

Université de Montréal

**Identification et caractérisation de gènes
différemment exprimés dans les tubules proximaux de
reins diabétiques et impliqués dans le développement
de la néphropathie diabétique**

Par Nicolas Godin

Programme de sciences biomédicales
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D)
en sciences biomédicales

Août 2010

© Nicolas Godin, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

Identification et caractérisation de gènes différemment exprimés
dans les tubules proximaux de reins diabétiques et impliqués dans
le développement de la néphropathie diabétique

Présentée par :
Nicolas Godin

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Daniel Lajeunesse
Président rapporteur

Dr. John S.D. Chan
Directeur de recherche

D^{re}. Shao-Ling Zhang
Codirecteur de recherche

Dr. Daniel Bichet
Membre du jury

Dr. Andrey Cybulsky
Examineur externe

Résumé

La néphropathie diabétique est une maladie rénale caractérisée par un syndrome néphrotique et de la glomérulosclérose. Celle-ci est reliée à l'angiopathie de capillaires suite au diabète. Il s'agit d'une importante cause d'insuffisance rénale en Amérique.

Or, les anomalies tubulaires comme l'apoptose ou le détachement de tubules des glomérules sont reconnues comme étant de bons marqueurs de progression de cette maladie. Ainsi, il a été proposé au cours des travaux reliés à cette thèse d'étudier les différents mécanismes moléculaires reliés à l'apoptose des tubules proximaux, en particulier dans un thème de relation avec les dommages reliés aux espèces réactives oxygénées (ROS). Une des hypothèses développée au cours de précédents travaux faisait état que l'une des sources initiales qui entraînent le développement de dommages tubulaires soit régulée à travers la production de ROS dérivés des NADPH oxydases.

Ainsi, une des premières séries d'expériences entreprises au cours de cette thèse a été effectuée sur un modèle animal de diabète de type 2, la souris db/db. Suite à la caractérisation des différentes pathologies rénales et leur réduction par la surexpression de l'enzyme antioxydante catalase dans les tubules proximaux, des expériences de micro-puces d'expression génétiques furent effectuées. À l'aide de cet outil et par des analyses bioinformatiques, il a été possible d'établir un profilage de gènes reliés à différentes voies de signalisation modulées par le diabète et la catalase. Ainsi, il a été possible d'effectuer de plus amples études sur des gènes reliés à l'apoptose surexprimé dans les tubules proximaux de souris diabétiques.

Un des gènes pro-apoptotique mieux caractérisé durant cette thèse fut le gène *Bmf*, un membre de la famille des régulateurs de Bcl-2 impliqués dans l'apoptose via le relâchement de cytochrome c de la mitochondrie. Ainsi, il a été déterminé que ce gène est surexprimé dans les tubules proximaux de souris diabétiques, et que celui-ci était augmenté dans différents modèles *in vitro* de diabète. Cela a permis de conclure que *Bmf* joue sans doute un rôle important la régulation de l'apoptose et de l'atrophie des tubules proximaux.

Une autre étude effectuée dans le cadre de cette thèse était reliée avec l'utilisation d'un modèle transgénique afin de mieux définir le rôle que jouent les dommages reliés au stress oxydatif dans la progression des pathologies rénales reliées à l'induction du système rénine-angiotensine.

Les résultats obtenus ont permis de déterminer que la surexpression de l'enzyme antioxydante catalase a permis de réduire les différentes pathologies rénales observées dans les souris transgéniques, ce qui permet de conclure que les espèces réactives oxygénées jouent un rôle important dans le développement de l'hypertension et des dommages rénaux.

Mots-clés: Rein, système rénine-angiotensine, néphropathie diabétique, hypertension, ROS, micro-puces d'expression, souris transgéniques

Abstract

Identification and characterization of genes differently expressed in proximal tubules and involved in the development of diabetic nephropathy

Diabetic nephropathy is a disease characterized by a nephrotic syndrome and glomerulosclerosis. It is related to capillaries angiopathy caused by diabetes. It is one of the main sources of end stage renal disease in America.

Tubular anomalies such as apoptosis or tubular detachment from glomeruli are known to be efficient markers for the progression of this disease. Thus, it has been proposed during the work related to this thesis to study the different molecular mechanisms linked with proximal tubules apoptosis, particularly those related with reactive oxygen species (ROS). A previously stated hypothesis made by our laboratory stated that one of the initial sources of the development of tubular damages may be regulated by the production of ROS by NADPH oxidases.

Thus, one of the first series of experiments carried during this thesis was done on an animal model of type 2 diabetes, the db/db mouse. Following the characterization of different renal pathologies and their reduction in the proximal tubules by the antioxidant enzyme catalase, experiment with genetics expression microarrays were carried. Using this tool and bioinformatics analysis, it was possible to profile different genes linked to pathways involved by diabetes and the catalase enzyme. Thus, it was possible to carry further studies on these genes linked to apoptosis and overexpressed in the proximal tubules of diabetic mice.

One of the pro apoptotic genes characterized in this thesis was the *Bmf* gene, a member of the family of Bcl-2 regulator, involved in apoptosis related to the release of cytochrome c from the mitochondria. Thus, it was determined that this gene is overexpressed in the proximal tubules of diabetic mice, and that it was also upregulated by *in vitro* models of diabetes. This enabled our team to conclude that *Bmf* must play an important role in the regulation of apoptosis and atrophy of the proximal tubules.

Another study carried during this thesis was linked with the use of a transgenic animal model to better define the role played by damages related to oxidative stress in the progression of renal pathologies related to renin-angiotensin system activation.

The results obtained by this study stated that overexpression of the antioxidant enzyme catalase managed to reduce the different kidney pathologies observed in the transgenic model, which let us conclude that reactive oxygen species have an important role to play in the development of hypertension and kidney damages.

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

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1 - Introduction	1
1.1 Le rôle du rein et l'homéostasie.....	1
1.1.1 La physiologie rénale.....	1
1.1.2 Histologie rénale	2
1.1.3 Les aquaporines et leurs rôles dans le rein	7
1.2 Les maladies rénales chroniques.....	12
1.2.1 Les changements causés par les pathologies rénale.....	12
1.2.2 Les maladies rénales chroniques et le taux de filtration glomérulaire	13
1.2.3 Incidence, prévalence et causes de l'insuffisance rénale	14
1.2.4 Le diabète mellitus et le rein	15
1.3 Les ROS et le stress oxydatif.....	15
1.4 La néphropathie diabétique.....	18
1.4.1 Introduction : diabète et néphropathie	18
1.4.2 La pathogénèse de la néphropathie diabétique	19
1.4.3 Le rôle des podocytes dans la filtration glomérulaire.....	19
1.4.4 Les PKC et la néphropathie diabétique	24
1.4.5 Les TGF- β et la néphropathie diabétique.....	26
1.4.6 L'hypertension et la néphropathie diabétique	28
1.4.7 La réabsorption rénale du glucose dans la néphropathie diabétique	29
1.4.8 Le stress oxydatif et la néphropathie diabétique.....	30
1.4.9 Les récepteurs activés par les proliférateurs du peroxydome (PPAR) et la néphropathie diabétique	32
1.5 L'apoptose.....	34
1.5.1 Le système général de l'apoptose.....	34

1.5.2	Le rôle de la caspase 12.....	39
1.5.3	La famille Bcl-2 et l'apoptose	40
1.5.4	L'apoptose dans les glomérules diabétiques	41
1.5.5	L'apoptose dans les tubules diabétiques	42
1.6	Le système rénine-angiotensine (RAS) et l'hypertension	43
1.6.2	L'angiotensine II locale dans le rein	44
1.6.3	Les canaux ioniques rénaux et le système RAS.....	47
1.6.4	L'activation du système RAS intrarénal et le développement de l'hypertension	50
1.6.5	Modèles in vitro de l'activation du système RAS.....	54
1.6.6	Mesures de la pression sanguine	55
1.6.7	Le système RAS intrarénal et la néphropathie diabétique.....	55
1.6.8	Les effets hémodynamiques de l'angiotensine II.....	56
1.6.9	L'angiotensine II et ses effets non-hémodynamiques	56
1.6.10	Les effets de bloqueurs du RAS chez les patients diabétiques	58
1.6.11	Le rôle des reins dans la régulation de la pression sanguine	59
1.6.12	L'hypertension et la néphropathie.....	60
1.7	Les modèles animaux des maladies rénales	61
1.7.1	Les modèles de néphropathie diabétique.....	61
1.8	Technologies de micro-puces et les pathologies rénale	63
1.8.1	Les micro-puces.....	63
1.8.2	Historiques des études de micro-puces dans les maladies rénales	64
1.9	Hypothèse et Objectifs de cette étude	66
Chapitre 2 -	Article 1: Bcl-2-Modifying Factor Induces Renal Proximal Tubular Cell Apoptosis in Diabetic Mice	68
2.1	Abstract	69
2.2	Introduction.....	70
2.3	Results	71
2.4	Discussion.....	75
2.5	Methods	79
2.6	Acknowledgements.....	86
2.7	Disclosure	87
2.8	References.....	87

Chapitre 3 -	Article 2: Catalase overexpression prevents hypertension and tubular apoptosis in angiotensinogen transgenic mice.....	106
3.1	Abstract	106
3.2	Results	108
3.3	Discussion.....	111
3.4	Materials and methods	114
3.5	Disclosure	118
3.6	References.....	118
3.7	Acknowledgments.....	122
Chapitre 4 -	Discussion	138
4.1	Les tubules proximaux et leur rôle dans les dommages rénaux	138
4.2	Modèle transgéniques de surexpression du système RAS.....	139
4.2.1	Caractérisation du modèle	139
4.2.2	Effet du RAS sur l'apoptose	141
4.2.3	Les effets du blocage des NADPH oxydases par l'apocynine	142
4.3	Modèles transgéniques reliés à la surexpression de catalase	143
4.3.1	Modèle de diabète de type 1 : Injections avec STZ.....	143
4.3.2	La souris db/db, un modèle de diabète de type 2	144
4.4	Le modèle double transgénique caractérisé	145
4.5	L'utilisation des micro-puces pour l'évaluation de pathologies rénales..	147
4.5.1	Stratégie de micro-puces adoptée dans notre laboratoire.....	147
4.5.2	Résultats des micro-puces sur les souris db/db	148
4.5.3	Gène Bmf caractérisé dans cette étude	149
4.5.4	Caractérisation de la caspase-12.....	150
4.6	Perspectives	152
4.6.1	Méthodologie de découverte de biomarqueurs	152
4.6.2	Techniques de microdissection par capture au laser.....	153
4.6.3	Conclusions.....	154
Chapitre 5 -	Annexes	156
5.1	Analyse de bases de données publiques reliées aux expériences de micro-puces sur des sujets humain	156
5.2	Niveaux ioniques urinaires de modèles de souris transgéniques	158
Chapitre 6 -	Références	159

Liste des tableaux

Tableau 1-1. La réabsorption de différentes molécules biologiques dans les reins.....	7
Tableau 2-1. List of genes upregulated in microarray chips of db/db vs db/m+ and db/db vs db/db-CAT Tg mice overexpressing CAT.....	96
Tableau 2-2. Supplementary Tables. Up-regulated pro-apoptotic genes in RPTs of db/db mice, compared to heterozygous db/m+ and db/db-CAT Tg mic.....	104
Tableau 3-1. Primers for genotyping and RT-qPCR.....	127
Tableau 4-1. Gènes pro-apoptotiques sur-exprimés dans les souris db/db vs contrôles et db/db-Cat-Tg.....	149
Tableau 5-1. Résultats des analyses de données de micro-puces sur des échantillons cliniques.....	156
Tableau 5-2. Rapport d'analyse de l'ANOVA pour le probeset 226530_at (Bmf) de l'étude E-GEOD 11166.....	157

Liste des figures

Figure 1-1. Anatomie générale du rein.....	1
Figure 1-2. Anatomie générale du néphron.....	2
Figure 1-3. Diagramme structural d'un glomérule rénal	3
Figure 1-4. La barrière de filtration rénale.....	4
Figure 1-5. Structure des aquaporines.....	8
Figure 1-6. Le transport aqueux et la régulation des aquaporines 2.....	10
Figure 1-7. Les changements observés dans le rein par les maladies rénales.....	13
Figure 1-8. Les changements glomérulaires et des cellules mésangiales dans les maladies rénales.....	14
Figure 1-9. Le transport des électrons dans la mitochondrie permettant la synthèse de l'ATP.	16
Figure 1-10. Production de ROS et NADPH.....	17
Figure 1-11. Anomalies des podocytes dans les maladies rénales.....	19
Figure 1-12. L'implication de l'angiotensine II dans le développement des changements des podocytes.	21
Figure 1-13. Relations entre l'activation de différentes voies de signalisations et les récepteurs pour les AGEs.....	24
Figure 1-14. Un schéma simple de la relation entre une élévation du taux de glucose et l'activation des PKC et leurs effets sur la fibrose.....	25
Figure 1-15. Le complexe de signalisation cellulaire relié au TGF- β	27
Figure 1-16. Mécanisme moléculaire de la néphropathie diabétique reliée à la génération de ROS et la formation de AGEs.	28
Figure 1-17. Réabsorption du glucose par les tubules proximaux et transfert à travers la membrane basolatérale.....	29
Figure 1-18. La structure présumée des isoformes de NADPH oxydases.....	31
Figure 1-19 La structure des PPAR.....	32
Figure 1-20. Les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose.	36

Liste des figures (2)

Figure 1-21. Mécanismes de l'apoptose en réponse au stress du réticulum endoplasmique.	38
Figure 1-22. Activation de l'apoptose par les différents membres de la famille BH3 et Bcl-2.	40
Figure 1-23. Le système rénine-angiotensine.....	46
Figure 1-24. Les principaux canaux sodiques rénaux et leur localisation.....	47
Figure 1-25. Agents qui augmentent l'activité des canaux ioniques dans les tubules proximaux.	49
Figure 1-26. Agents qui diminuent l'activité des canaux ioniques des tubules proximaux.	49
Figure 1-27. Modèle de la sécrétion de l'AngII dans les tubules proximaux.	50
Figure 1-28. L'activation de PAI et son rôle dans la fibrose.....	57
Figure 1-29. Schéma d'une expérience de micro-puces.	64
Figure 1-30. Un schéma proposé de la régulation des événements pathologiques reliés à la néphropathie diabétique et aux ROS dans le rein.	67
Figure 2-1. Bmf Expression is Elevated in RPTs of db/db Diabetic Mice.....	97
Figure 2-2. Bmf Expression is Upregulated in RPTs from STZ-induced Diabetic Mouse Kidneys.	98
Figure 2-3. High Glucose Stimulates ROS Generation and Bmf mRNA Expression.....	99
Figure 2-4. Cloning Rat Bmf.	100
Figure 2-5. Overexpression of Rat Bmf Induces Caspase-3 Activity in IRPTCs.....	101
Figure 2-6. Overexpression of Rat Bmf Increases TUNEL and Co-immunoprecipitates with Bcl-2 in IRPTCs.....	102
Figure 2-7. Supplementary Figure. Bim Expression is Elevated in RPTs of db/db Diabetic Mice.	105
Figure 3-1. Transgene expression.	128
Figure 3-2. Kidney to body weight ratio and morphological analysis in male non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20.....	129

Liste des figures (3)

Figure 3-3. Urinary albumin/creatinine ratio (ACR) and systolic blood pressure (SBP) in male non-Tg and Tg mice.....	130
Figure 3-4. ROS generation, NADPH oxidase activity and immunostaining of HO-1 in RPTs of non-Tg and Tg mice.	131
Figure 3-5. ACE and ACE2 expression in male non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20.	132
Figure 3-6. Urinary Ang II and Ang 1–7 levels, and renal ACE activity in male non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20.....	133
Figure 3-7. Masson's trichrome staining, collagen type IV and MCP-1 expression in male non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20.....	134
Figure 3-8. TGF- β 1 and PAI-1 expression in male non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20.	135
Figure 3-9. Apoptosis in male non-Tg and Tg mouse kidneys.	136
Figure 3-10. Supplementary Figure. H/E and Agt-immunostaining of Non-Tg and Tg mice.	137
Figure 4-1. Le promoteur KAP utilisé pour propulser les transgènes utilisés dans notre laboratoire.	140
Figure 4-2. Procédure de préparation pour la microdissection et capture au laser.	153
Figure 4-3. Les effets présumés de réno-protection de la catalase sur le développement des maladies rénales chroniques.....	154
Figure 4-4. L'activation des PKC peut être le résultat d'une hausse des agents oxydatifs, qui peuvent être initiés par différents facteurs tels que l'hyperglycémie.....	155
Figure 5-1. Expression du probeset 226530_at de l'étude E-GEOD 11166	157
Figure 5-2. Niveaux ioniques urinaires des modèles de souris transgéniques (Agt/Cat). .	158

Liste des abréviations

ACE.....	Enzyme de conversion de l'angiotensinogène
ACE2.....	Enzyme de conversion de l'angiotensinogène de type 2
ADH.....	Hormone antidiurétique
AGEs.....	Facteurs de glycation avancés
AGT.....	Angiotensinogène
AJG.....	Appareil juxta-glomérulaire
AQP.....	Aquaporine
ARN.....	Acide ribonucléique
CHIP28.....	Channel-forming integral protein of 28kD
CKD.....	Chronical kidney disease – maladie rénale chronique
DPI.....	Diphénylène iodonium
ERK.....	Extracellular signal-regulated kinases
GFR.....	Glomerular filtration rate – taux de filtration glomérulaire
IRC.....	Insuffisance rénale chronique
JNK.....	c-Jun N-terminal kinases
MAPK.....	Mitogen-activated protein kinase
NADPH.....	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NDI.....	Diabète insipide néphrogénique
NHE3.....	Canal Échangeur Sodium-Hydrogène de type 3
PKA.....	Protéine kinase A
PKC.....	Phosphokinase C
RAGE.....	Récepteur pour les facteurs de glycation avancés
RAS.....	Système rénine-angiotensine
ROS.....	Espèces Réactives oxygénées

Liste des abréviations (2)

RRT..... Traitements de remplacement rénal

STZ..... Streptozotocin

TGF-B..... Facteur de croissance transformant bêta

TUNEL..... Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

TZD..... Thiazolidinediones

Remerciements

Je tiens à remercier du fond du cœur l'implication de tous ceux qui m'ont supporté aux cours de ces dernières années en me permettant de compléter ces études de doctorat.

En premier lieu, je dois souligner la qualité des conseils et la collaboration de mes directeurs de recherche, soit les Dr John S.D. Chan et Shao-Ling Zhang. Ceux-ci m'ont toujours démontré un appui soutenu qui m'a permis de mieux progresser dans mes démarches.

De plus, je tiens à remercier les différentes personnes avec qui j'ai travaillé dans le laboratoire pour le travail d'équipe qui nous a permis de d'obtenir des résultats de recherche d'aussi bonne qualité. Il s'agit d'Isabelle Chénier, de la Dre Marie-Luise Brezniceanu et de la Dre Fang Liu, sans oublier Stacey Chen, Stella Tran, Garnet J Lau et la Dre Cara Lau.

Chapitre 1 - Introduction

1.1 Le rôle du rein et l'homéostasie

1.1.1 La physiologie rénale

Le rein joue plusieurs rôles dans le maintien des processus physiologiques, et particulièrement dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Il s'agit aussi de l'organe qui joue le plus grand rôle dans la maintenance du volume et de la composition en solutés des fluides biologiques, et il possède un rôle de filtre permettant l'élimination de molécules organiques non désirables dans l'urine. C'est par ce processus que des produits métaboliques tels que l'urée, la créatinine ou les excès de minéraux seront éliminés dans l'urine, alors que d'autres molécules telles que les protéines, le glucose et les acides aminés ne le seront pas. Il est cependant à noter que le processus de la concentration urinaire est complexe, et dépend du bon fonctionnement des unités de filtration rénales que l'on nomme « néphrons ».

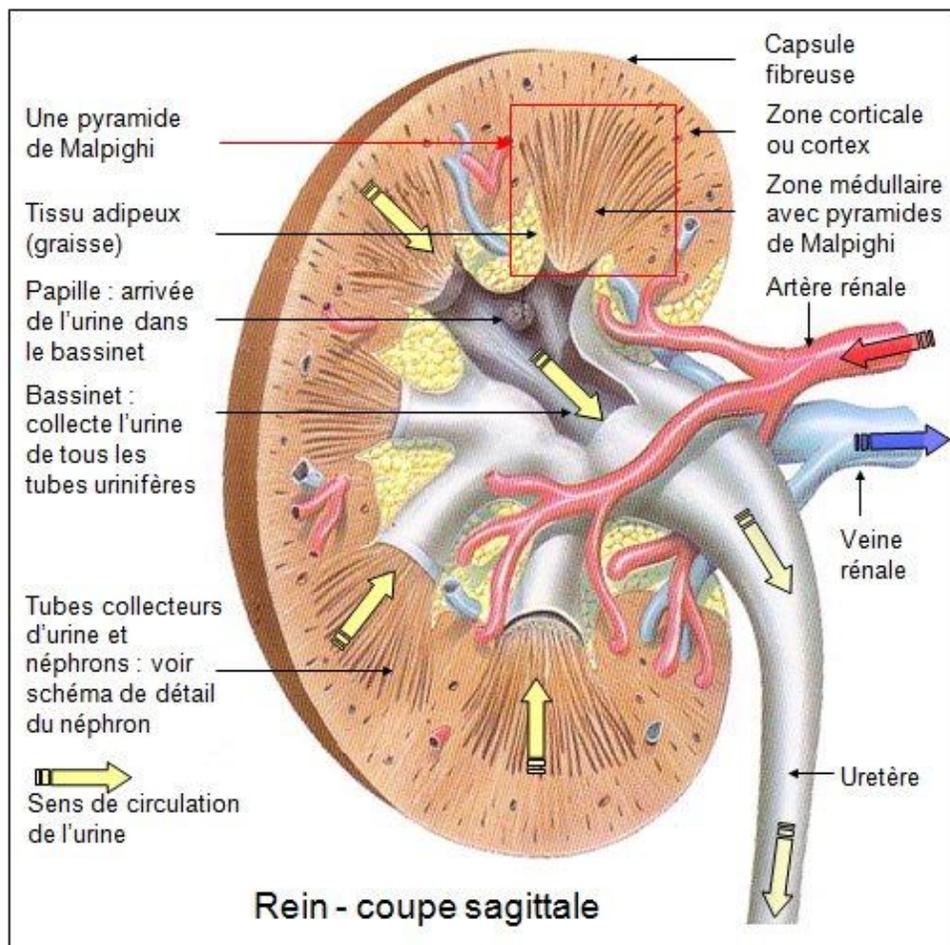


Figure 1-1. Anatomie générale du rein. [1]

Les néphrons constituent les unités fonctionnelles de base du rein [2]. À la base, ceux-ci sont composés de deux principales parties : le corpuscule rénal qui contient la capsule de Bowman dans lequel se situent le glomérule et le tubule rénal qui se sépare en différentes parties distinctives contenant différents canaux permettant une réabsorption optimale de l'eau et des ions.

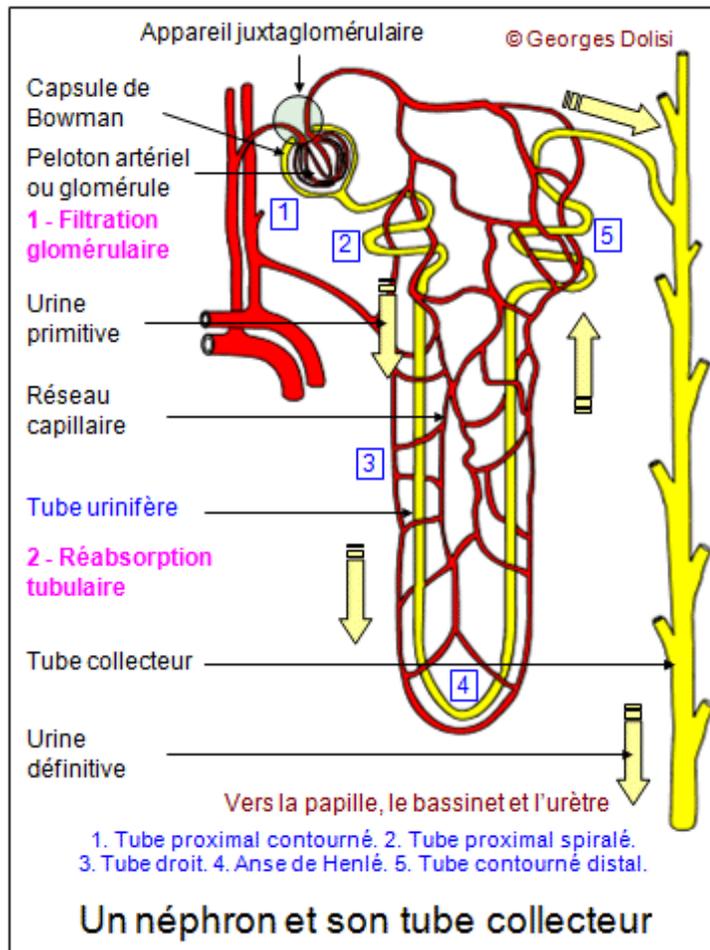


Figure 1-2. Anatomie générale du néphron. [3]

1.1.2 Histologie rénale

Il est possible de différencier deux principaux types de néphrons, caractérisés selon leur position à l'intérieur du rein. Les néphrons dit « corticaux », localisés dans la région supérieure du cortex rénal, et les néphrons de la région juxtamédullaire, qui sont plus près de la médulla.

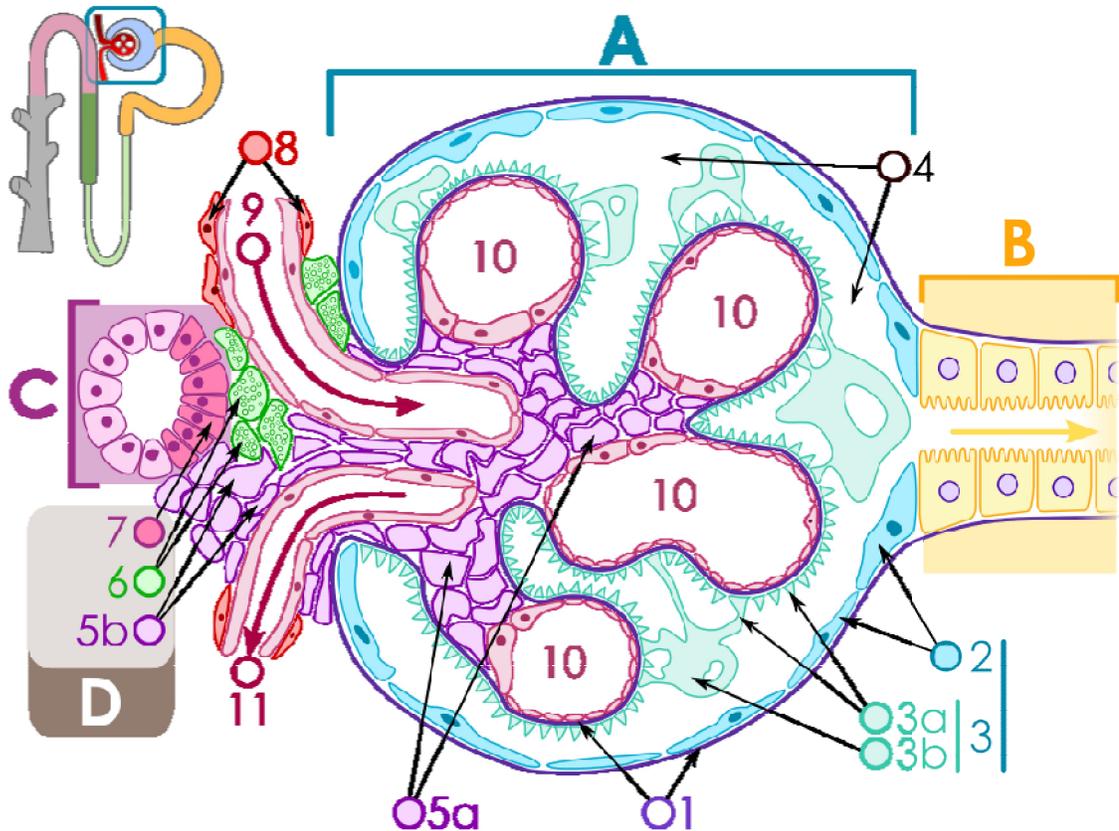


Figure 1-3. Diagramme structural d'un glomérule rénal. (Image libre de wikipedia.org, M.Komorniczak)

- | | |
|---|---|
| A – Glomérule rénal | 4. Chambre urinaire |
| B – Tubule proximal | 5a. Mésangium – Cellules extraglomérulaire |
| C – Tube contourné distal | 5b. Mésangium – Cellules intraglomérulaire |
| D – Appareil juxtaglomérulaire | 6. cellules granuleuses de l'appareil juxtaglomérulaire |
| 1. Membrane basale glomérulaire | 7. <i>Macula densa</i> |
| 2. Capsule de Bowman – couche pariétale | 8. Myocytes lisses |
| 3. Capsule de Bowman – couche viscérale | 9. Artériole afférente |
| 3a. Pédocelles du podocyte | 10. Anses capillaires |
| 3b. Podocyte | 11. Artériole efférente |

1.1.2.1 Le glomérule

Les corpuscules rénaux sont composés d'un glomérule entouré de la capsule de Bowman. Le glomérule peut être considéré au premier abord comme un ensemble de capillaires alimenté par une artériole afférente de la circulation rénale. L'eau ainsi que les minéraux présents dans le sang sont ainsi filtré dans la capsule de Bowman par l'effet de la pression sanguine, formant un filtrat. Il est à noter qu'environ 20% du plasma de la circulation rénale sera filtré à travers les

glomérules à chaque passage dans la capsule de Bowman. Le reste du liquide sanguin sera reconduit dans les artérioles efférentes et retournera dans la circulation sanguine.

1.1.2.2 La barrière de filtration rénale

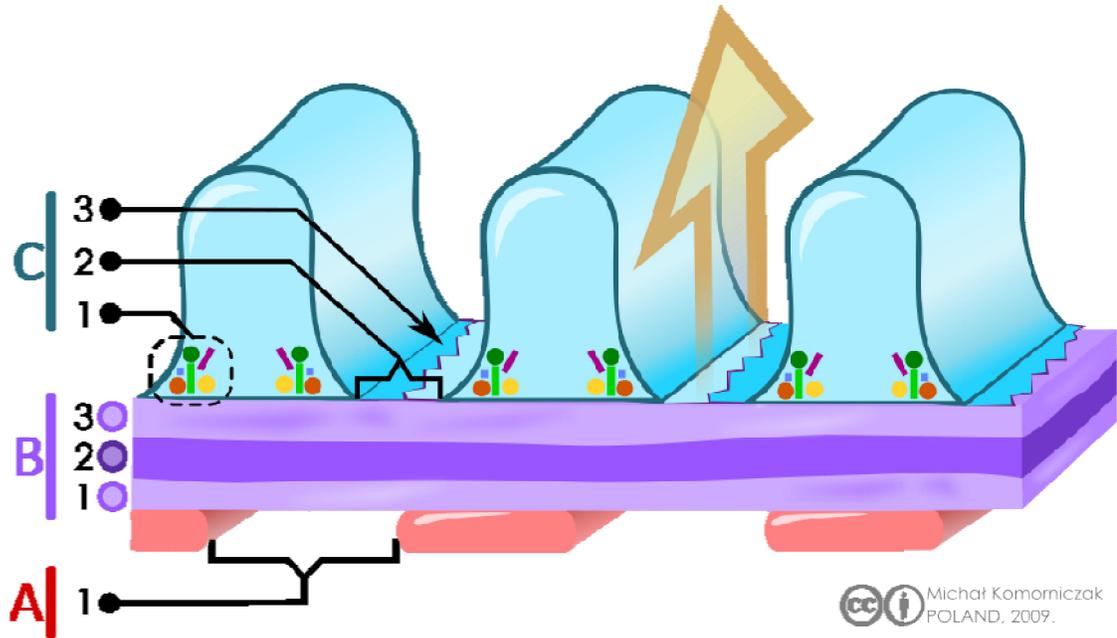


Figure 1-4. La barrière de filtration rénale. (Image libre de wikipedia.org, M.Komorniczak)

A. Les cellules endothéliales du glomérule. 1. Pores (fenestrés). B. Membrane basale glomérulaire: 1. lamina rara externa 2. lamina densa 3. lamina rara interna C. Podocytes: 1. Protéines enzymatiques et structurales 2. Fentes de filtration 3. Diaphragme

C'est en passant à travers l'enveloppe glomérulaire que les composés sanguins seront filtrés. En premier lieu, le filtrat traversera la membrane basale glomérulaire, puis les podocytes qui forment la barrière de filtration rénale avant de déverser dans la région du tubule proximal. Il est à noter que les cellules endothéliales des glomérules ne sont pas considérées comme faisant partie de la barrière de filtration puisque ceux-ci contiennent des ouvertures assez larges pour permettre le passage de toute molécule plus petite qu'un globule rouge [4].

1.1.2.3 La membrane basale glomérulaire

D'une épaisseur d'environ 250-300nm, la membrane basale glomérulaire (MGB) contient trois épaisseurs distinctives. La lamina rara externa située près des podocytes, la lamina densa au centre et la lamina rara interna près des cellules endothéliales glomérulaires. La membrane basale glomérulaire est composée de nombreux glycoaminoglycans négativement chargés (tel que le sulfate d'héparan) qui, en chargeant négativement la membrane basale, préviennent le passage de protéines vers la capsule de Bowman.

1.1.2.4 Les podocytes

Les podocytes sont des cellules uniques, très spécialisée, complètement différenciées et situées dans les glomérules rénaux [5]. Une caractéristique clé de la structure des podocytes sont les processus des pédicelles, ces organelles qui connectent les podocytes à la membrane basale glomérulaire via les intégrines et les dystroglycans. L'action des pédicelles, de la membrane basale et des cellules endothéliales fenestrées permet de former la barrière de filtration glomérulaire qui s'assure de la filtration de l'eau et de solutés, tout en prévenant la perte d'albumine dans l'urine.

Les corps cellulaires des podocytes contiennent les noyaux cellulaires, le réticulum endoplasmique, les mitochondries et l'appareil de Golgi. Ce corps cellulaire peut parfois dépasser de la membrane basale dans l'espace urinaire. Ce phénomène est dû à une réorganisation topographique qui se manifeste par le détachement des podocytes dans le sédiment urinaire, ce que l'on retrouve dans différents cas de diabète.

La configuration morphologique unique des podocytes est due à un cytosquelette bien développé, composé de filaments d'actine associés à des protéines incluant la myosine, l' α -actinine, la taline et vinculine. Ce cytosquelette joue ainsi un rôle essentiel dans la liaison entre les podocytes et la membrane basale [6, 7]. De plus, dans le glomérule mature, les podocytes continuent d'exprimer des protéines de la membrane basale, ce qui inclut collagène IV, laminine, entactine, agrine et perlecan [8].

La jonction cellulaire entre les podocytes est une structure unique connue sous le nom de fente de filtration et qui est recouverte par un mince diaphragme. Celui-ci est constitué de protéines telles que la néphrine, podocine, P-cadhérine, mFAT1, neph1 ainsi que de protéines associées telles que CD2AP. La structure et la fonction de la barrière de filtration glomérulaire est dépendante des interactions de ce cadre de protéines. La néphrine en particulier, une protéine transmembranaire de 180kDa, est seulement exprimée dans les glomérules que par les podocytes, et joue un rôle en association avec ZO-1 et CD2AP afin de conférer à la fente de filtration ces caractéristiques [9-11].

1.1.2.5 Les cellules mésangiales intraglomérulaires

Les cellules mésangiales intraglomérulaires sont localisées dans les matrices mésangiales du corpuscule rénal. Elles permettent, par leurs propriétés contractiles, la régulation du flot sanguin des capillaires glomérulaires. Aussi, elles contribuent à la formation de la matrice extracellulaire (ECM) par sécrétion de protéines telle que fibronectine et collagène IV. De plus, elles ont une fonction de phagocytose des cellules mésangiales intraglomérulaires. Les composés de la GBM et des immunoglobines peuvent être aussi phagocytés par les cellules mésangiales [5].

1.1.2.6 Les tubules rénaux

Les tubules rénaux forment la deuxième partie du néphron, et peuvent être décomposés en trois principales parties : les tubules proximaux, les anses de Henle et les tubules contournés distaux [6, 7].

a) Le tubule proximal

Il est possible de différencier le tubule proximal en deux parties : le tubule proximal droit ou contourné. La caractéristique la plus distinctive des tubules proximaux est la présence d'une bordure « en brosse » sur la surface luminale des tubules due à la présence de microvilles. Ceux-ci permettent une augmentation de la réabsorption des tubules proximaux par une plus grande surface de contact vers le côté luminal. C'est ainsi que les tubules proximaux permettent la réabsorption quasi-totale du glucose et des acides aminés présent dans l'ultrafiltrat rénal, ainsi que la majorité de l'eau et des minéraux.

Les tubules proximaux contournés sont aussi responsable de la sécrétion d'ions d'hydrogène ou des molécules de créatinine dans le lumen, permettant leur évacuation dans l'urine. Les tubules proximaux contournés contiennent un nombre fixe de canaux permettant la réabsorption du glucose. Normalement, leurs nombre est suffisant pour permettre une réabsorption totale, mais dans certaines conditions comme le diabète, le niveau de glucose dans l'ultrafiltrat est si élevé que les molécules de glucose seront sécrétées dans l'urine, une condition nommée glycosurie.

b) L'anse de Henle

Relié au tubule proximal, l'anse de Henle est une structure qui peut être divisée en quatre parties : la branche descendante, la branche ascendante mince, la branche ascendante épaisse médullaire et la branche ascendante épaisse corticale. Cette structure rénale est responsable, par la composition spécifique en canaux ioniques et aqueux de chaque partie, de la concentration des urines [8].

c) Les tubules distaux

Les tubules contournés distaux constituent le segment final des néphrons. Ceux-ci réabsorbent une certaine portion de l'eau et des ions de sodium. La quantité réabsorbée dépendant du nombre de canaux aqueux présent à la surface basale et apicale de ces tubules.

d) L'appareil juxta-glomérulaire

L'appareil juxta-glomérulaire (AJG) est un segment unique du néphron localisé dans le cortex rénal, situé là où les artérioles afférentes et les tubules distaux contournés se rejoignent [9, 10]. L'AJG a comme rôle de réguler la formation du filtrat ainsi que la pression sanguine systémique. Il est composé des cellules juxta-glomérulaires, de cellules de la macula densa ainsi que de cellules mésangiales extraglomérulaires. Les cellules juxta-glomérulaires sont en mesure de détecter une baisse de la pression sanguine systémique et peuvent sécréter l'hormone de la rénine, ce qui activera le système rénine-angiotensine et causera une augmentation de la pression sanguine. Cela s'effectue par une détection de la concentration en sodium du filtrat; lorsque le niveau de sodium est trop bas, la macula densa stimulera les cellules juxta-glomérulaires afin qu'elles sécrètent de la rénine qui favorisera l'excrétion de potassium et la réabsorption de sodium, entraînant une hausse de la pression sanguine.

Tableau 1-1. La réabsorption de différentes molécules biologiques dans les reins.

Substance	Réabsorption
Glucose	Le glucose est normalement presque entièrement réabsorbé au niveau des tubules proximaux
Protéines, et acides aminés	Toutes ces molécules sont réabsorbées au niveau des tubules proximaux
Urée	Cette substance régule l'osmolarité urinaire. Elle est réabsorbée passivement au niveau du tubule proximal et dans les tubules collecteurs, mais sécrétée dans l'anse de Henle
Sodium	Majoritairement réabsorbé au niveau du tubule proximal (65%) et dans l'anse de Henle (25%)
Chloride	Réabsorbée de façon passive avec le sodium à travers les canaux symporteurs Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ dans les tubules proximaux et l'anse de Henle
Eau	Réabsorption par les canaux aquaporines
Bicarbonate	Réabsorption par les tubules proximaux, l'anse de Henle et les tubes collecteurs
Protons	Utilise les ATPases vacuolaires
Potassium	Majoritairement réabsorbé au niveau du tubule proximal (65%) et dans l'anse de Henle (25%)

1.1.3 Les aquaporines et leurs rôles dans le rein

1.1.3.1 Le transport aqueux par les aquaporines

Pendant de nombreuses années, les scientifiques ont pensé que le transport de l'eau à travers les membranes cellulaires était principalement dû à la diffusion, mais différentes observations venaient contredire cette hypothèse, notamment :

- i. Le transport aqueux par osmolarité à travers les membranes des globules rouges est beaucoup trop rapide pour être simplement expliqué par la diffusion.
- ii. Des composés à base de mercure parviennent à inhiber de façon réversible cette perméabilité à travers la membrane des globules rouges et des tubules proximaux [11].
- iii. Des études d'inactivation par radiation de la membrane de bordure en brosse des reins ou celle des globules rouges démontraient l'existence de canaux médiateurs de la perméabilité aqueuse [12, 13].

Différentes protéines jugées comme candidates ont donc sans succès été proposées afin d'expliquer ces phénomènes, jusqu'à la découverte de la première protéine de la famille des aquaporines par Peter Agre.

C'est durant les années 1991 à 1994 que Peter Agre fit la démonstration évidente de l'expression des canaux aquaporines. Originellement intéressé par l'isolation de l'épitope relié au facteur Rh dans les globules rouges, il réussit à isoler dans ceux-ci une protéine inconnue, qui apparaissait jouer un rôle de transport. Celle-ci semblait posséder 6 hélices alpha transmembranaires, et fut nommé CHIP28 (pour Channel-forming integral protein of 28kD). Suite à la détermination de sa composition et séquence de ADNc [14], l'ARNc de cette protéine fut injecté dans des oocytes de xénopes dans le but de confirmer, par l'expression de cette protéine, l'hypothèse que celle-ci pourrait constituer le canal responsable du transport aqueux dans les globules rouges [15]. Les oocytes injectés avec l'ARNc démontraient ainsi une grande

perméabilité aqueuse, possiblement inhibée par des agents à base de mercure, tout comme la protéine présumée responsable du transport aqueux. Cependant, afin de démontrer hors de tout doute le rôle de CHIP28 dans le transport de l'eau, cette protéine fut purifiée à la surface de membranes lipidiques artificielles. Cette membrane devint ainsi beaucoup plus perméable à l'eau, un phénomène encore une fois inhibé par des agents au mercure [16]. Cela confirma hors de tout doute la pertinence de CHIP28 comme transporteur aqueux. Peu de temps après, la localisation de cette protéine par l'utilisation d'anticorps démontra que CHIP28 n'était pas seulement exprimé dans les globules rouges, mais aussi à la surface des membranes en brosse des tubules proximaux, ainsi que sur les segments descendants de l'anse de Henle [17], où s'effectue une grande partie de la réabsorption aqueuse du rein.

La première de ces molécules découverte dans les globules rouges fut donc ainsi renommée plus tard Aquaporine 1 (AQP1). Aujourd'hui, cette famille de canaux tétramériques comprend de nombreux membres, dont au moins six sont exprimés dans diverses régions du rein.

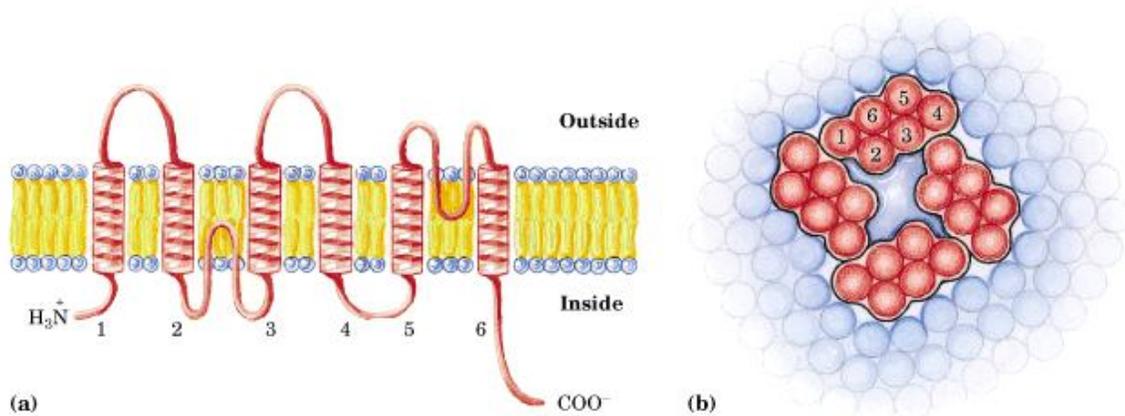


Figure 1-5. Structure des aquaporines. [18]

1.1.3.2 Réabsorption aqueuse et AQP1

Dans le rein, les tubules proximaux et la paroi de la branche descendante de l'anse de Henle sont responsables pour environ 85% de la réabsorption aqueuse du filtrat glomérulaire. Ces régions sont aussi celles qui expriment fortement l'aquaporine 1 dans leurs parois, augmentant ainsi la concentration osmotique du filtrat par un mouvement de transport passif de l'eau qui, au moment du passage dans l'anse de Henle, aura pour but de créer un contre-courant osmolaire favorisant la récupération des ions présents en solution. Cette sélectivité de l'aquaporine 1 pour les molécules d'eau est ainsi particulièrement importante afin de concentrer l'urine. Il est à noter que les membranes des artérioles rénales expriment aussi ces canaux AQP1, dans laquelle ils servent à faciliter le transport aqueux et l'évacuation des ions (« washout »).

Afin de mieux comprendre le rôle *in vivo* des AQP1, des modèles animaux de souris « knockout » pour cette protéine ont été générés [19]. En condition normale, ces animaux ne semblent pas

éprouver de difficultés si ce n'est de la perméabilité osmotique rénale qui est beaucoup plus basse que chez les souris contrôles. Cependant, ces souris KO sont particulièrement affectées par une privation d'eau. En effet, suite à un manque d'eau, l'osmolarité urinaire des souris AQP1-KO reste basse (autours de 650 mOsm – signifiant une perte d'eau importante), alors que celle des souris contrôles est monte au delà de 2500mOsm. Puisque l'injection de desmopressine (un agoniste des récepteurs V2 de la vasopressine) n'a aucun effet sur l'osmolarité urinaire des souris AQP1-KO, on peut conclure que les problèmes de réabsorption de l'eau associés avec la perte de AQP1 est due aux reins et non pas à la sensibilité des osmorécepteurs centraux.

Chez l'humain, des individus souffrant de déficience pour AQP1 ont été étudiés [20, 21]. Ceux-ci présentent une mutation sur le chromosome 7 colocalisée avec l'antigène sanguin de Colton. Comme pour le modèle animal, ces individus ne présentent généralement aucune conséquence clinique de cette condition, bien qu'ils ne soient pas capables d'une concentration urinaire équivalente à un sujet normal. Une différence majeure avec le modèle animal apparaît cependant car les sujets, lorsque soumis à une privation d'eau, ont un taux de filtration glomérulaire normal, en contraste avec les souris AQP1-KO. De plus, ceux-ci ne souffrent pas de polyurie. Cela suggère que chez l'humain, la déficience d'AQP1 est compensée dans les tubules proximaux. Cependant, l'incapacité de ces individus, lors de privation d'eau, de pouvoir générer une concentration urinaire comparable à celle d'individus normaux semble indiquer que l'absence d'AQP1 continue d'avoir un certain effet sur la réabsorption aqueuse au niveau de l'anse de Henle ou des artérioles rénales.

1.1.3.3 Aquaporine 2

Dans le rein, les canaux AQP2 se retrouvent principalement dans le segment distal, sur le pôle apical de la membrane du canal collecteur. Leur fonction première est de réabsorber entre 10-20% du filtrat glomérulaire qui n'a pas été capté par les tubules proximaux.

C'est aussi dans ces cellules que s'effectue la régulation de la réabsorption aqueuse de ces tubules par la vasopressine (hormone antidiurétique ou ADH), sécrétée par l'hypophyse postérieure en réponse aux changements de l'osmolarité plasmique détecté par les osmorécepteurs de l'hypothalamus.

Suite à sa sécrétion et transport dans le rein, l'ADH ira se lier aux récepteurs V2 présents sur la membrane basolatérale des cellules du canal collecteur. Cette liaison entraînera une réaction de cascade biochimique impliquant la modification d'une protéine Gs couplée au récepteur V2 en sa forme active G α s, qui se liera à l'adénylate cyclase. Cette protéine générera ensuite des molécules de cAMP à partir d'ATP, qui agiront comme second messenger afin d'activer les protéines kinase A (PKA) liées aux vésicules endocytiques contenant les canaux AQP2. Ces vésicules seront ensuite transportées vers le côté luminal des cellules par un moteur impliquant des filaments d'actine. Par la suite, la fusion de ces vésicules avec la membrane luminale permettra donc ainsi d'amener un plus grand nombre de canaux AQP2 qui favoriseront la réabsorption d'eau (voir figure ci-dessous - nephrohus.org).

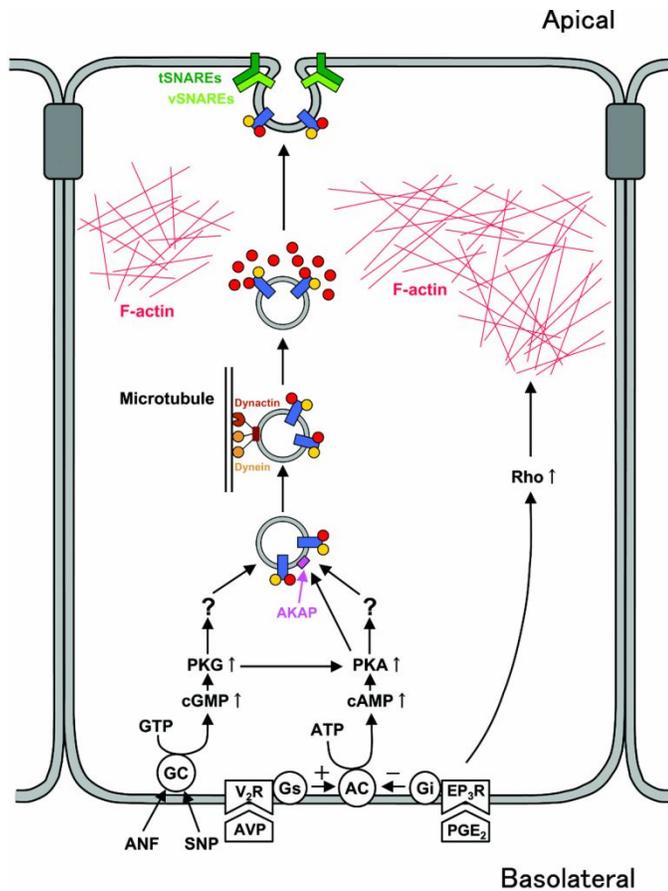


Figure 1-6. Le transport aqueux et la régulation des aquaporines 2. [22]

Dans les modèles d'études animales, les rats Brattleboro démontrent une déficience dans la génération d'ADH qui cause une diminution de l'expression de l'AQP2 pouvant être renversée par l'injection d'ADH, confirmant le lien entre ces deux protéines. Chez la souris, la délétion complète du gène AQP2 cause la mort par polyurie au niveau néonatal, rendant toute étude de délétion complète difficile à réaliser. Cependant, il a été possible d'établir une lignée de souris dont le gène AQP2 est excisé suivant l'injection de Tamoxifène (qui agit dans ces souris comme un agent délétère par activation de Cre-recombinase) [23]. Dans ce modèle, on a observé une baisse significative de l'osmolarité urinaire suite à la délétion de AQP2, mais celle-ci n'a pas augmenté suivant une privation d'eau, démontrant l'importance de ces canaux pour la concentration urinaire.

