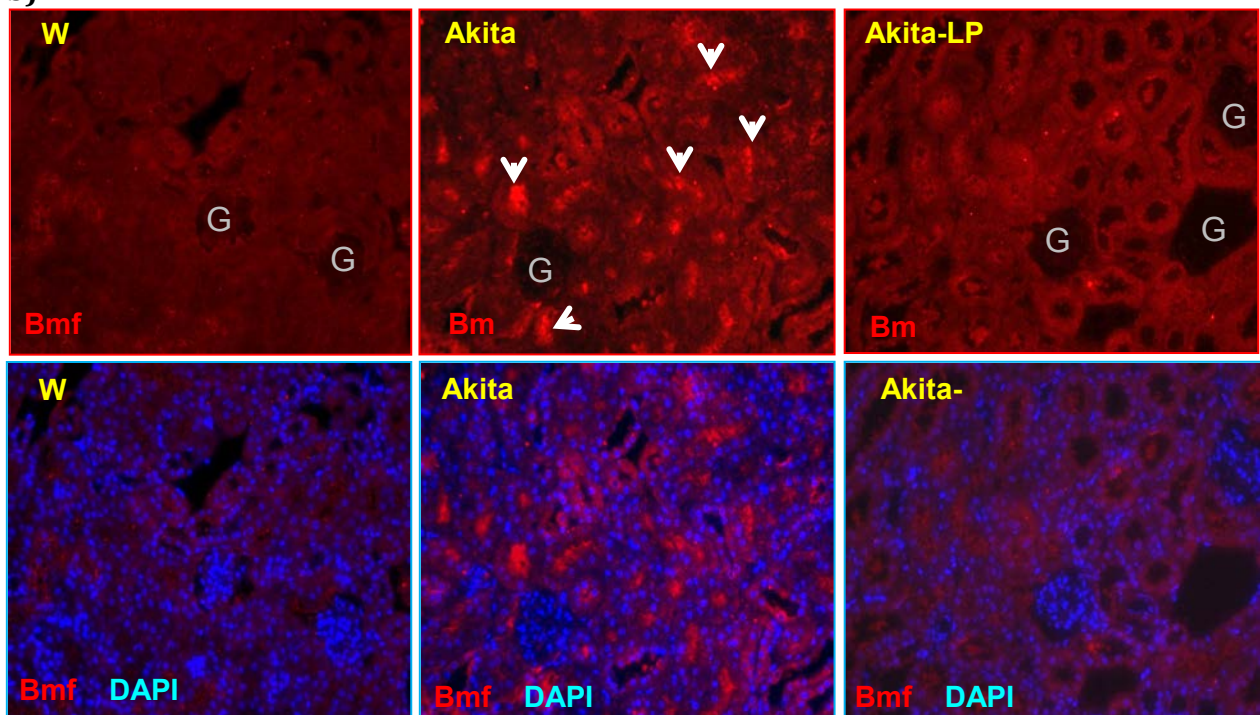
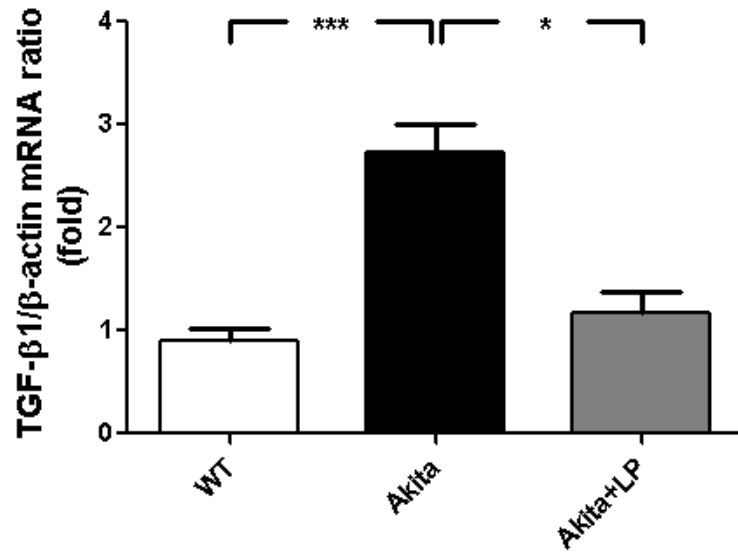
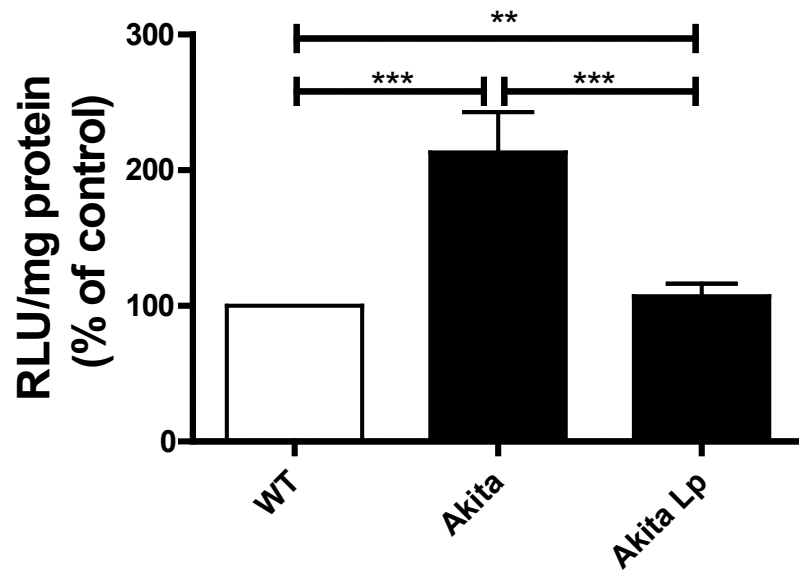


Figure 4. Normalisation de l'expression de Bcl-2 modifying factor par le traitement au Los-Per (LP). A) RT-qPCR de l'ARNm de Bmf extrait fraîchement à partir d'IRPTC de souris WT, Akita, Akita-LP à l'âge de 16 semaines. Les valeurs ont été normalisées avec l'ARNm de la β -actine. B) immunofluorescence avec un 2^e anticorps Alexa fluor (594 en rouge) et un premier anticorps Santa Cruz contre Bmf sur des sections de reins en paraffine isolés de Souris WT, Akita, Akita-LP. La coloration au DAPI permet d'identifier les noyaux. L'ensemble des données correspondent à une moyenne \pm écart type, N= 5 (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,005)

a)



b)