Chez l'humain, la déficience du système relié autour du gène AQP2 a des conséquences cliniques radicales. Celle-ci se produit en particulier à travers le diabète insipide néphrogénique (NDI), une maladie caractérisée par une polyurie massive combinée avec une polydipsie. L'urine de patients souffrant de NDI est très peu concentrée en solutés, démontrant chez l'humain l'importance de l'AQP2 pour la régulation de la concentration urinaire. Il est à noter que le NDI n'est qu'un type parmi plusieurs types de diabètes insipides (par exemple, le diabète insipide central, qui cause une diminution de la sécrétion d'ADH).

Afin de confirmer le diagnostic de NDI chez les patients démontrant les symptômes classiques de cette maladie, on peut procéder à des tests de concentration d'ADH sanguin, qui démontreraient un taux élevé de cette hormone chez les patients atteints. Les patients peuvent aussi subir un test de privation d'eau, durant lequel les patients atteints de cette maladie ne démontreront pas d'élévation de l'osmolarité urinaire, mais auront un taux plus élevé d'osmolarité sanguine étant donné la perte d'eau non compensée. À la fin de ces tests, des injections de desmopressine sont effectuées et permettront de classer le type de DI présent, car des patients atteints de NDI resteront insensibles à cette injection et ne démontreront pas d'augmentation de l'osmolarité urinaire.

Il existe aussi différentes formes de NDI. Cette maladie peut être acquise suite à différentes maladies telles que l'amyloïdose et des reins polykystiques, ou même suite à la prise de médicaments tels que le Lithium. Une autre forme de NDI n'est pas acquise, mais plutôt héritée. La plus commune de celles-ci est causée chez les hommes par une mutation du récepteur V2 de la vasopressine situé sur le chromosome X (« X-linked NDI »), dans lequel plus d'une trentaine de mutations différentes ont été caractérisées [24].

Une forme autosomale récessive du NDI existe aussi, causée par une mutation du gène AQP2, dont les protéines mutantes malformées ayant une mauvaise conformation restent dans le réticulum endoplasmique et ne rejoignent pas la membrane apicale [25]. La forme autosomale dominante du NDI est très rare et consiste en une mutation du gène AQP2 dont les protéines non-fonctionnelles atteignent néanmoins une conformation leur permettant de s'intégrer aux autres protéines AQP2, créant des canaux oligomères incapables de fonctions correctes [26].

1.1.3.4 Aquaporine 3 et 4

Si les protéines AQP2 se retrouvent sur la surface apicale des cellules des canaux collecteurs, ces types d'aquaporines AQP3 et AQP4 se retrouvent sur le côté basolatéral de ces cellules et complètent ainsi AQP2. Dans cette région rénale, ces deux protéines ont une fonction similaire afin de permettre la sortie de l'eau à travers la membrane basale du tube collecteur, bien qu'elles ne soient pas régulées par le même mécanisme.

Les canaux AQP3 ne sont pas spécifiques pour l'eau, mais peuvent aussi transporter du glycérol ou de l'urée, ce qui peut les classer dans la sous-famille des aquaglycéroporines. Ces canaux peuvent donc permettre un efflux d'urée en plus de leur rôle de transport aqueux traversant la membrane apicale par les canaux AQP2. Il n'est donc pas surprenant que les canaux AQP3 soient surexprimés dans les cas de privation d'eau, et que des injections de desmopressine augmentent aussi le nombre de canaux AQP3 [27].

Dans un modèle animal de souris, une délétion de AQP3 entraîne un phénotype de polyurie combiné avec polydipsie, qui s'aggrave en cas de double invalidation AQP3/AQP4 -/- [28]. Cette souris mutante présente donc des symptômes similaires à ceux observés dans le NDI, mais la cause principale de cette condition est due à une diminution forte de la perméabilité aqueuse de la membrane basale des tubes collecteurs. Chez l'humain, certaines mutations sur le gène

AQP3 ont été découvertes, et correspondent avec l'antigène sanguin GIL [29]. Dans les globules rouges de ces patients, les études ont démontré que le transport aqueux et de l'urée étaient normaux, mais que le transport de glycérine était affecté par cette mutation.

Les canaux AQP4 sont sélectifs pour l'eau, mais contrairement aux autres aquaporines aqueuses, ceux-ci ne sont pas affectés par des molécules reliées au mercure. Des souris avec délétion de ces canaux ont souffraient d'une légère capacité de la concentration urinaire, mais présentaient en général un phénotype normal [30]. Chez l'humain, des mutations sur ce gène ont été observées, mais ont été plutôt reliées avec des œdèmes cérébraux [31].

1.1.3.5 Aquaporine 7

Exprimée uniquement sur la membrane apicale des tubules proximaux, les protéines AQP7 font partie de la famille des aquaglycéroporines. La génération de souris avec délétion pour ce gène a démontré que celles-ci, bien que obèses et résistantes à l'insuline, avaient un phénotype rénal normal, si ce n'est d'une légère diminution de la perméabilité aqueuse de la membrane en brosse des tubules proximaux [32]. Chez l'humain, l'expression d'AQP7 semble diminuée chez les sujets souffrant d'obésité, mais n'était pas affecté par le diabète de type 2 [33].

1.1.3.6 Aquaporine 11

Localisé à l'intérieur des tubules proximaux, le rôle exact joué par cette isoforme n'est pas encore complètement défini. Il a été démontré que des modèles animaux de souris avec délétion pour ce gène meurent très jeunes suivant la formation de kystes rénaux reliés à l'insuffisance rénale [34]. Cela illustre donc que cette isoforme joue un rôle essentiel dans le maintien des fonctions rénales.

1.2 Les maladies rénales chroniques

1.2.1 Les changements causés par les pathologies rénale

Il existe différentes causes aux changements histologiques reliés aux maladies rénales. Cependant, les altérations pathologiques reliées à l'insuffisance rénale sont similaires : sclérose glomérulaire et atrophie des tubules auxquels ils sont reliés. D'autres caractéristiques communément observées incluent des tubules avec un lumen dilaté, la fibrose tubulo-interstitielle, des infiltrations de cellules inflammatoires. L'hypertension et l'ischémie rénale ont aussi des effets sur les artéioles rénale, qui deviennent plus épaisses et réduisent le diamètre de leurs lumen [35, 36].

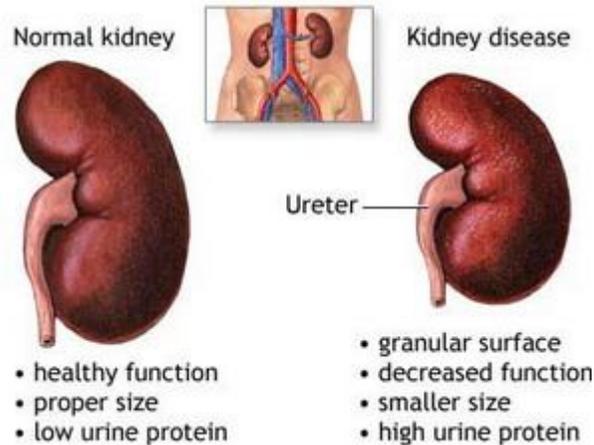


Figure 1-7. Les changements observés dans le rein par les maladies rénales. [37]

En général, les reins malades sont pâles, petits et durs, en plus d'avoir un volume cortical plus petit. La démarcation entre le cortex et la médulla n'est plus aussi claire que dans une condition normale. De plus, dans les cas d'insuffisance rénale, la taille des reins est encore plus petite, et la surface granuleuse avec des cicatrices au niveau cortical [38].

1.2.2 Les maladies rénales chroniques et le taux de filtration glomérulaire

Peu importe la cause, les dommages rénaux et les pertes de fonction ayant une durée de plus de trois mois sont nommés maladies rénales chroniques (CKD, *chronic kidney disease*), qui correspond à une perte progressive des fonctions rénales [39]. L'analyse du taux de filtration glomérulaire (GFR, *glomerular filtration rate*) est la méthode de mesure de la fonction rénale la plus commune. Celle-ci permet ainsi de déterminer le niveau de progression d'une maladie rénale. Les CKD peuvent être divisées en cinq étapes basées sur le GFR, avec chaque étape subséquente correspondant à une baisse graduelle de la GFR. D'après l'institut national du diabète, des maladies digestives et rénales, la cinquième étape peut aussi se référer comme une insuffisance rénale, équivalente à une perte totale ou presque totale des fonctions rénales [40].

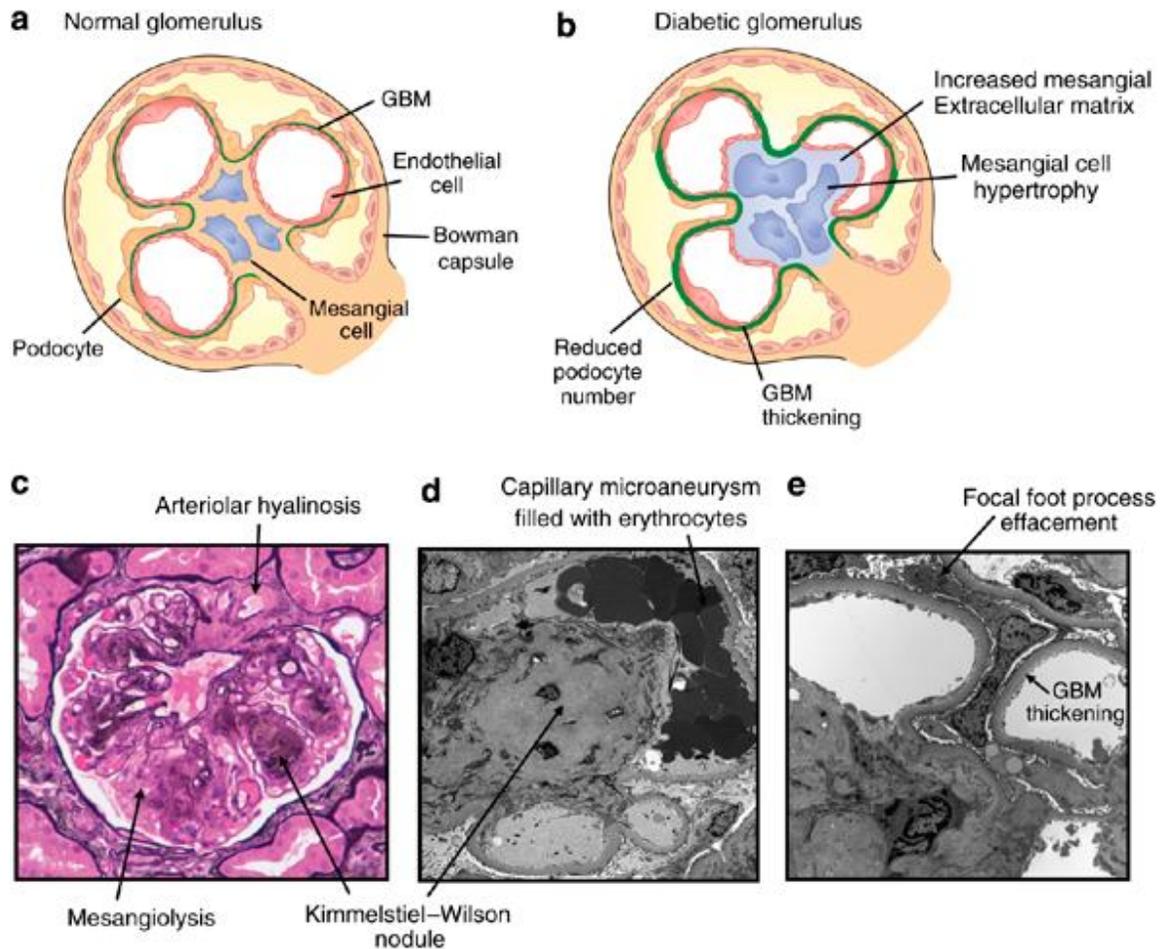


Figure 1-8. Les changements glomérulaires et des cellules mésangiales dans les maladies rénales. (a) Anatomie glomérulaire du rein en santé (b) Les changements morphologiques qui caractérisent les maladies telles que le diabète incluent un épaississement de la membrane basale glomérulaire, l'expansion des cellules mésangiales et les changements à la structure des podocytes (c) Microscopie démontrant les changements mésangiaux tels que l'expansion de l'architecture cellulaire. De plus, les artérioles rénales prennent de l'expansion dans ces conditions. (d) Microscopie électronique montrant les changements mésangiaux, l'expansion des capillaires et la formation de micro-aneurismes (e) Microscopie électronique montrant les changements de la barrière de filtration glomérulaire dans les maladies rénales, telles que l'épaississement de la membrane basale et les modifications des podocytes. [41]

Les patients souffrant d'insuffisance rénale ont ainsi besoin de dialyse ou d'une transplantation rénale afin de survivre. Cependant, comme le GFR tend à diminuer avec l'âge, il est important de prendre cette notion en note lors d'une évaluation des fonctions rénale [42].

1.2.3 Incidence, prévalence et causes de l'insuffisance rénale

L'incidence, définie comme le nombre de nouveaux patients diagnostiqués dans une population spécifique durant une période de temps fixe. La prévalence indique le nombre de patients atteints dans la population à un moment donné. Or l'incidence et la prévalence de l'insuffisance rénale continue de croître au niveau mondial. En 2005, environ 1,9 millions de personnes recevaient des traitements de remplacement rénal (RRT), bien que ce chiffre ne soit pas complètement précis en raison de différences entre les différents registres mondiaux [43].

Aux États-Unis, le nombre de patients sous dialyse a triplé ces 20 dernières années, passant de 123 000 en 1989 à 366 000 en 2007. Si les taux de mortalités reliés à la dialyse sont restés constant durant les années 90, ceux-ci ont diminué depuis les années 2000, et ce malgré une augmentation considérable du nombre d'hospitalisation reliées à des infections découlant des traitements. [44]

1.2.4 Le diabète mellitus et le rein

Le diabète mellitus est responsable pour environ le tiers des nouveaux cas d'insuffisance rénale chronique (IRC) et constitue la cause la plus commune de IRC aux États-Unis et au Canada, où environ la moitié des nouveaux cas sont reliés au diabète sucré [45].

Des centaines de milliers de personnes sont présentement atteintes du diabète, et environ sept millions de nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année [46]. Cette maladie est caractérisée par une hyperglycémie chronique qui accompagne différentes pathologies micro et macro-vasculaires. Ces complications finissent par affecter les petits vaisseaux sanguins, ce qui produit de la rétinopathie, de la néphropathie et de la neuropathie. Le processus central de ces événements est caractérisé par l'athérosclérose, ce qui entraîne une réduction des parois artérielle, provoquant des complications telles que les maladies coronariennes ou des infarctus. Différentes études ont été effectuées afin de mieux déterminer la relation entre l'hyperglycémie et les complications diabétiques [47].

1.3 Les ROS et le stress oxydatif

L'oxygène moléculaire est essentiel pour tous les organismes aérobiques. Retrouvé dans la mitochondrie, le métabolisme énergétique aérobique est dépendant de la phosphorylation oxydative, un phénomène qui s'effectue à travers l'énergie d'oxydoréduction du transport d'électrons mitochondriaux et qui est converti en liens phosphate contenus dans l'ATP.

L'oxygène (O_2) sert de récepteur final d'électrons dans la réaction qui catalyse la réduction d' O_2 en H_2O . Durant ces transferts d'électron, certains métabolites très réactifs de l'oxygène peuvent être formés à cause d'une réduction partielle. Ces métabolites incluent des anions superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et en présence d'ions de métaux de transitions, il est possible qu'un nombre encore plus élevé de radicaux hydroxyles soient formés. Ces métabolites partiellement réduits de l'oxygène sont ainsi nommés espèces réactives oxygénées, étant donné leur réactivités très élevées par rapport à celles de l'oxygène [48].

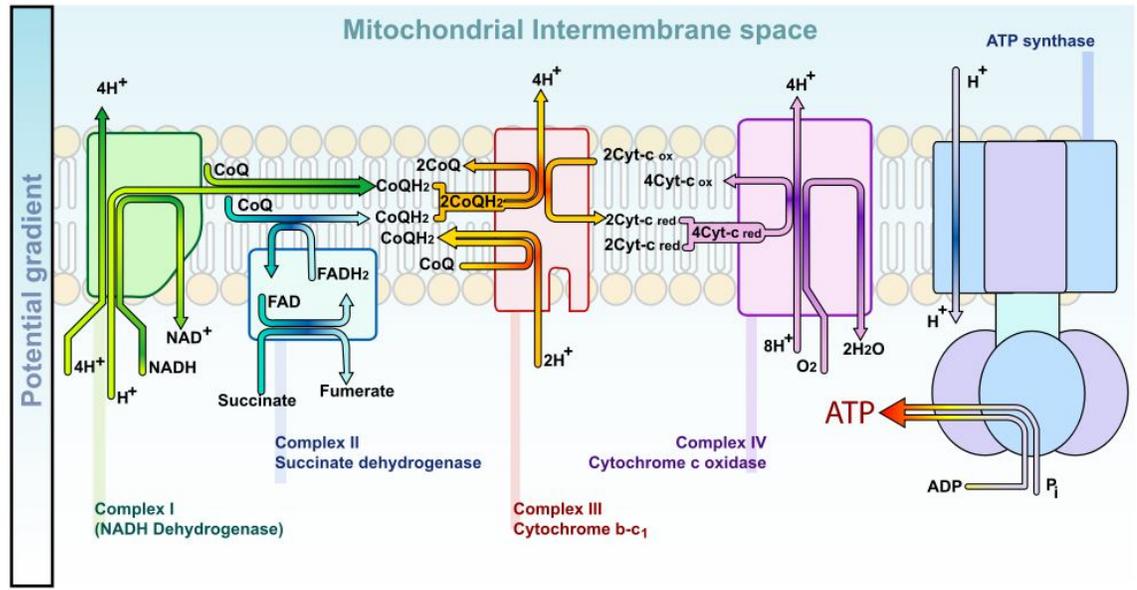


Figure 1-9. Le transport des électrons dans la mitochondrie permettant la synthèse de l'ATP. (Image libre de wikipedia.org, Mariana Ruiz Villarreal)

En certaines conditions, les ions superoxydés peuvent réagir avec l'oxyde nitrique (NO) afin de produire une quantité significative d'anions peroxynitrites, un agent oxydatif potentiel : $\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{ONOO}^-$. En effet, les phagocytes possèdent une enzyme oxydase sur la membrane plasmique capable de générer des anions, ce qui génère des ROS requis pour une réponse immunitaire efficace. Les ROS générés par des cellules non-phagocytaires ont traditionnellement été considérés comme des produits toxiques du métabolisme à cause de leur potentiel à endommager des lipides, à oxyder les protéines et à causer des mutations dans l'ADN. Autre que les mitochondries, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes et les NADPH oxydases sont aussi des sources de production de ROS. De plus, une variété de cytokines et de facteurs de croissances se liant à différents récepteurs sont reconnus comme étant capables de générer des ROS dans différents types de cellules non-immunitaires [48].

Différentes enzymes antioxydantes telles que les superoxydes dismutase réduisent les anions superoxyde en H_2O_2 , ou la catalase et la glutathione peroxydase, qui réduisent les H_2O_2 en H_2O , ce qui offre un rôle protectif contre les dommages induits par les ROS [49]. De plus, des molécules non-enzymatiques telles que la vitamine E, la vitamine C ou la glutathione jouent un rôle clé dans la balance de l'oxydation cellulaire. Ainsi, le stress oxydatif sera présent s'il existe une différence entre la production d'oxydants et la capacité cellulaire à prévenir ces dommages résultants de ce stress oxydatif.

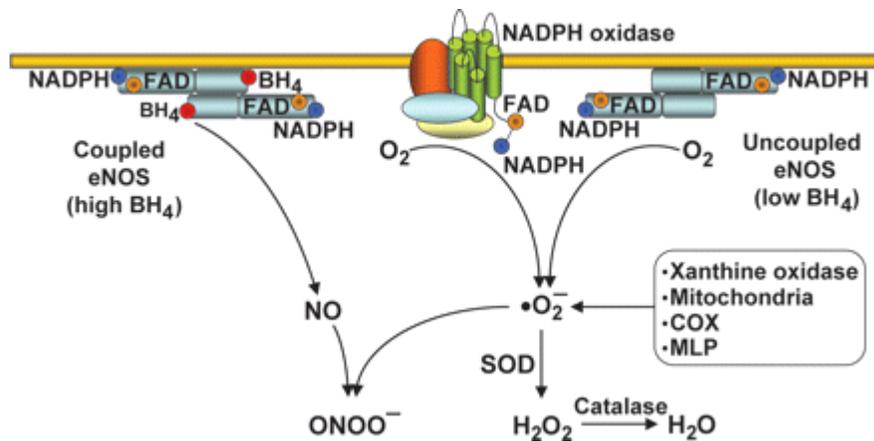


Figure 1-10. Production de ROS et NADPH. [50] Cette figure illustre la relation entre le NO et la formation de ROS à travers les protéines NADPH oxydase (Nox), qui impliquera la formation de superoxyde qui seront réduit par différentes enzyme en eau.

Le stress oxydatif cause des dommages aux structures cellulaires, aux acides nucléiques, aux lipides et aux protéines. Des radicaux hydroxyles peuvent réagir avec tous les composés des molécules de l'ADN, ce qui cause des dommages aux bases purines et pyrimidines ainsi qu'au squelette de désoxyribose, la formation de 8-OHdG étant un exemple typique d'une lésion de l'ADN par le stress oxydatif [51]. Des modifications permanentes du matériel génétique par les ROS pourraient ainsi être la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogénèse ainsi que d'autres processus pathologiques incluant le diabète. Les acides gras polyinsaturés qui sont des résidus des phospholipides sont aussi extrêmement sensibles à l'oxydation, et sont ainsi une autre cible de la génération de ROS. Le 4-hydroxynonanal, un produit à faible propriétés mutagènes est aussi un produit toxique majeur de la peroxydation des lipides [52]. Cependant, les protéines varient grandement dans leur susceptibilité au dommage oxydatif, par exemple, des protéines intactes sont beaucoup moins sensible à l'oxydation que des protéines mal repliées. Il faut noter que des modifications oxydatives des protéines augmentent leur susceptibilité à des attaques protéolytiques. Selon des estimations, le taux de protéolyse est décuplé suivant une exposition aux attaques par des radicaux superoxyde ou du peroxyde d'hydrogène [53]. En se basant sur les recherches de Stadtman, il a été possible de découvrir que les chaînes latérales des acides aminés résiduels des protéines, plus particulièrement des cystéines et des méthionines, sont susceptibles à l'oxydation par les ROS [54]. L'oxydation des résidus de cystéine peut en effet former des liens disulphiques mixés entre les groupes thiols des protéines et ceux des molécules riches en thiols, telles que les glutathiones (GSH). Aussi, une variété de processus intracellulaires sensibles au stress telles que les facteurs nucléaires KB (NF-KB), les MAP kinases p38, les kinases amino-terminales c-Jun et les kinases activées par le stress (JNK/SAPK), les hexoamines et autres, peuvent être activées, ce qui résultera en une augmentation de l'expression de nombreux gènes liés au dommage cellulaire, leur permettant de jouer un rôle majeur dans la progression de pathologies [49].

1.4 La néphropathie diabétique

1.4.1 Introduction : diabète et néphropathie

La néphropathie diabétique est la complication micro-vasculaire la plus commune du diabète sucré. Celle-ci se développe chez environ 40% des patients avec le diabète de type 1 et 10% des patients avec le diabète de type 2 (résistant à l'insuline). Les maladies rénales chroniques découlant du diabète sont associées avec des taux de morbidité et de mortalité plus élevés que les problèmes rénaux de patients vivant sans le diabète. La néphropathie diabétique est caractérisée par une insuffisance rénale progressive accompagnée d'hyperglycémie, d'albuminurie clinique (300mg/24h) ou de microalbuminurie (30mg/24h), d'hypertension, d'une baisse du taux de filtration glomérulaire et de risques élevés de maladies cardio-vasculaires [55]

La néphropathie diabétique est une maladie progressive qui demande plusieurs années pour se développer. En phase préliminaire, l'hyperfiltration glomérulaire et des taux d'excrétion plus élevés d'albumine urinaire (micro-albuminurie) sont des manifestations de la néphropathie diabétique. D'autres changements préliminaires observés dans les glomérules des cas de néphropathie diabétique incluent l'hypertrophie, l'épaississement de la membrane basale glomérulaire ainsi qu'une expansion et accumulation des protéines de la matrice extracellulaire telles que fibronectine, laminine et collagène [56]. Au cours de la progression de la néphropathie diabétique, de plus en plus de glomérules seront perdus et, en conséquence, le taux d'albumine excrété dans l'urine augmentera (macro-albuminurie). Au cours de la progression de la maladie, les reins des patients seront aussi marqués par de la glomérulosclérose, de la fibrose interstitielle ainsi que la progression vers les IRC.

Une des premières complications morphologiques observées dans la néphropathie diabétique est une expansion de l'aire des cellules mésangiales [57] causée en partie par une augmentation de l'expression des protéines de la matrice extracellulaire. Une autre condition préliminaire observée dans ND est l'épaississement de la membrane basale glomérulaire qui est normalement observée un an suivant le début du diabète de type 1 [58]. De plus, cet épaississement continue de progresser aux cours des ans, puisque l'augmentation de la synthèse de la matrice extracellulaire et une diminution moindre de son recyclage contribuent à une hausse du volume de la membrane basale glomérulaire. Dans les conditions diabétiques, les chaînes α_1 et α_2 de la collagène IV sont surexprimées dans les cellules mésangiales, alors que les chaînes α_3 et α_4 sont augmentées dans la membrane basale glomérulaire [59]. La déposition de collagène de type I et III dans le volume mésangial est associée avec une glomérulosclérose avancée qui ne se produit que tardivement (69). Ces événements tardifs incluent des changements vasculaires et des changements dans l'architecture tubulo-interstitielle et de la fibrose interstitielle [57, 60-63]. Ainsi, depuis sa description par Kimmelstiel et Wilson, la glomérulosclérose nodulaire a été considérée comme une des caractéristiques clés de la néphropathie diabétique [60].

Depuis la description initiale de ce syndrome, les efforts de recherche ont surtout été orientés vers la région mésangiale glomérulaire. L'hypothèse autour de ces efforts voulait que l'augmentation de la matrice mésangiale soit la lésion centrale responsable de la pathogénèse de la néphropathie diabétique. Cependant, des recherches récentes ont permis d'impliquer les podocytes glomérulaires comme étant un joueur majeur de la pathogénèse de la néphropathie diabétique [64, 65]. Ces découvertes permettent donc d'orienter la recherche vers la compréhension des fonctions des podocytes afin de prévenir et traiter cette maladie.

1.4.2 La pathogénèse de la néphropathie diabétique

Bien que la pathogénèse de la néphropathie diabétique ne soit pas entièrement expliquée, différents facteurs peuvent y être reliés comme, par exemple, les dommages cellulaires reliés à l'hyperglycémie. D'autres facteurs incluent une hausse de la formation des facteurs de glycation avancés, l'activation des PKC (Protein Kinase C), une augmentation de l'activités des facteurs de croissance, une augmentation de la formation des espèces réactives oxygénées, l'activation de cytokines (angiotensine II), une activation du mécanisme de la réductase de l'aldose et une baisse du contenu en aminoglycan des membranes basales.

1.4.3 Le rôle des podocytes dans la filtration glomérulaire

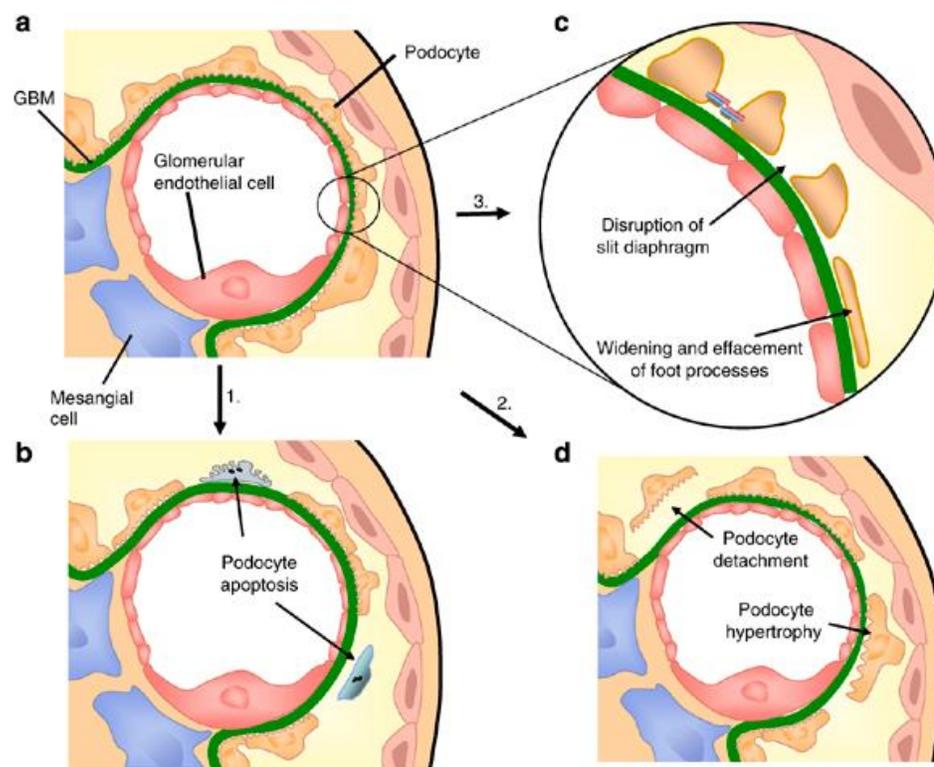


Figure 1-11. Anomalies des podocytes dans les maladies rénales. (a) Architecture normale des podocytes. (b) Apoptose des podocytes, qui permet la fuite de molécules telles que l'albumine. (c) Les cellules des podocytes peuvent adopter une configuration modifiée suite à l'apoptose ou le détachement de cellules. (d) L'hypertrophie des podocytes suivant un détachement de cellules résulte aussi en une diminution des activités de filtration. [41]

1.4.3.1 Les dommages des podocytes et le développement de la néphropathie diabétique

Les résultats de recherches indiquent que les anomalies de la structure et des fonctions des podocytes surviennent tôt dans le développement des maladies rénales liées au diabète [66]. L'intégrité fonctionnelle des podocytes est requise pour une barrière de filtration de taille suffisante, de charge correcte et maintenant la structure de nœud capillaire afin de contrebalancer la pression intra-glomérulaire. De plus, la synthèse et le maintien de la membrane basale glomérulaire et la production et la sécrétion de facteur de croissance vasculaire endothéliaux sont requis pour garantir l'intégrité des cellules endothéliales du glomérule. Une hypothèse indique que les dommages des podocytes ont un effet sur ces fonctions, ce qui peut résulter dans un cas de néphropathie.

1.4.3.2 Pertes de podocytes dans la néphropathie diabétique

Les podocytes sont des cellules complètement différenciées et incapables de se régénérer. En conséquence, la perte des podocytes peut induire des altérations permanentes de la barrière de filtration glomérulaire. Des études ont révélé que le nombre de podocytes par glomérule est réduit chez les patients souffrant de diabète sucré de type 1 et 2 [67, 68], et ce même malgré un taux d'excrétion d'albumine normal [69]. Par visualisation et quantification des podocytes et de la perte de la membrane basale, il a été démontré que le détachement des podocytes correspond avec les lésions retrouvées dans la néphropathie diabétique et la perte des fonctions rénales de patients diabétiques. Ces résultats confirment les données obtenues par différents modèles d'animaux diabétiques. Par exemple, chez le rat, il a été démontré que les podocytes détachés sont viables et peuvent s'attacher dans les expériences *ex vivo*, démontrant même une activité proliférative limitée [70]. Ces résultats suggèrent donc que le détachement des podocytes peut se produire même si l'apoptose ne se produit pas. Une diminution du nombre de podocytes pourrait donc résulter du détachement des podocytes de la membrane basale glomérulaire dans l'espace urinaire en plus de l'apoptose des podocytes.

Les expériences sur des modèles animaux tendent aussi à démontrer que le diabète est responsable pour une hausse de l'apoptose dans les podocytes. Il a été démontré par un tel modèle que l'apoptose des podocytes correspondait à une hyperglycémie dans différents modèles de souris diabétiques [71]. Dans ce modèle, l'augmentation du taux d'excrétion d'albumine urinaire coïncide avec l'apoptose des podocytes, mais précède les pertes significatives de podocytes des glomérules.

De plus, ces études démontrent un rôle pour l'augmentation des espèces réactives oxygénées (ROS) dans l'apoptose des podocytes, et la perte de podocytes observées *in vitro* et *in vivo*, ce qui suggère que la perte des podocytes représente un mécanisme précoce résultant au développement de la néphropathie diabétique. D'autres études effectuées sur des modèles d'animaux diabétiques ont démontré qu'une utilisation d'antioxydants permettait de réduire la perte et la diminution de la densité des podocytes, supportant le rôle joué par les ROS dans la perte des podocytes liée au diabète [72].

En plus du rôle des ROS, d'autres études permettent de déterminer d'autres mécanismes moléculaires des effets du diabète sur l'apoptose des podocytes. Comme il est généralement courant que le diabète soit caractérisé par une augmentation de l'activité de l'angiotensine II [73], une étude a ainsi démontré que la production d'angiotensine II induite par la production d'angiotensinogène par les podocytes et de récepteurs de l'angiotensine II de type I (AT₁R) est augmentée par le glucose, alors que les niveaux d'expression de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) et de rénine sont inchangées, et cela dans les modèles de diabète par culture cellulaire ou par modèles in vivo.

Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la génération d'angiotensine II par les podocytes exposés à une augmentation des niveaux de glucose est principalement due à une augmentation du substrat angiotensinogène, en relation avec une augmentation de l'expression des récepteurs AT₁R. Cela génère des effets qui augmentent l'activité de l'angiotensine II dans les podocytes. Ces recherches tendent aussi à supporter l'hypothèse que les mécanismes impliquant ACE ou non sont impliqués dans la production d'angiotensine II reliée à l'élévation du taux de glucose (voir figure ci-dessous).

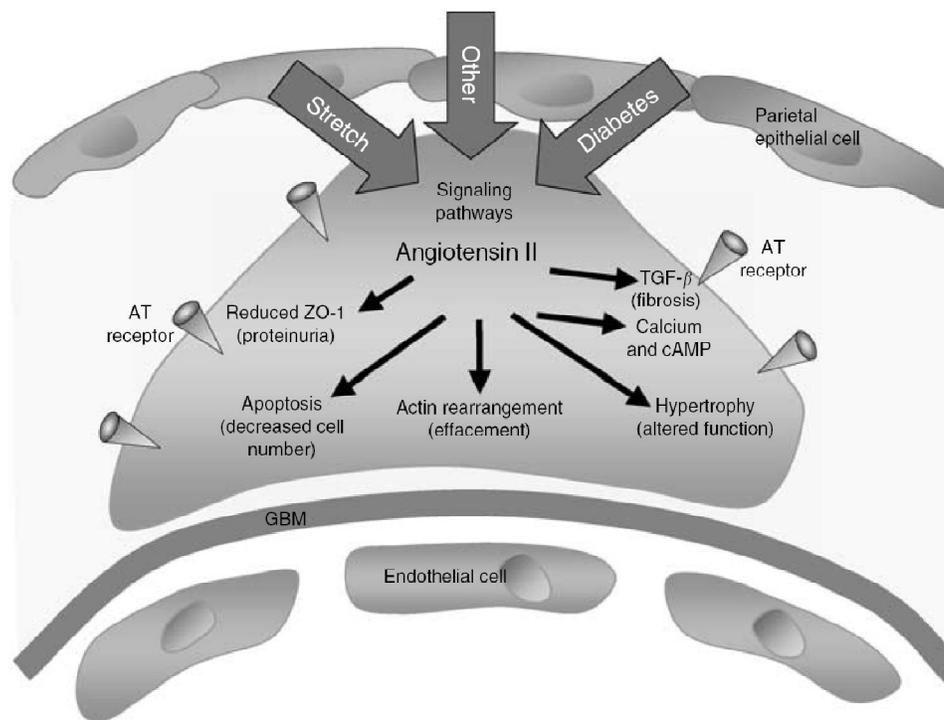


Figure 1-12. L'implication de l'angiotensine II dans le développement des changements des podocytes. [64]

L'angiotensine II induit aussi l'apoptose des podocytes dans les expériences ex-vivo à travers la médiation par le TGF-β1. Ainsi, il serait possible d'imaginer que l'augmentation de l'activité de TGF-β1 agit de concert avec une augmentation de l'activité de l'angiotensine II afin d'augmenter l'apoptose des podocytes dans le diabète.

1.4.3.3 Le diabète et la perte des processus des pédicelles

La perte des processus des pédicelles est une pathologie reconnue de la néphropathie diabétique. Cette perte peut être le résultat de dommages du diaphragme de la fente de filtration, d'altérations de la membrane basale des glomérules ou de changements dans les podocytes, tels que la dynamique du cytosquelette ou la neutralisation du domaine apical négativement chargé des podocytes. Il faut noter que cette perte de processus par les pédicelles et une réponse normale des podocytes à une insulte et n'est pas nécessairement reliée à la néphropathie diabétique.

Il est probable que différents types de dommages peuvent causer cette perte des processus des pédicelles à travers différents mécanismes de signalisation cellulaire. Dans le cas du diabète, une étude a permis de déterminer que l'hyperglycémie a un effet sur la protéine ZO-1, une protéine de jonction impliquée dans le bon fonctionnement du diaphragme de la fente de filtration. Ces résultats indiquent que, dans différents modèles animaux, le diabète est relié à une diminution de l'expression et de la distribution de la protéine ZO-1 de la membrane du podocyte vers le cytoplasme. De plus, l'expression et la phosphorylation de ZO-1 sont diminuées dans les cellules épithéliales glomérulaires de rat exposées à une élévation du taux de glucose. Ces résultats suggèrent que les altérations dans le contenu et la localisation de ZO-1 pourraient être reliées à la pathogénèse des pédicelles et la protéinurie reliée au diabète [74].

L'activation des protéines kinases p38 MAPK joue un rôle dans le maintien du cytosquelette d'actine en réponse au stress et à divers stimuli. Le mécanisme de signalisation de p38 MAPK permet la régulation et l'activation de la protéine réactive aux chocs de chaleur HSP25, qui se lie aux filaments d'actine et les stabilise, permettant de maintenir la forme cellulaire. Une étude a permis de démontrer que dans différentes cultures de podocytes, le taux de glucose permet l'augmentation de la phosphorylation de p38 MAPK et de HSP25, ce qui protège les podocytes des changements du cytosquelette d'actine induit par le glucose [75]. Cette étude a aussi permis de démontrer que dans un modèle animal de diabète de type 1, l'activation précoce des p38MAPK est associée à une augmentation de la phosphorylation de HSP25, de la maintenance du cytosquelette d'actine, ainsi que des taux d'albuminurie normaux.

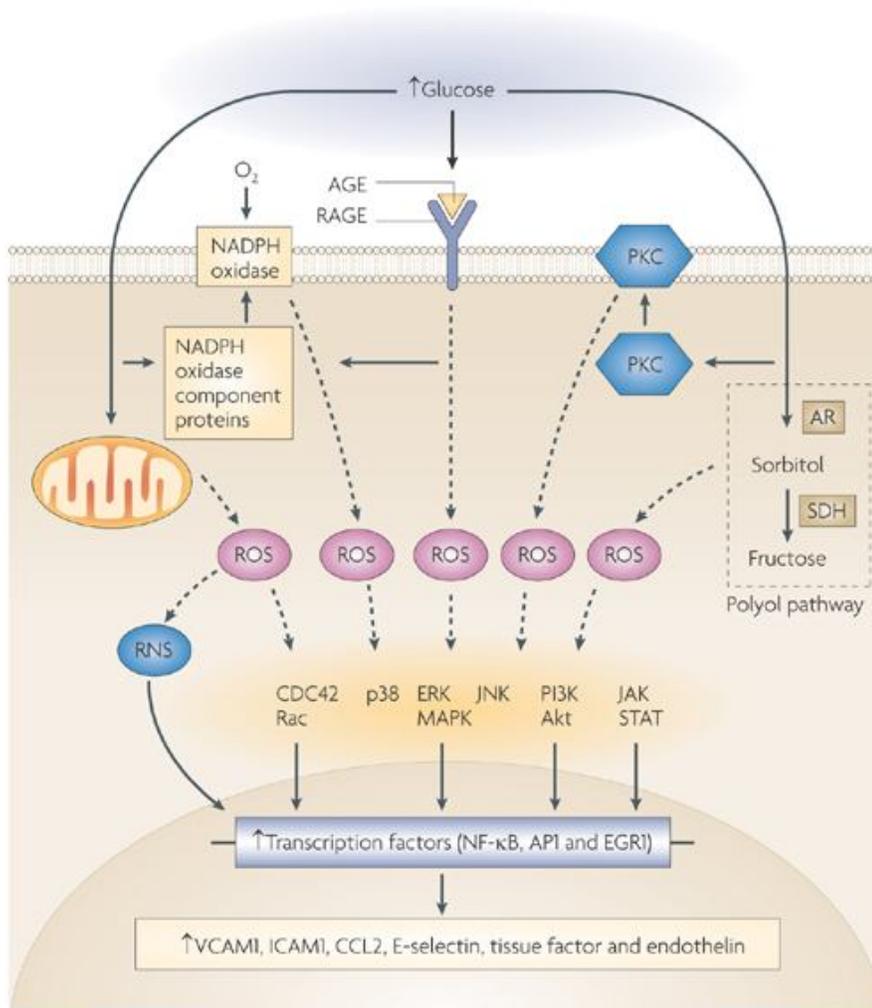
Cependant, au cours de la progression de la maladie, la régression des p38MAPK et HSP25 sont associés avec des changements du cytosquelette, la perte de processus des pédicelles et la protéinurie. Ces données permettent ainsi d'identifier les processus de réponse des podocytes à l'hyperglycémie, ainsi que d'identifier différentes cibles pharmacologiques destinées à contrer les effets dommageables de l'hyperglycémie sur la structure et la fonction des podocytes.

1.4.3.4 Néphropathie diabétique et facteurs de glycation avancés (AGEs)

Le rein est une cible pour les dommages reliés aux produits de glycation avancés, et celui-ci contribue aussi à une augmentation de la concentration de ces AGE au cours du déclin des fonctions rénales qui ne peuvent plus les évacuer [76]. Des études cliniques sur des patients atteints de diabète ont démontré que les taux d'AGEs présent dans le sérum sont significativement augmentés au cours de la progression de la microalbuminurie et, de façon

subséquente, au cours du développement de la néphropathie [77]. Makita et al. ont réussi à déceler une augmentation des peptides AGE en corrélation avec la sévérité des dommages rénaux de patients atteints de diabète de type 1 et 2 [78]. Tanji et al. ont rapporté que les patients atteints de néphropathie diabétique ont une expression plus élevée de récepteurs pour les AGE (RAGE) dans leurs podocytes et que la sévérité de la néphropathie est en corrélation avec la formation des AGE dans les compartiments glomérulaires et tubulo-interstitiels [79]. De plus, des études sur des modèles d'animaux diabétiques ont aussi démontré cette augmentation des AGE [80]. Aussi, les changements pathologique des reins diabétiques peuvent être diminués par l'utilisation d'inhibiteurs de la formation des AGE et par d'autres approches visant à réduire leur accumulation, tels que des agents qui brisent les liens croisés [81, 82]. Tel que démontré par Vlassara et al., les AGE peuvent causer des dommages rénaux similaires à ceux retrouvés dans la néphropathie diabétique, tels qu'une élévation du volume glomérulaire et le contenu en AGE, un épaissement de la membrane basale glomérulaire, une expansion de la matrice mésangiales, l'activation des NF- κ B, une augmentation de l'expression de l'ARNm de collagène IV et TGF- β [83]. Soulis-Liparota et al., de façon similaire, ont démontré l'effet des AGE dans la médiation des dommages rénaux dans différents modèles d'animaux diabétiques, ainsi que le rôle que peuvent jouer les inhibiteurs de l'activation des AGE afin d'améliorer la condition diabétique dans ces modèles sans influencer directement le contrôle glycémique [84]. Depuis, différentes expériences ont supportés et étendu ces découvertes [85]. Ainsi, il semble que les effets dommageables des AGEs sur le rein semblent provenir de leurs interactions avec des récepteurs pour les AGE spécifiques ainsi qu'avec des protéines de liaison spécifiques.

Les AGEs peuvent réagir avec de multiples systèmes, tels que ceux de l'inflammation, de l'oxydation, du métabolisme et du contrôle hémodynamique. Ces différentes interactions semblent se produire autour du ligand multiple RAGE, un récepteur membre de la famille des molécules sur la surface cellulaire [86, 87] qui est reconnu comme étant le récepteur de la signalisation pour les AGEs. Le RAGE est hautement exprimé par de multiples cellules dont la fonction est perturbée dans les cas de diabète [87]. Ces récepteurs sont aussi présents sur de nombreux types de cellules rénales incluant les tubules proximaux, les cellules mésangiales et les podocytes [88-91]. De nombreuses études ont aussi démontré le rôle des RAGE dans le développement de la néphropathie diabétique [92, 93]. Dans les souris transgéniques surexprimant le récepteur RAGE dans les cellules vasculaires, Yamamoto et al. ont découvert une augmentation des dommages rénaux suivant l'apparition du diabète. Ces changements incluent : une élévation de l'albuminurie et des niveaux de créatinine sérique, une expansion mésangiale et de la glomérulosclérose avancée [94]. De même manière, des études de délétion (knockout) pour le récepteur RAGE dans un modèle de souris diabétiques par STZ ont démontré une réduction des dommages rénaux lorsque comparé avec des souris témoin. En particulier, ces souris avec délétion n'ont pas démontré une expansion mésangiale significative ou un épaissement de la membrane basale glomérulaire [91].



Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 1-13. Relations entre l'activation de différentes voies de signalisations et les récepteurs pour les AGEs. [95]

1.4.4 Les PKC et la néphropathie diabétique

Parmi les différentes kinases, les PKC sont parmi les plus étudiées. Les PKCs font partie d'une famille de kinases sérine/thréonine qui comprennent 13 isoformes classées en trois groupes selon leur mode d'activation. Le groupe des PKCs classiques consiste des isoformes α , β I, β II et γ . Celles-ci dépendent du calcium, du diacylglycérol (DAG) ou son analogue le phorbol 12-myristate 13-acétate, et dans la plupart des cas de la phosphatidylsérine (PS) pour leur activation. Certaines isoformes indépendantes du calcium mais requérant du DAG et de la PS pour leur activation sont classifiées comme les nouvelles PKCs, et incluent les sous-types δ , ϵ , η et ν . Les isoformes ζ , ι , λ et μ constituent une troisième groupe de PKCs, nommés comme étant les atypiques. Leur activation ne requiert ni calcium ou DAG, seulement de la PS.

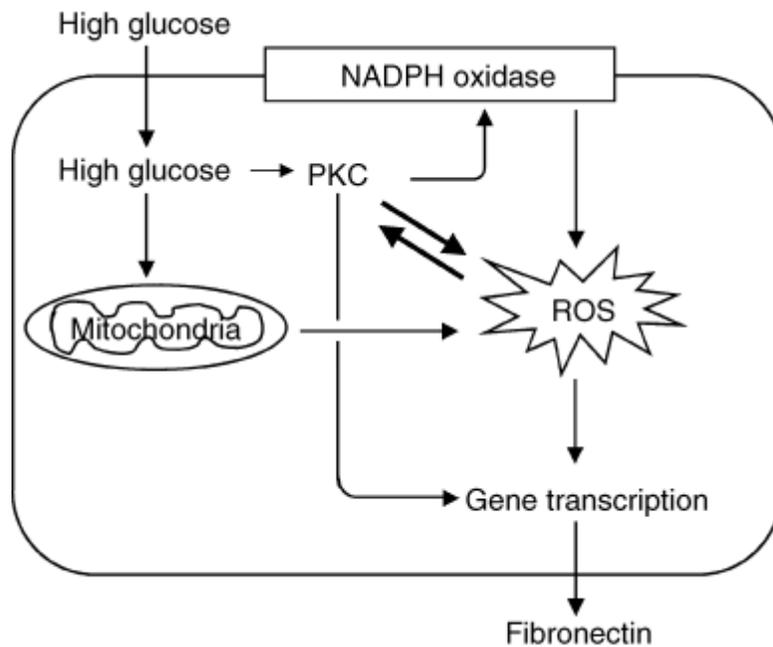


Figure 1-14. Un schéma simple de la relation entre une élévation du taux de glucose et l'activation des PKC et leurs effets sur la fibrose. [96]

Les protéines kinases C semblent être au centre de la pathogénèse reliée à la néphropathie diabétique. Ishii et al. ont été les premiers à publier au sujet de la relation entre l'activation isozyme des PKC dans un milieu diabétique relié avec le début de la néphropathie diabétique. Ils ont découvert que le LY-333531, un inhibiteur des PKC- β , a permis de prévenir une élévation du taux de filtration glomérulaire, de l'augmentation du taux d'excrétion de l'albumine et du temps de circulation rétinien, ainsi que de la surexpression de l'ARNm de TGF- β 1 dans les glomérules et de l'expression de protéines de la matrice extracellulaire [97, 98]. Ils ont aussi observé un effet similaire dans le modèle de souris db/db (modèle de diabète de type 2). Le LY-333531 a aussi prévenu l'expansion mésangiale progressive [99]. Cohen et al. ont aussi démontré que l'albumine glycosylée stimule l'activité des PKC- β des cellules mésangiales, en relation avec l'expression de collagène IV [100]. La stimulation de kinases MAP, particulièrement les kinases ERK 1 et 2 régulées par des signaux extracellulaires suivant l'activation des PKC, est nécessaire à la croissance des cellules mésangiales et la surexpression des gènes des facteurs de croissance et des protéines de la matrice extracellulaire [101, 102]. Dans les cellules mésangiales cultivées dans un milieu riche en glucose [103, 104] et dans les glomérules isolés de rats traités avec du STZ [105], l'activité des ERK 1 et 2 ont été significativement plus élevées que dans les contrôles cultivés dans un milieu avec une concentration normale de glucose. Cette hausse semble être dépendante des PKC, malgré le fait que l'expression protéique soit restée inchangée. Il a aussi été déterminé que les taux d'expression de TGF- β 1 et l'expression des protéines de la matrice extracellulaire étaient reliées aux ERK 1 et 2 [102]. Dans les cultures de cellules mésangiales du rat, Ha et Lee ont démontré que le glucose génère des molécules H_2O_2 en une heure et que l'inhibition des PKC parvient à bloquer la hausse de l'ARNm et de l'expression des protéines de TGF- β 1 et de fibronectine reliée au glucose ou au H_2O_2 [106]. Ces données indiquent que les ROS

généérés dans les conditions de milieux riches en glucose stimulent les PKC de façon directe, ou indirecte. Or, un des mécanismes pour l'activation directe de PKC par les ROS s'effectue à travers les changements de réduction-oxydation dans les groupes sulfhydriles des régions riches en cystéines des différentes isoformes des protéines PKC. Ces changements reliés aux réactions de réduction-oxydation pourraient ainsi causer les différentes isoformes des PKC à être plus sensibles à l'activation par le diacylglycérol (DAG) durant les signaux de transduction [107]. Ces résultats suggèrent que les isozymes des PKC stimulées peuvent avoir de nombreuses fonctions dans les cascades de signaux qui entraînent l'expression de collagène IV et l'accumulation des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine. Aussi, les activités basales des PKC- β sont requises pour la surexpression de protéines de la matrice extracellulaire induite par un haut taux de glucose, ce qui contribue à la glomérulosclérose et à la fibrose tubulo-inertielle reliée au diabète.

1.4.5 Les TGF- β et la néphropathie diabétique

Les signaux des TGF- β sont activés par un grand nombre de médiateurs qui ont été identifiés comme impliqués dans le développement de dommages rénaux dans la néphropathie diabétique. Les AGE, les ROS, le DAG, les PKC et l'angiotensine II peuvent activer la signalisation par le TGF- β [108, 109]. Le TGF- β est connu comme étant une des cytokines importante responsables du développement de la surexpression de la matrice extracellulaire associée à la néphropathie diabétique ainsi qu'à sa pathologie [110]. Les isoformes TGF- β 1, 2 et 3 sont des membres de la famille des TGF- β qui ont une conformation dimérique et ont de nombreux effets. Lorsque ceux-ci se lient à leur récepteur de type II, il se déclenche une réaction de trans-phosphorylation sur les récepteurs sérine/thréonine kinase de type I. Ces récepteurs de type I agissent ensuite avec les protéines Smad2 et Smad3, formant un complexe avec le Co-Smad4 [111]. Ensuite, ce complexe se déplace vers le noyau cellulaire pour se lier aux promoteurs de gènes activés par le TGF- β tels que le collagène α 1, PAI-1, Jun B, c-Jun et la fibronectine. Ces liaisons entraîneront la régulation de leur transcription [112].

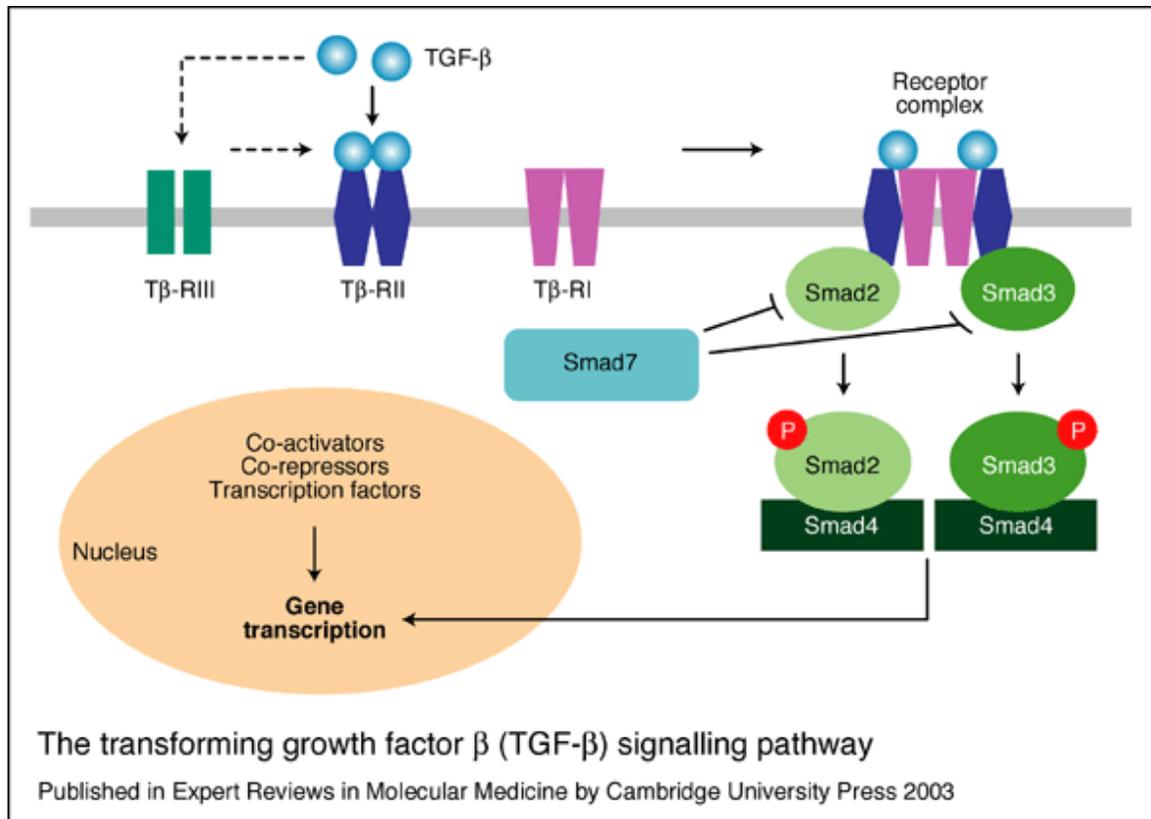


Figure 1-15. Le complexe de signalisation cellulaire relié au TGF- β . [113]

En plus de la signalisation par le Smad, 3 sous-groupes de membres de la famille des MAP kinases, soit les ERK1 et 2, les unités p44/p42 des MAP kinases, les JNK/SAPK et l'unité p38 MAPK sont impliqués dans la cascade de signalisation du TGF- β dans les cellules mésangiales du rein [110]. Une autre cytokine impliquée dans la signalisation par TGF- β est le CTGF, qui est induit par le TGF- β grâce à des facteurs de promotion de la transcription et des éléments de consensus de Smad localisés dans le promoteur CTGF [114]. Ainsi, le TGF- β et le CTGF agissent en combinaison, ce qui augmente l'hypertrophie cellulaire et la déposition de protéines de la matrice extracellulaire, ce qui cause de la glomérulosclérose, un épaississement artériolaire et la fibrose tubulo-interstitielle [115], ayant comme conséquence physiologique une perte des fonctions rénales. Des études in vivo par Wang et al ont ainsi démontré une élévation des TGF- β dans les glomérules de rats diabétiques par injections avec STZ [116, 117]. Pour sa part, le Smad3 peut se déplacer dans les noyaux des cellules des glomérules de souris diabétiques de type II db/db [118], ce qui atteste de la surexpression du système relié au TGF- β dans la néphropathie diabétique. En utilisant un anticorps neutralisant sélectif pour le TGF- β , Ziyadeh et al. ont démontré une amélioration de l'hypertrophie diabétique rénale, de l'expansion de la matrice mésangiale, et du développement de l'insuffisance rénale [119], cela malgré le fait que les effets que cela a eu sur l'albuminurie sont controversés [119, 120]. Cela permet néanmoins de conclure que la signalisation par le TGF- β a un rôle central dans la pathologie de la matrice extracellulaire reliée à la néphropathie diabétique [121].

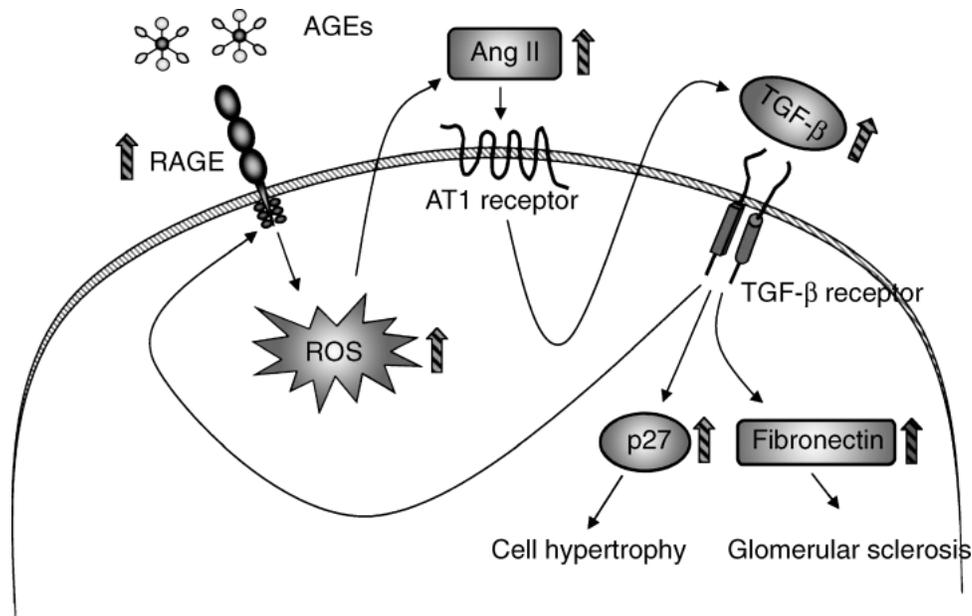


Figure 1-16. Mécanisme moléculaire de la néphropathie diabétique reliée à la génération de ROS et la formation de AGEs. [122]

1.4.6 L'hypertension et la néphropathie diabétique

Une haute prévalence de l'hypertension a été observée chez les proches parents des patients souffrant de néphropathie diabétique, ce qui suggère que la susceptibilité de développer cette maladie puisse être influencée par une prédisposition à l'hypertension [123, 124]. La manière la plus efficace de contrôler la progression de la néphropathie diabétique semble être le contrôle soutenu de l'hypertension. De plus, l'hypertension glomérulaire est détectée par des microponctures rénales dans les cas de diabète expérimental, et ce même si la pression sanguine est normale, ce qui indique que celle-ci pourrait jouer un rôle critique dans l'initiation et la progression de la néphropathie diabétique [125]. Un certain nombre d'observations supportent le rôle de l'hypertension capillaire des glomérules dans la pathogénèse de la néphropathie diabétique. Par exemple, les effets protecteurs des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans le diabète expérimental sont partiellement dus à une diminution de l'hypertension capillaire des glomérules à travers la vasodilatation des artérioles glomérulaires efférentes [126]. L'hypertension capillaire des glomérules résulte en différents changements du volume glomérulaire, ce qui étire les composants structurels des glomérules incluant les cellules mésangiales et les podocytes [127]. Cet étirement change la morphologie des cellules mésangiales et diminue le nombre de podocytes à travers différents mécanismes. Une des conséquences de ces actions est une augmentation de l'expression de la matrice extracellulaire ainsi que dans une diminution de sa dégradation par les cellules mésangiales dont la morphologie a été transformée à travers l'action de TGF- β 1 [128, 129]. L'étirement mécanique peut aussi stimuler les réactions inflammatoires dans les cellules mésangiales, ce qui peut contribuer à une augmentation des dommages glomérulaires. De plus, les protéines

chemo-attractives des monocytes 1 (MCP-1) et les molécules d'adhésion intercellulaires 1 (ICAM-1) ont été impliquées dans la néphropathie diabétique [130, 131].

Les podocytes ont aussi été impliqués dans la néphropathie diabétique. Ces cellules sont importantes pour la synthèse de la matrice protéique de la membrane basale glomérulaire ainsi que pour le maintien de ses fonctions. En même temps, les podocytes sont très sensibles aux forces mécaniques [127]. Les étirements mécaniques sont en mesure de réduire le nombre de podocytes à travers différents mécanismes qui incluent une réduction de leur prolifération [132], l'activation de l'apoptose des podocytes [133] ainsi que du détachement des podocytes de la membrane basale glomérulaire. L'intégrine $\alpha3\beta1$ est une molécule d'adhésion principalement reliée à l'adhésion des podocytes à la membrane basale glomérulaire [134]. Dans les conditions de stress mécanique, l'expression de l'intégrine $\alpha3\beta1$ est diminuée, ce qui diminue l'adhésion des podocytes avec la membrane extracellulaire [135].

1.4.7 La réabsorption rénale du glucose dans la néphropathie diabétique

Le tubule proximal, à travers les canaux symporteurs Na^+ /Glucose SGLT2 et le canal SGLT1, est le principal endroit où se produit la majorité de la réabsorption du glucose et son passage vers le côté basolatéral des cellules tubulaires pour son excrétion dans le fluide interstitiel avec un balancement par une pompe protonique Na^+/K^+ . Dans un rein normal, presque la totalité du glucose sera réabsorbé [136].

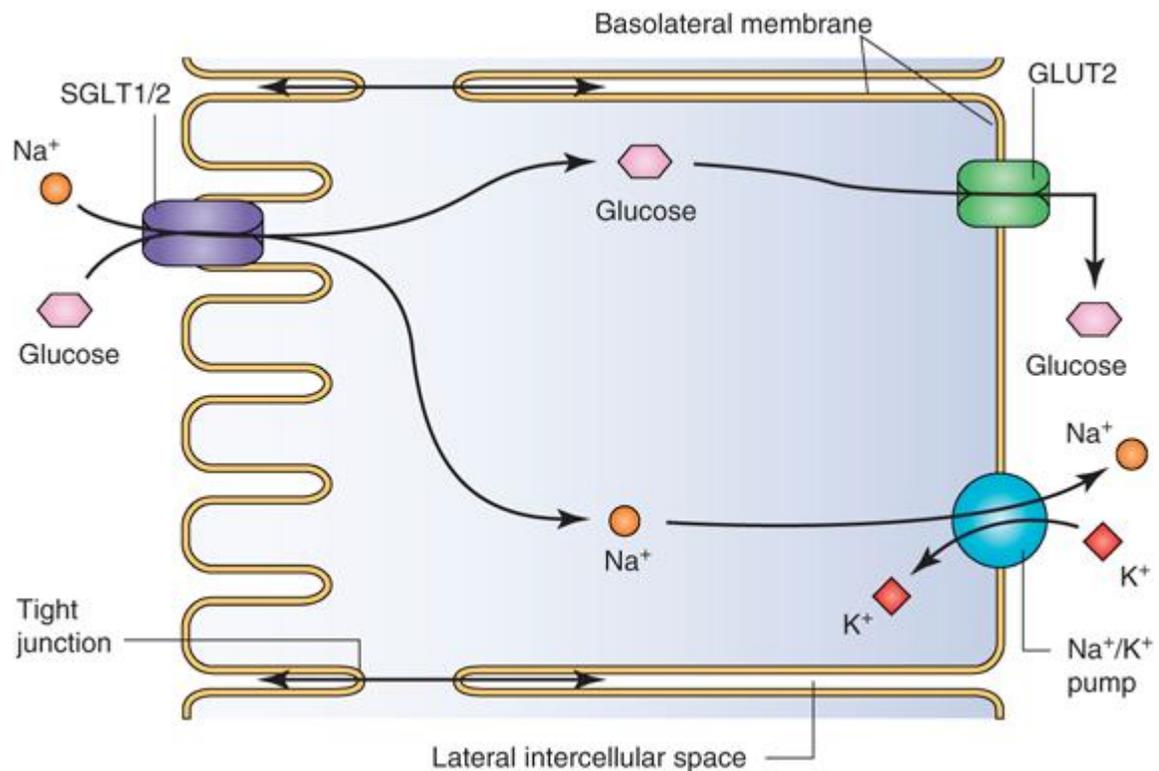


Figure 1-17. Réabsorption du glucose par les tubules proximaux et transfert à travers la membrane basolatérale. [136]

Or, dans les cas de néphropathie et de diabète, les niveaux de glucose sanguin sont beaucoup plus élevés, ce qui empêche une totale réabsorption de ces molécules. Or, il a été démontré que les niveaux de SGLT2 sont différemment exprimés lors de la présence de diabète, ce qui entraîne un taux de réabsorption cellulaire trop élevé qui pourrait jouer un rôle dans le développement de dommages tubulaires et glomérulaires. En effet, des traitements avec insuline ou phlorizine sont parvenus à rétablir l'expression de ce canal à un niveau normal. [137]

1.4.8 Le stress oxydatif et la néphropathie diabétique

Dans les circonstances normales, les activités métaboliques continues du rein génèrent une quantité considérable d'espèces réactives oxygénées. De plus, l'environnement urinaire est très favorable à l'oxydation, ce qui explique la grande variété d'enzymes antioxydantes qui coexistent avec différentes molécules absorbantes des radicaux libres afin d'équilibrer l'environnement de réduction-oxydation. Le diabète s'accompagne d'une augmentation de la génération des ROS dans les tissus, incluant ceux du rein, ce qui implique de multiples réseaux moléculaires. Bien que l'augmentation de la génération des ROS dans les reins soit d'origines multiples, il est évident qu'une des principales sources de ROS rénaux soit reliée à la famille des oxydases NADPH non-phagocytaires, qui sont structurellement reliées mais fonctionnellement distinctes des oxydases NADPH que l'on retrouve dans les neutrophiles. Les trois principales différences entre ces deux protéines est que les oxydases NADPH non-phagocytaires génèrent continuellement de bas niveaux de superoxyde, même dans les cellules non-stimulées. En second lieu, ces enzymes non-phagocytaires généreront un bas niveau de superoxydes mêmes si elles sont surexprimées par différentes conditions pathologiques. Finalement, il semble qu'une grande proportion des ROS générés dans les cellules non-phagocytaires semble être intracellulaire, alors que la génération de superoxydes durant la phagocytose par les neutrophiles se fait surtout au niveau extracellulaire dans les compartiments phagosomals [138]. Des données d'études animales et humaines suggèrent que les oxydases NADPH sont une source enzymatique majeure de génération de ROS dans certaines conditions pathologiques [139, 140]. En fait, Zalba et al. ont postulé que les oxydases NADPH sont la plus important source de superoxyde dans les parois des vaisseaux sanguins de différents modèles d'hypertension expérimentale, incluant l'hypertension induite par l'angiotensine II, l'hypertension rénovasculaire et l'hypertension d'origine génétique [140].

La NADPH oxydase est une enzyme formée de multiples sous-unités qui catalyse la production de superoxydes par la réduction de l'oxygène O₂ en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons : $2 O_2 + NADPH \rightarrow 2 O_2^- + NADP^+ + H^+$. La NADPH oxydase a été découverte dans les cellules phagocytaires, et est composée de différentes enzymes telles que p47phox (« phox » étant dérivé de phagocyte oxydase), p67phox, p40phox, p22phox, des unités catalytiques gp91 phox (aussi connue sous le nom de Nox2) [141, 142] ainsi que la GTPase Rac2. Dans les cellules non stimulées, p47phox, p67phox et p40phox sont confinées dans le cytosol, alors que p22phox et gp91phox sont situées sur la membrane cellulaire, formant la flavoprotéine hétérodimérique nommée cytochrome b558. Une fois que les cellules sont stimulées, p47phox devient phosphorylée et les sous-unités cytosoliques forment un complexe. Ce complexe va ensuite se

déplacer à la membrane cellulaire où il se liera au cytochrome b558 afin de former une oxydase active, ce qui entraîne le transfert d'électrons de NADPH vers l'oxygène O_2 , formant l'ion O_2^- [143]. Cependant, l'activation des NADPH oxydases requiert aussi la participation de Rac2 (ou Rac1) ainsi que de Rap1A [144, 145]. Suite à la découverte des homologues de gp91phox, différents membres de la famille des « Nox » (pour NADPH-oxydase) ont été désigné sous les noms de Nox1 à 5 ainsi que Duox1 et 2 [146-148]. Celles-ci sont exprimées dans de nombreux tissus et servent de médiateurs pour différentes fonctions biologiques.

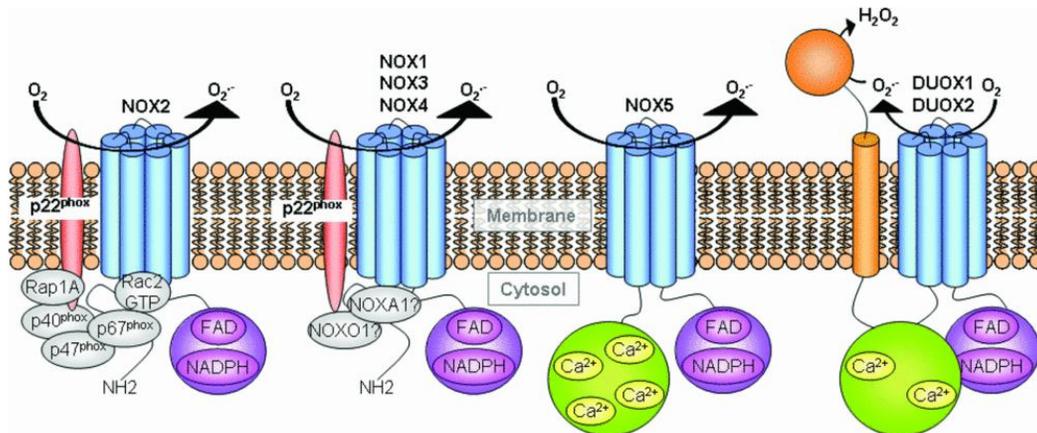


Figure 1-18. La structure présumée des isoformes de NADPH oxydases. Les isoformes des protéines transmembranaires NADPH oxydases sont constituées de six α -hélices contenant des résidus d'histidine impliqués dans le lien haem. [149]

Parmi ces homologues, Nox4 a été communément appelé « Renox » (pour Renal oxydase) est abondamment exprimée dans les reins. Des études récentes ont démontré le rôle que joue cette isoforme dans la néphropathie diabétique. Etoh et al. ont en effet démontré que l'expression de Nox4 et de p22phox étaient significativement augmentées dans les glomérules et les tubules distaux de rats diabétiques par injection de STZ [150]. Ils ont aussi trouvé que les unités Nox4 et p22phox étaient co-localisées avec le 8-OHdG, un marqueur pour le dommage causé à l'ADN par les ROS. Une autre expérience effectuée par Gorin et al. indique aussi une relation de cause à effet entre les ROS dérivés de Nox4 et la néphropathie diabétique : l'utilisation de nucléotides antisens a été employée pour inhiber l'expression de Nox4, ce qui a effectivement réduit la génération de ROS et a permis de prévenir le développement de l'hypertrophie et de l'augmentation de l'expression de fibronectine [151].

Dans une revue, Ha et Lee ont postulé que les ROS jouent un rôle important dans le remodelage de la matrice extracellulaire dans la néphropathie diabétique. Par exemple, différents facteurs tel qu'un taux de glucose élevé, les AGEs, l'angiotensine II et le TGF- β 1 peuvent tous augmenter le niveau de ROS dans les cellules rénales. Aussi, ils contribuent à l'augmentation de la synthèse de la matrice extracellulaire tout en diminuant sa dégradation, ce qui emmène l'expansion glomérulaire et mésangiale ainsi qu'à la fibrose tubulo-interstitielle dans les reins diabétiques [152].

Une autre source de ROS intracellulaires résultant de l'hyperglycémie est la mitochondrie. Kakimoto et al. sont parvenus, par la détection des niveaux urinaires du marqueur du stress oxydatif systémique total 8-OHdG [153, 154], à démontrer que l'hyperglycémie permet une augmentation du dommage à l'ADN causé par l'oxydation mitochondriale ainsi que la délétion de l'ADN mitochondrial dans les reins de rats diabétiques. Bien que l'insuline parvienne à normaliser les niveaux de 8-OHdG rénaux, cela n'a pas eu d'effet sur la délétion de l'ADN mitochondrial [153], ce qui suggère que le dommage de l'ADN mitochondrial pourrait être impliqué dans la pathogénèse de la néphropathie diabétique. Une étude clinique traitant des liens entre le dommage oxydatif à l'ADN et les dommages tubulo-interstitiel chez les patients atteints de diabète de type II avec néphropathie diabétique a permis de démontrer que les niveaux urinaires de 8-OHdG étaient plus élevés chez les patients avec diabète de type II que chez les sujets contrôles. De plus, les niveaux de 8-OHdG avaient tendance à être plus élevés en relation avec la sévérité des lésions glomérulaires ainsi qu'avec la sévérité des lésions tubulo-interstitielle chez les patients atteints de diabète de type II [155]. De Plus, Houstis et al. ont démontré une relation de cause à effet entre les ROS présents dans différents modèles in-vitro et in vivo de résistance à l'insuline [156].

1.4.9 Les récepteurs activés par les proliférateurs du peroxydome (PPAR) et la néphropathie diabétique

Les PPARs font partie de la famille des récepteur stéroïde/nucléaire, et trois isoformes de cette famille ont été identifiées et caractérisées, connues comme PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ [157-159]. Les PPARs jouent un rôle critique dans la régulation de différents processus biologiques tels que le métabolisme des lipides, l'adipogénèse, la sensibilité à l'insuline, les réponses immunitaires, la croissance cellulaire et la différenciation cellulaire [158-161]. Il a aussi été démontré que ces protéines participent à la pathogénèse de différentes maladies telles que la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose, l'obésité, la dyslipidémie, l'hypertension, l'athérosclérose et la microalbuminurie [162-164]. Bien que les rôles des trois sous-types de PPAR ont des rôles qui se superposent, chaque isoforme a une distribution tissulaire, une sélectivité aux ligands et des effets biologiques spécifiques.

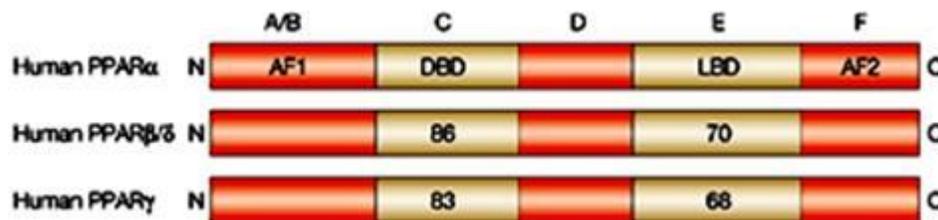


Figure 1-19 La structure des PPAR. Les PPARs contiennent 5 régions spécifiques, incluant les 2 régions les plus conservées (C et E) [165].

a) Les PPAR α et la néphropathie diabétique

Dans les reins, les PPAR α sont hautement exprimés dans les tubules proximaux et les tubes médullaires ascendants [166, 167], où cette protéine joue un rôle crucial dans l'homéostasie de

l'énergie rénale [168]. Il a été démontré que l'expression du gène PPAR α augmentait beaucoup dans les reins diabétiques [169]. Malgré un mécanisme d'action encore inconnu, il a été possible de démontrer à l'aide d'études cliniques que les agonistes de type fibreux pour les PPAR α parviennent à atténuer la néphropathie diabétique en ayant un effet protecteur sur les reins de patients souffrant de diabète de type II [170, 171]. L'influence des agonistes pour les PPAR α semble être multifonctionnelle; par exemple, les PPAR α semblent être impliqués dans la résistance à l'insuline, dans le contrôle glycémique et dans la toxicité des lipides sur les cellules β des îlots de Langerham [172-174]. Dans les reins, l'activation des PPAR α a un effet direct sur les cellules mésangiales. Il a été prouvé que l'activation des PPAR α permet de bloquer l'expression de TGF- β 1 reliée au stress oxydatif, permettant l'atténuation de la glomérulosclérose [175]. Kamijo et al. [176] ont démontré que des souris à jeun déficientes pour le gène de PPAR α démontraient une élévation du taux d'excrétion d'albumine urinaire ainsi que de l'accumulation d'albumine dans les tubules proximaux, ce qui suggère que les PPAR α permettent la promotion de la réabsorption d'albumine et sa dégradation dans les tubules proximaux. Ces résultats suggèrent que les PPAR α sont important pour la régulation de la sensibilité à l'insuline et qu'ils représentent ainsi une cible de choix pour le traitement du diabète de type II.

b) Les PPAR γ et la néphropathie diabétique

Les PPAR γ sont surtout exprimés dans les tubes collecteurs de la médulla distale et à un moindre degré dans les glomérules et la microvasculature rénale [166, 177] ainsi que dans les tubules proximaux [160]. Un groupe d'agoniste pour les PPAR γ est connu sous le nom de thiazolidinediones (TZD) comprend des membres tel que le troglitazone, le rosiglitazone et le pioglitazone. Ceux-ci ont des effets bénéfiques sur l'excrétion d'albumine urinaire et sur la fibrose rénale dans différents modèles animaux de la résistance à l'insuline, du diabète de type II et de l'hypertension [178]. Différentes études cliniques ont démontré que les agonistes pour le PPAR γ permettent de protéger les fonctions rénale en réduisant l'albuminurie chez les patients souffrant de diabète de type II avec ou sans hypertension [178-181]. De plus, les études cliniques ont révélé que le troglitazone, le rosiglitazone et le pioglitazone permettent une protection rénale et un contrôle glycémique supérieurs dans les patients atteints de diabète de type II lorsque comparé avec l'insuline ou d'autres agents hypoglycémiques oraux incluant la metformine, le glyburide et le glivencimide [182-185]. Les TZD parviennent même à démontrer un protection rénale supérieur à celle des inhibiteurs des enzymes de conversion de l'angiotensine en ce qui à trait aux dommages rénaux dans un modèle de rats souffrant de diabète de type II [186]. Des données in vitro suggèrent aussi que les agonistes des PPAR γ ont des effets bénéfiques sur les cellules mésangiales [187, 188], sur les podocytes glomérulaires [189] et sur les tubules contournés proximaux [190, 191]. Aussi, bien que le diabète de type I agisse de façon différente que celle du diabète de type II, des études ont démontré que les TZD sont aussi efficaces pour diminuer la néphropathie diabétique dans un modèle de diabète de type I que dans le type II [192, 193].

Pour résumer, ces résultats indiquent que l'activation des PPAR γ exerce des actions antiprolifératives, anti-fibrotiques et anti-inflammatoires dans différents types cellulaires rénaux

d'humains et de modèles animaux, ce qui permet une amélioration de la progression de la fibrose glomérulaire et tubulo-interstitielle ainsi que de l'état d'hyperglycémie. Grâce à ces actions protectives, les PPAR γ sont des cibles de choix pour le traitement des dommages reliés à la fibrose glomérulaire et particulièrement dans les cas de néphropathie diabétique, mais des effets secondaires tels que le gain de poids et la rétention de fluides devront être contrôlés afin que les agonistes pour ces protéines puissent être envisagés comme traitement à long terme [194].

c) Les PPAR β/δ et la néphropathie diabétique

Contrairement aux PPAR α et PPAR γ , les rôles physiologiques des PPAR β/δ sont encore méconnus, sans doute dû au faits de leurs distribution tissulaire très étendue ainsi que d'un manque de ligands cliniques connus [195]. Les PPAR β/δ rénaux sont principalement exprimés dans le cortex et la médulla, incluant les cellules mésangiales, l'interstice médullaire et les cellules stromales [166, 196].

Proctor et al. ont examinés l'expression de PPAR β/δ dans deux modèles de souris souffrant de diabète de type I (modèles Akita et OVE26). Dans les deux modèles, il a été démontré que l'expression de PPAR β/δ avait beaucoup diminuée, ce qui peut avoir contribué à la lipotoxicité rénale reliée à une réduction de l'oxydation des acides gras [197]. Des études in vitro par Hao et al. ont démontré que la surexpression de PPAR β/δ permet une protection contre la mort cellulaire reliée à l'hypertoncité dans un modèle de cellules médullaires interstitielles, ce qui implique que les PPAR β/δ sont un facteur de survie critique dans les reins [198]. Donc, la réduction du PPAR β/δ rénal pourrait être un des réseaux impliqués dans les dommages rénaux reliés au diabète, et les agonistes de PPAR β/δ pourraient conférer une protection rénale contre la néphropathie diabétique et d'autres maladies rénales.

1.5 L'apoptose

1.5.1 Le système général de l'apoptose

L'apoptose a tout d'abord été rapporté par Kerr et al. en 1972 [199], qui l'ont décrit comme une forme de mort cellulaire morphologiquement distincte et consistant en un séquence contrôlé d'évènements qui mèneront à l'élimination de cellules sans qu'il y ait une accumulation de substances toxiques dans l'environnement des cellules. Dans les cellules de mammifères, la réponse apoptotique est contrôlée à travers la voie intrinsèque ou extrinsèque, dépendamment de l'origine du signal apoptotique.

1.5.1.1 La voie extrinsèque

Débutant à l'extérieur de la cellule, où les conditions dans le milieu extracellulaire déterminent la séquence qui entrainera l'apoptose. Cette voie est aussi connue comme étant celle du récepteur pour la mort cellulaire, puisque dans ce cas l'apoptose est initiée par la liaison de ligands à des récepteurs spécifiques pour l'apoptose. Des molécules adaptives telles que FADD (domaine mortel associé au Fas), TRADD (domaine mortel associé avec le facteur de nécrose tumorale 1 – TNF-1) ou Daxx (une protéine associée au domaine mortel et qui se lie de façon

spécifique avec le domaine Fas) contiennent des domaines mortels qui interagissent avec les récepteurs pour l'apoptose et transmettent ensuite le signal apoptotique à travers la machinerie cellulaire. Les récepteurs de l'apoptose les plus connus sont TNFR-1 (récepteur 1 du facteur de nécrose tumorale) et Fas [200]. Le FasL (ligand pour Fas) se lie à Fas et cause l'oligomérisation de sont récepteur, Fas. Cela résulte en un amasement de domaines mortels ainsi qu'à la liaison du cofacteur FADD. Les protéines FADD se lient via le motif de domaine mortel effecteur (DED) à un motif homologue dans la pro-caspase-8. Ce complexe de Fas, FADD et de pro-caspase 8 est connu comme le complexe de signalisation induisant la mort (DISC). Suite au recrutement de FADD, la pro-caspase 8 est activée à travers un auto-clivage. La caspase-8 active va ensuite activer des caspases suivantes dans la voie (caspase 3 et 7), ce qui commet la cellule vers l'apoptose [201].

1.5.1.2 La voie intrinsèque

Un autre voie de l'apoptose activée par différentes formes de stress cellulaire est connue comme la voie intrinsèque. Dans cette voie, comme la mitochondrie joue un rôle central dans la chaîne des réactions menant à l'apoptose, on appelle souvent celle-ci la voie mitochondriale. L'apoptose induite par le stress se produit à travers un mécanisme qui implique des altérations de la perméabilité mitochondriale, ce qui a comme effet de relâcher le cytochrome c des mitochondries, entraînant sa liaison à Apaf-1 et permettant la formation de l'apoptosome en combinaison avec la pro-caspase 9. Le clivage de la pro-caspase 9 permet la formation de la caspase 9 active, suivi de l'activation de la pro-caspase 3 en caspase 3 active. L'activation de la caspase 3 sera ensuite responsable des effets de l'apoptose tels que la dégradation de l'ADN, la condensation de la chromatine, etc.

D'autres protéines sont aussi relâchées des mitochondries endommagées, telles que les second activateur de caspase dérivés des mitochondries (SMAC), les protéines se liant aux inhibiteurs de l'apoptose avec un faible point isoélectrique (DIABLO), les facteurs de l'induction de l'apoptose (AIF) et les protéines nécessitant une haute température A2 (OMI/HTRA2 qui s'opposent aux effets des inhibiteurs de l'apoptose, lesquels se lient normalement aux pro-caspase 3 afin de prévenir son activation. Des études ont aussi démontré que les endonucléases G (Endo G) sont aussi activées par les signaux apoptotiques et sont ainsi capable d'induire la fragmentation nucléosomale de l'ADN indépendamment des caspases, des facteurs de fragmentation de l'ADN et des DNases activées par la caspase. Les endonucléases G sont des nucléases spécifiques à la mitochondrie qui peuvent se déplacer vers le noyau afin de cliver l'ADN de la chromatine durant l'apoptose. Les AIF ont aussi un rôle à jouer durant l'apoptose, alors qu'ils deviennent actifs durant leur relocalisation de la mitochondrie vers le noyau, où ils vont initier la condensation de la chromatine et une large fragmentation de l'ADN [202].

Il y a des preuves que les voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose sont reliées, mais cela n'a pas encore été prouvé hors de tout doute. Une hypothèse est concentrée autour du clivage du facteur pro-apoptotique Bid (un membre de type BH3-seul de la famille des Bcl-2) par la caspase-8. Comme la protéine complète Bid est localisée dans le cytosol, sa forme clivée tBid se

déplacera vers la mitochondrie, permettant la transduction de signaux apoptotiques de la membrane cytoplasmique jusqu'à la mitochondrie, ce qui cause la sortie du cytochrome c, la perte du potentiel de la membrane mitochondriale, l'affaissement cellulaire et la condensation du noyau de façon dépendante aux caspases [203].

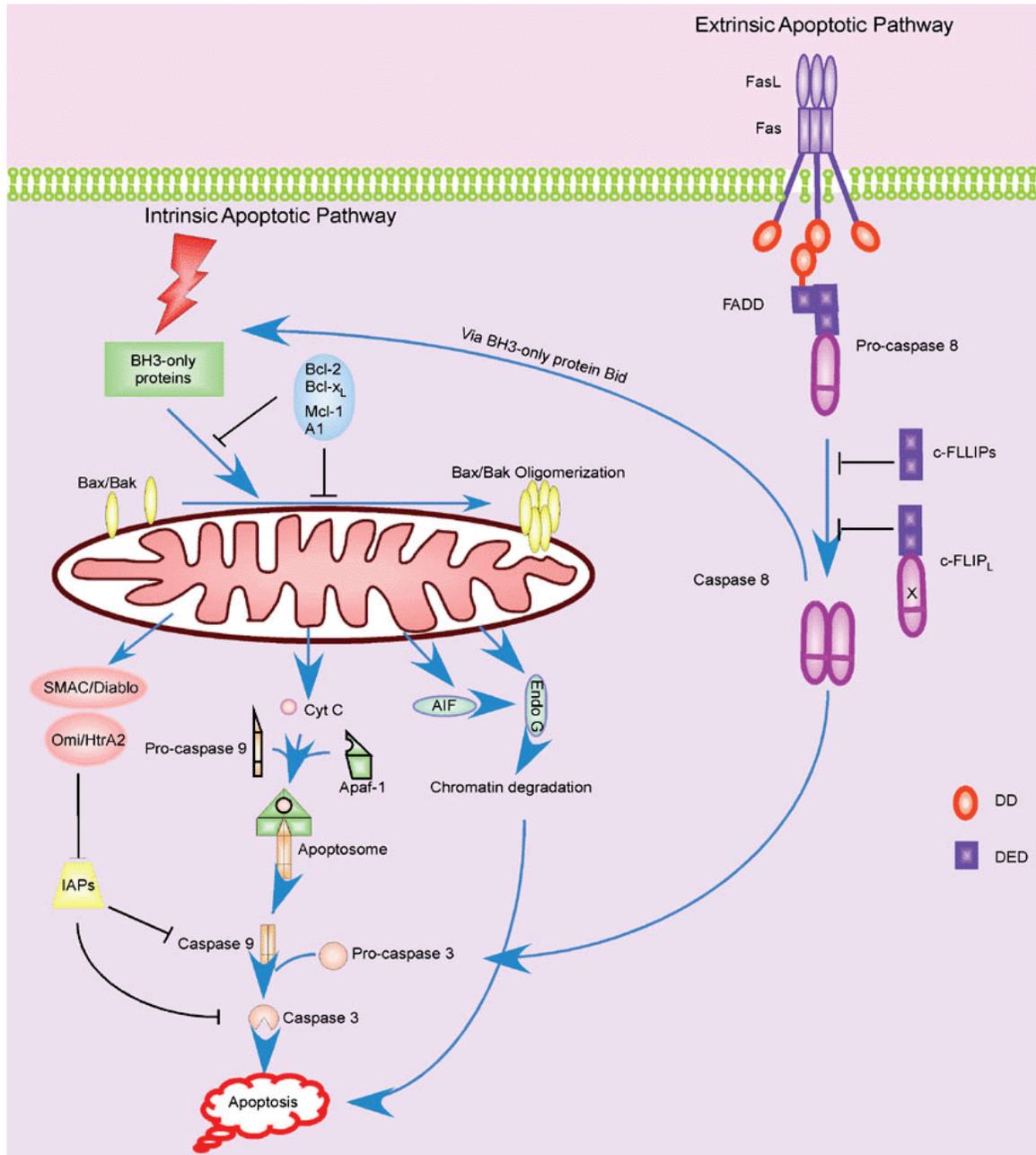


Figure 1-20. Les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose. [204]

Le réticulum endoplasmique est une organelle qui permet aux protéines nouvellement synthétisées d'établir une structure tertiaire correcte. Cela s'effectue par des modifications

post-translacionnelles, le repliement protéique et l'oligomérisation; seules les protéines dont le repliement sera correct seront transportées dans l'appareil de Golgi. Il a été démontré que l'accumulation de protéines incorrectement repliées dans le lumen du réticulum endoplasmique cause un stress qui peut être considéré comme dangereux pour la survie cellulaire. Afin de pouvoir gérer ce stress, un mécanisme de protection est utilisé dans les cellules de mammifères, connu comme la réponse aux protéines mal repliées (UPR, pour *unfolded protein response*). Ce mécanisme agit de 3 manières [205] :

- i. Diminue la synthèse protéique afin de prévenir l'accumulation de protéines mal repliées
- ii. Augmente la transcription de gènes de molécules chaperons du réticulum endoplasmique qui augmenteront la capacité de repliement des protéines
- iii. Augmentation de l'expression de facteurs de dégradation du réticulum endoplasmique

Si le stress cellulaire ne peut être résolu par ces mécanismes et que celui-ci expose les cellules au stress du réticulum endoplasmique pour une période de temps prolongée, alors il est possible que l'activation de l'apoptose s'effectue dans le but d'assurer la survie de l'organisme.

La réponse aux protéines mal repliées s'effectue à travers trois récepteurs transmembranaires du réticulum endoplasmique : les kinases pancréatiques du réticulum endoplasmique de type PKR (PERK) [206-208], les facteurs de transcriptions d'activation 6 (ATF6) [209-211] et l'enzyme requérant l'inositol1 (IRE1) [212-214]. Ces trois récepteurs du stress du réticulum endoplasmique sont généralement inactif par leur association avec la chaperonne du réticulum endoplasmique GRP78. Le stress dans cette organelle va causer la dissociation du GRP78 de ses récepteurs, ce qui mènera à leur activation ainsi qu'à la réponse aux protéines mal repliées. De plus, il semble que les médiateurs de cette réponse font aussi partie de l'apoptose suivant le stress du réticulum endoplasmique [205].

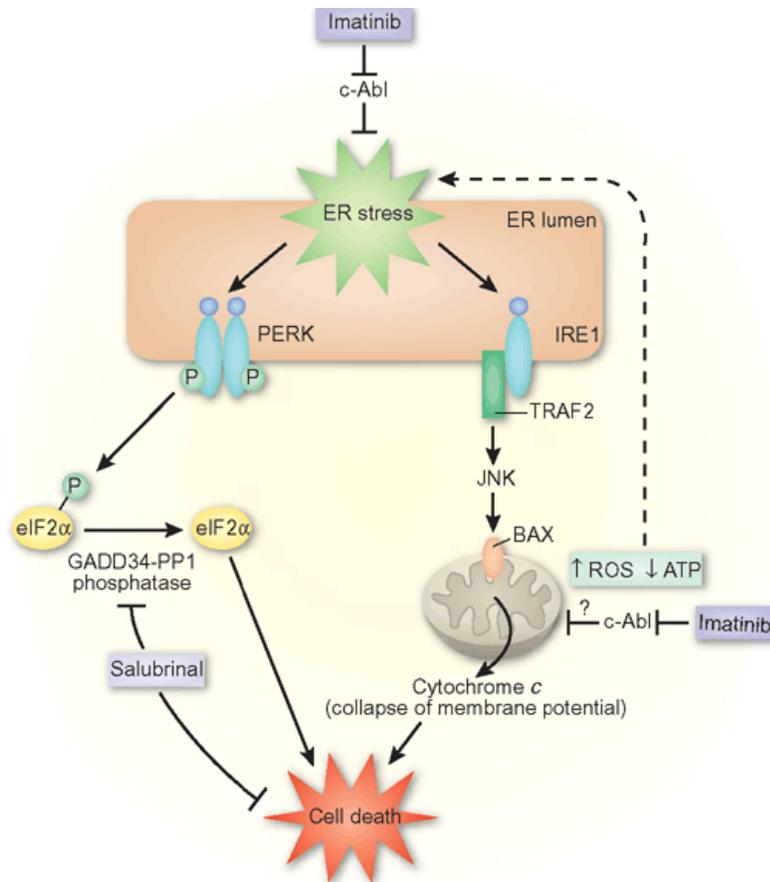


Figure 1-21. Mécanismes de l'apoptose en réponse au stress du réticulum endoplasmique. [215]

Chez l'humain, le stress du réticulum endoplasmique contribue à la perte de cellules β du pancréas dans différents types de diabète tels que le syndrome de Wolcott-Rallison, une rare maladie qui est caractérisée par la présence de diabète dépendant à l'insuline dès l'âge de la petite enfance [216]. Des preuves plus directes du rôle du stress du réticulum endoplasmique dans le diabète de type II ont aussi été démontrées par Laybutt et al. [217], qui ont démontré par des marquages la surexpression de protéines régulées par le glucose 78 (GRP78), les protéines se liant aux immunoglobulines (BiP) et les protéines pro-apoptotiques CHOP dans les pancréas de patients atteints de diabète de type II lorsque comparé aux contrôles non-diabétiques.

La voie de CHOP (protéines homologues au C/EBP favorisant la liaison CCAAT) caractérise l'apoptose du stress dans le réticulum endoplasmique. CHOP et le facteur de transcription GADD153 (arrêt cellulaire et dommage à l'ADN 153) sont normalement presque indétectables dans les conditions physiologiques normales, mais sont surexprimées suite au stress du réticulum endoplasmique [218].

Suite au stress du réticulum endoplasmique, ATF6 et PERK seront activés et l'expression de CHOP/GADD153 augmentés par ces deux voies [211, 219, 220]. PERK va ensuite transmettre son signal par la phosphorylation de eIF-2 α , ce qui augmentera l'expression de ATF4 [206]. La

protéine ATF6 sera ensuite clivée par la protéolyse reliée au stress du réticulum endoplasmique et il y aura un relâchement de son domaine cytosolique N-terminal (p50ATF6). La protéine de liaison X-box 1 (XBP-1), ATF4 et p50ATF6 formeront un complexe qui agira en tant que facteur de transcription dans le but d'augmenter l'expression de l'ARNm de CHOP [211]. Dans ce sens, Zinszner et al. ont démontré que le stress du réticulum endoplasmique induisait une réponse apoptotique beaucoup diminuée dans un modèle de cellule déficiente pour CHOP, ce qui suggère que la voie impliquant CHOP est au centre de la régulation de l'apoptose reliée au stress du réticulum endoplasmique [221]. Des études sur les gènes cibles de CHOP ont suggéré que cette protéine active la transcription de GADD34, de l'oxydoréductase-1 du réticulum endoplasmique (ERO1), du récepteur mortel 5 (DR5) et de l'anhydrase carbonique VI, qui semblent être reliés à l'apoptose. GADD34 peut aussi interagir avec la protéine phosphatase 1 (PP1), ce qui cause la déphosphorylation de eIF2 α et ainsi le relâchement de facteurs de traduction qui favoriseront la biosynthèse de protéine du réticulum endoplasmique [222, 223]. L'expression de GADD34 est aussi reliée avec l'apoptose induite par différents signaux, et sa surexpression peut initier ou augmenter le niveau d'apoptose [224]. ERO1, qui code pour une oxydase du réticulum endoplasmique, va cependant hyper-oxyder le réticulum endoplasmique. Des observations par Marciniak et al. indiquent que l'oxydation du réticulum endoplasmique pourrait aussi contribuer au mauvais repliement des protéines [225]. DR5, qui encode un récepteur mortel à la surface cellulaire et pourrait activer la séquence de cascade des caspases qui induit l'apoptose, et surexprimé par le stress du réticulum endoplasmique dans les cellules cancéreuse. De plus, il a été démontré que DR5 peut être directement régulé par CHOP au niveau transcriptionnel, et que CHOP est directement responsable pour l'induction de DR5 par le stress du réticulum endoplasmique. De plus, DR5 est un régulateur critique de l'apoptose induite par le stress du réticulum endoplasmique dans les cellules de carcinomes humains [226]. La sous-expression de CHOP a aussi permis de différer l'apparition du diabète chez un modèle de souris de diabète de type I, la souris Akita [227]. Ces données ont clairement amélioré les connaissances de la relation entre CHOP et l'induction de l'apoptose.

1.5.2 Le rôle de la caspase 12

Les caspases sont des composants pro-apoptotique connus. Parmi celles-ci, la caspase-12 a été identifiée comme une molécule qui initie l'apoptose en réponse au stress du réticulum endoplasmique [228] Localisée sur la membrane du réticulum endoplasmique, la caspase 12 va ensuite migrer sur le cytoplasme en condition de stress [229], ce qui se traduira par la mort cellulaire. Nakagawa et al. ont rapporté que des souris mutante qui n'expriment pas la caspase 12 étaient ainsi résistantes au stress du réticulum endoplasmique, mais celles-ci étaient sensibles à d'autres signaux de la mort cellulaire, ce qui suggère que la caspase 12 est un régulateur spécifique reliée à l'apoptose venant du stress du réticulum endoplasmique. Ils ont ainsi proposé que la pro-caspase 12 est clivée par la m-calpain en réponse au relâchement de calcium du réticulum endoplasmique [230]. Yoneda et al. ont établi que les protéines activées IRE1 α causaient par la suite le recrutement de facteurs associé au récepteur pour le facteur de nécrose de tumeurs 2 (TRAF2), qui va ensuite interagir avec la pro-caspase 12 pour l'activer [231]. Rao et al. [232] ont aussi découvert que la caspase 7 avait un rôle à jouer dans l'activation

de la caspase 12. Cependant, l'implication de la caspase 12 dans l'apoptose chez les cellules humaines n'est pas encore élucidée, puisque le gène humain de la caspase 12 contient des mutations qui sont critiques à sa fonction [233]. Donc, l'identification d'un homologue fonctionnel de la caspase 12 et son rôle dans la fonction du stress du réticulum endoplasmique reste à démontrer.