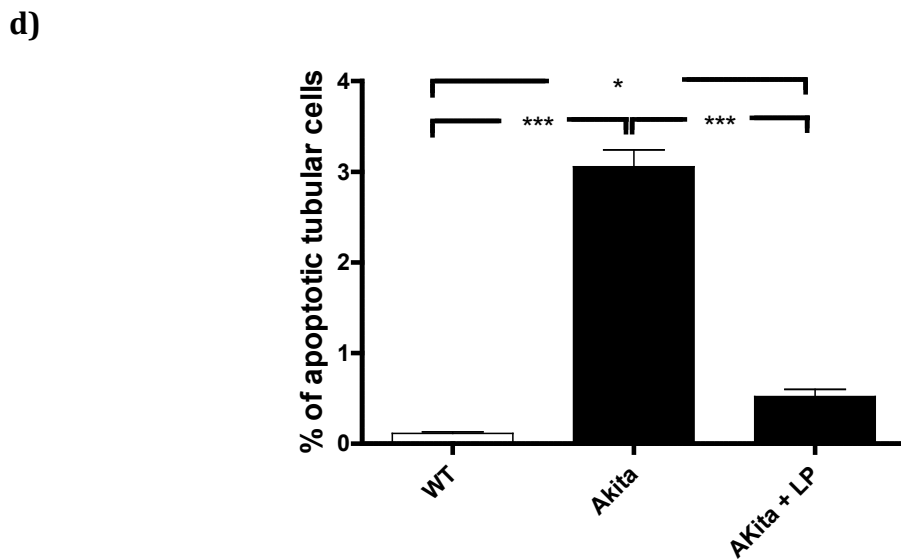
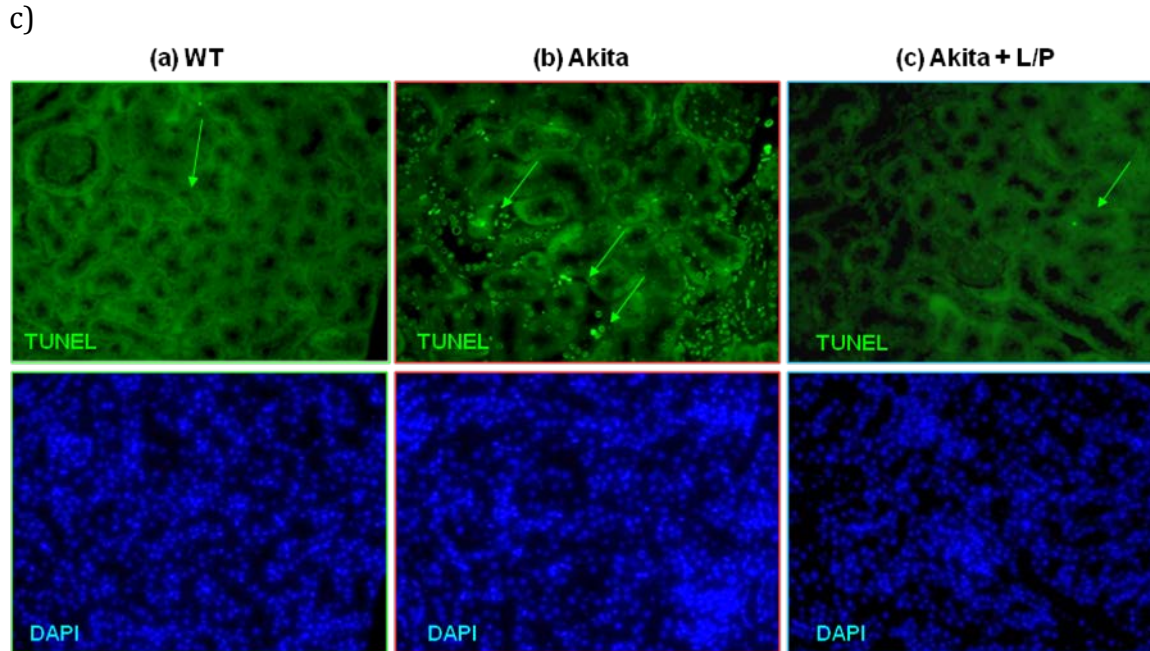
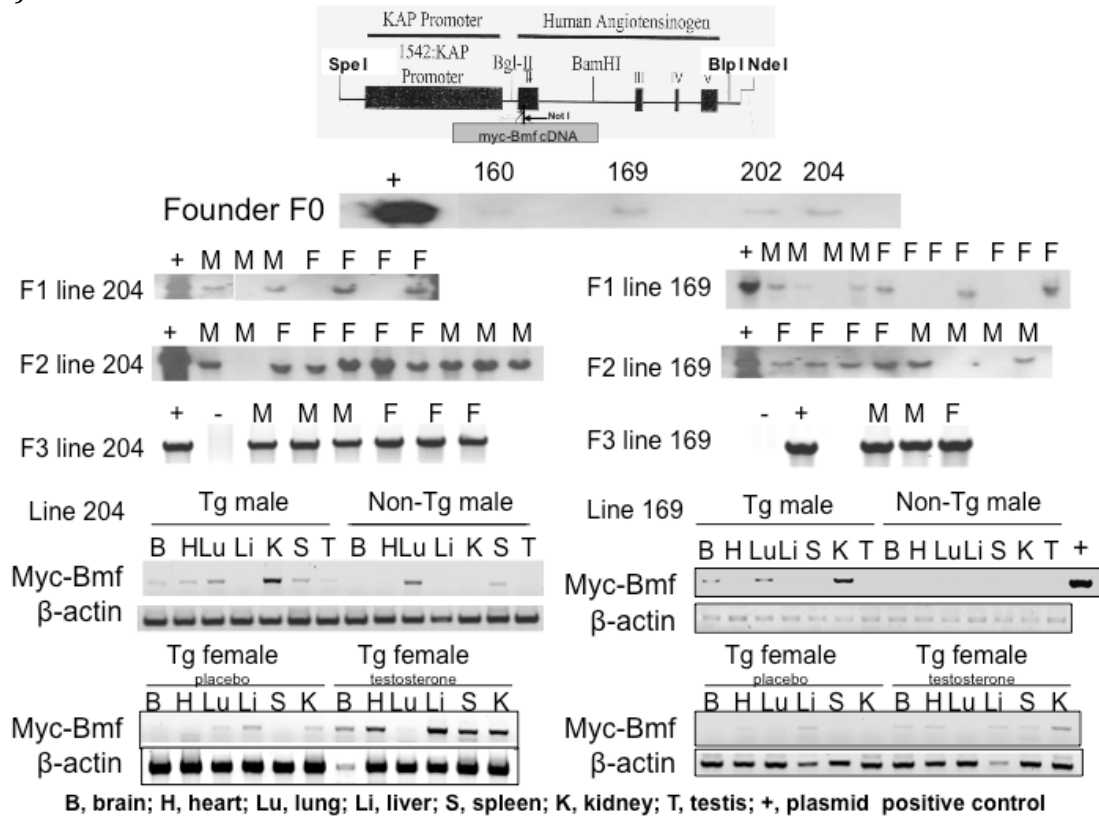


Figure 5. Normalisation de TGF- β , des ROS et de l'apoptose dans les RPTC dans les reins de souris Akita diabétiques suite au traitement à base des hypotenseurs Los-Per (LP). A) RT-qPCR de l'ARNm de TGF- β extrait fraîchement à partir d'IRPTC de souris WT, Akita, Akita-LP à l'âge de 16 semaines. Les valeurs ont été normalisées avec l'ARNm de la β -actine. B) Mesure des espèces réactives de l'oxygène et normalisation avec la concentration de protéines. (c) L'apoptose dans des reins de souris Akita 16 semaines par la méthode de (TUNEL) staining, les noyaux ont été colorés au DAPI. (d) graphique montrant une quantification de l'expérience de TUNEL par Image J, cellules apoptotiques (c) L'ensemble des données correspondent à une moyenne \pm écart type, N= 5 (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,005)

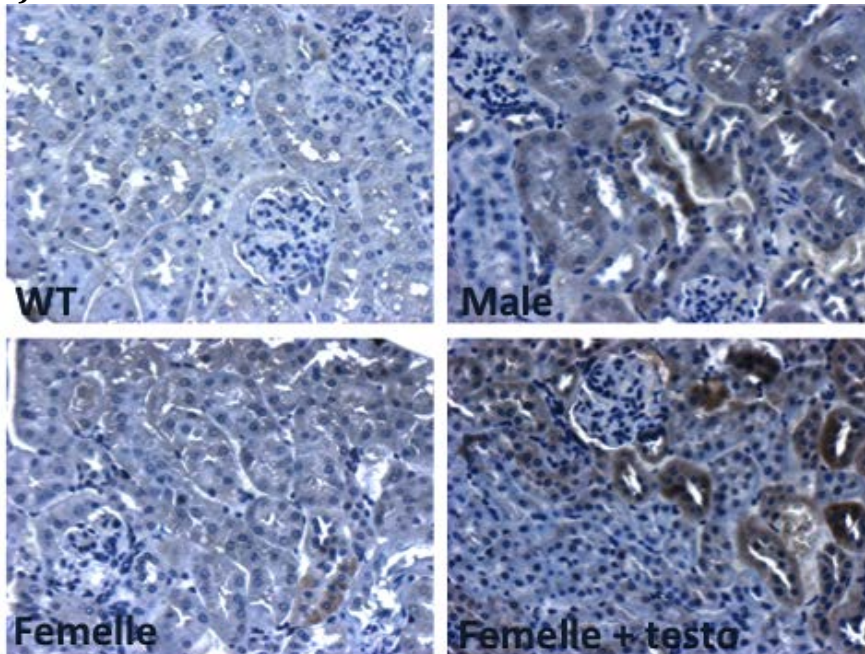
c) Surexpression de Bmf dans le modèle transgénique.

Finale­ment, Bmf étant une protéine qui semble jouer un rôle apoptotique important à la fois chez le rongeur et l'homme, nous avons décidé de construire un modèle transgénique qui surexprime Bmf spécifiquement au niveau des tubules proximaux grâce au promoteur «Kidney androgenic protein 2 (KAP2)». La figure 5a montre bien le résultat de génotypage de nos lignées, puis la figure 5b montre une surexpression de Bmf par immunohistochimie chez les souris mâles et les souris femelles traitées à la testostérone. Les souris WT et femelles non traitées montrent une moindre expression de Bmf. Comme attendu, le PAS Staining a permis de montrer que nos souris mâles et femelles traitées avaient davantage de dommages que nos WT et souris femelles non traitées.

a)



b)



c)

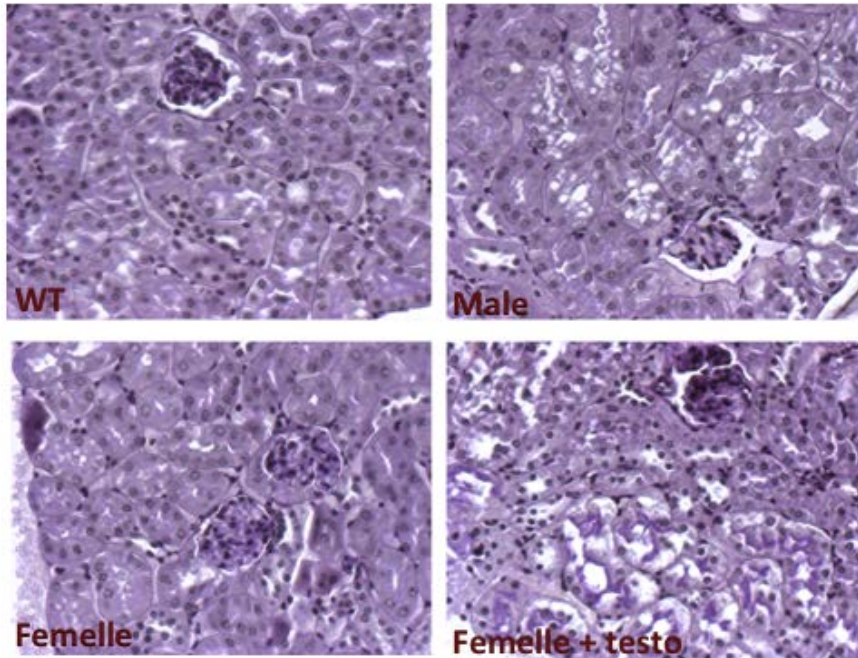


Figure 6. Génération des souris transgéniques surexprimant Bmf. (a) Schéma du géotypage des souris Bmf transgéniques. La construction KAP2-rat Bmf tg a été injectée dans des cellules embryonnaires de souris C57Bl6 X C3H. Le Southern blot avec une sonde contre hBmf a été réalisé sur l'ADN génomique de souris pour identifier les fondateurs et les souris hétérozygotes et homozygotes F₁, F₂ et F₃. À partir de la génération F₂ ou F₃ les souris positives sont identifiées par RT-qPCR avec des primer spécifiques. Br, cerveau; Hr, coeur; Ki, rein; Li, liver; Lu, poumons; Sp, rate; Ts, testicules. (B) Immunohistochimie réalisée sur des sections de paraffine de souris non tg, WT et hBmf tg, mâles, femelles, et femelles traitées à la testostérone avec un premier anticorps polyclonal anti Bmf (1 :200) de santa cruz (magnification X200). (C) Periodic acid-Schiff (PAS) staining a été réalisé sur des sections de paraffine de reins de souris non tg WT et hBmf tg, mâles, femelles, et femelles traitées à la testostérone (magnification X200).

Chapitre 4 - Discussion

Nous avons rapporté ici, que Bmf était une protéine apoptotique, impliquée dans la progression de la néphropathie diabétique. Elle serait surexprimée, *in vitro*, dans des cellules de tubules proximaux rénaux, lorsqu'elles sont stimulées avec des doses élevées de glucose, mais également, *in vivo*, dans ces mêmes tubules, chez les modèles de souris diabétiques (type 1 et 2) ainsi que chez l'humain.

Initialement, afin d'identifier les gènes apoptotiques régulés par les ROS chez le modèle db, nous avons réalisé une hybridation par puce à ADN qui a permis d'en identifier cinq. Nous nous sommes concentrés sur le gène codant pour la protéine Bmf, puisqu'il semblait le plus surexprimé chez la souris db et être normalisé chez la souris db-cat tg. Dans un premier temps, nous avons voulu confirmer les résultats obtenus par l'hybridation par puce à ADN. Nous avons donc, mesuré l'expression de l'ARNm et de la protéine Bmf respectivement, par RT-qPCR et immunohistochimie chez les Souris db/db, db/db Cat-tg, et WT grâce à un anticorps qui reconnaît l'isoforme apoptotique de Bmf. Comme on s'y attendait, Bmf semblait être surexprimée dans les tubules proximaux de souris obèses diabétiques db/db, et être normalisée chez les souris surexprimant la Cat. Donc, à priori, les ROS semblaient induire l'expression de cette protéine apoptotique. Cependant, afin de démontrer que Bmf était associée au diabète, nous avons vérifié son expression dans un second modèle diabétique où le diabète avait été induit par traitement au STZ. Encore une fois, nous avons démontré à la fois par RT-qPCR et immunohistochimie, une surexpression de Bmf dans les tubules proximaux. Nous avons également démontré qu'une normalisation de la glycémie par traitement à l'insuline permettait de normaliser l'expression de cette protéine. Donc nos travaux suggèrent que l'hyperglycémie induit la surexpression de Bmf dans les tubules proximaux via les ROS, cependant on ignore encore le mécanisme d'activation de cette protéine ainsi que son rôle physiologique dans ces tubules.

In vitro, nous avons commencé par démontrer notre hypothèse c'est-à-dire que la stimulation de cellules RPTC immortalisées de rats avec des doses élevées de glucose (25mM) induisait l'expression de Bmf, et l'inhibition des ROS avec différents inhibiteurs tels que la

roténone, le DPI, l'apocynine et la catalase atténuait cette expression. Le mécanisme précis par lequel le glucose induit l'expression de Bmf dans les RPTC demeure encore peu défini. Nos résultats ont démontré que TGF β stimulait l'expression de l'ARNm de Bmf et que l'inhibition de TGF β avec un siRNA inhibait l'expression de cette protéine en condition de glucose élevé. Ce qui concorde bien avec les travaux du Dr Ramjaun qui ont déjà démontré, dans les hépatocytes, que TGF β induisait l'expression de Bmf en activant les facteurs de transcription Smad3/4 [140]. Quant aux ROS, ils pourraient induire la phosphorylation de Bmf via c-Jun et d'autres voies de signalisation. Lorsque Bmf est phosphorylée elle se détache du cytosquelette et se lie à Bcl-2/Bcl-xL. Bax et Bak dimérisent alors pour former un pore dans la mitochondrie et libérer les cytochromes C, ce qui induit l'apoptose.