1.5.3 La famille Bcl-2 et l'apoptose

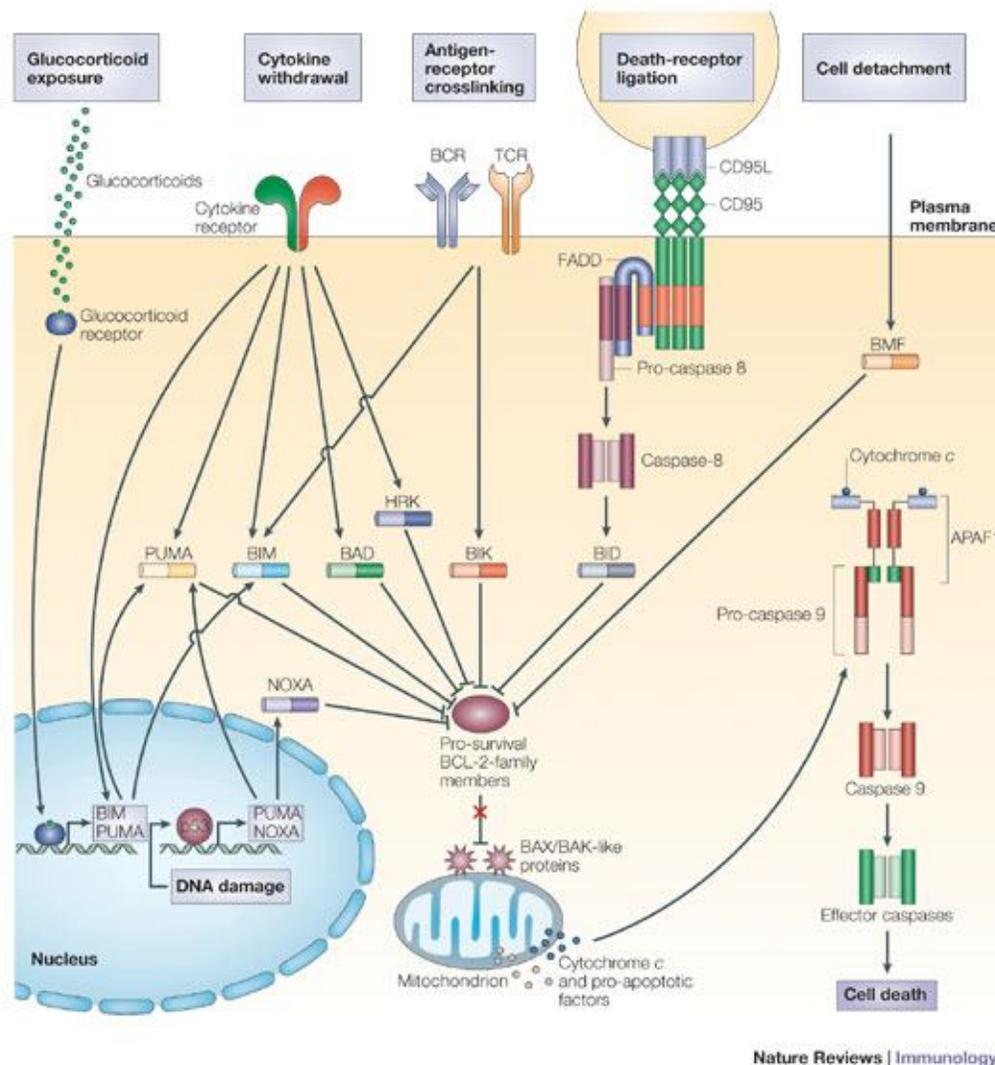


Figure 1-22. Activation de l'apoptose par les différents membres de la famille BH3 et Bcl-2. [234]

La famille des protéines de type Bcl-2 peut être divisée en deux groupes : les membres pro-apoptotiques et les anti-apoptotiques. Ce premier groupe comprend des membres des sous-familles des protéines ne contenant qu'un groupe BH3 (incluant Bid et Bim) et celles qui ont un domaine multiple (Bax et Bak). Le deuxième groupe, anti-apoptotique comprend les membres Bcl-2 et Bcl-XL.

En général, les membres pro-apoptotiques de la classe Bcl-2 sont recrutés à la surface du réticulum endoplasmique afin d'activer la caspase 12, alors que les membres anti-apoptotiques empêchent ce recrutement par un mécanisme dont tous les détails ne sont pas encore connus. McCullough et al. ont cependant découvert que Bcl-2 est sous exprimé suivant l'activation de CHOP lors de stress du réticulum endoplasmique, ce qui agit en faveur d'une plus grande présence de stress oxydatif et d'apoptose [235]. Un autre groupe dirigé par Contreras et al. a toutefois découvert que la surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 inhibait l'activation de la caspase 12 et l'apoptose durant le stress du réticulum endoplasmique [236]. Bax et Bak, des protéines normalement situées dans le cytosol, vont ensuite migrer vers la mitochondrie en réponse aux stimuli apoptotiques variés. Ces membres pro-apoptotiques sont essentiels à l'apoptose induite par le stress du réticulum endoplasmique car ils maintiennent l'homéostasie des niveaux de calcium du réticulum endoplasmique [237, 238]. Wei et al. ont ainsi observé que des cellules déficientes pour Bax et Bak sont ainsi résistantes à différents stimuli apoptotiques, incluant ceux du réticulum endoplasmique, tels que par la thapsigargin et la tunicamycin [239]. En testant différents inducteurs du stress du réticulum endoplasmique, Zong et al. ont découvert une augmentation des formes actives de Bax et Bak, ce qui indique une modification de la conformation de ces protéines de leur forme inactive vers la forme active suivant la réponse au stimuli du stress du réticulum endoplasmique. De plus, Bax et Bak peuvent aussi affecter les niveaux internes de calcium par la déplétion des niveaux calciques présent dans le réticulum endoplasmique.

1.5.4 L'apoptose dans les glomérules diabétiques

Différents types cellulaires jouent des rôles fonctionnels différents dans les glomérules. Par exemple, un excès d'apoptose dans n'importe lequel de ces types cellulaires peut causer une perte des fonctions rénales liée à une condition diabétique. Parmi ces différents types, l'apoptose des podocytes et des cellules mésangiales est d'un intérêt marqué.

Les podocytes sont des membres cruciaux de la barrière de filtration rénale. Or, leur nombre et leur densité sont grandement diminués lors des cas de diabète mellitus, et dans certains cas on observe aussi une perte des processus des pédicelles. Cette perte de podocytes serait probablement liée à leur détachement de la membrane basale des glomérules vers l'espace urinaire, ou simplement leur apoptose. Ces deux phénomènes peuvent même être reliés, puisque le détachement cellulaire pourrait entraîner la perte de l'interaction avec la matrice cellulaire nécessaire à la viabilité des cellules des podocytes [240]. Des expériences sur différents modèles animaux tendent même à supporter que le diabète induit l'apoptose des podocytes. Par exemple, Susztak et al. ont rapporté que l'apoptose des podocytes augmentait avec l'hyperglycémie présente chez la souris Akita (modèle de diabète de type I) et chez la souris db/db (modèle de diabète de type II). De plus, ils ont découvert que l'apoptose des podocytes coïncidait avec la présence d'excrétion de l'albumine dans l'urine, mais précédait de façon significative la perte de podocytes des glomérules. Les études in vitro qu'ils ont effectuées ont aussi démontré que l'augmentation de ROS induite par l'hyperglycémie avait un rôle à jouer dans la perte et l'apoptose des podocytes, ce qui suggère que cette diminution du nombre et de la

densité des podocytes était reliée au mécanisme de progression de la néphropathie diabétique [71]. Menini et al. [241] ont aussi démontré que l'apoptose dans les cellules glomérulaires avait significativement augmentée dans un modèle de rats diabétiques injectés avec du STZ pendant quatre mois, et à un niveau encore plus élevé après six mois, un modèle dans lequel la perte des podocytes correspondait à environ 70% des cellules apoptotiques. Siu et al. ont de leur côté découvert que même après seulement deux semaines d'induction au diabète par injection de STZ, qu'il était possible de démontrer une réduction significative du taux de podocytes par glomérule [72]. Ils ont aussi démontré un déclin similaire dans un modèle de souris injectées au STZ pendant deux semaines.

De façon différente des podocytes, les effets de l'hyperglycémie sur les cellules mésangiales semblent apparaître plus tardivement, causant des dommages mésangiaux. En fait, l'hyperglycémie pourrait, par l'activation de signaux pro-apoptotiques entraînant la mort cellulaire, être une des causes de la perte des composants cellulaires que l'on retrouve dans la glomérulosclérose. L'augmentation de l'apoptose des cellules mésangiales est aussi reliée à l'accumulation de la matrice extracellulaire dans les cas de segmentation de l'espace glomérulaire [242]. Différents groupes ont étudié cette apoptose des cellules mésangiales suite à l'hyperglycémie. Kang et al. ont découvert qu'un taux élevé de glucose stimulait le clivage de la caspase 3 et la fragmentation de l'ADN de cellules mésangiales humaines en culture, et que les ROS étaient impliqués dans l'activation de l'apoptose [243]. Yamagishi et al. ont démontré que l'apoptose de cellules mésangiales humaines en culture était induite par les AGEs [244]. De plus, le TGF- β 1, qui est activé par le diabète, a été impliqué comme facteur permettant l'induction de l'apoptose dans un modèle de cellules mésangiales en culture [245]. Mishra et al. ont aussi établi que l'hyperglycémie chronique était une source d'apoptose dans les cellules mésangiales humaines, et que celles-ci activaient la voie de l'apoptose intrinsèque reliée à la caspase 9. De plus, ils ont aussi découvert des cellules mésangiales apoptotiques dans les souris db/db (diabète de type II) [246]. Jung et al. ont de leur côté observé une augmentation significative du nombre de cellules apoptotiques dans les glomérules en condition de diabète ainsi que dans les cellules mésangiales stimulées par le glucose lorsque comparé à des contrôles et des cellules cultivées dans un médium avec un taux de glucose normal [247].

1.5.5 L'apoptose dans les tubules diabétiques

Les maladies rénales reliées au diabète ont originalement été décrites comme une glomérulopathie associée avec de la glomérulosclérose diffuse ou nodulaire. Cependant, moins du tiers des patients diabétiques avec présence de microalbuminurie ont ce genre d'altérations pathologiques [63]. Cependant, les changements fonctionnels et structuraux dans les tubules proximaux sont en meilleure corrélation avec la progression de la néphropathie diabétique. En fait, différentes expériences ont révélé que l'apoptose des tubules proximaux joue un rôle central qui résulte en une délétion des cellules tubulaires de reins ainsi que dans l'atrophie tubulaire. Ishii et al. ont démontré que, par une infusion de glucose, mannitol ou solution saline dans un modèle de rats Wistar, l'hyperglycémie dans les rats perfusés avec du glucose causait l'apoptose des tubules proximaux [248]. L'apoptose a aussi été détectée dans les cellules

corticales des tubules rénaux dans le modèle de souris diabétiques de type II db/db [249]. Aussi, Kumar et al. ont observé l'apoptose dans les cellules tubulaires et interstitielles dans les rats injectés avec du STZ par l'utilisation de la technique de TUNEL, du marquage de l'ADN et la microscopie électronique [250]. Des études in vitro tendent à supporter les résultats in vivo. Par exemple, en utilisant des marquages par l'annexine V et des techniques de TUNEL, Verzola et al. ont démontré que l'exposition de cellules HK-2 à 30mM de glucose pour 48 heures parvient à augmenter significativement le taux de l'apoptose observé lorsque comparé avec un médium contenant 5,5mM de glucose [251]. Dans une autre lignée cellulaire de tubules proximaux, les cellules LLC-PK1, Allen et al. ont découvert que leur exposition pendant 48 à un taux élevé de D-glucose ont augmenté le taux de fragmentation de l'ADN, l'activité de la caspase 3, le marquage par l'annexine V ainsi qu'une diminution de l'expression d'inhibiteurs de l'apoptose sur le chromosome X lorsque comparé avec des cellules contrôle exposée à 5mM de glucose [252].

De plus, les recherches effectuées précédemment dans notre laboratoire ont démontré une induction de l'apoptose des tubules proximaux in vitro et in vivo. Dans les cellules immortalisées de rats de tubule proximaux (IRPTCs), il a été observé qu'une élévation du taux de glucose augmentait la génération des ROS ainsi que l'apoptose de ces cellules. De plus, il a été noté que ces effets sur l'apoptose étaient aussi présents dans les modèles de souris diabétiques par injection de STZ et dans les souris db/db [253-255]. Aussi, cette apoptose tubulaire peut être réduite par l'utilisation d'agents antioxydants, ce qui permet de suggérer qu'il y a une relation de cause à effets entre la génération de ROS et l'apparition de l'apoptose. De plus, la protéinurie s'est développé durant la progression du diabète, ce qui augmente l'apoptose tubulaire par la stimulation des différentes voies de l'apoptose mitochondriale ou reliée au stress du réticulum endoplasmique, ce qui active la caspase 12 [256, 257].

1.6 Le système rénine-angiotensine (RAS) et l'hypertension

1.6.1.1 Le système rénine-angiotensine

Le système rénine-angiotensine est constitué d'une cascade enzymatique ayant pour but de produire un octapeptide, l'angiotensine II (AngII), à partir de l'angiotensinogène, principalement exprimée dans le foie et converti en angiotensine I grâce à la rénine, une enzyme exprimée surtout dans le rein. Par la suite, l'angiotensine I est convertie en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène (ACE).

L'angiotensine II est un puissant vasoconstricteur qui augmente la pression artérielle par sa liaison avec le récepteur AT1 ce qui, à travers des effets direct et indirects, induit la réabsorption ionique. Aussi, l'angiotensine II est connue comme étant un peptide pro-fibrotique qui augmente aussi la prolifération, stimule les cytokines et la concentration de radicaux libres [258, 259].

Grâce à l'utilisation de souris transgéniques, il est possible d'investiguer différents rôle physiologiques que joue cette molécule, puisque la technique de délétion génique chez la souris est maintenant commune [260]. En utilisant des cellules souche embryonnaires, il est possible

d'utiliser des techniques de recombinaison homologique afin d'induire presque tout changement voulu. La modification la plus commune est de procéder à une délétion d'un gène cible, ce qui produit en général un phénotype dramatique permettant de comprendre le rôle d'une protéine cible dans un modèle de mammifère.

1.6.2 L'angiotensine II locale dans le rein

Dans le but d'étudier de façon plus précise le rôle de ACE dans la génération d'angiotensine II, des modèles de délétion visant un organe en particulier ont été envisagés. En ce qui concerne le rein, son expression est associée avec l'endothélium vasculaire et l'épithélium des tubules proximaux. Des souris transgéniques n'exprimant le gène ACE que dans le rein ont donc été générées, grâce à l'utilisation de promoteurs spécifiques au rein tels que γ -GT (glutamyl-transpeptidase) ou KAP (*kidney androgen regulated protein*).

Le système RAS a été l'objet d'études approfondies depuis l'identification de la rénine par Tigerstedt et Bergmann en 1898. Ce système consiste en un réseau extracellulaire hormonal qui joue un rôle important dans la régulation de la pression sanguine et de la résistance vasculaire systémique. L'angiotensinogène (Agt), l'unique substrat du système, est d'abord sécrété par le foie et ensuite clivé dans la circulation sanguine par la rénine provenant de l'appareil juxta-glomérulaire des reins, formant l'angiotensine I (AngI - décapeptide), qui sera ensuite clivé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) pour former l'angiotensine II (AngII – octapeptide). ACE est une protéinase de type métalloprotéinase qui est exprimée à haute concentration à la surface des cellules endothéliales des poumons, en relation avec la circulation pulmonaire. L'angiotensine II, considéré comme le principal peptide actif du système RAS, agit sur 2 récepteurs, soit les récepteurs de AngII de sous-type I (AT₁R) et de sous-type II (AT₂R), dont l'expression est particulièrement importante dans les tissus cardiovasculaires, mais aussi dans d'autres tissus. Ce sont les récepteurs AT₁R qui sont reliés à la majorité des actions classiques de AngII, tels que la vasoconstriction, la stimulation de la sécrétion de l'aldostérone des glandes adrénales et la vasopressine sécrétée par l'hypophyse postérieure, ce qui augmentera la rétention de fluides et du sodium par les reins, ainsi que la stimulation du système nerveux sympathique via des récepteurs dans le cerveau. Chez les rongeurs, le récepteur AT₁R comprend deux isoformes, AT₁RA et AT₁RB; AT₁RA étant le récepteur qui est relié à la majorité de ses actions.

Ces souris transgéniques, qui n'expriment qu'une très faible proportion de ACE rénal ont donc été créées [261, 262]. Dans les deux lignées, il a été observé que les souris gardaient leur habilité à concentrer l'urine. De plus, lorsque soumises à une diète faible en sel, il n'a été observé qu'une faible différence de la pression sanguine entre les souris mutantes pour ACE et des souris contrôle. Cela a été expliqué, en partie, par l'augmentation massive du niveau de rénine. Ces données permettent donc de démontrer que le système rénine-angiotensine, même lors d'une expression diminuée d'ACE, parvient à maintenir une relative homéostasie qui ne sera perturbée que par un quasi-total manque de l'expression d'ACE rénal.

Les souris sous-exprimant ACE dans le rein permettent ainsi de mieux définir la génération spécifique aux organes et la fonction des peptides de l'angiotensinogène. L'évaluation de l'expression des peptides de l'angiotensine a été effectuée dans les souris qui n'expriment pas ACE et des souris contrôles soumise à un inhibiteur de ACE [263]. À l'aide de ces souris, il a été déterminé que c'est par cette enzyme de conversion que la majorité de l'angiotensine II est formée. Cette enzyme est responsable de 90% de la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II dans la majorité des organes du corps. Dans les souris avec une délétion totale de ACE, 97% de l'expression d'angiotensine II de souris contrôle était disparue. Cela semble consistant avec les observations décrivant la réduction de la pression sanguine dans les souris déficiente pour ACE [264]. Une autre observation intéressante démontre que dans le rein, le niveau d'angiotensine II est plus élevé que dans le sang, ce qui semble indiquer que le rein est responsable d'une partie de la production d'angiotensine II [265]. Cependant, la pathophysiologie des dommages rénaux n'est pas complètement définie en ce qui a trait à sa relation avec le syndrome métabolique [266].

Des modèles de surexpression du système RAS ont aussi été développés. Par exemple, l'utilisation du promoteur KAP2 a permis de démontrer que la surexpression de l'angiotensinogène dans les tubules proximaux de souris transgéniques était suffisante pour induire différentes pathologies, notamment une augmentation de la pression sanguine, de l'apoptose rénale, ainsi que de la protéinurie [267]. Ces différents dommages furent aussi atténués par des inhibiteurs d'ACE, concluant que la surexpression du système RAS est impliquée dans le développement de l'hypertension et des dommages rénaux.

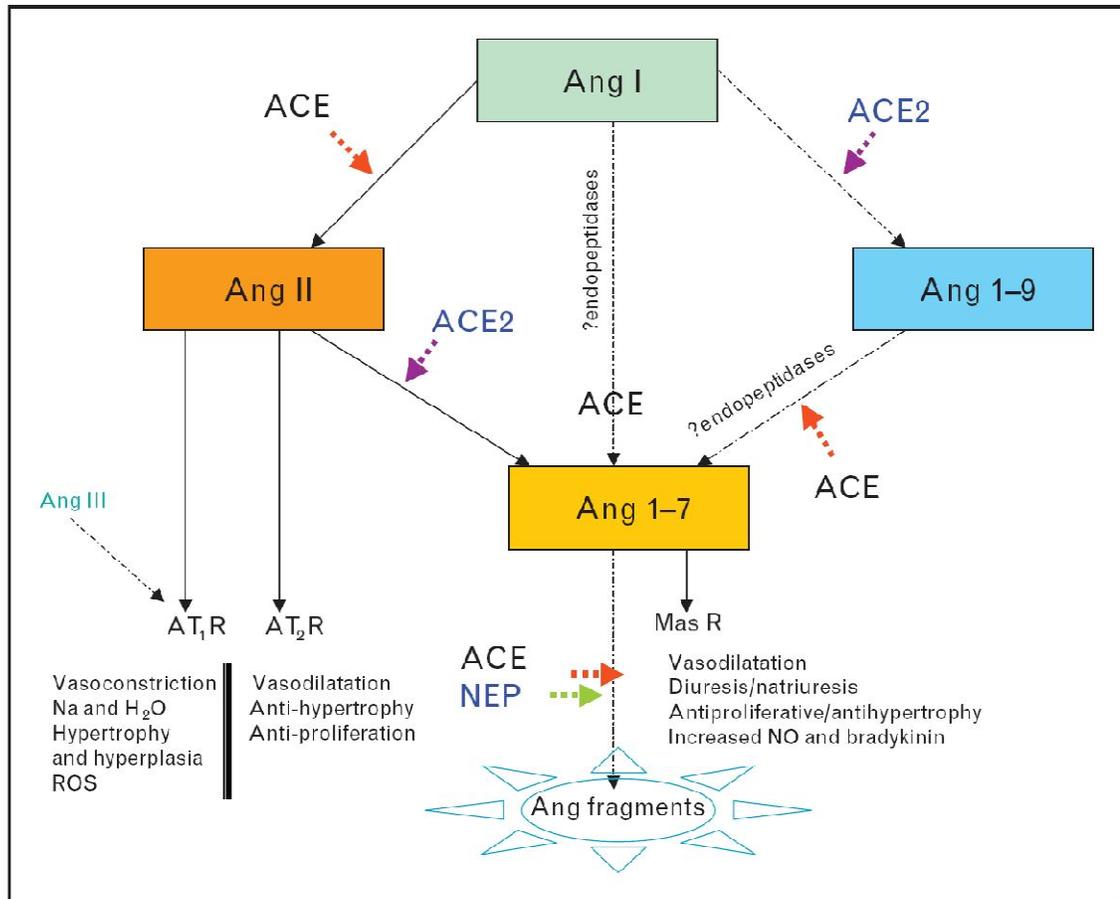


Figure 1-23. Le système rénine-angiotensine [268].

Cependant, des découvertes récentes ont permis l'expansion des connaissances au sujet du RAS. En effet, un homologue de ACE, nommé ACE2, a été découvert comme étant capable de causer le clivage de AngII en AngI-7 (heptapeptide). Ce peptide AngI-7 a de multiples actions qui vont principalement s'opposer à celles décrites comme étant liées à AngII telles que rapporté par Donoghue et al. ainsi que Tipnis et al. en 2000 [269, 270]. ACE2 partage environ 44% de son homologie séquentielle avec ACE, mais ACE2 est insensible aux inhibiteurs de ACE. De plus, il est possible pour AngI d'être clivé pour former AngI-7 par une endopeptidase neutre (neprilysine – NEP) [271]. Cette notion est significative car l'inhibition de ACE va entraîner une élévation des niveaux de AngI. De plus, une élévation des niveaux de AngI-7 pourrait avoir des effets anti-hypertensif [272]. Santos et al. ont ensuite découvert que le proto-oncogène Mas est aussi un récepteur pour AngI-7, et que l'axe ACE2-AngI-7 pourrait faire une contre-régulation des actions de l'axe du système RAS classique [273, 274].

La stimulation ou la diminution de les actions du système RAS sont principalement liées à travers la régulation de la sécrétion de la rénine et son expression. Auparavant, l'expression de Agt n'avait pas été considérée comme un facteur important pour la formation de AngII [275].

Cependant, des recherches nouvelles tendent à démontrer que des changements dans la concentration de Agt peuvent entraîner des modifications dans la formation de AngII [276, 277].

1.6.3 Les canaux ioniques rénaux et le système RAS

C'est à travers la régulation du transport de sodium dans les reins que s'effectue une importante partie de la régulation des fluides extracellulaires et de la pression sanguine artérielle. Différents canaux sodiques sont donc présents dans les différentes structures rénales, notamment au niveau épithélial. Ceux-ci seront régulés par l'action du système RAS.

Name	Identification	Gene name	Location ^a	No. of amino acids	Actual molecular mass (kDa) ^b
NHE3	Type 3 Na-H exchanger	SLC9A3	PT, DL, TAL (apical)	831	84
NaPi-2	Type 2 Na-phosphate cotransporter	SLC34A1	PT (apical)	637	85
NBC1	Type 1 Na-bicarbonate cotransporter	SLC4A4	PT (basolateral)	1035	145
NKCC2	Type 2 Na-K-2Cl cotransporter	SLC12A1	TAL (apical)	1095	163
NCC	Na-Cl cotransporter	SLC12A3	DCT (apical)	1002	165
ENaC- α	α -Subunit of epithelial Na channel	SCNN1A	CNT, CD (apical)	699	86
ENaC- β	β -Subunit of epithelial Na channel	SCNN1B	CNT, CD (apical)	640	88
ENaC- γ	γ -Subunit of epithelial Na channel	SCNN1G	CNT, CD (apical)	649	85
NKA- α_1	Na-K-ATPase, α_1 -subunit	ATP1A1	All segments (basolateral)	1023	98
NKA- β_1	Na-K-ATPase, β_1 -subunit	ATP1B	All segments (basolateral)	304	50

Cl, chloride; H, hydrogen; K, potassium; Na, sodium. ^aTubule segments: PT, proximal tubule; DL, descending limb of Henle's loop; TAL, thick ascending limb of Henle's loop; DCT, distal convoluted tubule; CNT, connecting tubule; CD, collecting duct. ^bEstimated molecular mass determined by immunoblotting.

Figure 1-24. Les principaux canaux sodiques rénaux et leur localisation [278].

1.6.3.1 Canaux NH3

Les canaux de type NHE3, localisés en majorité sur la surface apicale des membranes des tubules proximaux, ce type de canal est le plus important médiateur de la réabsorption de sodium dans le rein. D'une façon intéressante, il a cependant été démontré que sa délétion dans un modèle in vivo n'a eu que de faibles effets phénotypiques [279], étant donné un phénomène de compensation relié à la diminution du taux de filtration glomérulaire [280].

Il est reconnu que l'activation du système RAS est accompagnée d'une hausse du transport du sodium dans les tubules proximaux, et l'inhibition du RAS produit un effet inverse qui diminuera les effets de ACE sur le transport sodique [281]. Dans ce cas, l'angiotensine II, via le récepteur AT₁R, va causer l'augmentation de l'activité des canaux de transport sodique NHE3 par différents mécanismes tels que l'augmentation de l'expression de NH3 à la surface apicale des tubules. Cela fût démontré par des expériences de délétion, durant lesquelles l'Ang II n'a pas eu d'effet sur la régulation des canaux NHE3 [282]. D'autres facteurs que le système RAS peuvent cependant aussi contribuer à la régulation de NHE3, tel que la stimulation par les androgènes ou les hormones thyroïdiennes, ainsi que l'insuline [283, 284].

1.6.3.2 Les canaux Na⁺/K⁺ ATPases

Les canaux Na⁺/K⁺ ATPases se retrouvent sur la membrane basolatérale des cellules de tubules rénaux. Ceux-ci jouent un rôle critique dans le transport actif à travers les membranes cellulaires en permettant le passage contre le gradient de diffusion des ions sodium et potassium.

L'augmentation de l'absorption du sodium par l'action de l'angiotensine se fait partiellement par la régulation des canaux Na^+/K^+ ATPases. Cependant, l'Ang II a des effets différents sur ces canaux dépendamment de sa concentration. À faible concentration, l'Ang II stimule les canaux Na^+/K^+ ATPases. Cependant, à de plus hautes concentrations l'Ang II va inhiber ces canaux à travers la signalisation du récepteur AT_1R et de l'oxyde nitrique. Il est cependant intéressant de noter que, par l'étude d'un modèle animal de rats traités avec des oxydants, il était possible pour l'Ang II de stimuler l'activité de ces canaux peu importe la concentration utilisée. Ces actions sont associées avec l'augmentation de l'expression du récepteur AT_1R [285].

1.6.3.3 Les canaux NKCC2

La réabsorption de sodium se produisant dans la partie ascendante de l'anse de Henle est majoritairement régulée par les canaux sodium-potassium-bi-chlorure (NKCC2). Or, comme cette région rénale est aussi fortement impliquée dans la réabsorption de l'eau durant le processus de concentration de l'urine, la régulation sodique par ces canaux est sans doute reliée à la réabsorption aqueuse plutôt qu'au contrôle du sodium [286]. Il est cependant intéressant de remarquer que des modèles in vivo pour la délétion de NKCC2 souffrent du syndrome de Bartter [287] et de polyurie. Cela est principalement dû à un manque de compensation de la perte de sodium qui coïncide avec une incapacité à réabsorber l'eau au niveau de l'anse de Henle.

1.6.3.4 Canaux Sodium/Phosphate

Les canaux sodium/phosphate (NaPi) sont principalement situés à la surface apicale des tubules proximaux, et ceux-ci sont des canaux symporteurs qui régulent la réabsorption de sodium et de phosphate, et dont la régulation s'effectue par internalisation suite à une diète riche en phosphates [288].

Ces canaux ne semblent pas très régulés par le système RAS dans l'hypertension, mais il semble que l'hypertension joue tout de même un rôle dans leurs modulations [289]. Ainsi, dans les cas de haute pression sanguine, il a été observé que les canaux sodium/phosphate seront redistribués de la membrane en brosse des tubules proximaux vers une internalisation dans ces cellules [290].

1.6.3.5 Canaux sodium/bicarbonate

Les canaux co-transporteurs sodium/bicarbonate situés sur le côté basolatéral des tubules proximaux font partie de la famille des transporteurs de soluté de type 4 (SLC4), dont la principale fonction est de maintenir le pH intra et extracellulaire à un niveau physiologique [291]. Les canaux de type kNBC1, situés sur la membrane basolatérale des tubules proximaux, contribuent à 80% de la réabsorption de du HCO_3^- dans les tubules proximaux. Or, l'angiotensine II est un des importants régulateurs de ces canaux ioniques [292].

Agent	Transporter/pump
Angiotensin II	NHE3 Npt2a kNBC1 (at low concentrations of angiotensin II) Na ⁺ /K ⁺ ATPase (at low concentrations of angiotensin II)
Aldosterone	NHE1 NHE3
Androgens	NHE3
Endothelin-1	NHE3 (acute effect)
Glucocorticoids	NHE3 kNBC1
Glucagon	NHE3 (acute effect)
Nitric oxide	kNBC1
Norepinephrine	NHE3 kNBC1 Na ⁺ /K ⁺ ATPase
Phosphate deprivation	Npt2a
Thyroid hormone	NHE3

Figure 1-25. Agents qui augmentent l'activité des canaux ioniques dans les tubules proximaux. [293]

Agent	Transporter/pump
Angiotensin 1 – 7	Na ⁺ /K ⁺ ATPase (at high concentrations of angiotensin II) Npt2a
Angiotensin 2–8	Na ⁺ /K ⁺ ATPase
Dopamine	Cl/HCO ₃ NHE3 Npt2a and c Na ⁺ /K ⁺ ATPase NBC
Endothelin-1 (chronic)	NHE3
Glucagon (chronic)	NHE3
High dietary phosphate	Npt2a and c
Nitric oxide	NHE3 Na ⁺ /K ⁺ ATPase
Ouabain	NHE3 Na ⁺ /K ⁺ ATPase
Parathyroid hormone	Npt2a and c
Phosphatonins (FGF-23 sFRP-4)	Npt2a

Figure 1-26. Agents qui diminuent l'activité des canaux ioniques des tubules proximaux. [293]

1.6.3.6 Les systèmes RAS locaux

C'est dans les années 70 que l'existence de systèmes RAS locaux indépendants de la circulation locale ont été découverts. Des études ont en effet démontré que l'AngII n'est pas seulement généré dans la circulation systémique par la rénine et ACE dans les poumons, mais aussi produit de façon locale dans de nombreux organes tels que les reins, les vaisseaux sanguins, le cœur, les

glandes adrénales, les yeux, les testicules et le cerveau. À la différence du système RAS systémique, dont l'action est principalement centrée autour d'un système endocrinien qui permet de cibler différents tissus, l'AngII généré par les systèmes RAS locaux pourrait avoir des effets paracrine ou autocrine [294]. Dans ce cas, ce système peut induire l'inflammation, la croissance cellulaire, la mitogénèse, l'apoptose, la migration cellulaire, la différenciation cellulaire ainsi que la régulation de la synthèse de composés actifs et de voies de régulations. De plus, les systèmes RAS locaux pourraient être impliqués dans la médiation de dommages tissulaires [295].

Il y a eu de nombreuses études sur les système RAS intrarénaux [296]. Dans le rein, les cellules de tubules proximaux rénaux (RPTCs) sont capables d'exprimer tous les composants du système RAS [297-299]. Des expériences sur des modèles animaux ont aussi démontré que le taux d'AngII dans le lumen des tubules proximaux est environ mille fois plus élevé que celui dans le plasma (nanomolaire vs picomolaire). De plus, les composants du système RAS ont aussi été détectés dans les glomérules humains et animaux. Ainsi, les concentrations d'AngII dans le filtrat glomérulaire sont significativement plus élevées que celles dans le plasma [300-303]. Il a aussi été démontré que l'AngII produit dans les reins a aussi un important effet dans la régulation des fonctions rénales et de l'hémodynamie [304]. Des études plus approfondies par Navar et al. ont démontré que de nombreuses fonctions rénales et des changements structuraux étaient associés avec la surproduction de l'AngII intrarénal, ce qui entraîne le développement de l'hypertension et des dommages rénaux [305, 306].

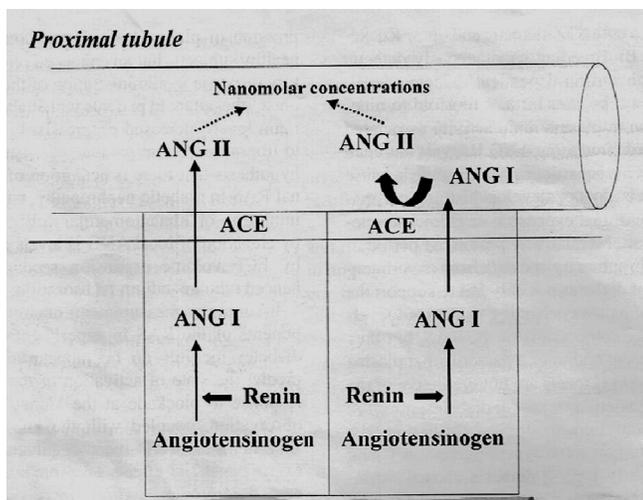


Figure 1-27. Modèle de la sécrétion de l'AngII dans les tubules proximaux [296].

1.6.4 L'activation du système RAS intrarénal et le développement de l'hypertension

1.6.4.1 Les modèles animaux de l'activation du système RAS et l'hypertension

Une des principales fonctions du système RAS est celui de la régulation de la pression sanguine. Pour cette raison, les effets des systèmes RAS locaux sur la régulation de la pression sanguine et

les dommages sur les organes ont été le sujet de nombreuses études. Afin de mieux comprendre comment cette relation s'effectue, différents modèles d'animaux transgéniques ont été développés. Ceux-ci démontrent une surexpression ou une délétion de composants spécifiques du système RAS.

Par exemple, les souris qui ont une délétion pour l'angiotensinogène, l'enzyme ACE ou le récepteur AT1 démontrent une hypotension marquée de plus de 35mmHg, en plus de dommages rénaux, une hyperplasie des artères intrarénales, et une inhabilité à concentrer leur urine, soulignant le rôle critique de ce système dans le rein [307, 308]. Cependant, la délétion complète d'un gène du système rénine-angiotensine ne possède pas que des avantages, car en général, cela ne représente généralement pas un modèle clinique réel dans lequel des patients utilisent des inhibiteurs d'enzyme de conversion ou des bloqueurs du récepteur AT1.

C'est pour cela que des modèles de recombinaison ciblée ont été utilisés afin de moduler l'expression de l'angiotensinogène par l'utilisation d'un nombre de différentes copies du gène [309]. Cette étude, en permettant d'associer chaque copie de l'angiotensinogène avec une augmentation de 8mmHg de la pression sanguine, a permis de valider les études humaines au sujet de la variabilité génétique et son rôle dans les différences de pression sanguine chez les humains [310, 311].

Un autre rôle présumé joué par ACE est celui de la dégradation de la bradykinine, un vasodilatateur agissant sur les vaisseaux sanguins. Afin de mieux comprendre ce phénomène, des souris n'exprimant pas ACE ont été croisées avec des souris dont le récepteur B2 de la bradykinine est manquant [312]. Ce récepteur est présumé être responsable des effets cardiovasculaires de cette molécule. Ainsi, les souris double-transgéniques ont démontré un phénotype équivalent à celui de souris ACE-KO (basse pression, sous-développement de la médulla rénale, difficulté à concentrer l'urine), ce qui semble démontrer que la pathologie principale reliée avec le manque de ACE est le manque d'angiotensine II et non pas un surplus de bradykinine.

a) La souris avec délétions du RAS

i. Les souris avec délétion pour l'angiotensinogène

Tanimoto et al. [307] ont été les premiers à créer une souris avec déficience pour l'Agt, et ils ont observé que ces souris avaient une pression sanguine plus basse que des souris contrôle de même race (67 vs 100 mmHg). Ensuite, Ishida et al. ont rapporté que sur 21 nouveaux nés de souris avec délétion de Agt, seulement 4 ont survécus au-delà de deux semaines [313], ce qui suggère que Agt a un important rôle pour le développement physiologique, ainsi qu'un rôle important dans le développement et le maintien de la morphologie rénale. Lorsque mise en ensemble, ces données indiquent que l'angiotensinogène est un gène important pour la physiologie et le développement rénal.

ii. Les souris avec délétion pour la rénine

Les souris C57BL/6 sont considérées comme un bon modèle pour les études sur la rénine, puisque celle-ci ne possède qu'un seul gène pour la rénine, tout comme les humains [314]. Des recherches effectuées par Takahashi et al. ont ainsi démontré que des souris avec une délétion complète pour le gène de la rénine étaient incapables de concentrer leur urine, en plus de souffrir d'hyponatrémie et de polyurie [315]. De plus, cette souris mutante présentait des changements histologiques rénaux similaires à ceux observés dans les souris avec délétion pour *Agt*. De plus, la pression sanguine des souris avec délétion pour la rénine était plus basse que celle des souris contrôles. Elles présentaient aussi des symptômes d'acidose métabolique, une élévation des taux de créatinine plasmatique et d'urée dans le sang, ce qui indique une réduction significative du taux de filtration glomérulaire. Elles avaient aussi un taux de mortalité plus élevé.

iii. Les souris avec délétion de ACE

Les souris dont le gène ACE a été enlevé présentent une diminution marquée de la pression sanguine systolique ainsi que des changements pathologiques dans les reins. De plus, les papilles rénales sont réduites et les artères intrarénales démontrent une hyperplasie vasculaire associée avec des infiltrats inflammatoires périvasculaires. Les fonctions rénales de ces souris avec délétion pour ACE sont aussi affectées, et elles démontrent une déficience dans la concentration urinaire ainsi qu'une diminution du taux de sodium/potassium urinaire [308]. D'autres études ont aussi démontré que, lorsque combinée avec une délétion de *Agt*, ACE cause une diminution de la pression sanguine [264, 309].

iv. Les souris avec délétion de ACE2

Parmi les différents gènes homologues de ACE, ACE2 est le seul avec une activité enzymatique définie [316]. Ayant une forte expression rénale, ACE2 cause la dégradation de AngII et le clive pour former l'Ang1-7 [316-318]. Afin de mieux définir son rôle dans les maladies rénales, Oudit et al. ont effectué la délétion de ACE2 dans un modèle de souris afin d'évaluer les effets sur la pathophysiologie rénale [319]. Ils ont ainsi trouvé que la perte de ACE2 a été associée avec le développement de glomérulosclérose chez les souris mâles et potentiellement régulée par l'AngII. Gurley et al. ont observé une augmentation significative de la pression sanguine d'environ 7 mmHg dans les souris avec délétion de ACE2 lorsque comparé avec des souris contrôles C57BL/6. Suite à l'injection de AngII, il a été possible d'observer une augmentation de la pression sanguine trois fois plus élevée dans les souris déficientes pour ACE2 que les contrôles [320]. Cette étude suggère ainsi que ACE2 est un composant fonctionnel du système RAS qui permet le métabolisme de AngII et ainsi la régulation de la pression sanguine.

v. Les souris avec déficience pour AT1RA ou AT1RB

Les souris possèdent deux types de récepteurs de type I pour l'angiotensine II [321, 322]. Des expériences effectuées chez les souris ont permis de démontrer que le gène AT1RA est le principal médiateur du tonus vasculaires systémique et périphérique, en plus de jouer un rôle

dans le système nerveux central (CNS). AT₁RB contribue plutôt à la réponse dipsogénique à l'AngII dans le CNS [323-325]. En effet, Oliverio et al. [326] ont démontré que le souris avec délétion pour AT₁RB sont généralement équivalents à des souris contrôles. Celle-ci ne manifestaient pas de changements pathologiques au niveau des organes majeurs tel que le cœur ou les reins, ce qui est consistant avec des études antérieures [324]. Cependant, des souris avec délétion pour AT₁RA et AT₁RB démontrent une diminution significative de la pression sanguine, ainsi que la diminution de la croissance physiologique et rénale, de la fertilité ainsi que de la structure rénale et de l'atrophie de la médulla interne, un épaissement de la paroi artérielle rénale, de l'inflammation corticale interstitielle, la fibrose et l'atrophie tubulaire [326].

vi. Les souris avec délétion de AT₂R

Le récepteur AT₂R a aussi été l'objet de délétion dans un modèle de souris. En contraste avec la réduction de la pression sanguine observée dans le souris avec délétion de AT₁RA, Ichiki et al. ont noté une petite augmentation de la pression sanguine dans les souris avec délétion pour le récepteur AT₂R, ce qui confirme que les récepteurs pour AngII de type 1 sont reliés à la majorité des effets vasoconstricteurs de ce peptide [327]. Des études effectuées par Gross et al. ont aussi démontré par l'utilisation de mesure de pression sanguine que les souris avec délétion pour le gène AT₂ démontrent une augmentation de 17 mmHg de la pression sanguine [328]. Cependant, les souris déficiente pour le récepteur AT₂R semblent normales, et ne souffrent pas de problème de développement ou d'une modification du taux de filtration glomérulaire [329].

vii. Les modèles de souris hétérozygotes avec délétion de composants du RAS

Certains composants du RAS ne peuvent être enlevés sans qu'il y ait des effets physiologiques graves qui empêchent leur étude. Pour cela, des modèles de souris hétérozygotes avec délétion de composants du RAS deviennent beaucoup plus intéressants pour l'étude de ce système. Par exemple, des souris hétérozygotes pour une délétion complète de Agt ont été générées par Smithies et al. [330], et Sugaya et al. ont croisé un autre modèle avec délétion spécifique pour le gène AT₁RA. De l'hypotension chronique a été observée chez ces souris lorsque comparé à des contrôles, bien que la diminution de la pression sanguine ne soit pas aussi élevée que sur des modèles homozygotes [331].

b) Modèles de souris avec surexpression systémique ou intrarénale du RAS

i. Les souris surexprimant le RAS de façon systémique

Une autre méthode d'étudier les effets du système RAS est de sur-exprimer certains de ses composants. Par exemple, Hatae et al. ont démontré que certains composants du système RAS sont hautement spécifiques selon les espèces. Par exemple, la rénine humaine est incapable de causer le clivage de l'angiotensinogène de souris, et vice-versa. Donc, seules les souris surexprimant à la fois la rénine et l'angiotensinogène humaine démontrent de l'hypertension [332-334].

ii. Les souris surexprimant le RAS local

En plus du RAS systémique, de nombreuses études ont été effectuées sur les niveaux des composants de RAS local ou tissulaire. Parmi ceux-ci, le RAS intrarénal a été l'objet de nombreuses études. Afin de mieux étudier le rôle de ses composants, différents modèles animaux surexprimant des composants spécifiques du RAS ont été créés. De plus, il est possible de moduler une surexpression spécifique aux tissus rénaux par l'utilisation du promoteur spécifique au rein régulé par les androgènes (KAP), qui est fortement exprimé de façon spécifique dans les tubules proximaux rénaux.

Le gène KAP a d'abord été identifié comme une protéine d'environ 20kD dont la fonction était inconnue mais fortement exprimé dans les tissus du rein. Le gène KAP représente environ 4% de l'expression d'ARNm total du rein [335]. De plus, différentes analyses ont démontré que le gène KAP est le deuxième gène en importance de son expression rénale [336]. Des études d'hybridation *in situ* sont parvenues à démontrer son expression localisée sur les tubules proximaux contournés chez les souris mâles et les femelles injectées avec testostérone [337]. En se basant sur la localisation cellulaire de l'ARNm de KAP dans le rein, Ding et al. sont parvenus à développer une souris transgénique combinant le transgène de l'angiotensinogène humaine avec le promoteur KAP (KAP-hAgt), ce qui a permis de démontrer que ce promoteur va propulser l'expression du gène hAgt de façon spécifique dans les tubules proximaux [338].

En se basant sur cette information, Lavoie et al. ont généré une souris transgénique qui surexprime à la fois la rénine et l'angiotensinogène humaine de façon spécifique dans les tubules proximaux à l'aide d'un vecteur d'expression modifié (KAP2) à partir du vecteur KAP [339]. Il a été possible d'observer une hausse significative de la pression sanguine dans ces souris double transgéniques. Ces souris, créées par un croisement entre deux espèces hétérozygotes, démontrent que le système RAS intrarénal peut avoir un effet significatif sur la pression sanguine.

1.6.5 Modèles *in vitro* de l'activation du système RAS

Des études *in vivo* peuvent être effectuées pour mieux définir les mécanismes de l'activation du RAS intrarénal. C'est pour cette raison que différentes lignées cellulaires de tubules proximaux ont été développées, telles que les cellules LLC-PK1 provenant de l'épithélium tubulaire de porcs, les cellules HK-2 de tubules proximaux humains, les cellules épithéliales rénales d'opossum, les cellules cEPT de l'épithélium de tubules proximaux de lapin, les cellules MCT de souris.

1.6.5.1 Les cellules HK-2

La lignée des cellules HK-2 a été développée par la transduction des gènes E6/E7 du virus de papillome humain dans les cellules primaires de tubules proximaux rénaux humains. Les cellules ont gardé un phénotype de cellules de tubules proximaux, et sont marquées positivement pour l'alkaline phosphatase, la cytokératine, les intégrines $\alpha\beta 1$ et la fibronectine. De plus, les cellules HK-2 ont gardé de nombreuses caractéristiques fonctionnelles des cellules de tubules

proximaux, par exemple, elles conservent le mécanisme de transport des sucres dépendant du sodium, ainsi que les réponses des adénylates cyclases aux hormones parathyroïdes. Pour cette raison, les auteurs de la synthèse de cette lignée cellulaire ont conclu qu'elle pourra être un outil utile pour l'étude des mécanismes cellulaires reliés à la pathophysiologie des cellules de tubules proximaux[340]. De plus, les cellules HK-2 ont été utilisées pour caractériser les effet du RAS [341] [342].

1.6.5.2 Les cellules IRPTCs

C'est en 1995 que le groupe d'Ingelfinger et al. a, par la transformation de cellules de tubules proximaux de rats immortalisées, établi une lignée cellulaire stable jusqu'à 45 passage et qui semble exprimés tous les composants du système RAS tels que ACE et les récepteurs pour l'AngII [343]. De plus, de nombreux marqueurs des cellules de tubules proximaux sont aussi présent dans cette lignée cellulaire, tels que la cytokétatine, les anhydrases carboniques et le transporteur du glucose GLUT2.

1.6.6 Mesures de la pression sanguine

La pression sanguine est sans doute parmi les plus importants paramètres cliniques des modèles expérimentaux de l'hypertension, et pour cette raison une variété de techniques est utilisée pour la mesurer. Dans les modèles animaux, la méthode de mesure la plus commune est l'utilisation de brassard ou d'un cathéter [344]. Ces méthodes ont des avantages tels que la simplicité et la rapidité des mesures, mais souffrent de certains inconvénients tels que la nécessité de restreindre les animaux ainsi que d'élever la température ambiante durant les prises de pression. Ces inconvénients entraînent ainsi des élévations des taux de cortisol et de catécholamines. Ainsi, bien qu'imparfaites, ces techniques de mesure de la pression sanguine sont généralement considérées comme fiables lorsque effectuées sur une plus longue période dans différents groupes d'animaux.

Pour ces raisons, la radio-téléométrie est une solution alternative pour obtenir des mesures de pressions sanguines d'animaux dans un environnement contrôlé, sans la présence de facteurs pouvant influencer ces mesures. Cette méthode consiste en l'implémentation d'un transmetteur par cathéter près de l'aorte abdominale d'animaux anesthésiés. Les animaux sont ensuite libre d'évoluer dans leur cage, le transmetteur relayant l'information sur la pression sanguine à des appareils de réception et un ordinateur qui permet l'acquisition des données. Ainsi, la téléométrie permet la vérification en temps réel de la pression sanguine [345, 346]. Bien que ce système possède de nombreux avantages par rapport à la prise de la pression sanguine classique, son coût d'opération élevé (environ 3000\$ par unité) limite son utilisation.

1.6.7 Le système RAS intrarénal et la néphropathie diabétique

Dans les conditions diabétiques, les mesures des composants du RAS indiquent sa sous-expression dans les animaux. De plus, des études cliniques suggèrent cependant son activation intrarénale dans la néphropathie diabétique. Les inhibiteurs de ACE et les bloqueurs de AT1R démontrent des effets bénéfiques en améliorant les conditions de la protéinurie dans les

modèles expérimentaux et cliniques de la néphropathie diabétique, ce qui permet d'impliquer le système RAS dans cette pathologie. De plus, différents groupes ont démontré une surexpression de la rénine intrarénale au niveau de l'ARNm et de l'expression protéique. Zimpelmann et al. ont en effet rapporté une élévation de l'ARNm de la rénine dans les tubules proximaux de rats diabétiques par injections de streptozotocine (un agent toxique pour les cellules β du pancréas), ce qui a été prévenue par des traitements à l'insuline, suggérant l'activation du RAS par la condition d'hyperglycémie [347].