De nombreuses études ont bien démontré le rôle crucial de Bmf dans l'apoptose. Par exemple en 2008, il a été démontré que la perte de Bmf accélérât le développement du lymphome du thymus, suite à des radiations Y [127], ou encore, en 2010, l'équipe du Dr Liu Xinghan et al [128] a démontré, que l'action thérapeutique du PS-341 plus connu sous le nom de Velcade ou Bortezomib, un agent anti cancéreux, se faisait via l'activation de Bmf dans les cellules tumorales gliales. Ils ont également démontré, que la perte de Bmf protégeait les lymphocytes de l'apoptose induite par les glucocorticoides ou l'inhibition des histones déacétylases [128]. Puis, plus récemment, il a été démontré que Bmf était impliquée dans la perte de l'attachement cellulaire « anoikis » dans les cellules épithéliales intestinales [101].

Bien que le rôle apoptotique de Bmf ait bien été étudié et bien documenté dans de nombreux tissus, Nous sommes les premiers à rapporter l'expression de cette protéine dans les tubules proximaux rénaux. Afin d'étudier sa fonction et de démontrer son rôle physiologique ainsi que son implication dans la progression de l'apoptose tubulaire et donc dans la progression de la néphropathie diabétique; nous avons démontré que la transfection cellulaire avec le plasmide rat Bmf augmentait l'activité de caspase 3 et que la stimulation d'IRPTC avec 25 mM de D-glucose, augmentait le nombre de cellules apoptotiques dans ces tubules. De plus, l'inhibition de Bmf, avec un siRNA spécifique, semblait réduire d'environ 2 fois le nombre de cellules apoptotiques comparé au contrôle. Contrairement à nos attentes l'apoptose mesurée par l'activité de caspase 3 ne semblait pas aussi importante, en condition de glucose élevé (25mM),

que celle mesurée par les expériences de TUNEL. Cette différence pourrait s'expliquer en partie, par le fait que la technique de mesure de l'activité de caspase 3 est spécifique à la détection de l'apoptose seulement, alors que celle de TUNEL détecte la fragmentation de l'ADN. Elle ne fait donc pas de distinction entre l'apoptose et la nécrose. Nous avons également démontré le rôle apoptotique de Bmf ainsi que son expression chez les patients souffrant de néphropathie diabétique. Donc en résumé, dans les tubules proximaux, le glucose élevé stimule la production de ROS, qui activent Bmf, qui induit l'apoptose des cellules de ces tubules *in vitro* et *in vivo*.

Maintenant que nous avons démontré *in vitro* et *in vivo* que l'expression de Bmf est induite par l'hyperglycémie via la production de ROS. Nous nous sommes interrogés sur le mécanisme par lequel le glucose stimulait l'expression de cette protéine. Notre hypothèse était que l'hyperglycémie mène à l'activation du RAS, qui libère de l'Ang II, qui active TGF- β et génère des ROS via le récepteur AT1. Ces ROS activent Bmf, qui induit l'apoptose des cellules des tubules proximaux et donc l'atrophie tubulaire.

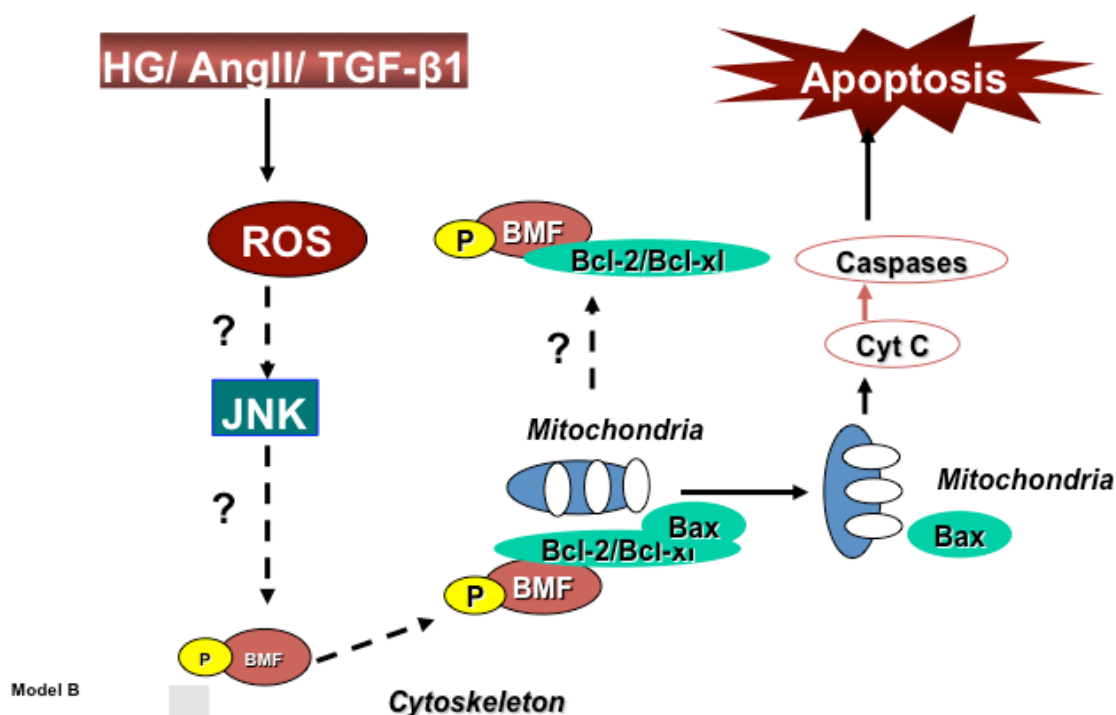


Figure 11. Schématisation du mécanisme d'activation de Bmf. Activation de Bmf par phosphorylation suite à l'activation de nombreuses kinases par le facteur TGF- β .

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier lieu démontré *in vitro* que la stimulation d'IRPTC avec différentes doses d'Ang II, stimulait l'expression de Bmf de façon dose dépendante, jusqu'à l'atteinte d'un sommet où l'expression de Bmf est à son maximum (10^{-9} mM d'Ang II) puis, par la suite même si la dose de l'Ang II augmente, Bmf diminue. Ce qui pourrait s'expliquer par le fait qu'à des doses trop élevées, l'Ang II inhibe l'expression de cette protéine et favorise l'activation d'autres voies. Nous avons aussi démontré que le promoteur du gène codant pour la protéine Bmf humaine était activé par l'Ang II et TGF- β , et inhibé par l'insuline. Ce qui concorde bien avec nos travaux antérieurs. Par la suite, nous avons voulu démontrer *in vivo* que l'inhibition du système RAS permettait de réduire l'expression de Bmf et donc de diminuer l'apoptose tubulaire chez la souris diabétique. Le modèle choisi fut la souris Akita car tout comme chez l'humain, ces souris caractérisées par une hyperglycémie, développent de l'hypertension [55, 129]. Pour normaliser l'hypertension, nous les avons traités avec une combinaison de deux inhibiteurs du RAS. Le losartan (L), un inhibiteur du récepteur AT1 [21, 130], et le perindopril (P), un inhibiteur de ACE [130]. Des études antérieures ont déjà démontré qu'une combinaison de ces deux classes d'inhibiteurs avait un meilleur effet [75, 76].

Nos travaux ont révélé que le traitement LP a permis de normaliser la pression mais également la production de ROS chez les souris Akita, ainsi qu'une diminution du nombre de cellules apoptotiques, et de l'expression de Bmf dans les tubules proximaux. La fonction rénale mesurée par le GFR ne semblait pas améliorée. Ce qui pourrait s'expliquer par le fait que bien qu'on ait traité l'hypertension chez ces souris, elles demeurent diabétiques, et l'hyperglycémie peut induire des dommages rénaux via des voies autres que le système RAS. La littérature a bien documenté par exemple que l'activation de la voie des PKC, qui est responsable de la synthèse de nombreux agents fibrotiques et de substances vasotropiques, qui induisent une hyperfiltration glomérulaire et une glomérulosclérose; ou encore la voie de l'aldose réductase, qui diminue l'oxyde nitrique et augmente la synthèse de prostaglandines. Ce qui encore une fois cause de l'hyperfiltration glomérulaire [21].

Nous savions déjà que les traitements à base d'hypotenseurs avaient un effet bénéfique sur le rein et étaient même recommandés comme traitement de première ligne contre la ND [21]. Cependant, leur mécanisme d'action au niveau rénal demeure encore peu défini. L'une des

hypothèses, qui pourrait expliquer le lien entre le RAS et l'apoptose serait que l'Ang II, via l'activation du récepteur AT1, active le facteur TGF- β , qui induit l'apoptose. Or l'implication de TGF- β dans la progression de la néphropathie diabétique est aujourd'hui bien documentée [131, 132]. De nombreuses études ont bien établi que TGF- β induisait un dépôt de MEC ou encore de fibronectine ou de collagène IV, ainsi que de nombreux autres facteurs fibrotiques et apoptotiques, qui endommageraient les tubules proximaux [33]. D'ailleurs l'inhibition de TGF- β semble neutraliser ces effets dans les modèles diabétiques [79, 133]. De plus, il a été rapporté, que dans les hépatocytes TGF- β induisait l'apoptose en stimulant la production de ROS, via l'activation de Noxa 4, chez le rat et l'humain [134]. et l'équipe du Dr Ramjaun a publié en 2007, que dans les carcinomes hépatiques, TGF- β stimulait l'expression à la fois de Bmf et de Bim via les ROS [135]. Ce qui concorde bien avec nos travaux, puisque chez le modèle Akita nous avons bien montré une surexpression de TGF- β et des ROS dans les tubules proximaux. Nous avons également montré que le traitement à base d'inhibiteurs du RAS LP semblait normaliser l'ensemble de ces effets. Donc l'ensemble de ces travaux démontre que dans les tubules proximaux, l'apoptose est induite par la surexpression de Bmf, qui est associée à l'activation de RAS via la voie de signalisation de TGF- β .

Les protéines à un domaine BH3 (Bim, Bid, Bmf, Bad, Bik, puma) sont nombreuses et leur rôle physiologique ainsi que pathologique en conditions de stress a été identifié. Des études de délétion de chacune de ces protéines individuellement ont révélé une redondance de fonction, puisque la perte de l'une d'entre elles en particulier ne semble pas perturber le développement embryonnaire. À l'exception de la délétion de Bim, qui cause la mort de plus de 40% des embryons dans les 10 premiers jours de leur développement [136]. En effet, de nombreuses redondance de fonction ont déjà été rapporté. Par exemple, Coultas et al ont démontré que les souris avec une délétion seulement de bim ou de bik étaient fertiles, alors que les souris mâles avec une délétion des deux protéines $bim^{-/-}bik^{-/-}$ avaient un sévère défaut dans la spermatogenèse [137]. Ou encore, qu'il y avait une redondance entre les protéines Bim et Puma dans leur réponse aux dommages induits à l'ADN [138], ainsi que les protéines Bad et Bmf dans leur rôle de suppresseurs de tumeurs. En effet, Les souris avec une délétion seulement de Bmf ou Bad ne semblent pas avoir un phénotype particulier, par contre la délétion des deux protéines favorise la tumorigenèse spontanée des cellules [127, 139].

Afin d'étudier le rôle physiologique rénal de Bmf *in vivo*, nous avons créé une nouvelle lignée de souris transgéniques, qui surexpriment spécifiquement la protéine Bmf humaine au niveau des tubules proximaux, dans les reins, à l'aide du promoteur « kidney androgen-induced protein; (KAP2) », un promoteur dont l'activité est sous le contrôle de la testostérone. Des études de southern blot ont permis dans un premier temps d'identifier les fondateurs, puis la génération F1 et F2. Par la suite des expériences de RT-PCR ont permis de génotyper les souris positives. À l'aide de l'immunohistochimie, nous avons démontré que Bmf était bien exprimé dans les tubules proximaux et qu'elle était sous le contrôle de la testostérone. En effet, comme on peut le voir dans la figure 6b, les souris WT ne semblent pas avoir une forte expression de Bmf, tout comme les femelles Bmf-tg non implantées à la testostérone. Par contre chez les mâles et chez les femelles implantées à la testostérone, pendant 20 jours, on note clairement l'expression de Bmf dans les RPTC. Ce qui prouve bien que cette lignée surexprime Bmf spécifiquement dans les tubules proximaux. De plus, le « Periodic acid-Schiff ;(PAS) » staining a démontré que les souris tg mâles ainsi que femelles implantées à la testostérone semblaient avoir davantage de dommages dans la structure rénale. En effet, chez ces souris, on note une perte de structure tubulaire ainsi que de la bordure en brosse des tubules proximaux. Cependant, on ne distingue pas de dépôt de collagène ou de MEC, ce qui peut s'expliquer par le fait que les résultats obtenus sont des résultats préliminaires. C'est à dire que l'étude ne comporte qu'un seul animal par groupe. Il est important de noter que nous venons tout juste d'obtenir ces souris et donc qu'il va falloir faire de nombreuses études dans le future afin de les caractériser. Nous aimerions, dans le future, croiser ces souris avec les souris Bmf Knockout *bmf*^{-/-} afin d'étudier l'effet qu'aura la surexpression de Bmf spécifiquement au niveau rénal. Nous escomptons démontrer que la surexpression de Bmf spécifiquement dans les tubules rénaux endommage davantage les reins et donc favorise la progression de la néphropathie diabétique.

En conclusion, cette étude a permis de démontrer, que chez les souris et patients diabétiques souffrant de néphropathie, le glucose, via l'activation du RAS et donc sous l'action de l'Ang II, induit l'expression de Bmf dans les tubules proximaux rénaux et cause l'apoptose de ces cellules. De nombreux travaux restent à venir pour élucider l'ensemble du mécanisme d'activation de cette protéine, afin de pouvoir inhiber sa fonction et prévenir l'atrophie tubulaire. Certains travaux ont

déjà démontré que Bmf, pourrait être libérée du cytosquelette suite a sa phosphorylation par JNK, activée préalablement par p38 MAPK, qui elle-même est activée par TGF- β dans les hépatocytes [135]. Ou encore que la phosphorylation de Bmf sur serine 77 par ERK2 réduisait son activité pro-apoptotique [140]. Cependant aucune de ces études na démontré comment Bmf se détachait du cytosquelette. Donc, dans le future, il serait intéressant pour notre laboratoire d'étudier les différents sites de phosphorylation que comporte le gène codant pour cette protéine et de déterminer l'ensemble des kinases qui seraient impliquées dans son mécanisme d'activation au niveau des RPTC dans les reins.