Des expériences antérieures dans notre laboratoire à l'aide de cellules IRPTCs de rat cultivées dans un médium riche en glucose expriment des niveaux plus élevés d'angiotensinogène lorsque comparées à des cellules dans un milieu normal. Cet effet était aussi dose-dépendant [348]. D'autres groupes ont aussi observé l'activation du RAS glomérulaire à l'aide de cultures de cellules mésangiales de rats mise en condition de haute pression similaire à celle que l'on retrouve dans la néphropathie diabétique [302]. Ainsi, l'activation du système RAS local dans les conditions diabétiques pourrait corrélérer avec une augmentation de la génération d'AngII dans les reins.

1.6.8 Les effets hémodynamiques de l'angiotensine II

Dans les années 1970 des expériences de micro-injections à l'aide de rats transfusés avec de l'AngII ont démontré que ce peptide parvenait à hausser la résistance des artérioles afférentes et efférentes, mais de façon plus marquée sur les artérioles afférentes. Conséquemment, l'AngII a été définie comme étant un composé capable de causer une augmentation de la pression des capillaires glomérulaires [349, 350]. Par la suite, d'autres observations furent reliées aux conditions diabétiques de modèles de rat, telle que l'hypertension des capillaires glomérulaires, la protéinurie et des anormalités rénales. Les traitements avec des inhibiteurs de ACE parvenant à normaliser la pression des capillaires glomérulaires ainsi que prévenant la protéinurie et la anormalité rénales, cela suggère que les effets hémodynamiques sont un élément central de la pathogénèse de la néphropathie diabétique [351, 352].

Des études cliniques effectuées avec des patients atteints de diabète de type 2 avec albuminurie ont démontré une augmentation de la pression glomérulaire ainsi que de la résistance artériolaire efférente lorsque comparé avec des patients sans albuminurie [353]. En résumé, ces études cliniques confirment l'importance du rôle de l'AngII dans la pathogénèse de la néphropathie diabétique.

1.6.9 L'angiotensine II et ses effets non-hémodynamiques

Différentes études ont démontré que l'AngII peut agir comme un facteur de croissance pour les cellules rénales, ce qui cause à la fois hypertrophie et la prolifération [354]. Ainsi, la prolifération de cellules mésangiales résulte en une augmentation de la synthèse de la matrice extracellulaire, ce qui contribue à la glomérulosclérose caractéristique de la néphropathie diabétique. De plus, TGF- β 1 est un élément important qui contribue au développement de

dommages rénaux. Or, comme l'AngII augmente l'expression de TGF- β 1, sans doute à travers l'activation des PKC et de la voie de p38 MAPK et de la voie des JAK/STAT [355, 356].

Un autre facteur de croissance nommée VEGF (facteur de croissance vasculaire endothélial) est abondamment exprimé dans l'épithélium des glomérules rénaux et des cellules des tubules collecteurs [357]. Williams et al. ont démontré que l'AngII parvient à stimuler l'expression de VEGF [358], et des niveaux de VEGF plasmiques élevés ont été observés par Hovind et al. chez des patients avec le diabète de type 1 souffrant de néphropathie diabétique [359]. Le VEGF induit aussi l'angiogénèse et augmente de façon significative la perméabilité microvasculaire, ce qui indique un rôle clé dans le développement de la pathogénèse reliés aux complications microvasculaires rénales [358].

L'AngII a aussi été observé comme étant capable d'augmenter l'expression du gène PAI-1 dans les cultures de cellules mésangiales, ce qui contrôle les activateurs de plasminogène et a comme effet de d'augmenter l'accumulation de la matrice extracellulaire.

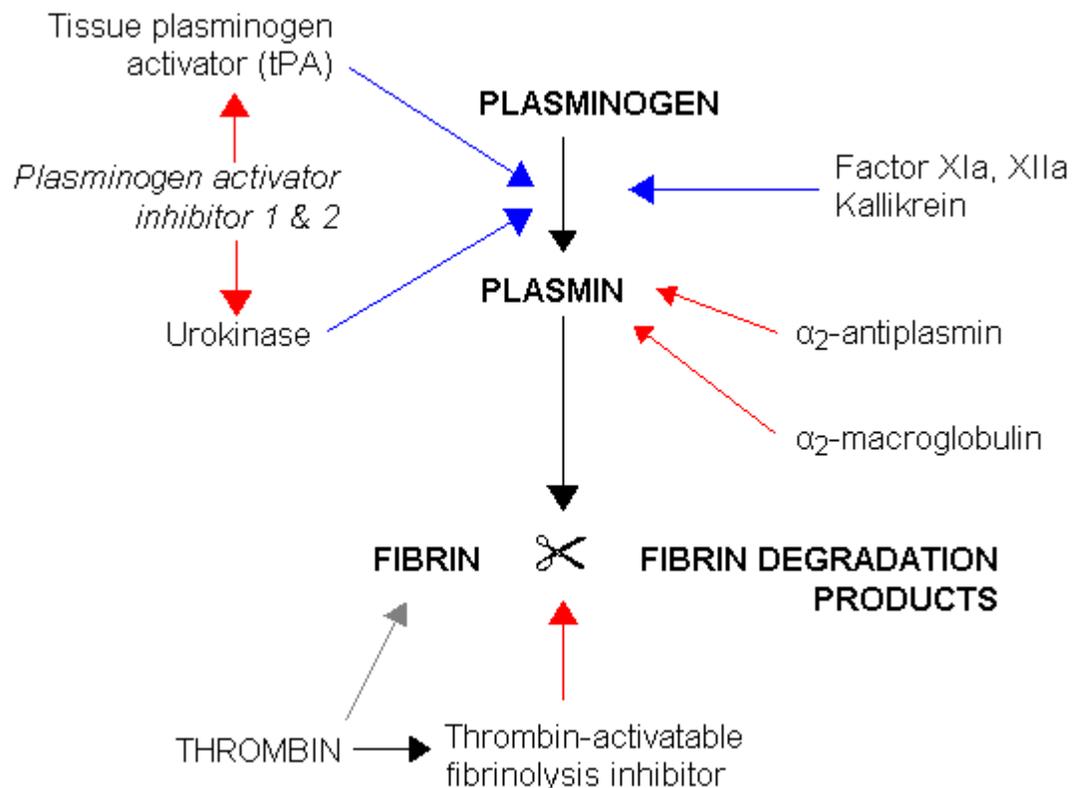


Figure 1-28. L'activation de PAI et son rôle dans la fibrose. En contrôlant la synthèse de plasmine qui dégradera les protéines fibrotique fibrines, les facteurs PAI moduleront la fibrose rénale. [360]

Dans notre laboratoire, des modèles de souris transgéniques surexpriment l'Agt dans les tubules proximaux ont été utilisées comme modèle de l'activation du RAS intrarénal. Ces souris ont été caractérisées comme ayant un niveau d'expression de TGF- β 1 et de PAI-1 plus élevés que des

souris contrôles. De plus, un niveau de fibrose interstitiel plus élevé a été observé, ce qui supporte le rôle de l'AngII et de ses effets non-hémodynamiques.

1.6.10 Les effets de bloqueurs du RAS chez les patients diabétiques

Un des marqueurs les plus fiables de dommages rénaux caractéristiques à la néphropathie diabétique est la présence de microalbuminurie, et sa prévention est la clé pour ralentir la progression de la néphropathie diabétique. L'étude clinique HOPE (*Heart Outcomes Prevention Evaluation*) a en effet observé entre 1994 et 1999 que le degré de l'albuminurie était un facteur de risque significatif des maladies cardiovasculaires chez des patients atteints de diabète ou non [361]. Un autre essai clinique par Mogensen et al. a démontré que la présence de microalbuminurie est aussi associée avec une augmentation de la pression sanguine et de l'hyperfiltration rénale [362]. Différentes études ont aussi confirmé que des traitements avec des agents anti-hypertension ont eu des effets protecteurs sur la microalbuminurie de patients atteints de diabète de type 1. Une méta-analyse effectuée sur cette étude a aussi conclu que les inhibiteurs de ACE parviennent à réduire la progression de la microalbuminurie et augmentent les chances de rémission. Bien que la capacité des inhibiteurs de ACE à réduire la pression sanguine n'explique pas complètement leur rôle dans la diminution des effets anti-protéiques, différentes données tendent à démontrer que ceux-ci parviennent à prévenir la progression de la néphropathie, ce qui permet la conservation des fonctions rénales à plus long terme [363]. Les inhibiteurs de ACE sont donc suggérés comme un traitement utile pour les patients atteints de diabète de type 1 avec microalbuminurie, et ce sans égard pour la pression sanguine.

Dans le diabète de type 2, différentes études ont aussi rapporté les effets rénoprotecteurs des traitements avec des antihypertenseurs sur des patients avec hypertension et microalbuminurie [364-366], mais il n'est pas encore totalement clair si l'effet rénoprotecteur de ces agents réside dans leur actions hypotensives. L'étude BENEDICT (*Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial*) a démontré que les inhibiteurs de ACE parviennent à réduire la progression de la microalbuminurie dans les patients atteints de diabète de type 2 avec hypertension mais sans albuminurie [367]. Cependant, d'autres études cliniques sur des patients hypertendus ont démontré que l'utilisation des inhibiteurs de ACE ou de bloqueurs de récepteurs de l'angiotensinogène parviennent à réduire l'incidence du diabète. Les traitements avec ces agents sont aussi connus comme étant capable d'exercer différents effets métaboliques positifs, tel que l'augmentation de la sensibilité à l'insuline [368].

De plus, même si la néphropathie diabétique se développe chez les patients atteints de diabète de type 1, les traitements avec des agents antihypertenseurs parviennent quand même à avoir des effets rénoprotecteurs. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de ACE réduit le déclin du taux de filtration glomérulaire et réduit la protéinurie chez ces patients [369]. Les agents bloqueurs du récepteur pour l'angiotensine ont des effets similaires chez les patients atteints de diabète de type 1 avec néphropathie diabétique [370]. Deux importantes études effectuées sur plusieurs pays, RENAAL et IDNT (*Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan, Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial*) ont tenté de déterminer les effets

rénoprotecteurs de ces bloqueurs du récepteur pour l'angiotensine chez des patients atteints de diabète de type 2 avec néphropathie diabétique et une élévation des niveaux de créatinine sérique. Ces deux études ont confirmé les effets rénoprotecteurs des traitements avec les bloqueurs pour le récepteur de l'angiotensine sur la progression de la néphropathie diabétique, en plus de diminuer la pression sanguine chez ces patients [371, 372]. Aussi, un rapport de l'étude clinique ADVANCE (*Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron MR Controlled Evaluation*) impliquant plus de 200 centres dans 20 différents pays a démontré que la combinaison d'inhibiteurs de ACE avec le diurétique indapamide chez des patients atteints de diabète a permis de réduire le taux de mortalité et les complications micro et macro-vasculaires. Cet effet a été rapporté indépendamment de la pression sanguine ou de traitements avec d'autres agents préventifs prescrits aux patients diabétiques. Il a aussi été conclu que ces traitements ont été bien toléré et utiles dans de nombreuses conditions cliniques mondiales. Il a aussi été prédit que si les bénéfices observés dans l'étude ADVANCE étaient appliqués à seulement la moitié des patients diabétiques mondiaux, que plus d'un million de morts pourraient être prévenues au cours de cinq années. Pour cette raison, il est maintenant considéré de combiner des traitements avec l'inhibiteur de ACE périndopril et l'indapamide chez les patients atteints de diabète de type 2 [373].

1.6.11 Le rôle des reins dans la régulation de la pression sanguine

Les études expérimentales et cliniques confirment le rôle du rein dans le contrôle de la pression sanguine. Différentes études suggèrent en effet que le rein est un important organe dans le développement de l'hypertension systémique chez des patients et sur différents modèles d'animaux hypertendus. Des expériences de transplantation effectuées sur des modèles animaux et humains ont démontré que les receveurs de greffes avaient une pression sanguine plus élevée si les donneurs étaient atteints ou prédisposés à l'hypertension. Des expériences effectuées antérieurement par Dahl et Heine [374] ont permis d'observer, par des transplantations rénales entre des rats sensible ou non à l'hypertension, que le phénotype de sensibilité à l'hypertension suivait le rein : un rein d'un animal sensible à l'hypertension causait celle-ci dans un rat normalement résistant, alors que la transplantation de rein d'un rat résistant diminuait la pression sanguine chez le rat sensible receveur. De façon similaire, une baisse de la pression sanguine a été observée chez des receveurs humains hypertendus de transplantations rénales dont les donneurs ne souffraient pas d'hypertension [375]. Ces études supportent ainsi le concept que l'hypertension systémique peut provenir de pathologies rénales qui induisent cette condition [306].

La pression sanguine est régulée par une variété de systèmes hormonaux qui incluent le RAS. Or, même dans une condition normotensive, les taux intrarénaux de AngII sont beaucoup plus élevés que les niveaux plasmiqes [376]. En condition d'hypertension, les niveaux d'AngII sont encore beaucoup plus élevés à cause de l'intervention de multiples mécanismes. De plus, des expériences conduites par Crowley et al. [377] ont démontré que les niveaux de récepteurs AT1R dans les reins étaient principalement responsables du potentiel hypertensif de l'AngII. Cela fut clairement illustré dans un modèle animal avec délétion du récepteur AT₁RA pour l'AngII,

alors que la présence de ce récepteur dans le rein seulement est parvenue à rétablir le phénotype de l'hypertension suivant des injections d'AngII. De façon inverse, la délétion de AT₁RA dans les reins seulement est parvenue à protéger les animaux de l'hypertension causée par une injection d'AngII et ce malgré l'expression de ce récepteur dans différents autres organes critiques à la régulation de la pression sanguine tels que le cerveau, le cœur, le système vasculaire et les glandes adrénales. Avant ces expériences, il fut rapporté par le même groupe que la délétion spécifique au rein de AT₁RA causait une diminution d'environ 20 mmHg de la pression sanguine malgré une expression normale de ce récepteur dans tous les autres tissus. De plus, il a été démontré que les niveaux d'aldostérone n'étaient pas affectés dans ce modèle animal. Ces données semblent indiquer que la pression sanguine est régulée par le récepteur AT₁R situé sur les cellules rénales. Ainsi, la réduction de la pression sanguine dans les animaux avec délétion rénale de l'AT₁RA était une conséquence directe de l'interruption des actions de l'AT₁R sur la vasculature rénale. Ainsi, les dysfonctions de l'épithélium rénal pourraient influencer la réabsorption rénale du sodium combinée avec l'excrétion de sodium urinaire [378]. En effet, une alimentation riche en sel a permis de renverser la baisse de pression sanguine observée dans ce modèle animal [379]. Plusieurs expériences effectuées par le groupe de Tomas Coffman ont aussi joué un rôle primordial dans la meilleure compréhension de ces données [323, 380-382].

1.6.12 L'hypertension et la néphropathie

Les reins sont des organes ayant un rôle central dans la régulation de la pression sanguine. Dans cette logique, la condition de haute pression sanguine peut causer des dommages aux reins, un terme nommé néphropathie hypertensive ou néphrosclérose hypertensive. Après la néphropathie diabétique, la néphropathie hypertensive est la seconde principale cause d'insuffisance rénale. Celle-ci peut affecter les vaisseaux sanguins des artères interlobaires. De leur part, les artéioles glomérulaire afférentes ou efférentes présentent de l'artériosclérose, tandis que les artères interlobaires manifesteront de l'hypertrophie myointime, correspondant à l'hypertrophie du media et à l'élasticité interne de la lamina. Les parois des artères et artéioles présentent aussi un épaississement relié à des dépôts positifs pour la hyaline, eosinophile et positif pour le test acide périodique de Schiff. À ces endroits, les cellules de muscles lisses sont atrophiées. En plus de ces changements artériolaires, les glomérules sont habituellement ischémiques et leur murs capillaires sont épaissis et affaiblis. Des lésions typiques de la glomérulosclérose focale segmentale sont aussi communes. Les tubules rénaux sont atrophiés et microcystiques, et de nombreux tubules contiennent des fragments protéiques. L'interstice tubulaire est fibrotique et contient de nombreuses cellules inflammatoires [383].

Cependant, cette relation entre l'hypertension et les reins est loin d'être claire. Une raison pour cela consiste au fait que les lésions vasculaires et glomérulaires décrites dans la néphropathie hypertensive peuvent aussi se retrouver dans les reins sans la présence de l'hypertension, en particulier en lien avec l'âge. De plus, les différences raciales sont évidentes et compliquent ce problème [384, 385]. Néanmoins, les connaissances indiquent que l'obésité, la cigarette, l'intolérance au sucres, l'hyperlipidémie et l'exposition à des néphrotoxines contribuent à la

néphrosclérose hypertensive et sont des composants qui laissent à penser que cette condition peut potentiellement être traitée par des changements de l'habitude de vie ainsi que par une baisse de la pression sanguine [386].

1.7 Les modèles animaux des maladies rénales

1.7.1 Les modèles de néphropathie diabétique

Puisque les recherches sur des sujets humains sont limitées, différents modèles animaux sont utilisés pour mieux comprendre la pathogénèse des maladies. Dans le cas du diabète, différents modèles animaux sont disponibles pour le diabète de types 1 ou 2. Par exemple, l'agent STZ est communément employé pour induire le diabète par des méthodes variées. Cet agent parvient à induire le diabète de type 1 par la destruction des cellules β du pancréas [387]. Cependant, ce produit a aussi des effets dommageables pour les reins inévitables. Par exemple, il a été rapporté que le STZ cause la nécrose tubulaire, des réductions du taux de filtration glomérulaire et des infiltrats de cellules inflammatoires [388], ce qui rend toute publication avec ce modèle plus complexe.

Un autre modèle populaire du diabète de type 1 est la souris Akita (C57BL/6-Ins2Akita/J). Ces souris possèdent une mutation sur le locus du gène *Ins2*, ce qui empêche la production d'insuline fonctionnelle chez ces souris. De plus, cette mutation entraîne la mort des cellules β du pancréas (possiblement par suraccumulation de protéines non fonctionnelles dans les cellules) et réduit l'expression d'insuline de ces souris à un niveau très bas environ trois ou quatre semaines après leur naissance [389]. Ainsi, les souris Akita développent des complications rénales, mais celle-ci sont moins graves que ce que l'on retrouve chez d'autres modèles de diabète de type 1.

En ce qui concerne le diabète de type 2, deux principaux modèles d'études ont été étudiés de façon approfondie. Les souris *db/db* et *ob/ob*, qui démontrent de nombreuses caractéristiques similaires à celles que l'on retrouve dans la néphropathie diabétique humaine. Ces souris, par mutation sur le gène ou le récepteur à la leptine, deviennent grasses ce qui se transpose par une évolution de pathologies rénales liées au diabète [390].

1.7.1.1 Hypertension, diabète et récepteur pour la leptine

Un autre modèle de souris associé avec l'hypertension et l'obésité sont les souris *db/db*, déficientes pour le récepteur à la leptine. Celles-ci, bien que obèses, ne souffrent pas nécessairement d'hypertension. Cependant, elles sont beaucoup plus susceptibles de souffrir de dommages rénaux que des souris contrôles, et semblent présenter les caractéristiques du syndrome métabolique, en plus de devenir diabétiques (type II). C'est pour cela que des recherches à l'aide de cette souris ont été effectuées en combinaison avec une diète riche en sel et implantation d'acétate de désoxycorticostérone (DOCA), un produit qui augmente la réabsorption de sodium dans le rein [391].

Il a donc été démontré par ces études que la pression sanguine des souris était plus élevée dans les souris traitées avec DOCA que dans les autres groupes. Différents marqueurs de dommages rénaux, tels que les niveaux urinaires de MCP-1, de collagène IV et d'albumine étaient aussi augmentés dans les souris avec DOCA, et plus particulièrement en association avec l'obésité. De plus, il a été déterminé que ces dommages rénaux étaient particulièrement reliés avec le stress oxydatif préexistant dans les souris obèses.

Cette augmentation du stress oxydatif, reliée à une augmentation de l'inflammation rénale, réitère ainsi que bien que l'hypertension accélère le développement de la néphropathie diabétique, et que même une augmentation modérée de la pression sanguine risque d'être dangereuse pour un patient atteint du syndrome métabolique. Ainsi, des combinaisons utilisant des agents anti-oxydatifs et anti-inflammatoire pourrait être bénéfique pour la santé des patients, en plus d'agents anti-hypertensif et la perte de poids.

Ce lien entre dommage rénal et stress oxydatif a ainsi pu être démontré par l'utilisation de souris db/db surexprimant la catalase dans les tubules proximaux rénaux [254]. En effet, dans ce modèle de souris, il a été démontré que la surexpression de cette protéine anti-oxydante a diminué les nombreuses pathologies observées chez les souris db/db, notamment en ce qui concerne l'apoptose, la hausse de la pression sanguine et l'albuminurie.

1.7.1.2 Rat Dahl sensibles et SHR

La protéinurie reste le meilleur indicateur de la progression vers l'insuffisance rénale, et constitue un facteur de risque important dans le développement de maladies cardio-vasculaires [392]. Selon les études, l'insuffisance rénale possède des composants génétiques, en plus des facteurs traditionnels tels que l'âge et la diète [393, 394]. De nombreuses études génétiques ont donc été menées afin de découvrir les gènes responsables de l'insuffisance cardiaque. Cependant, un nombre limité d'études reliées aux analyses d'association du génome complet [395].

Afin d'effectuer ce genre d'études génétique en association avec l'hypertension, les rats sensibles au sel Dahl ont été étudiés [396, 397]. Ceux-ci lorsque soumis à une diète riche en sel, développent rapidement de l'hypertension et une protéinurie associée avec la rétractation du processus des pédicelles des podocytes [398]. Cette hypertension n'est cependant pas immédiatement associée avec une diminution des fonctions rénales ou la perte de glomérules. Cependant, avec la progression de cette hypertension, les dommages rénaux apparaissent et les lésions des fonctions rénales et glomérulaires se prononcent [399].

Un autre type d'étude consiste à utiliser une lignée d'animaux avec un phénotype contrastant. C'est pourquoi les rats Dahl ont été croisés avec des rats spontanément hypertendus (SHR). Ceux-ci, malgré l'apparition rapide de l'hypertension, développent plutôt lentement des lésions rénales lorsque comparé aux rats Dahl. C'est pour cela qu'en transférant des locus de susceptibilité (RNO8 et RNO13) de rats SHR dans les rats Dahl, il a été observé une diminution marquée de la protéinurie et une augmentation des fonctions rénales dans les rats Dahl

transgéniques. De plus, une diminution des dommages glomérulaires et tubulaire a été démontrée, ce qui confirme le rôle que jouent ces loci dans l'expression phénotypique de gènes reliés à la protéinurie [400, 401].

Les rôles joués par les reins dans les complications reliées à l'hypertension sont évidents. Bien que les modèles animaux ne représentent pas toujours exactement les pathologies humaines, ceux-ci restent néanmoins des outils précieux afin de mieux comprendre l'évolution et la régulation des phénomènes reliés aux reins et à l'hypertension. Au cours des années, le développement d'outils génétiques de plus en plus perfectionnés indique que l'étude de la régulation de pathologies par différents modèles animaux pourra s'effectuer de façon de plus en plus élégante. Étant donné les limitations des modèles de délétion complète de gènes, les techniques de délétion spécifiques aux tissus et d'expression conditionnelle permettront de faire avancer les connaissances dans ce domaine.

1.8 Technologies de micro-puces et les pathologies rénale

1.8.1 Les micro-puces

De plus en plus, l'étude de maladies complexes telles que le diabète ou l'hypertension nécessite une compréhension plus complète des réseaux moléculaires et biochimiques qui participent aux différentes pathologies physiologiques. Or, pour être en mesure de mieux définir les relations entre ces réseaux, il est primordial de pouvoir compter sur un outil qui offre un aperçu immédiat des niveaux d'expression d'une multitude de transcrits biologiques. Une telle technologie est disponible, il s'agit des micro-puces à ADN. Cette technologie permet de passer de l'analyses des fonctions de gènes spécifiques à une étude exhaustive des milliers de transcrits. Ainsi, il est possible de mieux comprendre l'interaction entre des dizaines de voies biologiques présentes dans un modèle biologique et sur un tissu spécifique [402].

Décrite depuis 1995 [403] mais utilisée de façon plus générale depuis le début des années 2000, la technologie des micro-puces à ADN est en soi simple : il s'agit simplement de molécules d'ADN (sondes) alignées ou attachées sur une surface solide, la plupart du temps une puce de composés polymères [404]. Cette plate-forme permet ainsi, par la liaison entre les nucléotides d'un échantillon type et l'ADN des sondes sur la puce, de déterminer le niveau d'expression de milliers de gènes cibles par le transfert d'un signal correspondant à la quantité de nucléotides marqué lié sur la puce.

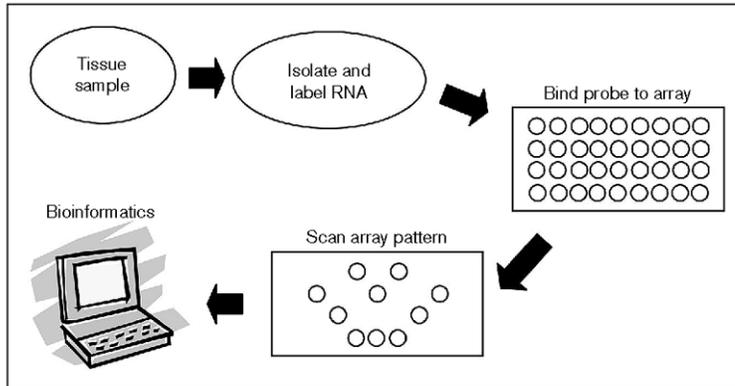


Figure 1-29. Schéma d'une expérience de micro-puces. *Affymetrix.com*

La réalisation d'une expérience de micro-puces se fait en plusieurs étapes qui peuvent varier selon le type d'expérience et de micro-puces. Dans les cas de puces d'expression de transcrits génétiques de type simple Affymetrix (ARNm), voici cette séquence :

- i. Purification : Les échantillons sont purifiés, et l'ARNm des cellules est isolé.
- ii. Transcription inverse : L'ARNm est transformé en ADNc par enzyme de transcriptase inverse
- iii. Un second brin d'ADNc complémentaire est synthétisé à partir du produit de transcription inverse, transformant le produit ADNc en ADN double-brin.
- iv. Une transcription In Vitro est ensuite réalisée avec de l'ARN marqué avec de la biotine (marqueur fluorescent) afin d'amplifier cet ARN (ARN amplifié)
- v. Suivant une purification de cet ARN, celui-ci est hybridé sur la puce en vue d'analyse du signal de fluorescence.

Les technologies de puces ont cependant des faiblesses, l'une d'entre elle étant basée sur la dépendance de cette technologie à une excellente compréhension de la majorité des gènes et transcrits présent dans un organisme. Ainsi, la limite des technologies des micro-puces est dépendante de la quantité et de la validité des annotations reliées aux amorces hybridées sur les puces [405, 406]. De plus, il faut s'assurer, par des études de la qualité de l'ARNm, qu'il n'y a pas de présence d'autres nucléotides tels que l'ADN dans les échantillons utilisés pour les expériences de micro-puces.

1.8.2 Historiques des études de micro-puces dans les maladies rénales

Dans le cadre de cette thèse, différentes analyses de micro-puces ont été effectuées sur les modèles développés dans notre laboratoire. Or, depuis la mise au point de cette méthode d'analyse génomique, différents groupes ont utilisés cette technologie pour établir un profil d'expression génétique et tenter de découvrir de nouveaux gènes impliqués dans l'évolution de maladie rénales.

Une des premières analyses impliquant les reins de souris diabétiques a été effectuée par Wada et al. en 2001 [407] sur un modèle de souris diabétiques induites par injections de STZ. Pour ce faire, ceux-ci ont isolé l'ARNm de reins totaux de souris ayant subi ou non une néphrectomie avant d'utiliser la technologie de micro-puces à ADN afin de déterminer les voies métaboliques impliqués dans la progression de la néphropathie diabétique. Par ces analyses, de nombreux gènes potentiellement impliqués dans ce modèle ont été déterminés, tels que des gènes reliés à la gluconéogenèse, ainsi que des gènes reliés au métabolisme des lipides. De plus, différents gènes reliés au MAP kinases et à la génération de protéine de la matrice extracellulaire ont été observés comme étant surexprimés dans les reins de souris injectées avec STZ. Ainsi, cette étude fût une des premières investigations permettant de mieux comprendre les changements rénaux reliés à la progression de la néphropathie diabétique, tout en affirmant la possibilité de l'utilisation des méthodes de biotechnologiques à haut débit pour la compréhension des pathologies rénales.

En 2004, une autre série d'analyses par micro-puces sur différents modèles de néphropathie diabétique a été effectuée par Susztak et al. [408], qui ont isolé l'ARNm de reins totaux provenant de deux modèles distincts, soit les souris db/db ou les souris induites au diabète par injections de STZ et comparées avec des contrôles. De façon intéressante, ceux-ci ont découvert que l'ostéopontine faisait partie des meilleurs marqueurs de l'expansion de la matrice mésangiale rénale. Il a ainsi été possible, lors d'expériences complémentaires sur des animaux diabétiques db/db, de relier l'expression de ce gène avec le niveau de glomérulopathie rénale. Cette analyse concorde ainsi avec les résultats obtenus dans notre laboratoire, qui ont déterminé que l'ostéopontine était surexprimé de façon importante dans les tubules proximaux de rats diabétiques et les lignées cellulaires de tubules proximaux [409].

Une autre publication d'intérêt clinique impliquant les micro-puces a été publiée en 2004 par Vaelde et al. , qui ont cherché à déterminer les voies génétiques régulées dans les glomérules de patients atteints de néphropathie diabétique et comparé avec les glomérules de patients en santé. À partir de reins de patients qui étaient non conforme pour des transplantations, ils ont isolé l'ARNm de glomérules, qu'ils ont ensuite utilisé pour des expériences de micro-puces suivies d'analyses par PCR en temps réel. Ils ont ainsi été en mesure de remarquer que plusieurs gènes reliés au transport de molécules ainsi qu'à la réparation cellulaire. Aussi, ils ont confirmé un rôle entre leur résultats et les dommages vasculaires, l'expansion de la matrice mésangiale, la prolifération cellulaire et la protéinurie.

En 2006, Makino et al. ont publié une étude sur les glomérules de souris diabétiques db/db et la régulation des voies génétiques qui pourraient être reliées à la néphropathie diabétique. Pour ce faire, ceux-ci ont isolé l'ARNm de glomérules de souris contrôles et db/db à un stade précoce de la néphropathie diabétique, et ce avant que n'apparaissent des changements histologiques afin que les gènes différemment exprimés ne soient pas reliés aux altérations cellulaires suivant les dommages rénaux, mais bien aux dommages rénaux glomérulaires. De plus, ils ont administré de la pioglitazone (agoniste de PPAR γ) sur des souris db/db afin de comprendre comment cette molécule agit sur la régulation génétique et mène à une sensibilisation à l'insuline. De plus, un

autre groupe a récemment publié sur les effets de la surexpression de KAP dans les tubules proximaux [410].

1.9 Hypothèse et Objectifs de cette étude

Au cours des dernières années, notre laboratoire a utilisés divers modèles expérimentaux pour mieux caractériser les liens qui unissent le stress induit dans les tubules proximaux avec l'évolution de pathologies rénales telles que le diabète, l'hypertension et la néphropathie glomérulaire. En effet, il est maintenant démontré que la fibrose tubulo-interstitielle et l'atrophie tubulaire constituent des agents de prédiction efficaces de l'insuffisance rénale.

Néanmoins, les mécanismes qui sont reliés à cette perte des fonctions tubulaires sont encore méconnus. Dans le cadre de cette thèse, il est envisagé d'utiliser des techniques de génomique avancée afin de mieux définir les différentes voies métaboliques reliées à la néphropathie diabétique, et de façon plus précise aux mécanismes moléculaires qui jouent un rôle dans la progression de cette maladie.

Pour ce faire, il est convenu de :

1 – Caractériser les mécanismes moléculaires qui sont régulés dans les tubules proximaux d'un modèle *in vivo* de diabète de type 2 (souris db/db) grâce à l'utilisation de micro-puces d'expression. Suivant cette analyse, des expériences de validation de ces résultats seront entrepris pour découvrir de nouveaux marqueurs potentiels reliés à la néphropathie diabétique.

2- Caractériser les changements pathophysiologiques d'un modèle de souris transgéniques surexprimant l'angiotensinogène en relation avec le rôle que jouent les ROS dans l'induction d'une hausse de la pression sanguine, par l'utilisation d'un transgène surexprimant le gène antioxydant de la catalase (Cat-Tg). Ces souris dites « double-transgéniques » (Agt/Cat-Tg) seront comparées avec le modèle Agt-Tg afin de mieux comprendre comment les ROS peuvent réguler la progression de dommages rénaux.

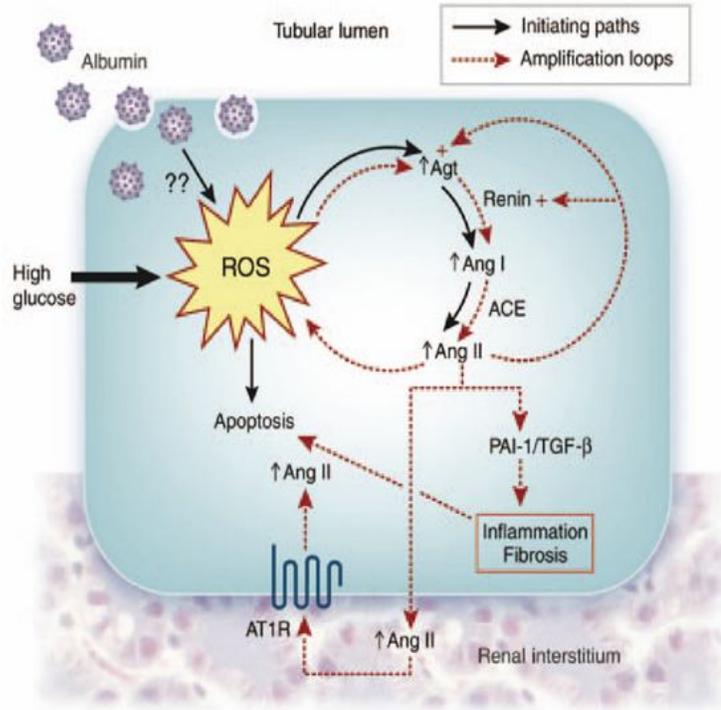


Figure 1-30. Un schéma proposé de la régulation des événements pathologiques reliés à la néphropathie diabétique et aux ROS dans le rein. Les ROS y figurent ainsi comme un élément central dans la régulation des pathophysiologies rénales. [411]

Chapitre 2 - Article 1: Bcl-2-Modifying Factor Induces Renal Proximal Tubular Cell Apoptosis in Diabetic Mice

Garnet J. Lau^{*†}, Nicolas Godin^{*†}, Shyh-Jong Wu^{*††}, Jian-Xin Zhu^{*}, Chih-Chang Wei^{*},
Stella Tran^{*}, Marie-Luise Brezniceanu^{*}, Isabelle Chénier^{*}, Janos G. Filep^{**},
Julie R. Ingelfinger^{***}, Shao-Ling Zhang^{*}, John S.D. Chan^{*†††}

*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

[†] Garnet J. Lau and Nicolas Godin 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

E-mail: john.chan a umontreal

Running Title: Bmf Expression in the Diabetic Kidney

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

Subject categories: Pathophysiology of renal disease and progression

Abstract: 217 words; Text: 3,993

2.1 Abstract

To investigate the mechanisms leading to tubular apoptosis in diabetes, we aimed to identify pro-apoptotic genes that are differentially up-regulated by reactive oxygen species (ROS) in diabetic mouse RPTCs. DNA chip microarray analysis on total RNA, isolated from renal proximal tubules (RPTs) of 20 week-old heterozygous db/m+, db/db and db/db catalase (CAT)-transgenic (Tg) mice revealed differential upregulation of the Bcl-2-modifying factor (Bmf) ($P < 0.01$) in RPTs of db/db mice, compared to db/m+ and db/db CAT-Tg mice. Real-time quantitative polymerase chain reaction and immunohistochemistry confirmed the up-regulation of Bmf in RPTCs of db/db mice. This increase did not occur in db/db CAT-Tg mice. Likewise, RPTCs of mice rendered diabetic with streptozotocin also exhibited increased Bmf expression, which could be reversed by insulin treatment. *In vitro*, overexpression of Bmf cDNA in rat RPTCs by transient transfection co-immunoprecipitated with Bcl-2, enhanced caspase-3 activity and promoted apoptosis. Furthermore, culture of RPTCs in high glucose (25 mM) evoked a 4-fold increase in Bmf mRNA

expression, which was inhibited by rotenone (an inhibitor of mitochondrial electron transport chain complex I), catalase, and to a lesser degree, diphenylene iodonium (DPI, an inhibitor of NADPH oxidase). Taken together, these data demonstrate differential up-regulation of Bmf in RPTCs of diabetic mice and suggest a potential role for Bmf in regulating RPTC apoptosis and tubular atrophy in diabetes.

2.2 Introduction

While the classical 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, both hallmarks of advanced stages of chronic kidney.^[412] In this regard, tubulointerstitial fibrosis and tubular atrophy appear to be better predictors of late-stage renal disease progression than glomerular pathology.^[413] Indeed, 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).^{[7, [414]}

The mechanisms underlying tubular atrophy are incompletely delineated. Studies have shown that high glucose concentrations are associated with increased reactive oxygen species (ROS) production, which inhibits proximal tubular function and induces apoptosis.^[415-417] Apoptosis has been detected in renal proximal tubular cells (RPTCs) of diabetic mice^[418] and rats^[250] as well as of diabetic patients,^[419, 420] 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 high glucose level-induced RPTC apoptosis or ROS generation.

We previously reported that high glucose enhances angiotensinogen (Agt) gene expression via ROS generation in rat RPTCs *in vitro*^{[421][20]} and that overexpression of rat Agt in RPTCs induces hypertension, albuminuria and RPTC apoptosis in diabetes *in vivo*.^[21] 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*.^[422] These data suggest that ROS generation is directly or indirectly responsible for RPTC apoptosis in diabetes.

Here we 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, an observation subsequently validated by immunohistochemistry and real time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Furthermore, we show enhanced Bmf expression in the RPTCs of streptozotocin-induced diabetic mice, an effect reversed by insulin. Finally, we report that Bmf overexpression enhances RPTC apoptosis and that high glucose induces Bmf mRNA expression via ROS generation *in vitro*.

2.3 Results

Microarray Analysis

Statistical results from normalized data of the different probe sets represented on the chips generated a list of 21 up-regulated and 25 down-regulated genes associated with apoptosis in renal proximal tubules (RPTs) of db/db mice, when compared to heterozygous db/m+ or db/db CAT-transgenic (Tg) mice (**Supplementary Tables I & II**). The 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 up-regulated (**Table I, A**) and 6 down-regulated pro-apoptotic genes (**Table I, B**) 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+ ($p < 0.005$). This increase was significantly attenuated in db/db CAT-Tg mice ($p < 0.05$).

Validation of Bmf Expression by Immunohistochemistry

We previously reported the 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.^[422] 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 level (**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 Induces ROS Generation and Bmf mRNA Expression in RPTCs in Vitro

Rat immortalized RPTCs (IRPTCs) were cultured in normal glucose (5 mM) or high glucose (25 mM) medium in the absence or presence of rotenone (an inhibitor of the mitochondrial electron transport chain complex I), catalase (CAT), or diphenylene iodonium (DPI, an inhibitor of NADPH oxidase). Cells were then harvested to assess ROS generation with the lucigenin assay and RNA was isolated for RT-qPCR analysis. IRPTCs cultured in high glucose produced considerably higher amounts of ROS than IRPTCs cultured in normal glucose (**Figure 3A**) and these increases could be markedly attenuated or inhibited by rotenone, CAT, or DPI. Furthermore, IRPTCs cultured in high

glucose medium exhibited a 4-fold higher Bmf mRNA expression than IRPTCs cultured in normal glucose medium ($p \leq 0.01$) (**Figure 3B**). The high glucose-stimulated increase in Bmf mRNA expression was inhibited by rotenone and CAT, and to a lesser degree, by DPI.

Cloning and Amino Acid Sequence of Rat Bmf

We cloned Bmf cDNA from rat (Wistar strain) IRPTCs by conventional RT-PCR, and its deduced amino acid sequence is shown in **Figure 4A**. 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 (**Figure 4B**).

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

To study the role of Bmf in apoptosis, rat IRPTCs 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 5A, a and b**) and anti-Myc immunoblotting (**Figure 5B**). 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 IRPTCs were cultured in high glucose medium ($P < 0.005$) (**Figure 5C**).

To assess apoptosis, rat IRPTCs were also subjected to the terminal transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling (TUNEL) assay. IRPTCs transiently

transfected with N-terminally-Myc-tagged Bmf exhibited on average a 4-fold increase in TUNEL-positive cells as compared with empty vector-transfected cells ($P < 0.005$) (**Figure 6A, B**). Parallel assays with lysates from transfected cells confirmed the expression of Myc-tagged Bmf (**Figure 6C**).

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 and Myc-Bmf proteins were observed in rat IRPTCs over-expressing of Myc-Bmf cultured in high glucose medium (**Figure 6D, a and b**).

2.4 Discussion

The present study documents enhanced Bmf expression in RPTCs of db/db and STZ-induced diabetic mice 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.^[423] A combination of high p-values, fold changes and Gene Ontology annotation^[424] 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 up-regulated ($p < 0.01$, 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. Bmf, Bad, Bik, Bid, Bim, Hrk, Noxa, and Puma share the conserved BH3 domain but lack the BH1, BH2, and BH4 domains.^[425] The short BH3 domain is essential for interaction with pro-survival members of the Bcl-2 family, including Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, and Mcl-1.^[426] Bmf has been found to be most abundant in the pancreas, liver, kidney, and hematopoietic tissues.^[425, 427, 428] Bmf is usually sequestered to the cell cytoskeleton by associating with the dynein light-chain 2 of myosin V, which binds to cytoskeletal structures.^[429] Certain damage signals, such as the detachment of adherent cells from their substratum (anoikis), trigger the release of Bmf, which then binds to pro-survival Bcl-2 proteins.^[425, 429] At present, little is known about the physiological role of Bmf *in vivo*. Studies with Bmf-deficient mice revealed that Bmf is dispensable for embryonic development and cell detachment and ultraviolet radiation-induced apoptosis.^[31] Another study demonstrated that Bmf overexpression is associated with germ cell apoptosis in the rat testis *in vivo*.^[430] To our knowledge, the role of Bmf in diabetes-associated RPTC apoptosis *in vitro* and *in vivo* has not been reported.

To confirm enhanced Bmf expression, we employed another model of diabetes, STZ-induced diabetes in mice.⁽²¹⁾ Our results document significant up-regulation of Bmf expression in RPTCs of STZ-induced diabetes and its reversal by insulin. These observations would suggest a hitherto unrecognized role for hyperglycemia in the regulation of Bmf expression in the kidney.

There is evidence that high glucose induces apoptosis in RPTCs via ROS generation.^{[243,}
^{252]} Our present data show that high glucose also stimulates Bmf mRNA expression that can be

inhibited by rotenone, CAT, and to a lesser extent, DPI. These observations indicate that ROS derived from mitochondrial oxidative metabolism may mediate, at least in part, high glucose-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. We cloned Bmf from Wistar rat IRPTCs⁽³⁵⁾ by conventional RT-PCR. Amino acid sequence analysis revealed 98.9% homology between our cloned Bmf from Wistar or Norway rats and published murine Bmf (mRNA Accession number: Rat NM_139258 and Mouse NM_138313) with amino acid variations at positions 39 and 40. Transient transfection of RPTCs with rat Bmf cDNA resulted in activation of caspase-3 parallel with increases in the number of apoptotic cells. These data confirm that Bmf overexpression induces RPTC apoptosis, similar to that observed in transfected fibroblasts and cancer cells.^[425, 427] We were unable to detect increases in endogenous rat Bmf expression in RPTCs by immunoblotting (unpublished results) using the same anti-Bmf antibodies that we have employed for immunohistochemistry. While the reasons for these observations are not clear, Schmelzle et al. also noted that commercially-available anti-Bmf antibodies do not work in immunoblotting as opposed to immunohistochemistry of murine Bmf.^[431]

The precise mechanism(s) by which high glucose evokes Bmf expression in RPTCs remains unclear. One possibility is that high glucose, which enhances Agt gene expression and subsequently activates the intrarenal RAS, also increases mitochondrial ROS generation.^[421, 432] Augmented intrarenal angiotensin II (Ang II) stimulates transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) expression in RPTCs.^[433, 434] Binding of TGF- β 1 to its receptors leads to activation of receptor-activated Smad3, which dimerizes with Smad4.^[435-438] The Smad3/4 dimer then translocates to the nucleus, binds to the Bmf gene promoter to enhance Bmf gene transcription.

This mechanism is supported by the findings of Ramjaun et al.^[29] showing that TGF- β 1 stimulates Bmf gene expression. Moreover, ROS could induce phosphorylation of Bmf via c-Jun N-terminal kinase^[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 mitochondrion 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 IRPTCs lend further support to this notion.

To explore the possible involvement of Bcl2-like 11 (Bim) in RPTC apoptosis in db/db mice, RT-qPCR was also performed to quantify Bim mRNA expression. Bim expression was indeed elevated in db/db mice as compared to control mice. Interestingly this increased expression was not normalized by CAT expression in the db/db CAT-Tg mice (**Supplementary Figure 1**), indicating that Bim might act in concert with Bmf to induce RPTC apoptosis in db/db mice.

At present, we have no explanation as to why db/db mice do not develop overt tubular injury despite the persistent increase in tubular apoptosis. This might, in part, be attributed to the genetic background (C57Bl6) of mice used in our experiments. Indeed, it has been well documented that mice in C57Bl6 background are resistant to developing diabetic nephropathy as compared to mice on other genetic backgrounds, i.e., DBA2.⁴³

Our results may have clinical implications in diabetes. Since tubular apoptosis is one of characteristic morphological changes in human diabetic kidneys^[419, 420, 439] and tubular atrophy appears to be a better indicator of disease progression than glomerular pathology,^[440-442] we would 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*. 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, in particular tubular atrophy.

2.5 Methods

a) Chemicals and Constructs

D-glucose, D-mannitol, DPI (diphenylene iodinium, an inhibitor of NADPH oxidase), rotenone (an inhibitor of mitochondrial electron transport chain complex I), 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. Anti-Bmf and anti-c-Myc polyclonal antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). 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.^[338]

Full-length rat Bmf cDNA was cloned from immortalized Wistar rat RPTCs^[443] 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) were created in our lab (J.S.D.C.) and have been described previously.^[422] Homozygous rCAT-Tg mice were then crossed with heterozygous db/m+ mice (B6.Cg $m^{+/+}$ *Lep^{db}* in C57BL/6J background) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA (<http://jaxmice.jax.org>)). Breeding was continued until homozygous db/db rCAT-Tg mice were obtained and has been recently reported.^[422] 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. All animals received standard mouse chow and water *ad libitum*. Animal care met the standards set forth by the Canadian Council on 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 20 weeks of age and the kidneys were removed immediately. The left kidney was harvested for immunohistochemistry. The right kidney was taken for proximal tubule isolation by Percoll gradient⁴⁵ with slight modifications.⁴⁶ Briefly, cortical fragments were first washed with DMEM:Ham F-12 medium containing 0.2% bovine serum albumin (BSA), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) pre-equilibrated with 95% O₂/5% CO₂, and then digested with agitation for 30 minutes at 37°C in DMEM:Ham F-12 medium containing collagenase (1 mg/ml). Following digestion, the mixtures were passed once through a metal filter (60 mesh). The resulting tubular suspensions were washed twice with DMEM:Ham F-12 medium, resuspended in a culture medium containing 42% Percoll pre-equilibrated with 95% O₂/5% CO₂ and centrifuged at 28,000 x g without braking for 30 minutes at 4°C. Three bands were observed following centrifugation: an upper band of enriched distal tubules; a middle band of enriched glomeruli and a lower band of enriched proximal tubules. The lower band was carefully isolated with a syringe and washed 3 times in DMEM:Ham F-12 medium. Proximal tubular cells were characterized by their histological appearance as described previously.⁴⁵ This procedure consistently yielded a highly purified preparation of proximal tubules (>97% by microscopy) with viability >95% (determined by trypan blue exclusion).

Aliquots of freshly-isolated mouse RPTs were immediately processed for total RNA isolation and subjected to gene chip microarray analysis or RT-qPCR. Briefly, total RNAs from 3 individual mice in 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 standard protocol recommended by the manufacturer. 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). AffymGUI (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.^[444-447] The GCRMA algorithm was employed for background correction of the data,^[448] 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^[25] 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 collected and subsequently reverse transcribed for use in RT-qPCR to quantify the amount of Bmf mRNA expressed in mRPTs according to previously-described methods.^[422] Forward (5'-CCCTGGGGAGCAGCCCCCTG-3') and reverse (5'-GCCGATGGAAGTGGTCTGCAA-3') primers of Bmf (NM_139258) and forward (5'-ATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGC-3') and reverse (5'-AGCATTTGCGGTGCACGATGG-3') primers of β -actin (NM_031144) were employed in RT-qPCR assays.

Immunohistochemistry

Immunostaining for Bmf was performed by the standard avidin-biotin-peroxidase complex method (ABC Staining System, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).^[422] Samples from at least 3 animals per group were analyzed visually under light microscope. Bmf-immunostaining was quantified by the NIH ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) software^[255] Briefly, approximately

4 fields at 200x magnification per animal were randomly selected from each group. The collected images were changed into 8-bit grayscale by the software. Then, a threshold was determined to filter particles outside the color and intensity range. This threshold was applied to all images, which were analyzed by calculating the total area covered by colored particle deposition and expressed as 'arbitrary units'.

Induction of Diabetes

Twelve week old male mice were divided into 3 groups. Group 1: control group, received vehicle intraperitoneally (i.p.). Group 2: Streptozotocin (STZ)-induced diabetes. The animals were administered STZ (50 mg/kg in 10 mM sodium citrate buffer, pH 4.5), i.p., daily for 5 consecutive days. 48 h after the last STZ administration, blood glucose level was determined with a Side-Kick Glucose Analyzer (Model 1500, Interscience, ON, Canada). Mice with blood glucose >16.6 mM were studied. Group 3: Insulin treatment. On day 3 after the last STZ injection, diabetic mice received a subcutaneous insulin implant (1 Linbit implant per 20 g body weight, and a 0.5 Linbit implant for each additional 5 g body weight) to maintain euglycemia. Blood glucose was monitored twice a week and euthanized with CO₂ at 4 weeks post-STZ administration. Body weight and blood glucose was measured. Both kidneys were removed, decapsulated and then weighed together. Left kidneys were processed for immunohistochemistry and the right kidneys were used for isolation of renal proximal tubule (RPT).⁽²¹⁻²³⁾

Cell Culture

Immortalized rat RPTCs (IRPTCs) at passages 13-18 were used in the present study, and the culture conditions have been reported elsewhere.^[449] 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^{-6} M), DPI (5×10^{-6} 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 generation, cells were harvested and subjected to the lucigen assay, as previously reported.^(19, 20)

Transfections, Apoptosis and Caspase-3 Activity Assays

The pCMV-Myc mammalian expression vector containing N-terminally-Myc-tagged rat Bmf was transiently transfected into IRPTCs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's recommendations. Following transient transfection, cells were incubated for 24 h in 5 mM D-glucose plus 20 mM D-mannitol or 25 mM D-glucose medium and then analyzed for apoptosis by TUNEL assay followed by DAPI staining (TUNEL kit, Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). The percentage of apoptotic IRPTCs was estimated semi-quantitatively. For each group (pCMV-Myc Empty Vector, pCMV-Myc-rat Bmf), 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 (BD Bioscience Pharmingen, Mississauga, ON, Canada).^[20-22] Raw data was then corrected to cell lysate protein concentrations.

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

Co-immunoprecipitation of Myc-Bmf with Bcl-2 was performed as described previously.⁵² Briefly, IRPTCs transiently-transfected with pCMV-Myc-rat Bmf and cultured for 24 hrs in DMEM containing 5 mM or 25 mM D-glucose, were collected and sonicated for 8 seconds on ice in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 1 mM EDTA, 1 mM EGTA and a protease inhibitor cocktail (La Roche Biochemicals) and centrifuged at 18,200 x g (13,6000 rpm) for 10 min at 4°C to remove insoluble cell debris. Immunoprecipitation of the cytosolic fractions was performed as the following: 500 µg of cytosolic fraction was incubated with 3 µg anti-Myc antibody or non-immunized rabbit IgG for 3 hrs at 4°C with agitation, then 20 µl of Protein G plus beads was added and further agitated overnight at 4°C. The mixture was then centrifuged and the beads were washed 3 times in lysis buffer. Finally, 30 µl of 2x loading buffer was added to the beads, boiled at 95°C for 5 minutes, and subjected to 12% SDS-PAGE. Western blotting for Bcl-2 and Myc was performed as described elsewhere.²¹⁻²³ Relative densities of Bcl-2 and Myc-bands were quantified by computerized laser densitometry (ImageQuant software (version 5.1), Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

Statistical Analysis

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

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, diphenylene iodinium; 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 by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 84363 to J.S.D.C.), the Kidney Foundation of Canada (KFOC80015), and the National Institutes of Health (NIH) of USA (HL-48455 to J.R.I.). This manuscript nor

any significant part of it is under consideration for publication elsewhere. The data, however, has been presented in part as free communication (SA-FC479) 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. Goestemeyer AK, Marks J, Srai SK, et al.: GLUT2 protein at the rat proximal tubule brush border membrane correlates with protein kinase C (PKC)-beta1 and plasma glucose concentration. *Diabetologia* 2007; **50**: 2209-2217.
3. Gilbert RE, Cooper ME: The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? *Kidney Int* 1999; **56**: 1627-1637.
4. Marcussen N: Tubulointerstitial damage leads to atubular glomeruli: significance and possible role in progression. *Nephrol Dial Transplant* 2000; **15** (Suppl 6): 74-75.
5. 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.
6. Beyenbach KW: Kidneys sans glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **286**: F811-F827.
7. 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.
8. 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.

9. Han HJ, Lee YJ, Park SH, et al.: High glucose-induced oxidative stress inhibits Na⁺/glucose cotransporter activity in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **288**: F988-F996.
10. Thevenod F: Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol* 2003; **93**: 87-93.
11. Rogers LK, Bates CM, Welty SE, et al.: Diquat induces renal proximal tubule injury in glutathione reductase-deficient mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; **217**: 289-298.
12. de Haan JB, Stefanovic N, Nikolic-Paterson D, et al.: Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **289**: F544-F551.
13. Zhang Y, Wada J, Hashimoto I, 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**: 1090-1101.
14. Kumar D, Zimpelmann J, Robertson S, et al.: Tubular and interstitial cell apoptosis in the streptozotocin-diabetic rat kidney. *Nephron Exp Nephrol* 2004; **96**: e77-e88.
15. Kelly DJ, Stein-Oakley A, Zhang Y, 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**: 7-13.
16. Susztak K, Ciccone E, McCue P, et al.: Multiple metabolic hits converge on CD36 as novel mediator of tubular epithelial apoptosis in diabetic nephropathy. *PLoS Med* 2005; **2**: e45.
17. Kumar D, Robertson S, Burns KD: Evidence of apoptosis in human diabetic kidney. *Mol Cell Biochem* 2004; **259**: 67-70.
18. Verzola D, Gandolfo MT, Ferrario F, et al.: Apoptosis in the kidneys of patients with type II diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2007; **72**: 1262-1272.
19. Hsieh TJ, Zhang SL, Filep JG, et al.: High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 2002; **143**(8): 2975-2985.
20. Hsieh TJ, Fustier P, Zhang S-L, et al.: 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.
21. Liu F, Brezniceanu M-L, Wei C-C, et al.: Overexpression of angiotensinogen increases tubular apoptosis in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 269-280.

22. Brezniceanu M.L, Liu F, Wei C-C, et al.: Catalase overexpression attenuates angiotensinogen expression and apoptosis in diabetic mice. *Kidney Int* 2007; **71**: 912-923.
23. Brezniceanu M-L, Liu F, Wei C-C, et al., Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. *Diabetes* 2008;. **57**: 1-9.
24. Susztak K, Bottinger EP: Diabetic nephropathy: a frontier for personalized medicine. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 361-367.
25. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al.: Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000; **25**: 25-29.
26. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, et al.: Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 2001; **293**: 1829-1832.
27. Puthalakath H, Strasser A: 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**: 505-512.
28. Morales AA, Olsson A, Celsing F, et al.: Expression and transcriptional regulation of functionally distinct Bmf isoforms in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2004; **18**: 41-47.
29. Ramjaun AR, Tomlinson S, Eddaoudi A, et al.: Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGF beta-induced apoptosis. *Oncogene* 2007; **26**: 970-981.
30. Day CL, Puthalakath H, Skea G, et al.: Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands. *Biochem J* 2004; **377**: 597-605.
31. Labi V, Erlacher M, Kiessling S, et al. Loss of the BH3-only protein Bmf impairs B cell homeostasis and accelerated gamma irradiation-induced thymic lymphoma development. *J Exp Med* 2008; **205**: 641-655.
32. Show MD, Folmer JS, Anway MD, et al.: Testicular expression and distribution of the rat bcl2 modifying factor in response to reduced intratesticular testosterone. *Biol Reprod* 2004; **70**: 1153-1161.
33. Kang BP, Frencher S, Reddy V, et al.: High glucose promotes mesangial cell apoptosis by oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; **284**: F455-F466.
34. Allen DA, Harwood S, Varagunam M, et al.: High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases. *FASEB J* 2003; **17**: 908-910.

35. Ingelfinger JR, Jung F, Diamant D, et al.: Rat proximal tubule cell line transformed with origin-defective SV40 DNA: autocrine ANG II feedback. *Am J Physiol* 1999; **276**: F218-F227.
36. Schmelzle T, Mailleux AA, Overholtzer M, et al.: 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.
37. Zhang S-L, To C, Chen X, 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**: 302-312.
38. Shi Y, Massague J: Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; **113**: 685-700.
39. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH: Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001; **114**: 4359-4369.
40. Leivonen SK, Chantry A, Hakkinen L, et al., Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression in human gingival fibroblasts. Evidence for cross-talk between Smad3 and p38 signaling pathways. *J Biol Chem* 2002; **277**: 46338-46346.
41. Zhang M, Fraser D, Phillips A: ERK, p38, and Smad signaling pathways differentially regulate transforming growth factor-beta1 autoinduction in proximal tubular epithelial cells. *Am J Pathol* 2006; **169**(4): 1282-1293.
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.
43. Gurley SB, Clare SE, Snow KP *et al.* Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **290**: F214-F222
44. Ding Y, Davisson RL, Hardy DO, et al.: 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.
45. Vinay P, Gougoux A, Lemieux G: Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. *Am J Physiol* 1981; **241**: F403-F411.
46. Brezniceanu ML, Wei C-C, Zhang S-L, et al.: Transforming growth factor-beta 1 stimulates angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells. *Kidney Int* 2006; **69**: 1977-1985.
47. 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

48. Smyth GK, Michaud J, Scott HS: Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 2005; **21**: 2067-2075.
49. Wettenhall JM, Simpson KM, Scatterley K, et al.: affyImGUI: a graphical user interface for linear modeling of single channel microarray data. *Bioinformatics* 2006; **22**: 897-899.
50. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, et al.: Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; **5**: R80.1-R80.16.
51. Wu Z, Irizarry R, Gentleman R, et al.: A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *J Am Stat Assoc* 2004; **99**: 909-917.
52. Liu F, Wei C-C, Wu S-J, et al.: Apocynin attenuates tubular apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in transgenic mice independent of hypertension. *Kidney Int* 2009; **75**: 156-166.

Legends

Table I. A. List of genes upregulated in microarray chips of db/db vs db/m+ and db/db vs db/db-CAT Tg mice overexpressing CAT. **B.** List of genes downregulated in microarrays 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.** Immunohistochemical staining for Bmf expression in kidney sections (600x) from a) db/m⁺, b) db/db, and c) db/db-CAT-Tg mice; panel d) presents a non-immune rabbit serum control; PT: proximal tubule, G: Glomerulus. **C.** Quantification of Bmf immunohistochemical staining. Values are the mean \pm 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. Immunohistochemical staining for Bmf expression in kidney sections (600x) from non-diabetic control (panel a), STZ-induced diabetic (panel b), and insulin-treated STZ-injected mice (panel c); non-immune rabbit serum control is also presented (panel d). **B.** Quantification of Bmf immunohistochemical staining. Values are the mean \pm 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. **A.** ROS generation of RPTCs cultured in low and high 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 low or high glucose and various inhibitors, as indicated. Values are corrected to β -actin levels. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; N.S., non-significance)

Figure 4. 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.

Figure 5. Overexpression of Rat Bmf Induces Caspase-3 Activity in IRPTCs. IRPTCs were transiently-transfected by Lipofectamine 2000 with the plasmid containing N-terminally-tagged rat Bmf cDNA (pCMV-Myc rat Bmf). **(A)** Expression of the Myc-rat Bmf mRNA was confirmed by real-time qPCR. **(B)** Anti-Myc immunoblotting was also performed. Non-specific band serves as loading control. **(C)** Caspase 3 activity in IRPTCs cultured in low and high glucose media and pCMV-Myc rat Bmf overexpression. Values are corrected to lysate protein levels. Values are the mean \pm SEM, $n = 4$ to 8 . (*** $p < 0.005$; N.S., non-significance)

Figure 6. Overexpression of Rat Bmf Increases TUNEL and Co-immunoprecipitates with Bcl-2 in IRPTCs. **A.** IRPTCs were transiently transfected by Lipofectamine 2000 with pCMV-Myc rat Bmf. Cells were then fixed and subjected to TUNEL and DAPI staining. **A.** TUNEL (green) and DAPI (blue) fluorescent staining (200x) are shown for IRPTCs 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 fusion protein was confirmed by anti-Myc immunoblotting. β -actin serves as loading control. **D.** Interaction of Myc-Bmf with Bcl-2 in rat IRPTCs. (a) Western blotting for Bcl-2 in cytosolic fractions of rat IRPTCs before (total lysate) and after co-immunoprecipitation (co-IP) with anti-Myc. (b) Western blotting for Myc in cytosolic fractions of rat IRPTCs on the same membrane following immunoblotting for anti-Bcl-2 in (a). The relative density of Bcl-2 or Myc in IRPTCs cultured 5 mM D-glucose DMEM was expressed as controls, Values are the mean +/- SEM for 3 independent experiments. *p<0.05; **p<0.01; N.S., not-significant.

Supplementary Tables. I. Up-regulated pro-apoptotic genes in RPTs of db/db mice, compared to heterozygous db/m+ and db/db-CAT Tg mice, linked to the apoptosis pathway and selected by p<0.05 (total of 21 genes). **II.** Down-regulated pro-apoptotic genes in RPTs of db/db mice, compared to heterozygous db/m+ and db/db-CAT Tg mice, linked to the apoptosis pathway and selected by p<0.05 (total of 25 genes).

Supplementary Figure 1. Bim Expression is Elevated in RPTs of db/db Diabetic Mice. A. RT-qPCR for Bim mRNA levels in freshly-isolated RPTs from db/m, db/db, and db/db-CAT-Tg mice. Values were corrected to β -actin. Values are the mean \pm SEM (n=4 to 5 for each group). *p<0.05; ***p<0.005; N.S., not-significant.

Table I.**A.**

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					

B.

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

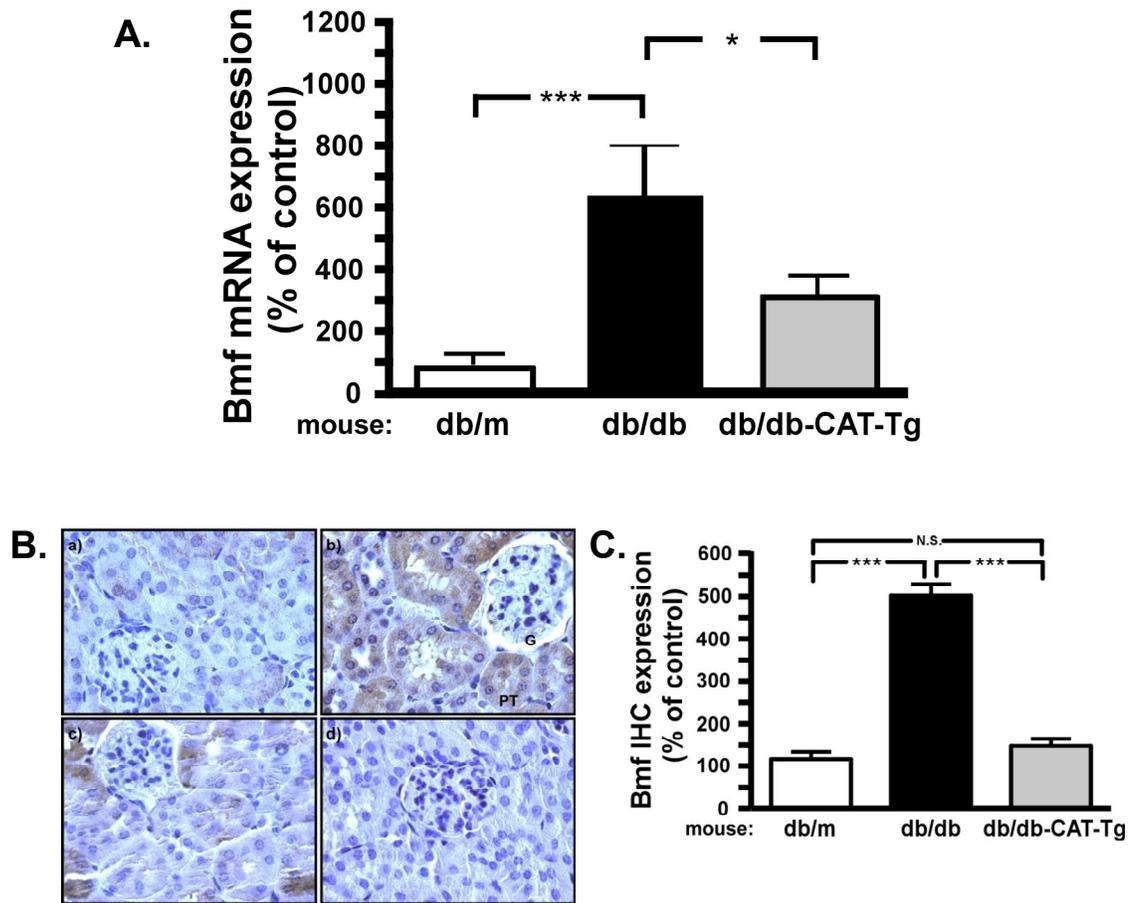


Figure 1

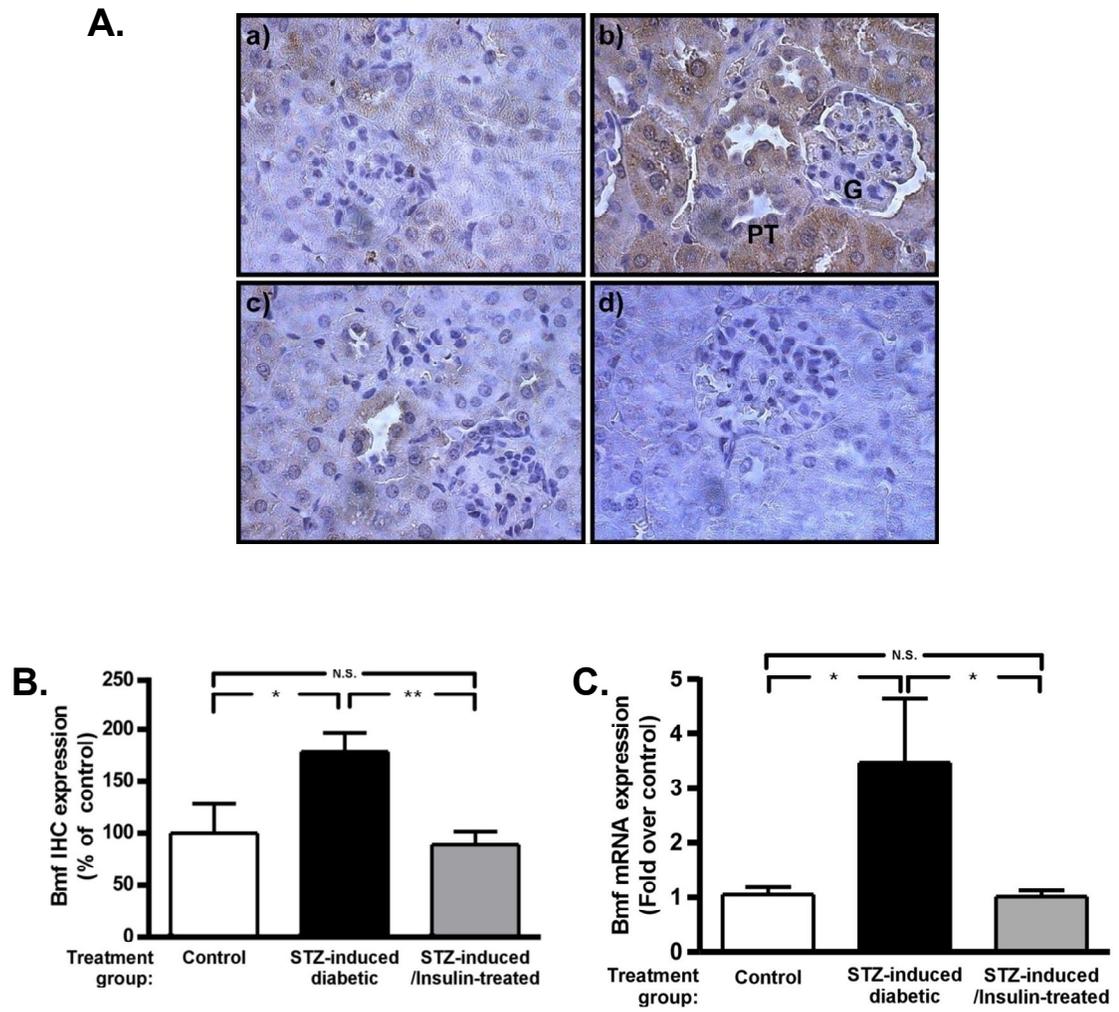


Figure 2

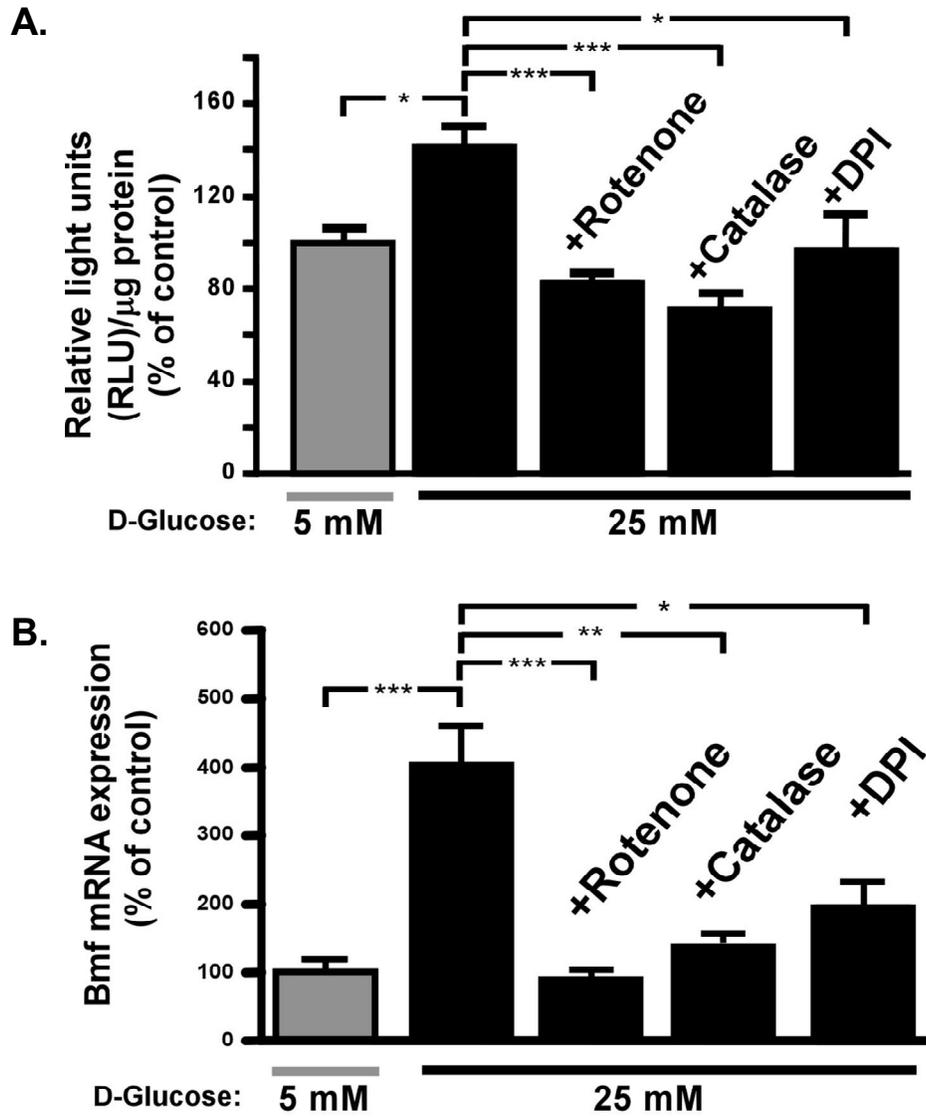


Figure 3.

A.

	10	20	30	40	50	60
Rat (Norway)	MEPPQCVEELEDVFC	PE	EDGE	PGTQ	FG	SLLSADLFAQS
IRPTC (Wistar)	MEPPQCVEELEDVFC	SE	EDGE	PGTQ	FG	GLLSADLFAQS
Mouse (C57BL/6)	MEPPQCVEELEDVFC	SE	EDGE	PGTQ	FG	GLLSADLFAQS
	70	80	90	100	110	120
Rat (Norway)	RPV	SQED	DKATQTL	S	PASPSQGVML	PCGVTEEP
IRPTC (Wistar)	RPV	SQED	DKATQTL	S	PASPSQGVML	PCGVTEEP
Mouse (C57BL/6)	RPV	SQED	DKATQTL	S	PASPSQGVML	PCGVTEEP
	130	140	150	160	170	180
Rat (Norway)	PEGQFLQ	HRAEVQ	TARKLQCTADQFHRL	H	MQHQQRDR	AWRQVFLFLQNLALNR
IRPTC (Wistar)	PEGQFLQ	HRAEVQ	TARKLQCTADQFHRL	H	MQHQQRDR	AWRQVFLFLQNLALNR
Mouse (C57BL/6)	PEGQFLQ	HRAEVQ	TARKLQCTADQFHRL	H	MQHQQRDR	AWRQVFLFLQNLALNR
			[-----BH3-----]			
Rat (Norway)	GVG	PW				
IRPTC (Wistar)	GVG	PW				
Mouse (C57BL/6)	GVG	PW				

B.

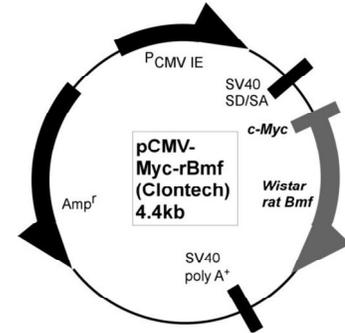


Figure 4

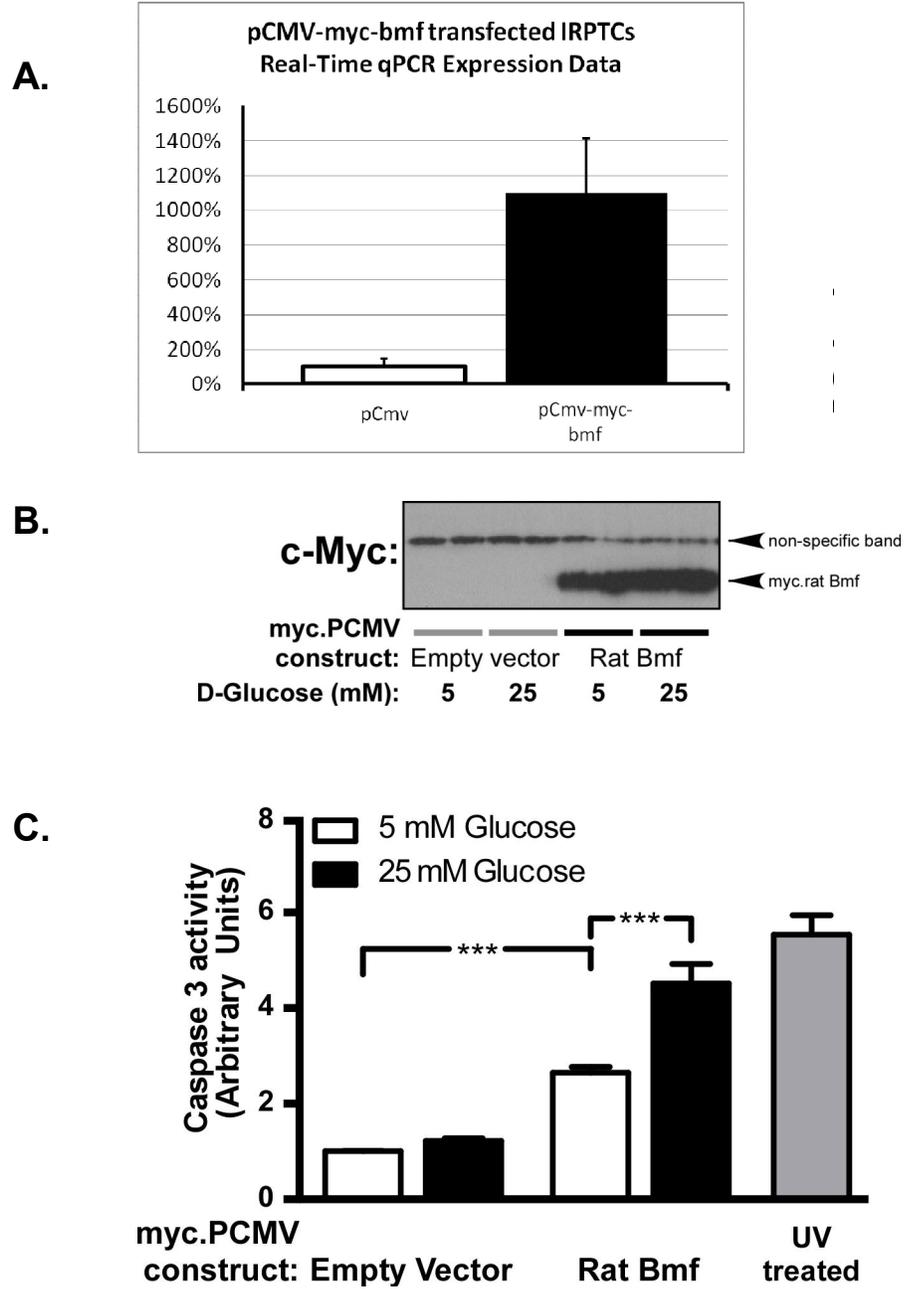


Figure 5.

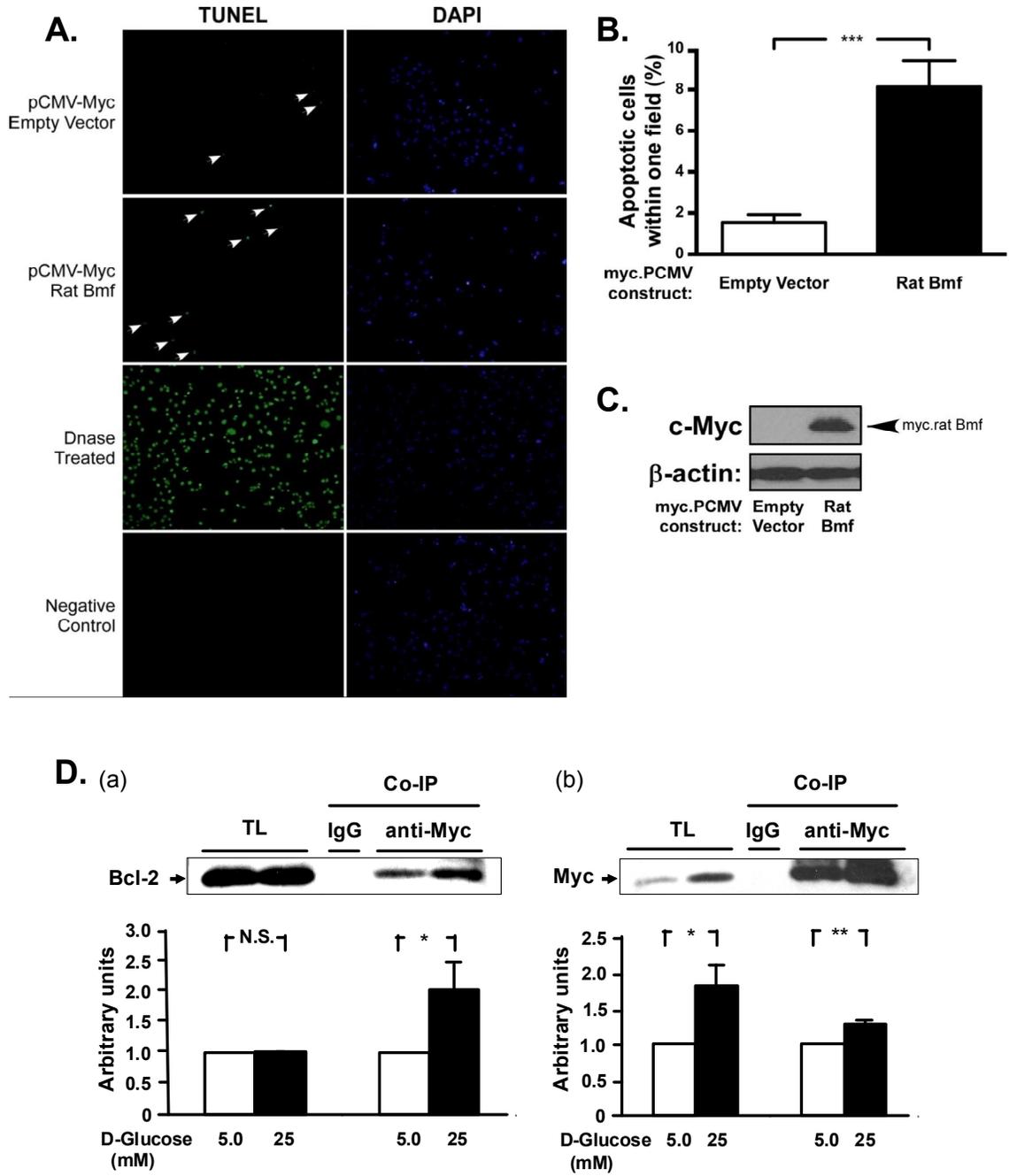


Figure 6.

**Bcl-2-Modifying Factor Induces
Renal Proximal Tubular Cell
Apoptosis in Diabetic Mice**

**SUPPLEMENTARY TABLES and
FIGURE**

100102

I.

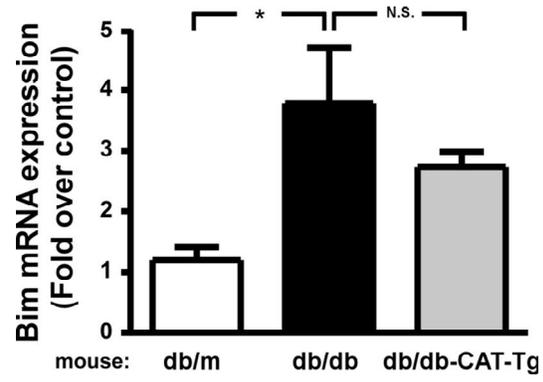
Gene Symbol	Probe Set id	Gene Title	Fold (WT-DB)	p-value (WT-DB)	Fold (DB-DBcat)	p-value (DB-DBcat)
Ank2	1434264_at	anky rin 2, brain	4,24	0,0387	4,82	0,0300
Bag4	1418707_at	BCL2-associated athanogene 4	2,66	0,0219	2,29	0,0269
	1449186_at					
Bfar	1440533_at	bifunctional apoptosis regulator	2,28	0,0491	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

II.

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 (S. cerevisiae)	-1,91	0,0035	-1,32	0,0194
Cy cs	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
Pcd6ip	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-HRNase hydrolase 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
Tbrg4	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 (C. elegans)	-1,53	0,0058	-1,39	0,0090

Supplementary Tables I & II.

(Please note that fold change values are expressed in a base-2 logarithmic scale.)



Supplementary Figure 1

Chapitre 3 - Article 2: Catalase overexpression prevents hypertension and tubular apoptosis in angiotensinogen transgenic mice

Nicolas Godin¹, Fang Liu¹, Garnet J Lau¹, Marie-Luise Brezniceanu¹, Isabelle Chénier¹, Janos G Filep², Julie R Ingelfinger³, Shao-Ling Zhang¹ and John S D Chan¹

1. ¹Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Hôtel-Dieu Hospital, Pavillon Masson, Montreal, Quebec, Canada
2. ²Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada
3. ³Harvard Medical School, Pediatric Nephrology Unit, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA

Correspondence: John S.D. Chan, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôtel-Dieu Hospital, Pavillon Masson, 3850 Saint Urbain Street, Montreal, Quebec, Canada H2W 1T8. E-mail: john.chan@umontreal

Received 7 May 2009; Revised 14 January 2010; Accepted 26 January 2010; Published online 17 March 2010.

3.1 Abstract

Transgenic mice that overexpress angiotensinogen, the sole precursor of angiotensins, in their renal proximal tubular cells develop hypertension, albuminuria, and tubular apoptosis. These pathological changes are due to enhanced generation of reactive oxygen species in the proximal tubule cells. Here, we determined whether overexpression of catalase to decrease oxidant injury in the proximal tubular cells could reverse these abnormalities. Double-transgenic mice specifically overexpressing angiotensinogen and catalase in their renal proximal tubular cells were created by cross-breeding the single transgenics. Non-transgenic littermates served as controls. Overexpression of catalase prevented hypertension, albuminuria, tubulointerstitial fibrosis, and tubular apoptosis in the angiotensinogen transgenic mice. Furthermore, the double transgenics had lower reactive oxygen species generation and reduced pro-fibrotic and apoptotic gene expression in the renal proximal tubular cells. Renal angiotensin converting enzyme-2 expression and urinary angiotensin 1–7 levels were downregulated in the single but normal in the double-transgenic mice. Thus, we suggest that the intrarenal renin-angiotensin system and reactive oxygen species generation have an important role in the development of hypertension and renal injury.

Keywords:**angiotensinogen; catalase; hypertension; oxidative stress; transgenic mice**

Angiotensin II (Ang II) has key roles in hypertension and renal injury leading to end-stage renal disease. Chronic treatment with renin-angiotensin system (RAS) blockers (angiotensin-converting enzyme inhibitors and/or antagonists of angiotensin II (subtype-1) receptor (AT₁-R)) lowers blood pressure and delays nephropathy progression.^{1, 2, 3, 4}

The degree of glomerulosclerosis, tubulointerstitial fibrosis, and tubular atrophy, determines the rate of decline in renal function.⁵ Ang II is involved in these processes and its action is largely mediated through the AT₁-R that is present throughout the kidney.⁶ The AT₁-R is expressed on both the luminal and basolateral membranes of renal proximal tubular cells (RPTCs). It has been postulated that Ang II produced within the renal proximal tubule (RPT) may be more important than Ang II derived from circulation in inducing kidney damage. Indeed, luminal and tissue Ang II levels are far higher than those in plasma.^{7, 8, 9} Intrarenal levels of angiotensinogen (Agt) and Ang II are elevated in hypertension and diabetes,^{10, 11, 12, 13, 14, 15} contributing not only to hypertension but also to kidney injury.

The existence of a local intrarenal RAS is now well accepted and all components of the RAS are expressed in RPTCs.^{16, 17, 18, 19, 20, 21, 22} Transgenic mice (Tgs) overexpressing rat Agt in their RPTCs are prone to developing hypertension, albuminuria, and renal injury and treatment with RAS blockers normalizes these parameters.^{23, 24} Overexpression of Agt increases reactive oxygen species (ROS) production in RPTCs through NADPH oxidase activation, and treatment of Agt-Tgs with apocynin (an inhibitor of NADPH oxidase) attenuates ROS generation and renal injury but not hypertension.²⁵ Thus, it is unclear whether ROS mediate intrarenal RAS actions on both hypertension development and kidney injury.

The present *in vivo* study sought to determine whether a mouse model characterized by rat catalase (Cat) overexpression in RPTCs could prevent ROS generation and the development of hypertension, thereby improving the pro-fibrotic and pro-apoptotic effects engendered by upregulated intrarenal RAS.

3.2 Results

Tissue-specific expression of rat Agt (rAgt) and rat Cat (rCat) transgenes in Tgs

The rAgt-HA (a sequence encoding amino acid residues 98–106 (YPYDVPDYA) of human influenza virus hemagglutinin-tag) and rCat-HA transgenes were highly expressed in RPTs of adult male Tgs ([Figure 1a](#)) but not in other tissues (liver, spleen, lung, heart, brain and testis; data not shown). Non-Tgs (wild type) did not express transgenes. Immunostaining confirmed the increased expression of Agt ([Figure 1b, B and D](#)) and Cat proteins ([Figure 1c, C and D](#)) in RPTCs of Tgs as compared with non-Tg littermates.

Renal morphology, albuminuria, hypertension and heart weight in Tgs

Although kidney/body weight ratios were similar among all groups ([Figure 2a](#)), renal damage was evident only in Agt-Tgs ([Figure 2b, B](#)) as compared with non-Tgs ([Figure 2b, A](#)) and Cat-Tgs ([Figure 2b, C](#)). Histological findings included loss of brush border in RPTCs and some RPTCs were flattened or atrophied in Agt-Tg kidneys, consistent with RPTC damage. Overexpressing of Cat markedly attenuated these abnormalities ([Figure 2b, D](#)). RPTC volume was significantly higher in Agt-Tgs than in non-Tgs and Cat-Tgs ([Figure 2c](#)). Overexpression of Cat effectively attenuated this change in Agt/Cat-Tgs. In contrast, glomerular volume did not differ significantly between Tgs and non-Tgs, and was unaffected by Cat overexpression ([Figure 2d](#)).

Consistent with previous studies (23, 24), an increased urinary albumin/creatinine ratio (ACR) ([Figure 3a](#)) was evident in Agt-Tgs at 20 weeks old as compared with non-Tgs and Cat-Tgs. Cat overexpression normalized ACR in Agt/Cat-Tgs. Systolic blood pressure (SPB) was significantly higher after 12 weeks in male Agt-Tgs as compared with non-Tgs and Cat-Tgs ($P < 0.05$, increased by 10 to 15 mmHg) and remained so ([Figure 3b](#)).

Overexpression of Cat normalized SBP in Agt/Cat-Tgs ([Figures 3b and c](#)). Wet heart weight/body weight ratios did not differ significantly among different groups ([Figure 3d](#)).

Oxidative stress in Tg kidneys

ROS generation and NADPH oxidase activity were significantly higher in RPTs of Agt-Tgs than in non-Tgs ([Figures 4a and b](#), respectively). Overexpression of Cat effectively inhibited ROS generation and NADPH oxidase activity in RPTs of Cat-Tgs and Agt/Cat-Tgs. Similarly, HO-1 expression (an oxidative stress-induced gene) increased in RPTCs of Agt-Tgs ([Figure 4c, B](#)) as compared with non-Tgs ([Figure 4c, A](#)) and Cat-Tgs ([Figure 4c, C](#)). Cat overexpression attenuated HO-1 expression in RPTCs of Agt/Cat Tgs ([Figure 4c, D](#)).

Cat overexpression on ACE and ACE2 expression in Tgs

There was intense immunostaining for ACE ([Figure 5a, A](#)) in RPTCs of non-Tgs. Decreased ACE immunostaining was observed in RPTCs of Agt/Cat-Tg ([Figure 5a, D](#)) as compared with non-Tg ([Figure 5a, A](#)), Agt-Tg ([Figure 5a, B](#)), and Cat-Tg ([Figure 5a, C](#)). In contrast, decreased immunostaining for ACE2 ([Figure 5b, B](#)) was observed in RPTCs of Agt-Tgs as compared with non-Tgs ([Figure 5b, A](#)) and Cat-Tgs ([Figure 5b, C](#)). Overexpression of Cat normalized ACE2 immunostaining in RPTCs of Agt/Cat-Tgs ([Figure 5b, D](#)) as compared with non-Tgs. Western blotting and RT-qPCR for protein and mRNA expression of ACE ([Figure 5c and e](#)) and ACE2 ([Figure 5d and f](#)) from isolated RPTs confirmed these findings.

Agt-Tg mice showed increased urinary Ang II levels and decreased Ang 1-7 levels compared with non-Tg and Cat-Tg mice, and these changes were normalized in Agt/Cat-Tg mice ([Figure 6a and b](#)). Furthermore, ACE activity in RPT was significantly higher in Agt-Tg mice than in non-Tgs, Cat-Tgs, and Agt/Cat-Tgs ([Figure 6c](#)).

Tubulointerstitial fibrosis

Agt-Tg kidneys showed enhanced expression of collagenous components of extracellular matrix proteins ([Figure 7a, B](#)), immunoreactive collagen type IV ([Figure 7b, B](#)), and

monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) ([Figure 7c, B](#)) as compared with the kidneys of non-Tg ([Figure 7a, A; b, A; and c, A](#)) and Cat-Tgs ([Figure 7a, C; b, C; and c, C](#)). Cat overexpression in Agt/Cat-Tgs attenuated these changes ([Figure 7a, D; b, D; and c, D](#)). Quantification on sections stained with Masson's trichrome ([Figure 7d](#)) and RT-qPCR for collagen type IV ([Figure 7e](#)) and MCP-1 ([Figure 7f](#)) mRNA expression confirmed the findings.

Agt-Tg kidneys also showed higher expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) ([Figures 8a, B](#)) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) ([Figure 8b, B](#)) than non-Tg kidneys ([Figures 8a, A and b, A](#)) and Cat-Tg kidneys ([Figures 8a, C and b, C](#)). Overexpression of Cat in RPTCs of Agt/Cat-Tgs prevented the increase in TGF- β 1 and PAI-1 expression ([Figures 8a, D and b, D](#)). Quantification of TGF- β 1 and PAI-1 protein by western blotting ([Figures 8c and d](#), respectively) and mRNA by RT-qPCR ([Figure 8e and f](#), respectively) further validated these data.

Cat overexpression prevents RPTC apoptosis in Tgs

The number of apoptotic RPTCs was higher in Agt-Tgs ([Figure 9a, B](#)) than in non-Tgs ([Figure 9a, A](#)) and Cat-Tgs ([Figure 9a, C](#)). Overexpression of Cat effectively attenuated RPTC apoptosis in Agt/Cat-Tgs ([Figure 9a, D](#)). Semi-quantitative estimation of the number of apoptotic RPTCs confirmed these findings ([Figure 9c](#)).

Immunohistochemistry showed increased staining for active caspase-3 ([Figure 9b, B](#)) in RPTCs of Agt-Tgs as compared with non-Tgs ([Figure 9b, A](#)) and Cat-Tgs ([Figure 9b, C](#)). Overexpression of Cat effectively attenuated increases in caspase-3 in RPTCs of Agt/Cat-Tgs ([Figure 9b, D](#)). Similar trends were detected by caspase-3 activity assay from isolated RPTs ([Figures 9d](#)).

An increased Bax/Bcl-xL ratio expression is associated with promotion of apoptosis. We next investigated whether this also occurred in RPTs of our Tg mice. Bax mRNA ([Figure 9e](#)) expression was augmented in RPTs of Agt-Tgs as compared with non-Tg littermates and Cat-Tgs. In contrast, Bcl-xL mRNA ([Figure 9f](#)) expression was significantly lower in

RPTs of Agt-Tgs than in non-Tgs and Cat-Tgs. Cat overexpression reversed these changes in RPTs of Agt/Cat-Tgs.

3.3 Discussion

This study shows that Cat overexpression in RPTCs effectively prevents hypertension, albuminuria, tubulointerstitial fibrosis, and RPTC apoptosis as well as normalizes RPTC ACE2 expression and urinary Ang 1–7 levels in Agt/Cat-Tgs as compared with Agt-Tgs.

These findings indicate that intrarenal RAS-induced ROS generation and downregulation of ACE2 expression likely have an important role in the development of hypertension, tubulointerstitial fibrosis, and RPTC apoptosis.

In the kidney, Cat is localized predominantly in the cytoplasm of proximal tubules of the superficial cortex. Cat was not detected in the glomeruli, distal tubules, loop of Henle, and collecting ducts.²⁶ Cat overexpression renders cell more resistant to H₂O₂ toxicity and oxidant-mediated injury. Transgenic mice overexpressing Cat are protected against myocardial injury in hypertension.²⁷ However, little is known about whether overexpression of Cat in the kidney could protect against kidney injury.

Consistent with our previous findings,²⁵ kidney/body weight ratios and glomerular volume did not differ significantly in non-Tgs and Tgs, whereas RPTC volume was significantly higher in Agt-Tgs than non-Tgs and was normalized in Agt/Cat-Tgs. These observations indicate that Agt overexpression and RAS activation stimulate RPTC hypertrophy without affecting glomerular tuft volume. However, whether intrarenal RAS activation would affect glomerular function such as glomerular filtration rate remains to be determined.

Albuminuria (measured by albumin/creatinine ratio, ACR) was detectable after week 16–20 in Agt-Tgs but not in non-Tgs. Cat overexpression in Agt/Cat-Tgs significantly reduced albuminuria at week 20 compared with Agt-Tgs. These observations imply a link between intrarenal RAS activation, ROS, and albuminuria independently of SBP. Indeed, this possibility is supported by our earlier report in which hydralazine (a vasodilator) lowered SBP but not albuminuria in Agt-Tgs.²⁵

Consistent with previous studies,^{23, 24, 25} baseline SBP was significantly higher in Agt-Tgs than in non-Tgs. Cat overexpression in RPTCs of Agt/Cat-Tgs effectively normalized SBP.

Interestingly, significantly higher urinary Ang II and lower Ang 1–7 levels were found in Agt-Tgs than in non-Tgs and these changes were normalized in Agt/Cat-Tg mice. Similar trends were detected in ACE activity in RPT. These findings strongly suggest that Ang II increases ACE activity via ROS generation and point toward an important role for the augmented intrarenal Ang II/Ang 1–7 ratio in the development of hypertension.

It is not known how Cat overexpression normalizes hypertension in Agt/Cat-Tgs. The hypothesis that Ang II may downregulate ACE2 gene expression, and subsequently favor hypertension development has received considerable attention. Indeed, Ferrario *et al.*²⁸ report that RAS blockade increases kidney cortex ACE2 activity and urinary Ang 1–7 excretion in normotensive Lewis rats. Recent studies by Koka *et al.*²⁹ established that ACE and ACE2 levels are low and high, respectively, in normal human kidneys whereas ACE and ACE2 expression is reversed in human hypertensive kidneys. Furthermore, they showed that Ang II upregulated ACE and downregulated ACE2 expression via AT₁R coupled to extracellular signaling-regulated kinase 1 and 2 (ERK 1/2) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) signaling *in vitro*.²⁹ Thus, our findings support the concept that RAS activation induces ROS generation via enhanced NADPH oxidase activity, upregulates ACE activity and downregulates ACE2 expression. Cat overexpression reverses these effects and thereby prevents hypertension development. The underlying mechanisms of ROS upregulation of ACE activity have yet to be defined.

Our data indicate that intrarenal Agt gene expression and ROS generation are important in mediating tubulointerstitial fibrosis and tubular apoptosis. Consistent with previous studies,^{24, 25} expression of extracellular matrix proteins such as collagen type IV and profibrotic gene such as TGF- β 1 were enhanced in the tubulointerstitium; furthermore, PAI-1 expression in RPTCs of Agt-Tgs was increased. In contrast, the expression of these genes was normalized in Agt/Cat-Tgs. Our findings on increased expression of MCP-1 in Agt-Tg kidneys as compared with non-Tgs but normalized in Agt/Cat-Tgs further supported the important role of intrarenal RAS and ROS in the development of tubulointerstitial fibrosis.