Chapitre 5 - Références

1. Shaw, J.E., R.A. Sicree, and P.Z. Zimmet, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010. **87**(1): p. 4-14.
2. *Fédération Internationale du Diabète*. Atlas du Diabète de la FID, 4e édition. Bruxelles, Belgique, Fédération internationale du diabète, 2009.
3. *AGENCE DE LA SANTÉ PUBLIQUE DU CANADA*. *Analyse inédite des données de 2008-2009 provenant du Système canadien de surveillance des maladies chroniques (Agence de la santé publique du Canada)*.
, 2011.
4. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, 2012. **35 Suppl 1**: p. S64-71.
5. Timper, K. and M.Y. Donath, *Diabetes mellitus Type 2--the new face of an old lady*. *Swiss Med Wkly*, 2012. **142**: p. w13635.
6. Kahn, B.B., *Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance*. *Cell*, 1998. **92**(5): p. 593-6.
7. Dedoussis, G.V., A.C. Kaliora, and D.B. Panagiotakos, *Genes, diet and type 2 diabetes mellitus: a review*. *Rev Diabet Stud*, 2007. **4**(1): p. 13-24.
8. Robertson, R.P., et al., *Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2004. **53 Suppl 1**: p. S119-24.
9. Robertson, R.P., *Consequences on beta-cell function and reserve after long-term pancreas transplantation*. *Diabetes*, 2004. **53**(3): p. 633-44.
10. Prentki, M. and C.J. Nolan, *Islet beta cell failure in type 2 diabetes*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(7): p. 1802-12.
11. Hull, R.L., et al., *Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(8): p. 3629-43.
12. Harding, H.P. and D. Ron, *Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review*. *Diabetes*, 2002. **51 Suppl 3**: p. S455-61.
13. Ramarao, P. and C.L. Kaul, *Insulin resistance: current therapeutic approaches*. *Drugs Today (Barc)*, 1999. **35**(12): p. 895-911.
14. Bailey, C.J., *Drugs on the horizon for diabetes*. *Curr Diab Rep*, 2005. **5**(5): p. 353-9.
15. Levey, A.S., et al., *Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)*. *Kidney Int*, 2005. **67**(6): p. 2089-100.
16. Radbill, B., B. Murphy, and D. LeRoith, *Rationale and strategies for early detection and management of diabetic kidney disease*. *Mayo Clin Proc*, 2008. **83**(12): p. 1373-81.
17. *La fondation canadienne du rein*. . 2012; Available from: <http://www.kidney.ca/page.aspx?pid=930>.
18. Waugh, A., Ross et Wilson, *anatomie et physiologie : normales et pathologiques / Anne Waugh, Allison Grant ; illustrations par Graeme Chambers ; coordination scientifique de l'édition française* 2011.

19. Sherwood, L., *Physiologie humaine / Sherwood ; traduction de la 3e édition américaine par Alain Lockhart ; révision scientifique de Stéphane Molotchnikoff* 2006.
20. Quérin, S., *La néphrologie et l'urologie / Serge Quérin, Luc Valiquette et collaborateurs* 2012.
21. Pyram, R., et al., *Chronic kidney disease and diabetes*. *Maturitas*, 2012. **71**(2): p. 94-103.
22. Wada, T., et al., *Clinical impact of albuminuria in diabetic nephropathy*. *Clin Exp Nephrol*, 2012. **16**(1): p. 96-101.
23. Mauer, S.M., *Structural-functional correlations of diabetic nephropathy*. *Kidney Int*, 1994. **45**(2): p. 612-22.
24. Fioretto, P. and M. Mauer, *Histopathology of diabetic nephropathy*. *Semin Nephrol*, 2007. **27**(2): p. 195-207.
25. Balakumar, P., et al., *Recent advances in pharmacotherapy for diabetic nephropathy: current perspectives and future directions*. *Pharmacol Res*, 2009. **60**(1): p. 24-32.
26. Balakumar, P., M.K. Arora, and M. Singh, *Emerging role of PPAR ligands in the management of diabetic nephropathy*. *Pharmacol Res*, 2009. **60**(3): p. 170-3.
27. Balakumar, P., et al., *Pathophysiology of diabetic nephropathy: involvement of multifaceted signalling mechanism*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009. **54**(2): p. 129-38.
28. Cingel-Ristic, V., A. Flyvbjerg, and S.L. Drop, *The physiological and pathophysiological roles of the GH/IGF-axis in the kidney: lessons from experimental rodent models*. *Growth Horm IGF Res*, 2004. **14**(6): p. 418-30.
29. Van Buren, P.N. and R. Toto, *Hypertension in diabetic nephropathy: epidemiology, mechanisms, and management*. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2011. **18**(1): p. 28-41.
30. Giunti, S., D. Barit, and M.E. Cooper, *Mechanisms of diabetic nephropathy: role of hypertension*. *Hypertension*, 2006. **48**(4): p. 519-26.
31. Mende, C.W., *Application of direct renin inhibition to chronic kidney disease*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2010. **24**(2): p. 139-49.
32. Riser, B.L., et al., *Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(1): p. 25-38.
33. Dai, C., J. Yang, and Y. Liu, *Transforming growth factor-beta1 potentiates renal tubular epithelial cell death by a mechanism independent of Smad signaling*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(14): p. 12537-45.
34. Li, Z.I., et al., *C-reactive protein promotes acute renal inflammation and fibrosis in unilateral ureteral obstructive nephropathy in mice*. *Lab Invest*, 2011. **91**(6): p. 837-51.
35. Lan, H.Y. and A.C. Chung, *Transforming growth factor-beta and Smads*. *Contrib Nephrol*, 2011. **170**: p. 75-82.
36. Ka, S.M., et al., *Kidney-targeting Smad7 gene transfer inhibits renal TGF-beta/MAD homologue (SMAD) and nuclear factor kappaB (NF-kappaB) signalling pathways, and improves diabetic nephropathy in mice*. *Diabetologia*, 2012. **55**(2): p. 509-19.
37. Lan, H.Y., *Diverse roles of TGF-beta/Smads in renal fibrosis and inflammation*. *Int J Biol Sci*, 2011. **7**(7): p. 1056-67.
38. Liu, F., et al., *C-reactive protein promotes diabetic kidney disease in a mouse model of type 1 diabetes*. *Diabetologia*, 2011. **54**(10): p. 2713-23.

39. Zhong, X., et al., *Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(9): p. 1668-81.
40. Kaparianos, A. and E. Argyropoulou, *Local renin-angiotensin II systems, angiotensin-converting enzyme and its homologue ace2: their potential role in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary diseases, pulmonary hypertension and acute respiratory distress syndrome*. Curr Med Chem, 2011. **18**(23): p. 3506-15.
41. Wei, Y., et al., *Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(46): p. 35137-46.
42. Santos, P.C., J.E. Krieger, and A.C. Pereira, *Renin-angiotensin system, hypertension, and chronic kidney disease: pharmacogenetic implications*. J Pharmacol Sci, 2012. **120**(2): p. 77-88.
43. Ozawa, Y., et al., *Renin-angiotensin system involvement in the oxidative stress-induced neurodegeneration of cultured retinal ganglion cells*. Jpn J Ophthalmol, 2012.
44. Lim, A.K. and G.H. Tesch, *Inflammation in diabetic nephropathy*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 146154.
45. Hills, C.E. and P.E. Squires, *The role of TGF-beta and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy*. Cytokine Growth Factor Rev, 2011. **22**(3): p. 131-9.
46. Santos, R.A., et al., *Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem*. Hypertension, 1988. **11**(2 Pt 2): p. 1153-7.
47. Donoghue, M., et al., *A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ace2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9*. Circ Res, 2000. **87**(5): p. E1-9.
48. Tipnis, S.R., et al., *A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase*. J Biol Chem, 2000. **275**(43): p. 33238-43.
49. Rice, G.I., et al., *Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ace2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism*. Biochem J, 2004. **383**(Pt 1): p. 45-51.
50. Vickers, C., et al., *Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase*. J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 14838-43.
51. Ferreira, A.J. and R.A. Santos, *Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7)*. Braz J Med Biol Res, 2005. **38**(4): p. 499-507.
52. Santos, R.A., et al., *Angiotensin-converting enzyme 2, Angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the Renin Angiotensin System*. J Endocrinol, 2012.
53. Pinheiro, S.V., et al., *Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria*. Kidney Int, 2009. **75**(11): p. 1184-93.
54. Liu, F., et al., *Overexpression of angiotensinogen increases tubular apoptosis in diabetes*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(2): p. 269-80.
55. Lo, C.S., et al., *Dual RAS blockade normalizes angiotensin-converting enzyme-2 expression and prevents hypertension and tubular apoptosis in Akita angiotensinogen-transgenic mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **302**(7): p. F840-52.
56. Holman, R.R., et al., *Long-term follow-up after tight control of blood pressure in type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2008. **359**(15): p. 1565-76.
57. Liu, F., et al., *Apocynin attenuates tubular apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in transgenic mice independent of hypertension*. Kidney Int, 2009. **75**(2): p. 156-66.

58. Brezniceanu, M.L., et al., *Catalase overexpression attenuates angiotensinogen expression and apoptosis in diabetic mice*. *Kidney Int*, 2007. **71**(9): p. 912-23.
59. Zhang, S.L., et al., *Essential role(s) of the intrarenal renin-angiotensin system in transforming growth factor-beta1 gene expression and induction of hypertrophy of rat kidney proximal tubular cells in high glucose*. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(2): p. 302-12.
60. Zhang, S.L., et al., *Insulin inhibits dexamethasone effect on angiotensinogen gene expression and induction of hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells in high glucose*. *Endocrinology*, 2002. **143**(12): p. 4627-35.
61. Hsieh, T.J., et al., *High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells*. *Endocrinology*, 2002. **143**(8): p. 2975-85.
62. Urushihara, M. and H. Kobori, *Angiotensinogen Expression Is Enhanced in the Progression of Glomerular Disease*. *Int J Clin Med*, 2011. **2**(1): p. 378-387.
63. Joles, J.A. and H.A. Koomans, *Causes and consequences of increased sympathetic activity in renal disease*. *Hypertension*, 2004. **43**(4): p. 699-706.
64. Wenzel, R.R., *Renal protection in hypertensive patients: selection of antihypertensive therapy*. *Drugs*, 2005. **65 Suppl 2**: p. 29-39.
65. Ruggenti, P., A. Schieppati, and G. Remuzzi, *Progression, remission, regression of chronic renal diseases*. *Lancet*, 2001. **357**(9268): p. 1601-8.
66. Komine, N., et al., *Effect of combining an ACE inhibitor and an angiotensin II receptor blocker on plasma and kidney tissue angiotensin II levels*. *Am J Kidney Dis*, 2002. **39**(1): p. 159-64.
67. Lewis, E.J., et al., *The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy*. *The Collaborative Study Group*. *N Engl J Med*, 1993. **329**(20): p. 1456-62.
68. Ruggenti, P., et al., *Renal function and requirement for dialysis in chronic nephropathy patients on long-term ramipril: REIN follow-up trial*. *Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia (GISEN). Ramipril Efficacy in Nephropathy*. *Lancet*, 1998. **352**(9136): p. 1252-6.
69. Ruggenti, P., et al., *Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(19): p. 1941-51.
70. Maschio, G., et al., *Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency*. *The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(15): p. 939-45.
71. Viberti, G. and N.M. Wheeldon, *Microalbuminuria reduction with valsartan in patients with type 2 diabetes mellitus: a blood pressure-independent effect*. *Circulation*, 2002. **106**(6): p. 672-8.
72. Parving, H.H., et al., *The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(12): p. 870-8.
73. Lewis, E.J., et al., *Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(12): p. 851-60.
74. Brenner, B.M., et al., *Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(12): p. 861-9.

75. Barnett, A.H., et al., *Angiotensin-receptor blockade versus converting-enzyme inhibition in type 2 diabetes and nephropathy*. N Engl J Med, 2004. **351**(19): p. 1952-61.
76. Hunsicker, L.G., *Emerging trends for prevention and treatment of diabetic nephropathy: blockade of the RAAS and BP control*. J Manag Care Pharm, 2004. **10**(5 Suppl A): p. S12-7.
77. Song, J.H., et al., *Effect of low-dose dual blockade of renin-angiotensin system on urinary TGF-beta in type 2 diabetic patients with advanced kidney disease*. Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(3): p. 683-9.
78. Xia, L., et al., *High glucose activates PKC-zeta and NADPH oxidase through autocrine TGF-beta1 signaling in mesangial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(6): p. F1705-14.
79. Miyajima, A., et al., *Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction*. Kidney Int, 2000. **58**(6): p. 2301-13.
80. Taura, M., et al., *A region N-terminal to the tandem SH3 domain of p47phox plays a crucial role in the activation of the phagocyte NADPH oxidase*. Biochem J, 2009. **419**(2): p. 329-38.
81. Gorin, Y., et al., *Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39616-26.
82. Nam, S.M., et al., *Effects of NADPH oxidase inhibitor on diabetic nephropathy in OLETF rats: the role of reducing oxidative stress in its protective property*. Diabetes Res Clin Pract, 2009. **83**(2): p. 176-82.
83. Winiarska, K., et al., *Hypoglycaemic, antioxidative and nephroprotective effects of taurine in alloxan diabetic rabbits*. Biochimie, 2009. **91**(2): p. 261-70.
84. Ribaldo, P.D., et al., *Green tea (Camellia sinensis) attenuates nephropathy by downregulating Nox4 NADPH oxidase in diabetic spontaneously hypertensive rats*. J Nutr, 2009. **139**(1): p. 96-100.
85. Bhatti, F., et al., *Mechanisms of antioxidant and pro-oxidant effects of alpha-lipoic acid in the diabetic and nondiabetic kidney*. Kidney Int, 2005. **67**(4): p. 1371-80.
86. Han, H.J., et al., *High glucose-induced oxidative stress inhibits Na⁺/glucose cotransporter activity in renal proximal tubule cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **288**(5): p. F988-96.
87. Rogers, L.K., et al., *Diquat induces renal proximal tubule injury in glutathione reductase-deficient mice*. Toxicol Appl Pharmacol, 2006. **217**(3): p. 289-98.
88. Zhang, Y., et al., *Therapeutic approach for diabetic nephropathy using gene delivery of translocase of inner mitochondrial membrane 44 by reducing mitochondrial superoxide production*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4): p. 1090-101.
89. Kumar, D., et al., *Tubular and interstitial cell apoptosis in the streptozotocin-diabetic rat kidney*. Nephron Exp Nephrol, 2004. **96**(3): p. e77-88.
90. Kelly, D.J., et al., *Fas-induced apoptosis is a feature of progressive diabetic nephropathy in transgenic (mRen-2)²⁷ rats: attenuation with renin-angiotensin blockade*. Nephrology (Carlton), 2004. **9**(1): p. 7-13.
91. Kumar, D., S. Robertson, and K.D. Burns, *Evidence of apoptosis in human diabetic kidney*. Mol Cell Biochem, 2004. **259**(1-2): p. 67-70.
92. Green, D.R. and G.I. Evan, *A matter of life and death*. Cancer Cell, 2002. **1**(1): p. 19-30.