The numbers of TUNEL-positive RPTCs were significantly higher in Agt-Tg than in non-Tgs, which is consistent with previous reports that Ang II induces RPTC apoptosis *in vivo*.^{24, 25, 30, 31} Consistent with the TUNEL assay, Agt-Tgs showed enhanced active caspase-3 expression and activity in their kidneys. These changes were attenuated by overexpression of Cat in concomitant upregulation of Bax mRNA and downregulation of Bcl-xL mRNA expression. Cat overexpression reversed the Bax/Bcl-xL mRNA ratio. An

increased Bax/Bcl-xL ratio is consistent with promotion of apoptosis, a mechanism by which RAS and ROS enhance tubular apoptosis in Agt-Tgs.

Based on our observations, we can offer two hypotheses concerning the ways in which intrarenal Ang II induces hypertension and kidney injury. First, intrarenal Ang II might affect SBP via enhanced renal Na⁺ absorption through direct stimulation of the sodium-potassium adenosine triphosphatase (Na⁺-K⁺-ATPase) and sodium/hydrogen exchanger-3 (NHE-3) activity in RPTs.^{32, 33} Second, because Ang II induces ROS generation and upregulates AT₁R expression, it would secondarily enhance renal sodium absorption via Na⁺-K⁺-ATPase activation. For example, Silva and Soares-da-Silva³⁴ reported that ROS upregulate Na⁺-K⁺-ATPase activity and gene expression in opossum RPTCs. More recently, Banday *et al.*³⁵ reported that oxidative stress-mediated AT₁R upregulation causes loss of the Na⁺-K⁺-ATPase biphasic response and enhances Na⁺-K⁺-ATPase activity in Sprague-Dawley rats. This possibility is supported by our preliminary (**note: voir annexe 1 ajoutée**) results that urinary sodium levels were significantly lower in Agt-Tgs than in non-Tgs and were normalized in Agt/Cat-Tgs.

Despite the fact that we previously reported that apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, was ineffective in preventing hypertension in Agt-Tgs,²⁵ our present study found that overexpression of Cat in RPTCs completely normalized SBP in Agt/Cat-Tgs. A possible explanation for these apparently inconsistent results is that renal Ang II may affect SBP through direct vasoconstriction of glomerular arterioles through the Ang II AT₁-receptor independently of ROS generation. Apocynin is a weak inhibitor of vascular NADPH oxidase in the absence of myeloperoxidase, which converts apocynin into active apocynin dimer.³⁶ Our current findings suggest that Cat-overexpression likely alleviates oxidative stress regardless of its source, whereas apocynin could only influence NADPH oxidase-dependent ROS production. Thus, Cat overexpression appears to be more effective than apocynin because NADPH oxidase is not the sole source of ROS in RPTCs of Agt-Tg mice.

Recent studies have shown that chronic hypoxia may be a mechanism of progression of chronic kidney diseases and that the activation of the RAS is intimately involved in chronic hypoxia of the kidney (see recent reviews: Fine and Norman;³⁷ Nangaku and Fujita³⁸). Thus, it is possible that the augmented renal RAS activation in our Agt-Tg mice might induce renal hypoxia via both hemodynamic and non-hemodynamic mechanisms, as postulated by Nangaku and Fujita.³⁸ The beneficial effects of Cat overexpression are,

at least in part, mediated by the amelioration of local hypoxia via degrading hydrogen peroxide to oxygen and water in RPTCs. However, whether activation of the intrarenal RAS may directly affect RPTC hypoxia remains to be determined. Finally, since chronic hypoxia in the kidney is an ideal therapeutic target and Cat expression might alleviate cellular hypoxia, our findings suggest that the activation of Cat expression in RPTCs by novel drugs may offer novel therapeutics for retarding or preventing chronic kidney disease.

In summary, our study indicates an important role for intrarenal RAS and ROS in hypertension, albuminuria, interstitial fibrosis and RPTC apoptosis observed in Agt-Tgs. The Agt/Cat-Tg model may be useful for studying the mechanism (s) of Ang II action on ROS generation and kidney-dependent hypertension. Our data suggest that selective inactivation of renal ROS generation and upregulation of ACE2 and Cat may provide novel therapeutic targets for preventing hypertension and reversing nephropathy in hypertension and renal disease.

3.4 Materials and methods

The pKAP2 plasmid contains the kidney androgen-regulated promoter (KAP), which is responsive to testosterone stimulation, was obtained from Dr Curt D Sigmund (University of Iowa, Iowa, IA, USA) and has been described elsewhere.^{39, 40} rCat cDNA was a gift from Dr Paul E Epstein (University of Louisville, Louisville, KY, USA). Rabbit polyclonal antibodies anti-heme oxygenase-1 (HO-1), anti-bovine Cat and monoclonal antibodies against β -actin were purchased from Assay Designs (Ann Arbor, MI, USA) and Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada), respectively. Polyclonal anti-ACE and anti-PAI-1 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) whereas anti-ACE2 and anti-MCP-1 were procured from R & D Systems. (Minneapolis, MN, USA). Polyclonal anti-cleaved caspase-3 antibody and monoclonal anti-collagen type IV antibody were obtained from New England Biolabs (Pickering, ON, Canada) and Chemicon International (Temecula, CA, USA), respectively. Rabbit anti-rat Agt antibodies were generated in our laboratory (JSDC).²¹ These antibodies are specific for intact rat and mouse Agt (that is, 55–62kDa Agt) and do not cross-react with pituitary hormone preparations or other rat or mouse plasma proteins.²¹ Oligonucleotides were procured

from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Restriction and modifying enzymes were purchased from either Invitrogen or La Roche Biochemicals (Laval, QC, Canada).

Generation of KAP2-Agt/Cat-Tgs

The creation of Tgs overexpressing rAgt or rCat in their RPTCs has been described previously.^{14, 23} Briefly, cDNA encoding full-length rAgt or rCAT fused with HA and terminating codon at the 3' end (*NotI* site flanked at both 5'- and 3'-terminali) were inserted into pKAP2 plasmid at the *NotI* site of exon II of human Agt gene. The isolated KAP2-rAgt or KAP2-rCAT transgene was then microinjected into 1-cell fertilized mouse embryos using a standard procedure. The positive Tg founders were then crossed with wild type C57Bl6 mice for F1 generation. Breeding was continued until homozygous F3 and F4 Tg mice were obtained. Agt/Cat Tgs were created by cross-breeding the Agt-Tgs (no. 388) with Cat-Tgs (no. 688) (C57Bl6 background) and by continuing breeding until homozygous Agt/Cat-Tgs were obtained.

Physiological studies

Unless otherwise noted, we used male Tgs aged 10–20 weeks at data collection. Non-Tg littermates served as controls. All animals received standard mouse chow and water *ad libitum*. Animal care and procedures were approved by the CRCHUM's Animal Care Committee.

Systolic blood pressure (SBP) was monitored with a blood pressure-2000 tail-cuff pressure machine (Visitech Systems, Apex, NC, USA)^{15, 23, 24, 25} in the morning, at least 2–3 times a week, for 10 weeks. The mice were trained in the procedure for at least 15–20min per day for 5 days before the first SBP measurements. SBP values represent the mean±s.d. of 2–3 determinations per week per animal per group (*N*=8 animals per group). All animals were euthanized at age 20 weeks. Twenty-four hours before euthanasia, they were housed individually in metabolic cages. Body weight was recorded. Urine was collected and assayed for albumin and creatinine (ELISA, Albuwell and Creatinine Companion, Exocell, Philadelphia, PA, USA).^{23, 24, 25} Both kidneys and hearts were removed immediately after euthanasia. The decapsulated kidneys and wet hearts were weighed. The left kidneys were processed for histology and apoptosis study, and the right kidneys were used for isolation of renal proximal tubules (RPTs) by Percoll gradient.^{23, 24, 25}

Histological studies

Kidney sections (4–5 sections, 3–4 μ m thick, per kidney) from eight animals per group were stained with hematoxylin and eosin or Masson's trichrome stain and analyzed visually under a light microscope by two investigators blinded to the treatments.^{23, 24, 25} Masson's trichrome-stained images were quantified by NIH ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

The mean glomerular volumes on 30 random glomerular sections per mouse were determined by the method of Weibel⁴¹ with the Motics Images Plus 2.0 image analysis software (Motic, Richmond, BC, Canada). RPTC volume was measured from 100 RPTCs per mouse with the same software. Outer cortical RPTs with similar cross-sectional views and clear nuclear structure were selected. The mean cell volume was estimated by the Nucleator method.⁴²

Immunohistochemical staining was performed according to the standard avidin–biotin–peroxidase complex method (ABC Staining System, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA).^{23, 24, 25} Immunostaining with nonimmune normal rabbit serum (displayed no immunostaining) for putative genes in both non-Tg and Tg mouse kidneys served as controls (not shown). The percentage of apoptotic RPTCs (TUNEL kit, Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) was estimated semi-quantitatively as previously described.^{24, 25}

Urinary Ang II and Ang 1–7 measurement and ACE activity assay

Mouse urine samples (180 μ l per animal) were initially purified by C18 Sep-Pak columns (Waters Corporation, MA USA) and then extracted with an extraction kit (Bachem Americas, Torrance, CA USA) according to the recommended number III protocol. The residues were then resuspended in 120 μ l of EIA buffer solution (supplied by Bachem Americas) and aliquots (50 μ l each) were used for Ang II or Ang 1–7 measurement by respective specific ELISA (Bachem Americas).

ACE activity was quantified by the cleavage of the substrate hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL, Sigma-Aldrich Canada) followed by labeling with *o*-phthaldialdehyde (OPA, Sigma-Aldrich Canada) according to the method described by Dean *et al.*⁴³ with slight modifications. Briefly, ~40 μ g of proteins (RPT extracts) were diluted in sodium borate buffer (0.4 mol/l boric acid, 0.3 mol/l NaCl, pH8.3) (final volume 50 μ l) and incubated for

1 h at 37°C in the presence or absence of 100 μ mol/l perindopril (an ACE inhibitor). The reaction was stopped by the addition of 0.34 mol/l NaOH (final concentration 0.28 mol/l) followed by labeling with 40 μ l of 20 mg/ml OPA. After incubation for 10 min, 100 μ l of 3 mol/l HCl was added and the measurements of fluorescence were carried at wavelengths of 360 nm excitation and 530 nm emission. The values of ACE activity were calculated by subtraction of perindopril-containing tubes from those without perindopril. All values were normalized by the protein concentrations and expressed as the relative light unit emission per mg protein.

ROS generation, NADPH oxidase and caspase-3 activity assays

ROS production in the kidney was assessed by ROS generation in freshly isolated RPTs by the lucigenin method^{14, 15, 24, 25, 44} and NADPH oxidase activity.²⁵ Oxidative stress in RPTCs *in vivo* was assessed by standard immunohistochemical staining for heme oxygenase 1 (HO-1, an oxidative stress-inducible gene that confers cellular oxidative stress *in vivo*).⁴⁵

Briefly, RPTs were washed in modified Krebs buffer containing NaCl (130 mmol/l), KCl (5 mmol/l), MgCl₂ (1 mmol/l), CaCl₂ (1.5 mmol/l), K₂HPO₄ (1 mmol/l) and Hepes (20 mmol/l), pH 7.4, and resuspended in 900 μ l of Krebs buffer supplemented with 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA). The cell suspension was transferred to plastic tubes and ROS production was assessed in a luminometer (LB 9507; Berthold, Wildbad, Germany). Measurement began with an injection of 100 μ l lucigenin (final concentration 5×10^{-4} M). Photon emissions were counted every 1 min for up to 20 min. Peak emissions at 10 min were recorded from each group for comparison. Modified Krebs buffer served as a control (blank). Solutions containing lucigenin without RPTs did not display any significant interference in the lucigenin assay. ROS production in RPTs was normalized with protein concentration and expressed as relative light units per min per mg protein.

NADPH oxidase activity was measured by a luminescence assay.^{25, 46, 47} Briefly, RPTs were homogenized in lysis buffer and assayed in 50 mmol/l phosphate buffer, pH 7.0, containing 1 mmol/l EGTA, 150 mmol/l sucrose, 5 μ M lucigenin and 100 μ M NADPH (final volume, 0.9 ml). The reaction was started after the addition of 100 μ l (\sim 100 μ g) of homogenate protein. No activity was detected in the absence of NADPH.

Caspase-3 activity was assayed on frozen (-80°C) RPTs with caspase-3 assay kits (BD Bioscience Pharmingen, Mississauga, ON, Canada), as described previously.^{24, 25}

Western blotting and real time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) assays for gene expression

Western blotting for ACE, ACE2, TGF- β 1, and PAI-1 was performed as described elsewhere using RPT lysates.^{14, 15, 24, 25} The membrane was then blotted with primary anti-ACE, ACE2, TGF- β 1, or PAI-1 antibody and then re-blotted with anti- β -actin monoclonal antibodies and chemiluminescent developing reagent (Roche Biochemicals). The relative densities of ACE, ACE2, TGF- β 1, PAI-1, and β -actin bands were quantified by computerized laser densitometry (ImageQuant software (version 5.1), Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

ACE, ACE2, collagen type IV, TGF- β 1, PAI-1, MCP-1, Bax, Bcl-xL, and β -actin mRNA expression in RPTs was quantified by RT-qPCR with forward and reverse primers corresponding to the respective genes ([Table 1](#)) according to the methods as described previously.^{14, 15, 24, 25}

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm s.d. The data are analyzed by one-way ANOVA and the Bonferroni test. *P*-values <0.05 were considered significant.

3.5 Disclosure

All the authors declared no competing interests.

3.6 References

1. The ADVANCE Collaborative Group. Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial): a randomized controlled trial. *Lancet* 2007; **370**: 829–840.

2. Gaede P, Lund-Andersen H, Parving H-H *et al.* Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; **358**: 580–591.
3. The ONTARGET Investigators. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med* 2008; **358**: 1547–1559.
4. Holman RR, Paul SK, Bethel A *et al.* Long-term follow-up after tight control of blood pressure in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; **359**: 1565–1576.
5. Bohle A, Mackensen-Haen S, Von Gise H *et al.* The consequences of tubulointerstitial changes for renal function in glomerulopathies. *Pathol Res Proct* 1990; **186**: 135–144.
6. Burnier M, Brunner HR. Angiotensin II receptor antagonists. *Lancet* 2000; **355**: 637–645.
7. Seikaly MG, Arant BS, Seney FD *et al.* Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J Clin Invest* 1990; **86**: 1352–1357.
8. Navar LG, Lewis L, Hymel A *et al.* Tubular fluid concentrations and kidney contents of angiotensin I and II in anesthetized rats. *J Am Soc Nephrol* 1994; **5**: 1153–1158.
9. Van Kats JP, Schalekamp MADH, Verdouw PD *et al.* Intrarenal angiotensin II: interstitial and cellular levels and site of production. *Kidney Int* 2001; **60**: 2311–2317.
10. Lai KN, Leung JCK, Lai KB *et al.* Gene expression of the renin-angiotensin system in human kidney. *J Hypertens* 1998; **16**: 91–102.
11. Navar L, Harrison-Bernard L, Nishiyama A *et al.* Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension* 2002; **39**: 316–322.
12. Reich HN, Oudit GY, Penninger JM *et al.* Decreased glomerular and tubular expression of ACE2 in patients with type 2 diabetes and kidney disease. *Kidney Int* 2008; **74**: 1610–1616.
13. Kobori H, Alper Jr AB, Shenava R *et al.* Urinary angiotensinogen as a novel biomarker of the intrarenal renin-angiotensin system status in hypertensive patients. *Hypertension* 2009; **53**: 344–350.
14. Brezniceanu M-L, Liu F, Wei C-C *et al.* Catalase overexpression attenuates angiotensinogen gene expression and apoptosis in diabetic transgenic mice. *Kidney Int* 2007; **71**: 912–923.

15. Brezniceanu M-L, Liu F, Wei C-C *et al.* Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. *Diabetes* 2008; **57**: 451–459.
16. Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II as a hypertrophogenic cytokine for proximal tubular cells. *Kidney Int* 1992; **43**(Suppl. 39): S100–S107.
17. Tang SS, Jung F, Diamant D *et al.* Temperature-sensitive SV 40 immortalized rat proximal tubule cell line has functional renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol* 1995; **268**: F435–F446.
18. Loghman-Adham M, Rohrwasser A, Helin C *et al.* A conditionally immortalized cell line from murine proximal tubule. *Kidney Int* 1997; **52**: 229–239.
19. Chen M, Harris MP, Rose D *et al.* Renin and renin mRNA in proximal tubules of the rat kidney. *J Clin Invest* 1994; **94**: 237–243.
20. Burns KD, Inagami T, Harris RC. Cloning of a rabbit kidney cortex AT₁ angiotensin II receptor that is present in proximal tubule epithelium. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1993; **264**: F645–F654.
21. Wang L, Lei C, Zhang S-L *et al.* Synergistic effect of dexamethasone and isoproterenol on the expression of angiotensinogen in immortalized rat proximal tubular cells. *Kidney Int* 1998; **53**: 287–295.
22. Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM *et al.* Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension* 2003; **41**: 392–397.
23. Sachetelli S, Liu Q, Zhang S-L *et al.* RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney. *Kidney Int* 2006; **69**: 1016–1023.
24. Liu F, Brezniceanu M-L, Wei C-C *et al.* Overexpression of angiotensinogen increases tubular apoptosis in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 269–280.
25. Liu F, Wei C-C, Wu S-J *et al.* Apocynin attenuates tubular apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in transgenic mice independent of hypertension. *Kidney Int* 2009; **75**: 156–166.
26. Zhou Z, Kang YJ. Cellular and subcellular localization of catalase in the heart of transgenic mice. *J Histochem Cytochem* 2000; **48**: 585–594.
27. Kang YJ, Chen Y, Epstein PN. Suppression of doxorubicin cardiotoxicity by overexpression of catalase in the heart of transgenic mice. *J Biol Chem* 1996; **271**: 12610–12616.

28. Ferrario CM, Jessup J, Gallapner PE *et al.* Effect of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. *Kidney Int* 2005; **68**: 2189–2196.
29. Koka V, Huang XR, Chung ACK *et al.* Angiotensin II upregulates angiotensin-1-converting enzyme (ACE), but down-regulates ACE2 via the AT1-ERK/p38 MAPK kinase pathway. *Am J Pathol* 2008; **172**: 1174–1183.
30. Cao Z, Kelly DJ, Cox A *et al.* Angiotensin type 2 receptor is expressed in the adult rat kidney and promotes cellular proliferation and apoptosis. *Kidney Int* 2000; **58**: 2437–2451.
31. Aizawa T, Ishizaka N, Kurokawa K *et al.* Differential effects of angiotensin II and catecholamine on renal cell apoptosis and proliferation in rats. *Kidney Int* 2001; **59**: 645–653.
32. Saccomani G, Mitchell KD, Navar LG. Angiotensin II stimulation of Na⁺-H⁺ exchange in proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1990; **258**: F1188–F1195.
33. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Wang CT *et al.* Concentration and actions of intraluminal Ang II. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**(Suppl 11): S189–S195.
34. Silva E, Soares-da-Silva P. Reactive oxygen species and the regulation of renal Na⁺-K⁺-ATPase in opossum kidney cells. *Am J Physiol Regul Comp Physiol* 2007; **293**: R1764–R1770.
35. Banday AA, Lokhandwala MF. Loss of biphasic effect on Na/K-ATPase activity by angiotensin II involves defective angiotensin type 1 receptor-nitric oxide signaling. *Hypertension* 2008; **52**: 1099–1105.
36. Heumuller S, Wind S, Barbosa-Sicard E *et al.* Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidase but an antioxidant. *Hypertension* 2008; **51**: 211–217.
37. Fine LG, Norman JT. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney Int* 2008; **74**: 867–872.
38. Nangaku M, Fujita T. Activation of the renin-angiotensin system and chronic hypoxia of the kidney. *Hypertens Res* 2008; **31**: 175–184.
39. Ding Y, Davission RL, Hardy DO *et al.* 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.
40. Lavoie JL, Bruse-Lake KD, Sigmund CD. Increased blood pressure in transgenic mice expressing both human renin and angiotensinogen in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 2004; **286**: F965–F971.
41. Weibel ER. Numerical density: shape and size of particles. In: Weibel ER (ed). *Stereological Methods*. Vol 2 Theoretical Foundations, Academic Press: London, 1980 pp 149–152.
42. Gundersen HJG. The nucleator. *J Microsc* 1988; **151**: 3–21.
43. Dean SA, Tan J, O'Brien ER *et al*. 17 β -estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ang II type 1 receptor in female rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; **288**: R759–R766.
44. Hsieh TJ, Zhang SL, Filep JG *et al*. High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 2002; **143**: 2975–2985.
45. Ishizaka N, Aizawa T, Ohno M *et al*. Regulation and localization of HSP70 and HSP25 in the kidney of rats undergoing long-term administration of angiotensin II. *Hypertension* 2002; **39**: 122–128.
46. Park YM, Park MY, Suh YL *et al*. NADPH oxidase inhibitor prevents blood pressure elevation and cardiovascular hypertrophy in aldosterone-infused rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **313**: 812–817.
47. Viridis A, Neves MF, Amiri F *et al*. Role of NADPH oxidase on vascular alternations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens* 2004; **22**: 535–542.

3.7 Acknowledgments

This work was supported in part by grants from the Kidney Foundation of Canada, the Canadian Institutes of Health Research (MOP-84363 to JSDC, MOP-86450 to S-LZ and MOP-12573 to JGF), the National Institutes of Health of USA (HL-48455 to JRI) and the support from the Foundation of the CHUM. We thank Dr Kevin D Burns (University of Ottawa, ON, CA) for the advice on urinary Ang 1–7 measurement.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure A. Hematoxylin/eosin (H/E) staining (× 200 magnification) of kidneys of male non-Tg (a), Agt-Tg (b), Cat-Tg (c) and Agt/Cat-Tg (d) mice.

Figure B. Immunohistochemical staining (× 200 magnification) of kidneys of male non-Tg (a), Agt-Tg (b), Cat-Tg (c) and Agt/Cat-Tg (d) mice.

Legends

Table 1

Primers for genotyping and RT-qPCR.

Figure 1.

Transgene expression. (a) RT-PCR product showing expression of rAgt-HA and rCat-HA mRNA in renal proximal tubules of adult male non-Tg and Tg mice (20 weeks old). rAgt-HA, rCat-HA, and β -actin fragments are indicated. (b) Immunohistochemical staining (× 600 magnification) of Agt in kidneys of male non-Tg (A), Agt-Tg (B), Cat-Tg (C), and Agt/Cat-Tg (D) mice by employing rabbit anti-rAgt (Rabbit no. 16, 1:100 dilution) polyclonal antibody. Immunostaining of Agt (× 200 magnification) of kidneys is shown in Supplemental Figure B. (c) Immunohistochemical staining (× 600 magnification) of Cat in kidneys of male non-Tg (A), Agt-Tg (B), Cat-Tg (C), and Agt/Cat-Tg (D) mice by employing rabbit anti-bCat (1:100 dilution) polyclonal antibody. Non-immune normal rabbit serum displayed no immunostaining in Tg mouse kidneys (not shown). Agt, angiotensinogen; Cat, cat catalase; Tg, transgenic.

Figure 2.

Kidney to body weight ratio and morphological analysis in male non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20. (a) Kidney-to-body weight ratio. The kidney-to-body weight ratio was measured as the weight of two kidneys per body weight. All data are expressed as the mean \pm s.d., N=8 (***P*<0.005; NS not significant). (b) Hematoxylin/eosin (H/E) staining (\times 600 magnification) of kidneys of male (A) non-Tgs, (B) Agt-Tgs, (C) Cat-Tgs, and (D) Agt/Cat-Tgs. Arrows indicate tubular damage, that is, RPTCs without brush border or cellular atrophy. H/E staining (\times 200 magnification) of kidneys is shown in Supplemental Figure A. (c) Mean RPTC volume of male non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20. (d) Mean glomerular volume of male non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20.

Figure 3.

Urinary albumin/creatinine ratio (ACR) and systolic blood pressure (SBP) in male non-Tg and Tg mice. (a) Urinary albumin (g/ml)/creatinine (mg/dl) ratio. (b) Longitudinal changes in mean SBP in male non-Tg (\diamond), Agt-Tg (\bullet), Cat-Tg (Δ), and Agt/Cat-Tg (\square) mice from week 10 to week 20 for a 10-week period. Baseline SBP was measured in all mice for 5 days before the first SBP reading. (c) Cross-sectional analysis of SBP (measured 2 to 3 times per week in the morning without fasting, week 20) in non-Tg and Tg mice. (d) Heart-to-body weight ratio. The heart-to-body weight ratio was measured as the wet weight of heart without blood per body weight. All data are expressed as means \pm s.d., N=8 (* *P*<0.05; ** *P*<0.01; *** *P*<0.005; NS not significant).

Figure 4.

ROS generation, NADPH oxidase activity and immunostaining of HO-1 in RPTs of non-Tg and Tg mice. (a) ROS generation. (b) NADPH oxidase activity. The actual NADPH oxidase activity of the controls (non-Tg) was 376.6 \pm 86.6 RLU/min/mg protein. All data are expressed as means \pm s.d., N=8 (* *P*<0.05; ** *P*<0.01; *** *P*<0.005). (c) Immunostaining of HO-1. (A) Non-Tg control littermate; (B) Agt-Tg mouse; (C) Cat-Tg mouse; (D) Agt/Cat-Tg mouse. Magnification \times 600. Arrow indicates representative HO-1 immuno-positive cells in the kidney. RLU, relative light units; ROS, reactive oxygen species.

Figure 5.

ACE and ACE2 expression in male non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20. (a) Immunostaining for ACE: (A) non-Tg control littermate; (B) Agt-Tg mouse; (C) Cat-Tg mouse; (D) Agt/Cat-Tg mouse. Magnification $\times 600$. Arrows indicate ACE immuno-positive cells. (b) Immunostaining for ACE2: (A) non-Tg control littermate; (B) Agt-Tg mouse; (C) Cat-Tg mouse; (D) Agt/Cat-Tg mouse. Magnification $\times 600$. Arrows indicate ACE2 immuno-positive cells. Western blotting of ACE (c) and ACE2 (d) in mouse RPTs. The same membrane was re-blotted for β -Actin. RT-qPCR of ACE (e) and ACE2 (f) in mouse RPTs. ACE, ACE2 and β -actin mRNAs were run simultaneously in the same RT-qPCR assay. ACE and ACE2 mRNA levels were normalized by corresponding β -actin mRNA levels. mRNA levels in non-Tg were considered as 100%. All data are expressed as means \pm s.d., N=8 (* P<0.05; NS, non-significant).

Figure 6.

Urinary Ang II and Ang 1–7 levels, and renal ACE activity in male non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20. Cross-sectional analysis of urinary Ang II (a), Ang 1–7 (b) levels, and RPT ACE activity (c) in non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20. Mouse urines were extracted and assayed by Peptide Enzyme Immunoassay (ELISA) according to the protocol provided by the manufacturer (Bachem Americas, CA, USA). The actual ACE activity of non-Tgs is 419 ± 134 RLU/min/mg protein. Values are expressed as means \pm s.d., N=8 in males (* P<0.05).

Figure 7.

Masson's trichrome staining, collagen type IV and MCP-1 expression in male non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20. Masson's trichrome staining (a), collagen type IV (b) and MCP-1 (c) immunostaining of male non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20. (a), (b), and (c): (A) non-Tg control littermate; (B) Agt-Tg mouse; (C) Cat-Tg mouse; (D) Agt/Cat-Tg mouse. Arrows indicate locations of collagenous materials (a), collagen type IV (b) and MCP-1 (c) immunostaining. Magnification $\times 600$. Quantification of collagenous component accumulation (Masson's trichrome staining) (d), RT-qPCR of collagen type IV, and (e) MCP-1 (f) mRNA. Collagen type IV, MCP-1 and β -actin mRNAs were run simultaneously

in the same RT-qPCR assay. Collagen type IV and MCP-1 mRNA levels were normalized by corresponding β -actin mRNA levels. mRNA levels in non-Tg were considered as 100%. All data are expressed as means \pm s.d., N=8 (* P<0.05; *** P<0.005). MCP-1, monocyte chemotactic protein-1.

Figure 8.

TGF- β 1 and PAI-1 expression in male non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20. TGF- β 1 (a) and PAI-1 (b) immunostaining of male non-Tg and Tg mouse kidneys at week 20. (a) and (b): (A) non-Tg control littermate; (B) Agt-Tg mouse; (C) Cat-Tg mouse; (D) Agt/Cat-Tg mouse. Arrows indicate TGF- β 1 immuno-positive areas (a) or PAI-1 immuno-positive cells (b). Magnification \times 600. Western blotting of TGF- β 1 (c) and PAI-1 (d) expression in mouse RPTs. RT-qPCR of TGF- β 1 (e) and PAI-1 (f) mRNA. TGF- β 1, PAI-1 and β -actin mRNAs were run simultaneously in the same RT-qPCR assay. TGF- β 1 and PAI-1 mRNA levels were normalized by corresponding β -actin mRNA levels. mRNA levels in non-Tg were considered as 100%. All data are expressed as means \pm s.d., N=8 (* P<0.05; *** P<0.005). PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1.

Figure 9.

Apoptosis in male non-Tg and Tg mouse kidneys. (a) TUNEL assay. (A) Non-Tg control; (B) Agt-Tg mouse; (C) Cat-Tg mouse; (D) Agt/Cat-Tg mouse. Magnification \times 600. (b) Immunostaining of active caspase-3 (anti- α -active caspase-3 antibodies (1: 50 dilution)). (A) non-Tg control; (B) Agt-Tg mouse; (C) Cat-Tg mouse; (D) Agt/Cat-Tg mouse. Arrows indicate apoptotic cells in proximal tubules. (c) Bar graph showing semi-quantitative analysis of apoptotic RPTCs from male non-Tg and Tg mouse kidneys. (d) Caspase-3 activity in RPTs from male non-Tg and Tg mouse kidneys. RT-qPCR of Bax (e) and Bcl-xL (f) mRNA. Bax, Bcl-xL, and β -actin mRNAs were run simultaneously in the same RT-qPCR assay. Bax and Bcl-xL mRNA levels were normalized by corresponding β -actin mRNA levels. mRNA levels in non-Tg were considered as 100%. All data are expressed as means \pm s.d., N=8 (* P<0.05; *** P<0.005).

Table I

Primers for genotyping:

Agt (S) N+676 to N+695 (5'-CCTCGCTCTCTGGACTTATC-3') (BC087679)

Cat (S) N+1152 to N+1170 (5'-CACTCACCGCCACCGCCTG-3') (BC081853)

HA (AS) (5'-GGCGTAGTCAGGCACGTCGT-3')

Primers for RT-qPCR:

(NM_207624) ACE (S) N+322 to N+341 (5'-AGGAGTTTGCAGAGGTCTGG-3')
ACE (AS) N+525 to N+506 (5'-GGAAGCAGACCTTGCCAGTG-3')

(NM_027286) ACE2 (S) N+917 to N+939 (5'-AGGAGGAAGTTGATGGATACCTA-3')
ACE2 (AS) N+1191 to N+1170 (5'-GGCTCAGTCAGCATAGAGTTTG-3')

(NM_007525) Bax (S) N+179 to N+199 (5'-TCATGAAGACAGGGGCCTTTT-3')
Bax (AS) N+364 to N+344 (5'-CAATCATCCTCTGCAGCTCCA-3')

(NM_009743) Bcl-xL (S) N+493 to N+516 (5'-TACCGGAGAGCGTTTCAGTGATCTA-3')
Bcl-xL (AS) N+672 to N+649 (5'-CTGCATCTCCTTGCTACGCTTTC-3')

(NM_007393) β -Actin (S) N+703 to N+723 (5'-CGTGCGTGACATCAAAGAGAA-3')
 β -Actin (AS) N+839 to N+819 (5'-GCTCGTTGCCAATAGTGATGA-3')

(NM_009931) Collagen IV(S) N+5826 to N+5846 (5'-TAGGTGTCAGCAATTAGGCAG-3')
Collagen IV(AS) N+6190 to N+6210(5'-GCATTTACACCTGAGCACAC-3')

(NM_011333) MCP-1 (S) N+92 to N+110 (5'-GTCCCTGTCATGCTTCTGG-3')
MCP-1 (AS) N+211 to N+191 (5'-CATCTTGCTGGTGAATGAGTA-3')

(NM_008871) PAI-1 (S) N+972 to N+989 (5'-CTCATCAGACAATGGAAGAGC-3')
PAI-1 (AS) N+1331 to N+1311 (5'-CATCACTTGCCCCATGAAGAG-3')

(NM_011577) TGF- β 1 (S) N+1031 to N+1051 (5'-CCAAACTAAGGCTCGCCAGTC-3')
TGF- β 1 (AS) N+1301 to N+1282 (5'-GGCACTGCTTCCCGAATGTC-3')

Figure 1

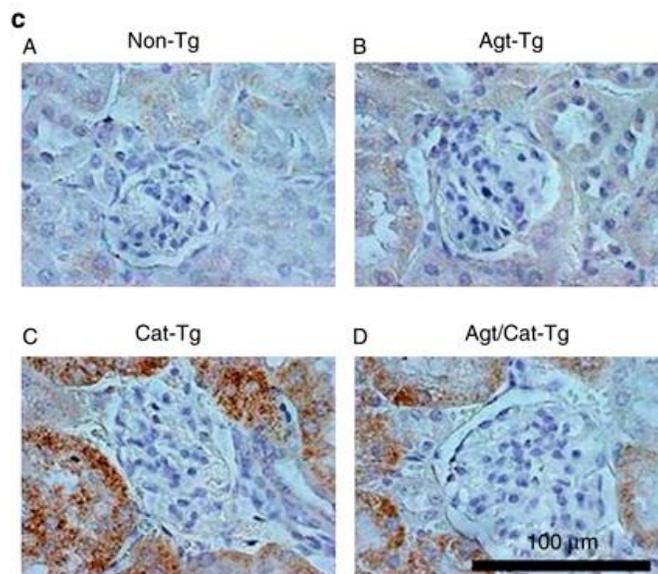
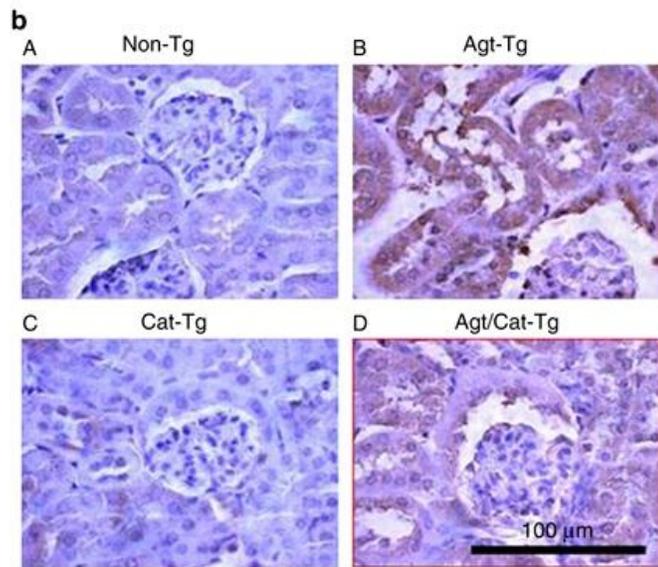
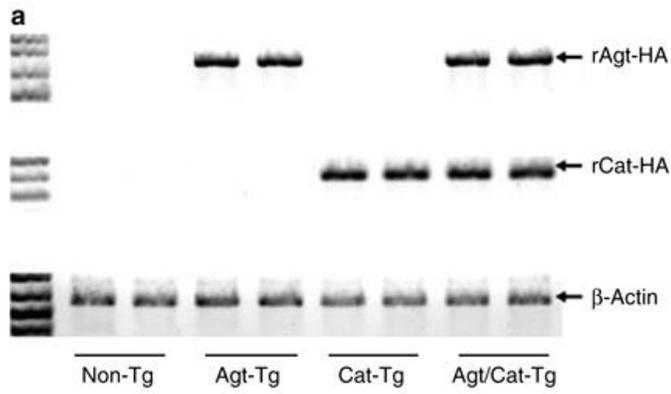