93. Orrenius, S., V. Gogvadze, and B. Zhivotovsky, *Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007. **47**: p. 143-83.
94. Oberholzer, C., et al., *Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration*. *FASEB J*, 2001. **15**(6): p. 879-92.
95. Kazi, A., et al., *The BH3 alpha-helical mimic BH3-M6 disrupts Bcl-X(L), Bcl-2, and MCL-1 protein-protein interactions with Bax, Bak, Bad, or Bim and induces apoptosis in a Bax- and Bim-dependent manner*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(11): p. 9382-92.
96. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(1): p. 47-59.
97. Garcia-Saez, A.J., *The secrets of the Bcl-2 family*. *Cell Death Differ*, 2012. **19**(11): p. 1733-40.
98. Anvekar, R.A., et al., *Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment*. *Front Oncol*, 2011. **1**(34).
99. Chipuk, J.E. and D.R. Green, *How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?* *Trends Cell Biol*, 2008. **18**(4): p. 157-64.
100. Puthalakath, H., et al., *Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis*. *Science*, 2001. **293**(5536): p. 1829-32.
101. Hausmann, M., et al., *BCL-2 modifying factor (BMF) is a central regulator of anoikis in human intestinal epithelial cells*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(30): p. 26533-40.
102. Morales, A.A., et al., *Expression and transcriptional regulation of functionally distinct Bmf isoforms in B-chronic lymphocytic leukemia cells*. *Leukemia*, 2004. **18**(1): p. 41-7.
103. Puthalakath, H. and A. Strasser, *Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins*. *Cell Death Differ*, 2002. **9**(5): p. 505-12.
104. Chen, H., et al., *Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice*. *Cell*, 1996. **84**(3): p. 491-5.
105. Lee, G.H., et al., *Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice*. *Nature*, 1996. **379**(6566): p. 632-5.
106. Hummel, K.P., D.L. Coleman, and P.W. Lane, *The influence of genetic background on expression of mutations at the diabetes locus in the mouse. I. C57BL-KsJ and C57BL-6J strains*. *Biochem Genet*, 1972. **7**(1): p. 1-13.
107. Chua, S., Jr., et al., *Differential beta cell responses to hyperglycaemia and insulin resistance in two novel congenic strains of diabetes (FVB- Lepr (db)) and obese (DBA-Lep (ob)) mice*. *Diabetologia*, 2002. **45**(7): p. 976-90.
108. Cohen, M.P., et al., *Prevention of decline in renal function in the diabetic db/db mouse*. *Diabetologia*, 1996. **39**(3): p. 270-4.
109. Lim, A.K., et al., *Antibody blockade of c-fms suppresses the progression of inflammation and injury in early diabetic nephropathy in obese db/db mice*. *Diabetologia*, 2009. **52**(8): p. 1669-79.
110. Koya, D., et al., *Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes*. *FASEB J*, 2000. **14**(3): p. 439-47.

111. Cohen, M.P., G.T. Lautenslager, and C.W. Shearman, *Increased urinary type IV collagen marks the development of glomerular pathology in diabetic d/db mice*. *Metabolism*, 2001. **50**(12): p. 1435-40.
112. Tesch, G.H. and A.K. Lim, *Recent insights into diabetic renal injury from the db/db mouse model of type 2 diabetic nephropathy*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011. **300**(2): p. F301-10.
113. Lee, A.S., et al., *An aqueous extract of Portulaca oleracea ameliorates diabetic nephropathy through suppression of renal fibrosis and inflammation in diabetic db/db mice*. *Am J Chin Med*, 2012. **40**(3): p. 495-510.
114. Like, A.A., et al., *Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis in mice. Morphologic and physiologic studies*. *Lab Invest*, 1978. **38**(4): p. 470-86.
115. Like, A.A. and A.A. Rossini, *Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus*. *Science*, 1976. **193**(4251): p. 415-7.
116. Breyer, M.D., et al., *Mouse models of diabetic nephropathy*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(1): p. 27-45.
117. Yoshioka, M., et al., *A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice*. *Diabetes*, 1997. **46**(5): p. 887-94.
118. Lindop, G.B., et al., *The glomerulo-tubular junction: a target in renal diseases*. *J Pathol*, 2002. **197**(1): p. 1-3.
119. Gilbert, R.E. and M.E. Cooper, *The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury?* *Kidney Int*, 1999. **56**(5): p. 1627-37.
120. de Haan, J.B., et al., *Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. **289**(3): p. F544-51.
121. Susztak, K., et al., *Multiple metabolic hits converge on CD36 as novel mediator of tubular epithelial apoptosis in diabetic nephropathy*. *PLoS Med*, 2005. **2**(2): p. e45.
122. Verzola, D., et al., *Taurine prevents apoptosis induced by high ambient glucose in human tubule renal cells*. *J Investig Med*, 2002. **50**(6): p. 443-51.
123. Kang, B.P., et al., *High glucose promotes mesangial cell apoptosis by oxidant-dependent mechanism*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **284**(3): p. F455-66.
124. Susztak, K., et al., *Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy*. *Diabetes*, 2006. **55**(1): p. 225-33.
125. Godin, N., et al., *Catalase overexpression prevents hypertension and tubular apoptosis in angiotensinogen transgenic mice*. *Kidney Int*, 2010. **77**(12): p. 1086-97.
126. Brezniceanu, M.L., et al., *Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells*. *Diabetes*, 2008. **57**(2): p. 451-9.
127. Labi, V., et al., *Loss of the BH3-only protein Bmf impairs B cell homeostasis and accelerates gamma irradiation-induced thymic lymphoma development*. *J Exp Med*, 2008. **205**(3): p. 641-55.
128. Tianhu, Z., Z. Shiguang, and L. Xinghan, *Bmf is upregulated by PS-341-mediated cell death of glioma cells through JNK phosphorylation*. *Mol Biol Rep*, 2010. **37**(3): p. 1211-9.

129. Oudit, G.Y., et al., *Human recombinant ace2 reduces the progression of diabetic nephropathy*. *Diabetes*, 2010. **59**(2): p. 529-38.
130. Ferrannini, E. and W.C. Cushman, *Diabetes and hypertension: the bad companions*. *Lancet*, 2012. **380**(9841): p. 601-10.
131. Liu, Z., et al., *Loss of angiotensin-converting enzyme 2 enhances TGF-beta/Smad-mediated renal fibrosis and NF-kappaB-driven renal inflammation in a mouse model of obstructive nephropathy*. *Lab Invest*, 2012. **92**(5): p. 650-61.
132. Pardali, E. and P. Ten Dijke, *TGFbeta signaling and cardiovascular diseases*. *Int J Biol Sci*, 2012. **8**(2): p. 195-213.
133. Ziyadeh, F.N., et al., *Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(14): p. 8015-20.
134. Caja, L., et al., *Overactivation of the MEK/ERK pathway in liver tumor cells confers resistance to TGF- β -induced cell death through impairing up-regulation of the NADPH oxidase NOX4*. *Cancer Res*, 2009. **69**(19): p. 7595-602.
135. Ramjaun, A.R., et al., *Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGF beta-induced apoptosis*. *Oncogene*, 2007. **26**(7): p. 970-81.
136. Bouillet, P., et al., *Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity*. *Science*, 1999. **286**(5445): p. 1735-8.
137. Coultas, L., et al., *Concomitant loss of proapoptotic BH3-only Bcl-2 antagonists Bik and Bim arrests spermatogenesis*. *EMBO J*, 2005. **24**(22): p. 3963-73.
138. Erlacher, M., et al., *Puma cooperates with Bim, the rate-limiting BH3-only protein in cell death during lymphocyte development, in apoptosis induction*. *J Exp Med*, 2006. **203**(13): p. 2939-51.
139. Baumgartner, F., et al., *Minor cell-death defects but reduced tumor latency in mice lacking the BH3-only proteins Bad and Bmf*. *Oncogene*, 2012.
140. Shao, Y. and A.E. Aplin, *ERK2 phosphorylation of serine 77 regulates Bmf pro-apoptotic activity*. *Cell Death Dis*, 2012. **3**: p. e253.