Figure 2

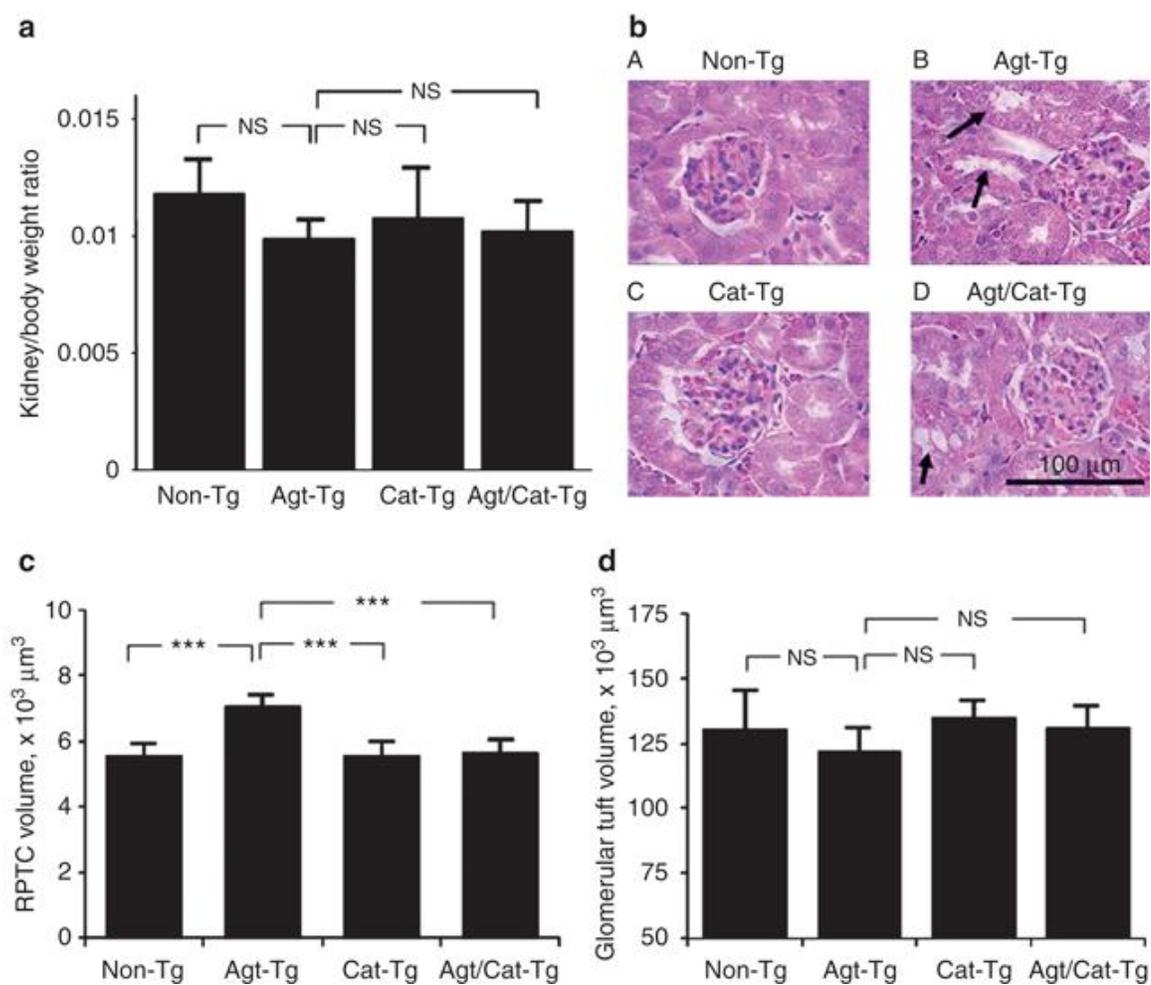


Figure 3

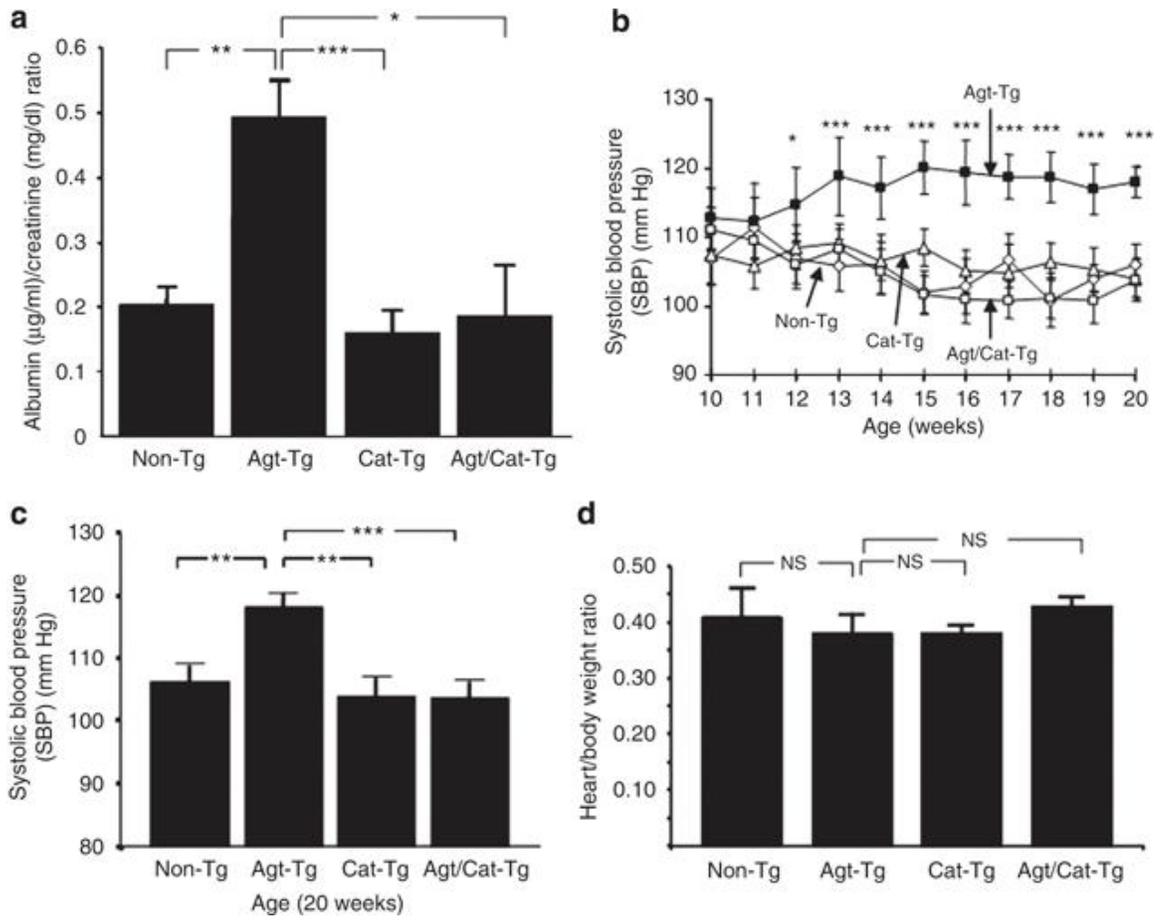


Figure 4

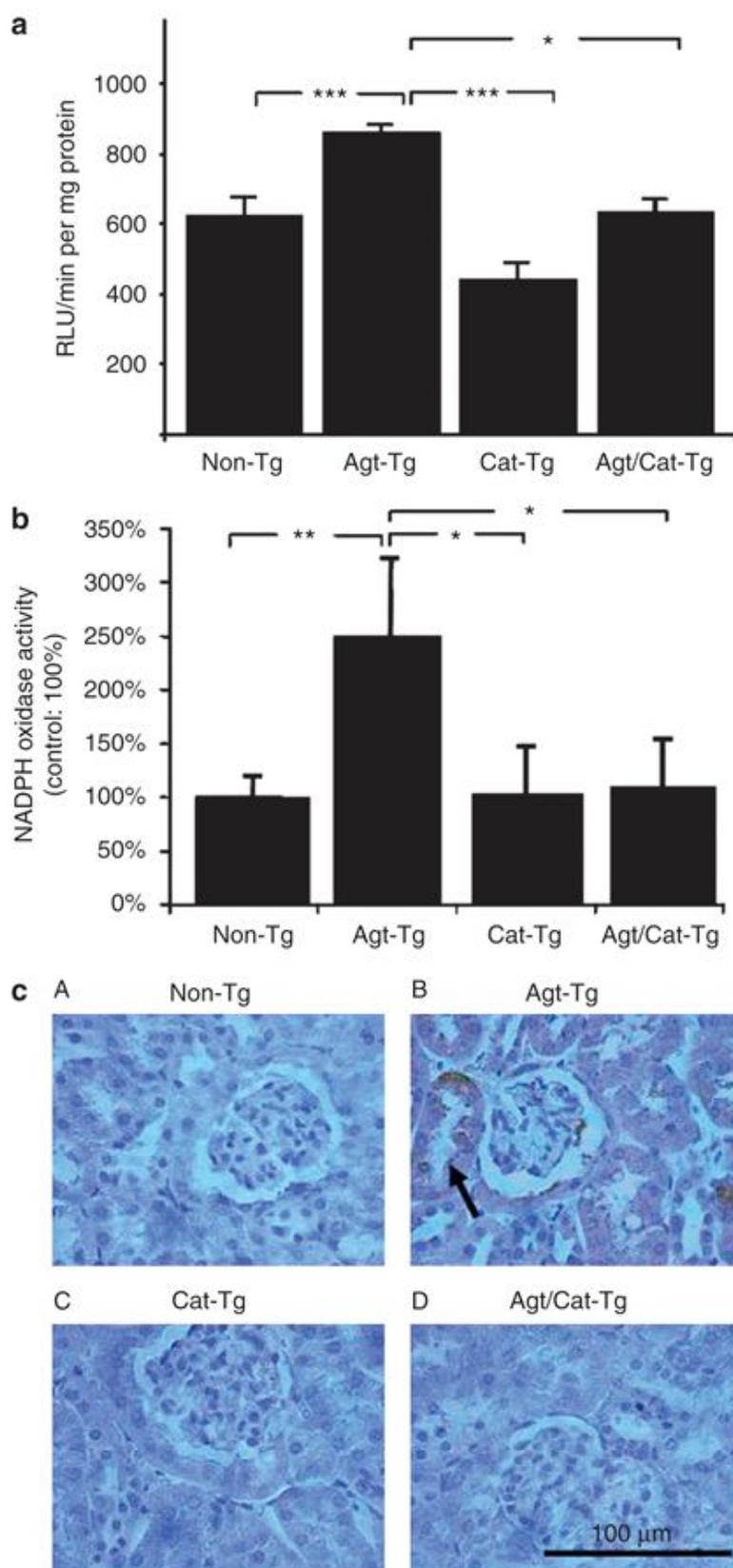


Figure 5

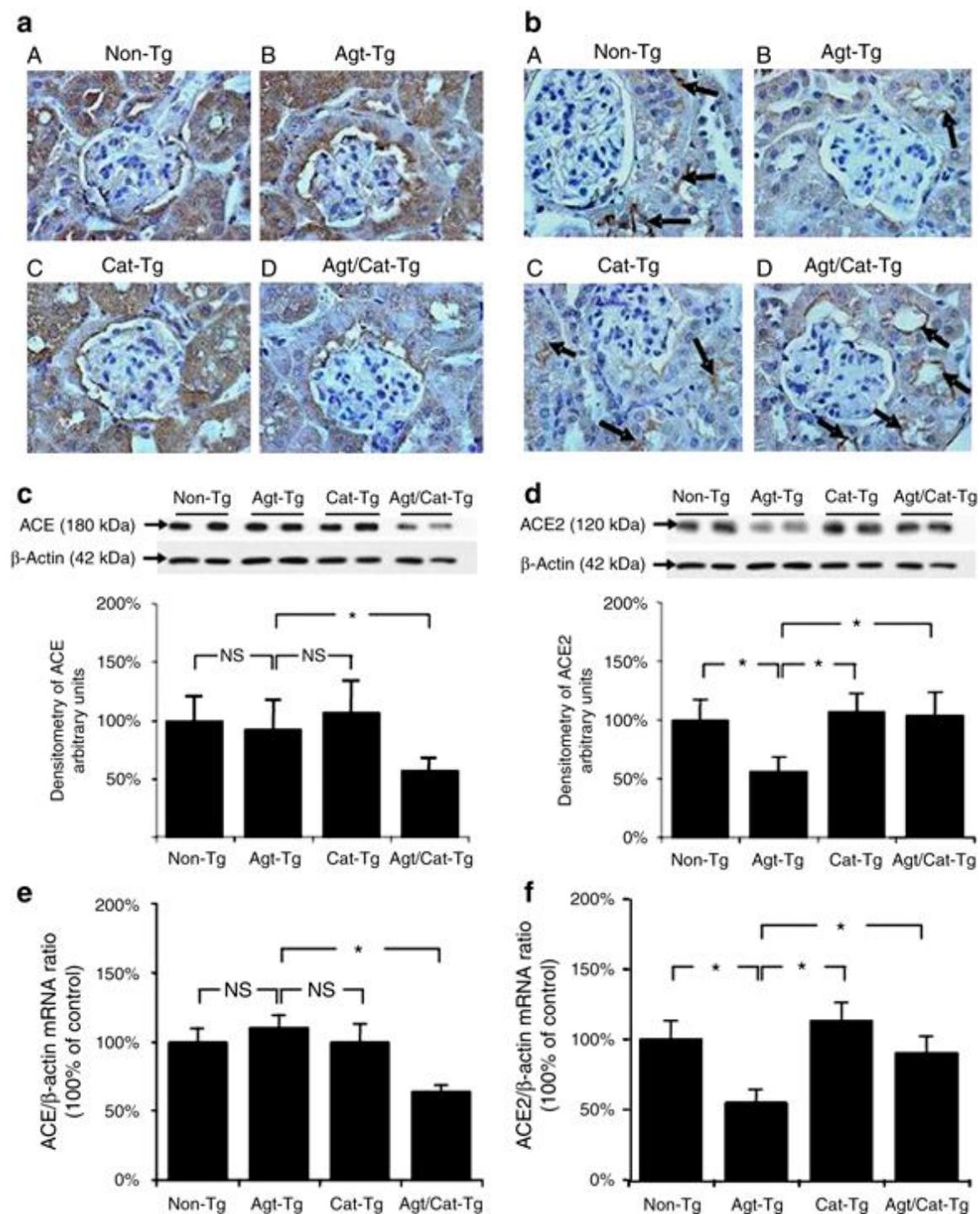


Figure 6

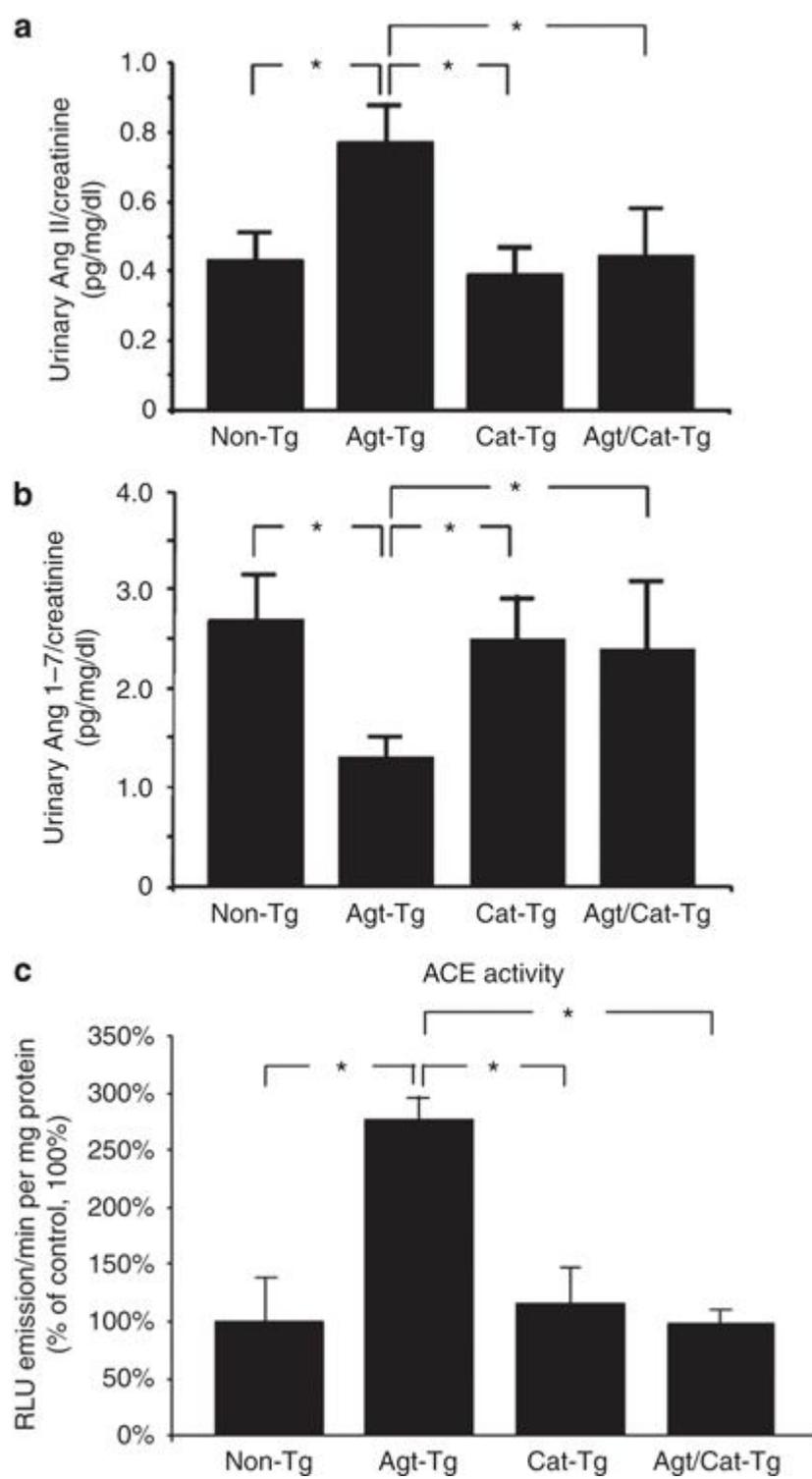


Figure 7

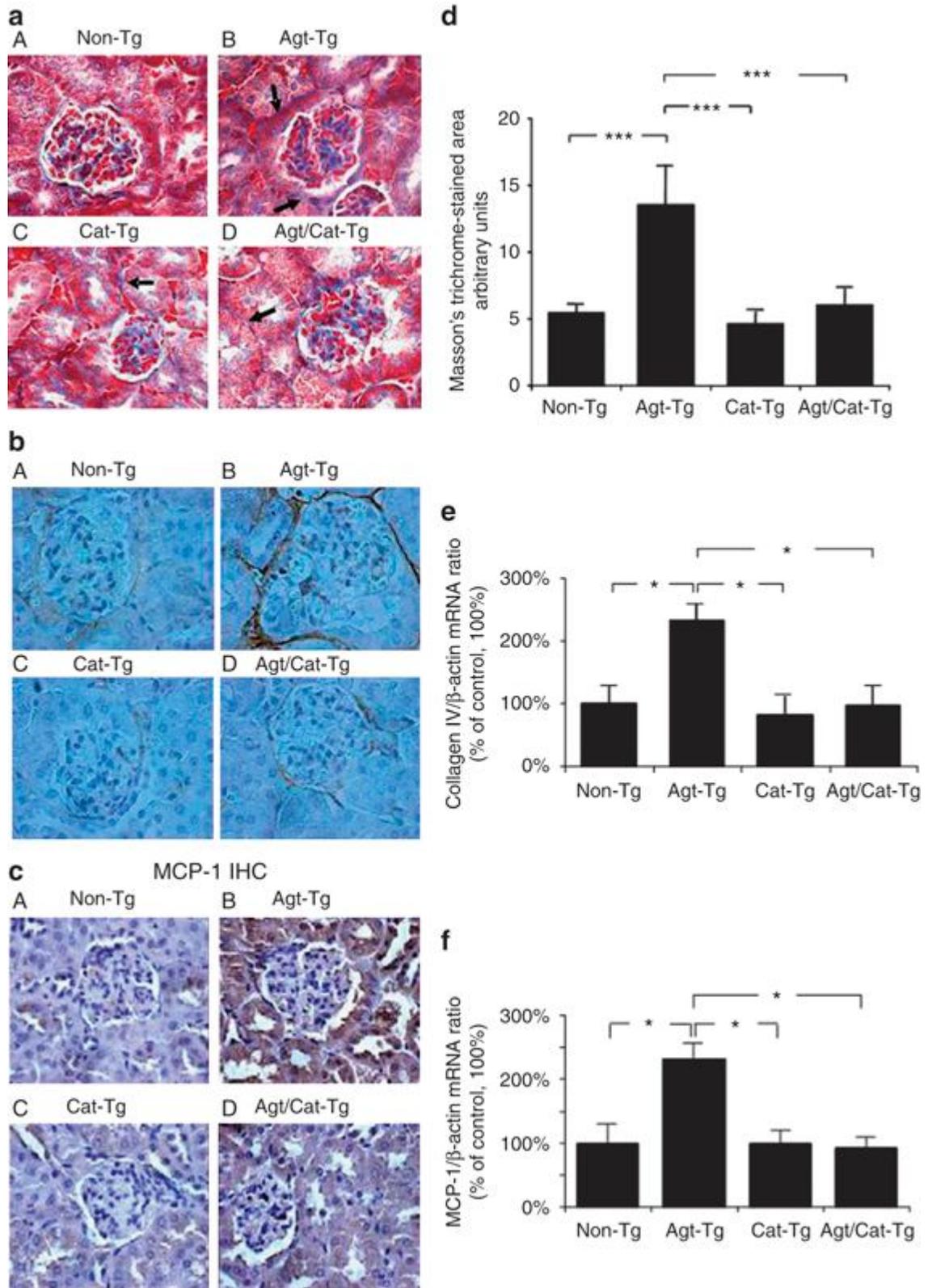


Figure 8

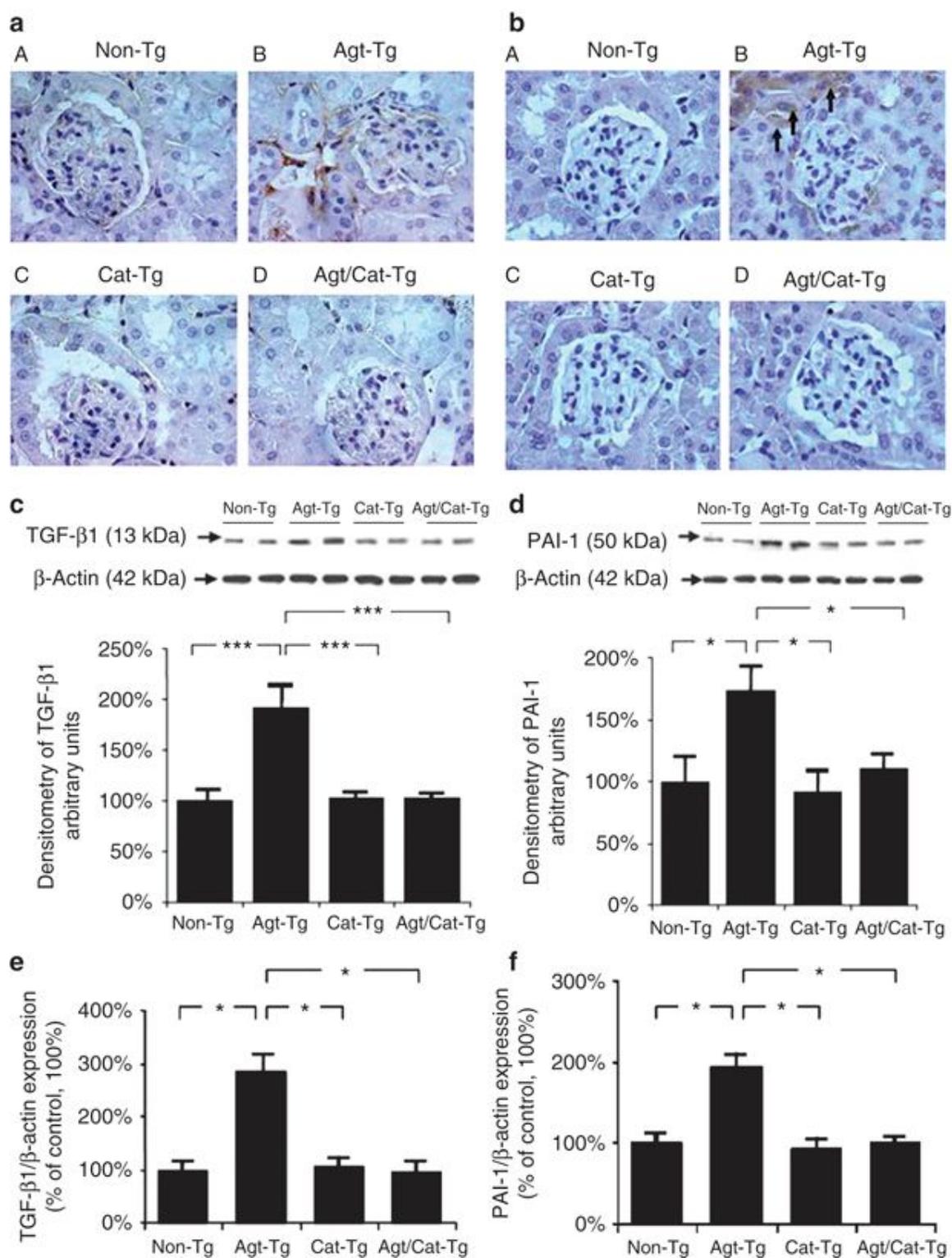
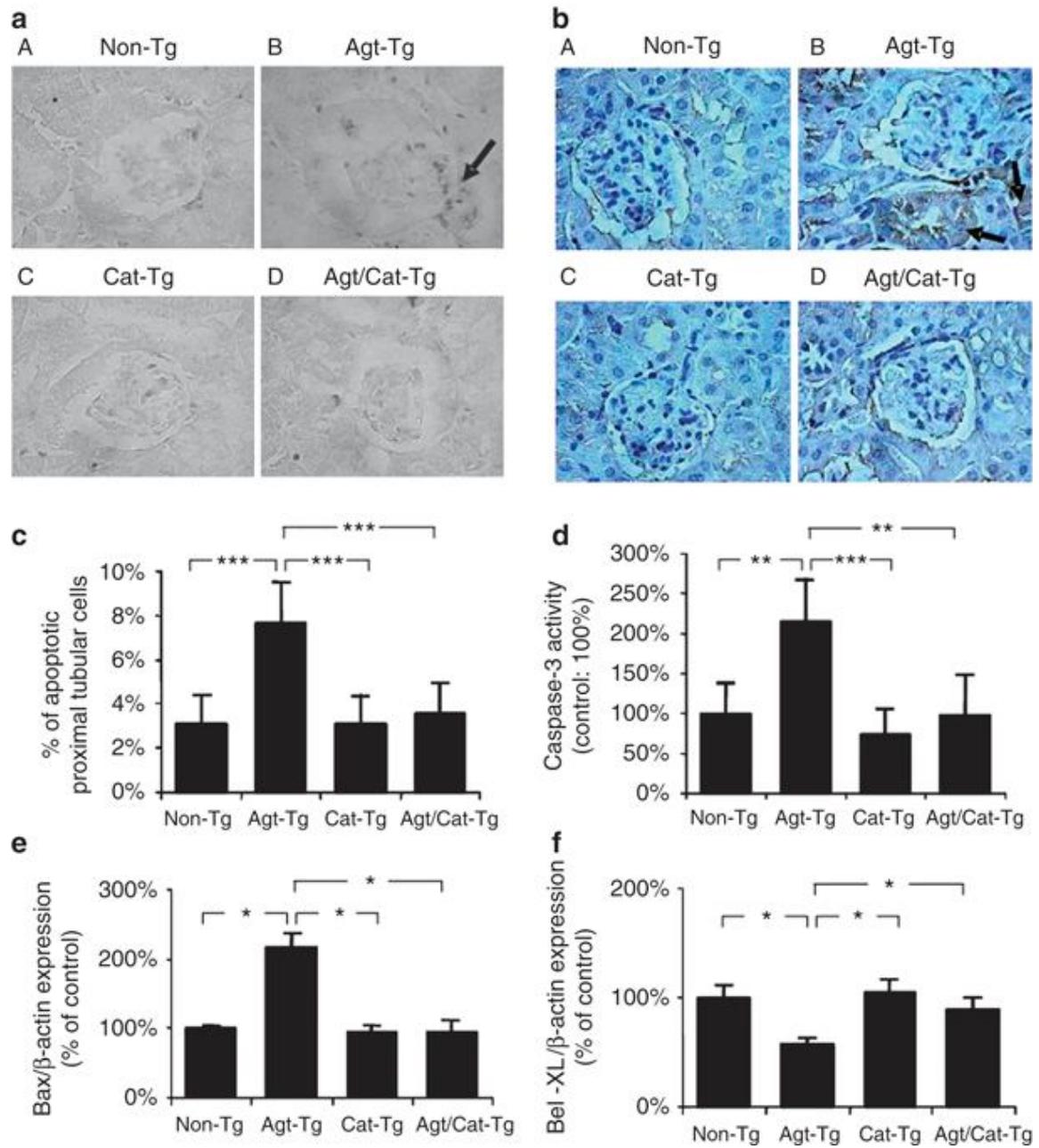


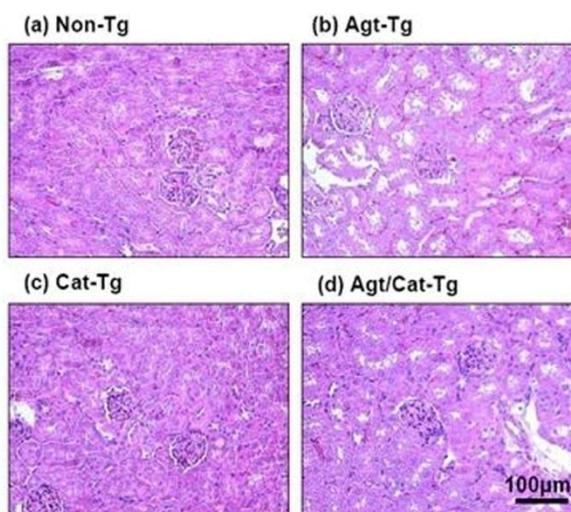
Figure 9



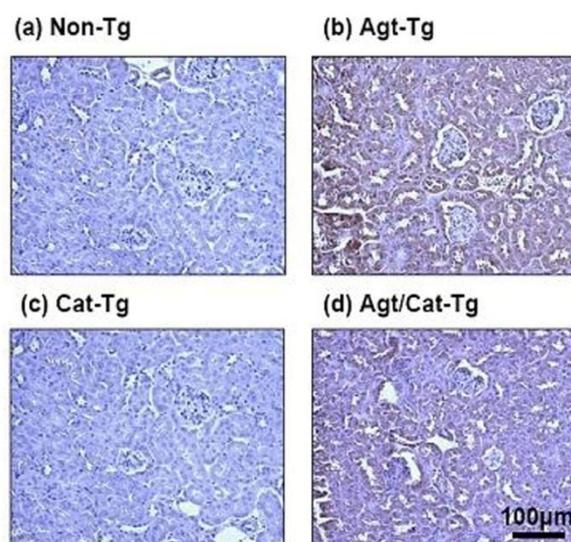
Figures supplémentaires

Supplemental Figures

A. H/E Staining (x200)



B. Agt-immunostaining (x200)



Chapitre 4 - Discussion

4.1 Les tubules proximaux et leur rôle dans les dommages rénaux

La progression de la néphropathie diabétique s'accompagne de nombreux changements pathophysiologiques complexes, tels que la diminution du taux de filtration glomérulaire et l'albuminurie [441, 450, 451]. Alors que les principales recherches à ce sujet ont porté sur les dommages glomérulaires accompagnant sa progression, différentes études permettent d'impliquer les tubules proximaux dans ces processus, et même de supporter l'hypothèse que les changements précoces dans ces structures tels que la fibrose interstitielle, l'apoptose cellulaire et l'atrophie tubulaire sont impliqués dans le développement et la progression des cas de néphropathie diabétique chez les humains [452].

Dans notre laboratoire, une des premières études effectuée pour mieux comprendre ce phénomène relié aux tubules proximaux a été publiée par Hsieh et al. en 2002. Cette étude a en effet permis d'associer une hausse du taux de glucose présent dans le milieu extracellulaire avec les espèces réactives oxygénées (ROS) générées dans les cellules de tubules proximaux rénaux (IRPTCs). Dans cette publication, notre laboratoire a établi un lien clair entre la surexpression de l'angiotensinogène reliée à un haut taux de glucose via la génération de ROS et l'activation subséquent de facteurs reliés au stress par la phosphorylation des p38 MAP kinases, correspondant à ce que d'autres groupe avaient précédemment rapporté sur différents modèles [453, 454]. On estimait alors possible que cette voie métabolique soit reliée à l'activation des protéines kinases C (PKC), comme par Kreisberg et al. l'avaient précédemment rapporté sur des cellules mésangiales rénales [455].

Ainsi, les expériences de notre laboratoire ont à ce moment permis d'établir un lien entre le niveau de glucose, l'activation du système rénine-angiotensine (RAS) et l'activation de p38MAPK. Or, comme la surexpression de l'angiotensinogène a été réduite par la présence d'agents antioxydants et d'inhibiteurs de l'oxydation mitochondriale, cela a permis d'établir l'hypothèse que cette hausse des ROS pourrait être reliée à la médiation d'autres voies biologiques affectant la physiologie des tubules proximaux et des autres unités rénales. Les ROS devenaient ainsi une cible potentielle dans le traitement de la néphropathie diabétique, et ce pour leur atténuation de plusieurs facteurs reliés à cette maladie.

Cette première étude fut ensuite complémentée par une autre publication qui mît en évidence le lien entre la résistance à l'insuline observée dans les cellules IRPTCs, l'activation du système RAS et la génération de ROS [432].

Dans cette nouvelle étude, il fût ainsi démontré qu'une concentration élevée de glucose ou la présence d'angiotensine II (AngII) parvenaient à limiter les effets inhibiteurs de l'insuline sur l'activation du système RAS, représentée par une surexpression d'angiotensinogène par les cellules, ce qui avait auparavant été démontré par d'autres groupes sur différentes lignées cellulaires, et particulièrement dans les muscles lisses [456, 457]. Or, cette activation du RAS dans les IRPTCs est sans doute reliée à l'hypertrophie et la surexpression de protéines de la matrice cellulaire, ce qui peut être cliniquement relié au développement de fibrose tubulo-interstitielle, comme rapporté précédemment par différents groupes [458, 459].

Puisque l'utilisation d'agents antioxydants et de bloqueurs pharmacologiques pour les récepteurs de l'angiotensine II de type 1 (AT₁R) est parvenu à renverser ces effets, cela a suggéré que les ROS et le système RAS font partie des médiateurs qui contribuent à la résistance à l'insuline à travers la surexpression d'angiotensinogène, entraînant l'activation du système RAS qui contribue au développement de pathologies rénales. Cela démontra aussi le rôle potentiel des agents antioxydants afin de réduire la diminution de sensibilité à l'insuline qui caractérise les dommages rénaux reliés au diabète.

Néanmoins, une des observations contradictoires de cette étude est reliée au fait que des hautes concentrations de glucose ou la présence d'insuline ne sont pas parvenues à réguler l'expression de l'angiotensinogène dans un modèle de cellules prétraitées avec de l'angiotensine II. Il est donc possible qu'une exposition continue à ce peptide causerait à long terme une diminution des signaux de régulation reliés aux PKC comme l'avait déjà observé un autre groupe [460], ce qui empêcherait les signaux moléculaires reliés au glucose ou à l'insuline de réguler les taux d'expression de l'angiotensinogène.

4.2 Modèle transgéniques de surexpression du système RAS

4.2.1 Caractérisation du modèle

Un modèle de souris transgéniques surexprimant l'angiotensinogène dans les tubules proximaux fût généré dans notre laboratoire [267] afin de mieux caractériser les effets du système RAS local sur les fonctions physiologiques d'un modèle *in vivo*. Ce transgène est propulsé grâce à l'utilisation du promoteur KAP, spécifique aux tubules proximaux et dépendant des hormones androgènes [338, 339, 461]. La génération de ce modèle avait comme objectif de répondre à une question non encore résolue par d'autres groupes utilisant des modèles transgéniques [338, 339, 461-463], à savoir si la simple activation du système rénine-angiotensine intrarénal est en mesure de provoquer de l'hypertension et des dommages rénaux, ainsi que de savoir si le

blochage du système RAS par différents agents pharmacologiques est en mesure d'atténuer ces effets.

Ainsi, la première caractérisation de ce modèle permit de déterminer que la surexpression d'angiotensinogène parvient à significativement augmenter la pression sanguine dans ce modèle ainsi qu'à induire de la microalbuminurie, deux marqueurs clés de la néphropathie induite par le diabète ou l'hypertension [464, 465]. De plus, des traitements avec des inhibiteurs de ACE et des bloqueurs du récepteur pour Ang II sont parvenus à renverser la hausse de la pression sanguine et la microalbuminurie, ce qui permet de suggérer l'existence d'un lien entre l'activation du système RAS intrarénal et ces phénomènes pathophysiologiques.

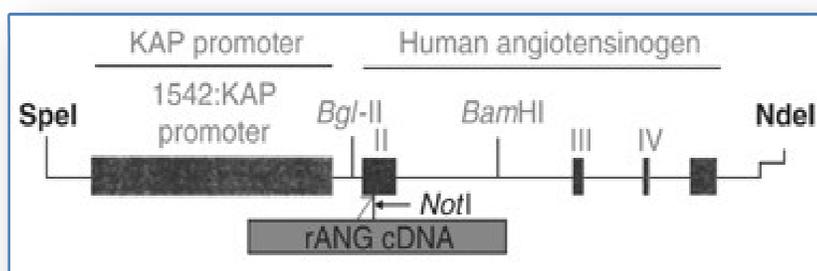


Figure 4-1. Le promoteur KAP utilisé pour propulser les transgènes utilisés dans notre laboratoire.

Une hypothèse énoncée dans cette publication pour expliquer ce phénomène est que l'angiotensinogène surexprimée dans les tubules proximaux soit convertie en Ang II dans le lumen tubulaire ou dans les tubules distaux, puisque ceux-ci expriment aussi la rénine [343]. Ainsi, l'Ang II affecterait la pression sanguine à travers la stimulation des échangeurs Sodium/Hydrogène des tubules proximaux et par les canaux sodiques présents dans les tubules collecteurs [466-468], ce qui stimulerait la réabsorption du sodium par les tubules proximaux. Bien que cela reste encore une hypothèse, la détermination de la concentration de sodium et de potassium urinaire effectuée dans le cadre de cette thèse semble démontrer une hausse de la réabsorption de sodium dans les tubules proximaux de souris surexprimant l'angiotensinogène, et ce de façon indépendante du niveau de potassium urinaire (Annexe 5.2). De plus, il a été présumé que l'Ang II pourrait induire l'expression de TGF- β 1 suite à la stimulation du récepteur AT $_1$ R, ce qui pourrait causer des dommages rénaux via l'hypertrophie cellulaire [433, 434]. Cette observation permettrait ainsi de relier le rôle primordial de réabsorption des tubules proximaux avec les pathophysiologies fibrotiques et inflammatoires induites par le TGF- β 1 [469].

Ainsi, des études ont été effectuées dans notre laboratoire au sujet des effets que TGF- β pourrait exercer sur l'expression de l'angiotensinogène dans les tubules proximaux [449]. Les résultats obtenus au cours de ces expériences ont démontré que le TGF- β 1 avait un effet dose-dépendant sur l'expression de l'angiotensinogène dans un modèle *in vitro* de cellules de tubules proximaux. De plus, il a été démontré que la présence de cette protéine pro-inflammatoire augmentait la génération de ROS, phénomène qui fut diminué par la présence d'agents antioxydants tel que le DPI et Tiron, ainsi que par l'utilisation d'inhibiteurs de ACE ou de bloqueurs pour le récepteur AT₁R.

Aussi, il fut observé que la surexpression d'un transgène TGF- β 1 dans ce modèle de tubules proximaux entraînait l'augmentation de l'expression des facteurs pro-fibrotiques PAI-1 et du gène pro-apoptotique p53. Cela permet ainsi de démontrer que les effets de TGF- β 1 dans les tubules proximaux impliquent la génération de ROS par les NADPH oxydases, ainsi que l'activation de p38 MAPK et de p53 [470]. Cette augmentation de l'expression du gène pro-apoptotique p53, par sa liaison sur des facteurs de transcriptions de l'angiotensinogène, va aussi sans doute augmenter la génération de l'angiotensinogène et l'activation du système RAS, ce qui entrainera la formation d'un cercle d'autorégulation qui résultera par l'apparition de pathologies rénales suite à une généralisation de l'induction de l'apoptose. Cette observation correspond avec une publication basée sur des tubules proximaux qui a permis d'observer un lien dose-dépendant d'activation directe entre l'expression de l'angiotensine II et l'activation du promoteur du gène PAI-1 via l'activation du récepteur AT₁R et les tyrosines kinases [471].

4.2.2 Effet du RAS sur l'apoptose

Suivant ces observations, notre laboratoire a cherché à déterminer comment la régulation du système RAS est impliquée dans la progression de la néphropathie diabétique, et plus particulièrement les mécanismes de régulation reliés au développement de l'hypertension, de l'albuminurie et des dommages rénaux. Pour ce faire, le modèle de souris surexprimant l'angiotensinogène dans les tubules proximaux a été utilisé pour une étude sur l'apoptose induite par des injections de STZ dans ce modèle, ce qui entrainera le diabète suite à la mort des cellules bêta du pancréas [472].

Il a été observé que les injections de STZ chez les animaux transgéniques ont causé une augmentation de différents marqueurs apoptotiques tels que le ratio de Bax pour Bcl-XL, la caspase-3 et le marquage par TUNEL. Les traitements avec de l'insuline ou des bloqueurs du système RAS sont parvenus à renverser cette augmentation de l'apoptose. Il faut cependant noter que les injections de STZ et les traitements avec insuline n'ont pas eu d'effets significatifs sur l'augmentation de la pression sanguine chez les souris transgéniques, alors que les

traitements avec des bloqueurs du système RAS n'ont pas eu d'effet sur l'augmentation du taux de glucose sanguin induit par le STZ.

Une série d'observations intéressantes ont aussi été effectuées dans le cadre de cette étude à l'aide de traitements par l'agent antihypertenseur hydralazine (qui agit en entravant l'action d'IP₃ dans le relâchement du calcium intracellulaire), dans le but de déterminer si les effets de l'augmentation du système RAS étaient principalement dus à l'augmentation de la pression sanguine. Or, bien que l'hydralazine soit parvenue à normaliser la pression sanguine des souris transgéniques, cela n'a pas eu d'effets sur l'albuminurie, l'apoptose des tubules proximaux et l'expression des marqueurs de l'apoptose dans le rein. Ainsi, cela démontre que les effets de l'augmentation de l'expression du système RAS intrarénal sur la pathophysiologie rénale ne sont pas uniquement reliés à l'augmentation de la pression sanguine systémique.

Cela indique donc qu'un mécanisme extérieur relie la hausse du système RAS et les effets pro-apoptotiques observés dans les tubules proximaux. Il est présumé que ce système agisse à travers la hausse des ROS que cause une hausse du taux de glucose et de l'angiotensine II, ce qui activerait les p38 MAPK et stimulerait la phosphorylation du gène pro-apoptotique p53 [473, 474]. À partir de là, il est probable que les différents signaux apoptotiques seront activés, ce qui mènera à l'apoptose des tubules proximaux et possiblement à l'atrophie tubulaire observée dans les cas de néphropathie diabétique [414, 475].

4.2.3 Les effets du blocage des NADPH oxydases par l'apocynine

Ainsi, une étude a été effectuée dans notre laboratoire afin de mieux caractériser le rôle que jouent les ROS dans les mécanismes reliés à la surexpression d'angiotensine II dans les tubules proximaux, en particulier les ROS générés par les NADPH oxydases. Pour cela, des souris surexprimant l'angiotensinogène dans les tubules proximaux furent traitées par différents agents pharmacologiques, soit l'apocynine (utilisé comme inhibiteur de NADPH oxydases), le périmopril (inhibiteur de l'enzyme ACE) et l'hydralazine [476]. Il fut observé que les traitements avec l'apocynine sont parvenus à prévenir l'apoptose des cellules de tubules proximaux ainsi que l'albuminurie dans les souris transgéniques, et ce même si la pression sanguine est restée inchangée par ces traitements. Cette observation, lorsque reliée avec les données indiquant une augmentation significative des ROS dans les tubules proximaux de différents modèles animaux [432] et humains [477, 478], semble confirmer la relation entre l'angiotensine II intrarénale et la production de ROS.

Néanmoins, les résultats obtenus durant ces expériences entrent en contradiction avec ce qu'ont rapporté d'autres études, soit que l'apocynine parvienne à réduire l'augmentation de la pression sanguine observée dans différents modèles de l'hypertension, que ce soit les rats Dahl hypertendus sensibles au sel [479], des rats hypertendus par aldostérone [480] ainsi que des rats hypertendus par angiotensine II [481]. Une explication pour cette observation serait que l'activation du système RAS intrarénal affecte directement la pression sanguine par vasoconstriction des artérioles rénales due à la liaison de l'angiotensine II aux récepteurs AT₁R.

Une autre explication impliquerait le rôle exact que joue l'apocynine dans la régulation des NADPH oxydases. En effet, bien que différentes études aient rapportés que l'apocynine soit en mesure de bloquer l'effet des NADPH oxydases [482], une autre étude a rapporté que ce composé ne soit pas en mesure d'agir sur les cellules de muscles lisses des artérioles rénales étant donné le manque de myéloperoxydases nécessaires à la conversion de l'apocynine en sa forme active [483]. Par contre, les cellules de tubules proximaux seraient en mesure d'effectuer cette conversion, ce qui expliquerait la capacité de cet agent à prévenir l'apoptose des tubules proximaux ainsi que les effets pathophysiologiques qui en découlent [484]. La capacité de l'hydralazine à réduire la pression sanguine sans pour autant affecter la pathophysiologie renforce aussi cette théorie.

Il est évident que les ROS ont un important rôle dans la médiation des effets causés par la surexpression d'angiotensinogène, et ceux-ci semblent être impliqués dans l'albuminurie, la fibrose interstitielle et l'apoptose des tubules proximaux. Ces effets observés dans les tubules proximaux semblent être indépendants de la pression sanguine systémique. Les NADPH oxydases semblent ainsi être une cible de choix pour le traitement des anomalies liées à la néphropathie diabétique ainsi qu'à l'apoptose et l'atrophie tubulaire.

4.3 Modèles transgéniques reliés à la surexpression de catalase

4.3.1 Modèle de diabète de type 1 : Injections avec STZ

C'est dans le but d'élucider le rôle des ROS dans les dommages rénaux que notre laboratoire a envisagé le développement d'un modèle *in vivo* de souris surexprimant la protéine antioxydante catalase (Cat) de façon spécifique dans les tubules proximaux grâce au promoteur KAP [267]. La catalase exerce son activité antioxydante par la conversion de peroxyde d'hydrogène en eau, ce qui entraînera une forte diminution des molécules oxydées [485]. La première utilisation de ce modèle animal dans notre laboratoire a été effectuée conjointement avec des injections de STZ sur ces animaux, cela dans le but de mieux définir les mécanismes reliant la génération des ROS induits par le diabète avec les différents événements observés dans cette pathologie, tels que

l'activation du système RAS et l'expression de gènes apoptotiques [388, 390]. Il fût ainsi observé que la surexpression de catalase dans les tubules proximaux de ces souris transgéniques permettait de prévenir la génération de ROS, ainsi que la surexpression d'angiotensinogène et des gènes apoptotiques communément exprimés dans le diabète. Cette observation confirme ainsi le rôle central exercé par les ROS dans le développement précoce du diabète.

Les expériences *ex vivo* entreprises durant cette études ont aussi confirmés ces effets, mais aussi que l'addition dans le milieu de glucose ou d'angiotensine II n'a pas évoqué de stimulation de la génération de ROS. De plus, les niveaux d'expression de l'angiotensinogène ou de gènes pro-apoptotiques et pro-fibrotiques n'ont pas été significativement augmentés dans les tubules de ces souris transgéniques, contrairement à ce qui a été observé chez les contrôles. Prises dans leur ensemble, ces observations confirment l'importance de la génération de ROS dans le développement de dommages rénaux reliés au diabète, et démontrent le potentiel thérapeutique des agents antioxydants.

4.3.2 La souris db/db, un modèle de diabète de type 2

Étant donné les résultats précédemment obtenus dans un modèle de diabète de type 1 impliquant les ROS dans le développement de dommage rénaux tels que la fibrose interstitielle et l'apoptose des tubules proximaux, notre laboratoire a effectué un croisement entre un modèle de souris diabétique de type 2 (modèle db/db [249, 486]) et les souris surexprimant la catalase dans les tubules proximaux. Ainsi, les souris db/db ont démontré de l'hypertension, de l'albuminurie, de la fibrose tubulo-interstitielle, une surexpression de gènes pro-apoptotiques et une hausse de l'apoptose tubulaire, ce qui est en concordance avec les observations d'autres groupes [487]. De plus, les souris db/db démontraient une augmentation de la génération de ROS dans leurs tubules proximaux lorsque comparées aux contrôles, ce qui est une indication de la présence de stress oxydatif dans ce modèle. Or, la surexpression du gène de la catalase est parvenue à normaliser l'expression des ROS dans les souris db/db-Cat.

En plus des effets sur la normalisation des ROS, la surexpression de la catalase dans le modèle diabétique est parvenue à atténuer les différentes pathophysiologies présentes dans les souris db/db, incluant l'hypertension. Cette dernière observation peut sembler curieuse, mais elle concorde avec les données d'expression de l'angiotensinogène, qui tendent à indiquer que les souris db/db démontrent une augmentation de ce gène qui est normalisée par l'action de la catalase. Ainsi, les résultats obtenus signifient clairement que la génération de ROS joue un rôle central dans l'établissement des conditions qui entraînent le développement de maladies rénales suite à l'hypertension, possiblement à travers la stimulation du système RAS intrarénal présent dans les tubules proximaux [488] et qui aura de nombreuses conséquences

physiologiques sur différents systèmes tels que la génération de TGF- β 1 ou l'expression de gènes pro-fibrotiques [466, 489].

Une des observations ayant un attrait clinique important dans cette étude est reliée à la diminution de l'albuminurie observée dans les souris transgéniques pour la catalase. En effet, cela offre un intérêt marqué puisqu'il est connu que les tubules proximaux des reins de patients diabétique démontrent des signes d'apoptose lorsqu'il y a présence d'albuminurie [420, 490]. De plus, différentes études ont démontré que la présence d'atrophie tubulaire rénale pourrait être un meilleur marqueur de progression des maladies rénales que les pathologies glomérulaires [414, 441, 491]. Ces différents résultats tendent à démontrer que l'apoptose des tubules proximaux, régulée par la production de ROS, pourrait être une des sources initiales des dommages rénaux qui entraîneront une progression vers l'insuffisance rénale. Et bien qu'il ne soit pas possible à ce moment d'identifier avec précision la cause de la formation des ROS, la plupart des études effectuées dans notre laboratoire et par d'autres groupes identifient les ROS dérivés des mitochondries, ainsi que la production reliée aux NADPH oxydases [432, 492-494].

4.4 Le modèle double transgénique caractérisé

Une des principales études effectuée dans le cadre de cette thèse constituait dans la caractérisation d'un modèle de souris transgéniques surexprimant à la fois l'angiotensinogène et la catalase dans les tubules proximaux [495]. Ce modèle permettait ainsi de comprendre d'une meilleure manière que par des traitements pharmacologiques et de façon plus poussée le rôle que jouent les ROS dans le développement des pathophysiologies rénales reliées à la surexpression du système RAS. Tout comme les modèles précédemment utilisés dans le cadre des études de surexpression dans notre laboratoire, les souris double transgénique Agt/Cat-Tg ne semblent pas démontrer de changement dans leur poids rénal, total ou du cœur.

Or, en contraste avec les résultats de l'étude sur les souris transgéniques traitées avec apocynine [476], nous avons déterminé que la surexpression de l'enzyme antioxydante catalase a permis de normaliser les différentes pathophysiologies rénales remarquées dans les souris transgéniques Agt-Tg, incluant la hausse de la pression sanguine.

Une explication pour cette observation est sans doute reliée à la diminution totale des ROS qui a été observée dans ce modèle et qui, contrairement à ce qui a été fait avec l'apocynine, permettait une action globale sur tous les ROS, qu'ils soient générés par l'action de NADPH oxydases ou non, et cela sans qu'il n'y ait besoin d'une enzyme pour activer l'apocynine, tel que décrit précédemment. Ainsi, les résultats obtenus durant cette étude démontrent bien que les

ROS jouent un rôle central dans le développement de nombreuses pathologies rénales reliées à l'activation du système RAS, et ce peu importe leur origine.

Il a aussi été intéressant de constater que la surexpression de la catalase dans le modèle Agt-Tg a eu des effets sur l'expression de gènes du système RAS. Par exemple, il a été démontré que le gène ACE2 est sous-exprimé dans les souris surexprimant l'angiotensinogène dans les tubules proximaux, mais que les souris doubles transgéniques avaient des niveaux d'expression de ce gène équivalents à ceux observés chez les souris contrôles. Ce résultat semble ainsi concorder avec les résultats d'autres groupes qui ont remarqué un débalancement de l'expression des différentes protéines enzymatiques du système RAS dans une variété de pathologies rénales [496-499], ce qui laisse présumer que le contrôle de l'expression du gène ACE2 a un rôle à jouer dans l'établissement de maladies rénales.

De plus, les données complémentaires obtenues par analyse ELISA ont permis de confirmer une variation du niveau des peptides urinaires reliés au système RAS et générés dans les tubules rénaux. Par exemple, alors que les souris transgéniques Agt-Tg ont démontré une augmentation des niveaux d'AngII urinaire, les niveaux d'Ang-(1-7) étaient significativement moins élevés dans les souris Agt-Tg. Ces niveaux de peptides urinaires ont été rétablis dans les souris Agt/Cat-Tg, ce qui laisse croire, suite à l'analyse du niveau d'activité de l'enzyme ACE, que l'angiotensine II agit en stimulant l'activité de ACE à travers la génération de ROS. Cela semble aussi indiquer que les niveaux relatifs d'expression de AngII et Ang-(1-7) jouent un rôle important dans le développement de l'hypertension, comme le laisse croire la littérature [497, 500]. Ces analyses génétiques et protéiques des niveaux d'expression de ACE et ACE2 ont en effet été l'objet de travaux antérieurs, notamment par une publication de Ferrario et al. [501], qui a déterminé que le blocage du système RAS augmente l'activité de ACE2 et les niveaux de Ang-(1-7) excrétés dans l'urine de rats contrôles.

La détermination du taux de sodium et potassium urinaire a aussi permis de démontrer, par l'observation d'une diminution de la concentration de sodium urinaire, qu'il est probable qu'il se produise une augmentation de la réabsorption de sodium dans les souris Agt-Tg (voir annexe 5.2). Les niveaux de potassium urinaires sont restés constants. Cela semble démontrer que les peptides AngII agissent en stimulant la réabsorption de sodium à travers les canaux sodiques tels que les échangeurs sodium/potassium et le canal NHE3 qui se retrouvent dans les tubules proximaux [466, 502]. De plus, il est possible que la hausse des ROS induite par l'AngII soit en mesure de stimuler l'expression des récepteurs AT₁R, ce qui entraînerait une augmentation de la réabsorption de sodium par l'augmentation de l'activation des ATPases sodium/potassium.

Ainsi, une des cibles d'intérêt que l'on puisse envisager pour de futures études serait basée sur l'analyse des canaux sodiques dont l'expression est différemment régulée par l'angiotensine II. Pour ce faire, il est envisagé d'utiliser une approche de micro-puces d'expression afin de déterminer les meilleurs marqueurs potentiels modulés dans les souris transgéniques mais réduits par la surexpression de catalase.

4.5 L'utilisation des micro-puces pour l'évaluation de pathologies rénales

Différents articles discutent de l'utilisation de micro-puces pour l'évaluation des fonctions rénales, notamment chez l'humain [503, 504]. Depuis de nombreuses années, des discussions se sont aussi portées sur l'utilité que pourraient jouer ces techniques dans le diagnostic clinique de pathologies rénales [505]. Alors que différents articles ont porté sur le profilage complet par micro-puce de modèles de néphropathie diabétique, la majorité d'entre eux ont porté sur les changements génétiques reliés au glomérule [506, 507]. Notre approche, plus spécifique aux tubules proximaux, est dans ce sens originale, particulièrement lorsque combinée avec nos modèles d'animaux transgéniques.

Une partie des travaux effectués dans notre laboratoire ont été accomplis grâce à l'analyse de micro-puces de tubules proximaux de reins de souris db/db. Des travaux antérieurs effectués par Mishra et al. sur ce modèle avaient surtout identifié les voies métaboliques reliées au PPAR α durant leurs analyses [169]. Or, notre groupe est parvenu à déterminer d'autres voies métaboliques régulées telles que l'apoptose ou le transport sodique, sans doute par une plus grande spécificité des tissus obtenus et par le fait que nos animaux ont été sacrifiés à 20 semaines, alors que la présence de pathologies rénales plus avancées est remarquée.

4.5.1 Stratégie de micro-puces adoptée dans notre laboratoire

Un des avantages marqués de nos expériences de micro-puce est ainsi la spécificité du type cellulaire utilisé. En effet, un des grands désavantages de nombreuses études qui utilisent l'ARNm de reins totaux est relié à la grande variabilité de types cellulaires que l'on retrouve dans cet organe. Or, le rein est constituée de différents types de cellules ayant un rôle spécifique, surtout lorsque l'on regarde les fonctions de réabsorption et de concentration urinaire qui peuvent même demander, en plus de la spécificité de l'expression de canaux spécifiques, la régulation des mouvements du côté apical et basal de la fusion membranaire protéique tel que le démontrent différents canaux comme les aquaporines 2 et 3.

Or, lorsque l'ARNm de reins totaux sera appliqué sur les micro-puces, il est évident que le signal généré par tous ces types cellulaires risque d'être passablement « dilué » dans un océan de gènes exprimés à divers niveaux d'expression dans différents types cellulaires, en plus de la disparité entre le nombre de cellules de chaque type. De plus, les pathologies rénales souvent observées dans différents modèles de maladies rénales comprennent bien souvent des infiltrations de cellules du système immunitaire (macrophage et monocytes), dont l'expression très élevée de gène pro-fibrotique et pro-inflammatoire risque de déstabiliser l'analyse du modèle d'expression étudié. Il en résulte donc un fort risque de retrouver des gènes qui, malgré leur réelle différence d'expression dans les micro-puces, ne soient pas du tout reliés aux pathologies rénales étudiées mais bien à différents facteurs tels que le poids ou la taille des organes prélevés, l'apoptose plus rapide de certains types cellulaires dépendamment des temps d'extraction des échantillons, d'une réaction immunitaire plus élevée dans certains animaux ou des infiltrations cellulaires.

L'isolation d'un type cellulaire spécifique ne peut garantir que les échantillons utilisés seront parfaitement purs, mais la collecte des échantillons par du personnel compétent et au même moment pour tous les groupes, ainsi que l'utilisation des mêmes réactifs pour leur stockage et leur préparation minimise les différences reliées aux manipulations techniques. De plus, l'isolation d'un type cellulaire spécifique minimise les différences d'expression reliées à une différence dans la proportion de différents types cellulaires prélevés.

Ainsi, en collectant spécifiquement les tubules proximaux lors de nos études d'expression, nous nous assurons d'avoir minimisé le plus grand nombre de facteurs pouvant résulter en de coûteuses fausses pistes de recherche afin de nous concentrer sur des marqueurs potentiels de qualité.

4.5.2 Résultats des micro-puces sur les souris db/db

Suite à l'analyse des micro-puces à ADN du modèle des souris db/db et comparaison avec les souris transgéniques db/db-Cat surexprimant la catalase dans leur tubules proximaux, il a été possible de classifier les différents transcrits différemment exprimés en différents groupes selon les voies métaboliques dont ils font partie (voir tableau 4-1 comme exemple).

Cela s'est effectué par une analyse de l'annotation des gènes par l'outil Gene Ontology (www.geneontology.org), permettant de relier les différents gènes analysés à leurs voies métaboliques spécifiques. Notre groupe s'est principalement intéressé aux voies métaboliques reliées à l'apoptose pour ces premières études.

Tableau 4-1. Gènes impliqués dans le transport sodique régulés dans les souris db/db vs contrôles et db/db-Cat-Tg.

ID	Symbol	Avg Exp	Gene Title	db-WT	p.db-WT	db-db/Cat	p.db-db/Cat
1446552_at	Slc12a3	4.3	solute carrier family 12, member 3	1.84	0.02	1.73	0.02
1451674_at	Slc12a5	2.7	solute carrier family 12, member 5	1.30	0.00	1.24	0.00
1416854_at	Slc34a2	3.8	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2	0.69	0.01	0.38	0.05
1421390_at	Slc12a1	3.7	solute carrier family 12, member 1	0.53	0.01	0.58	0.01
1418257_at	Slc12a7	8.7	solute carrier family 12, member 7	-0.54	0.04	-1.06	0.01
1417116_at	Slc6a8	10.6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8	-0.60	0.03	-0.79	0.01
1426432_a_at	Slc4a4	13.0	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 4	-0.67	0.04	-0.77	0.03
1417639_at	Slc22a4	7.8	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4	-0.80	0.03	-0.82	0.03
1419166_at	Slc5a2	12.4	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 2	-0.95	0.00	-0.81	0.00
1452071_at	Slc4a4	12.5	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 4	-1.07	0.03	-1.64	0.01
1437755_at	Slc5a12	12.2	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 12	-1.08	0.01	-2.04	0.00
1448596_at	Slc6a8	9.0	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8	-1.08	0.03	-1.21	0.02
1417280_at	Slc17a1	12.4	solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 1	-1.33	0.01	-1.37	0.01
1434096_at	Slc4a4	12.5	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 4	-1.54	0.02	-1.96	0.01
1450404_at	Slc23a1	5.9	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 1	-1.71	0.05	-1.83	0.04
1439494_at	Slc5a9	5.5	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 9	-1.74	0.01	-1.09	0.03
1428752_at	Slc5a11	7.5	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	-1.90	0.02	-2.02	0.02
1425606_at	Slc5a8	8.8	solute carrier family 5 (iodide transporter), member 8	-2.16	0.04	-3.89	0.01
1439519_at	Slc34a3	9.5	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 3	-2.21	0.00	-1.67	0.00

4.5.3 Gène Bmf caractérisé dans cette étude

C'est suite à l'analyse de micro-puces d'expression génétique que notre laboratoire s'est intéressé au gène Bmf (*Bcl-2 modifying factor*), un gène pro-apoptotique qui, selon les analyses de micro-puces, semble différemment exprimé dans les tubules proximaux des souris db/db lorsque comparé aux souris contrôles et souris db/db-Cat-Tg transgéniques pour la surexpression de la catalase.

L'hypothèse de base autour de cette étude visait à rechercher des gènes possiblement impliqués dans l'atrophie tubulaire liée au diabète, puisque les mécanismes liés à sa progression ne sont pas encore complètement élucidés. Notre groupe est ainsi parvenu à confirmer la surexpression de Bmf dans les tubules proximaux des reins de souris diabétiques db/db par différentes analyses d'expression génétique et d'immunobuvardage. De plus, différentes expériences *in vitro* nous ont permis d'associer ce gène à l'apoptose des tubules proximaux, ainsi que de démontrer une relation directe entre le niveau de glucose extracellulaire et l'expression de Bmf via la génération de ROS. De plus, à l'aide d'expériences

par injections de STZ qui ont induit le diabète dans un modèle animal, il a été possible de relier cet autre modèle *in vivo* de diabète avec la surexpression de Bmf, confirmant une fois de plus la relation établie entre le taux de glucose et l'induction de Bmf.

Auparavant, un autre groupe avait réussi à démontrer *in vitro*, dans un modèle cellulaire du foie, qu'une surexpression du gène Bmf a été détectée suite à l'activation de TGF- β . Cela a eu comme conséquence d'augmenter l'activité des NADPH oxydases et de façon conséquente les taux de ROS [508]. De plus, le TGF- β , par sa liaison avec son récepteur, va causer l'activation et la dimérisation de Smad3/Smad4. Ce complexe va ensuite se localiser dans le noyau cellulaire, ce qui activera la transcription de gènes pro-apoptotiques tels que Bmf [435, 438].

Or, les souris diabétiques par injection de STZ et le modèle db/db présentent aussi une augmentation de TGF- β et de ROS. Ainsi, il est probable de penser que les actions pro-apoptotiques de ces facteurs puisse être régulée en partie à travers l'action de Bmf dans les tubules proximaux. Nos travaux semblent donc confirmer le mécanisme d'activation biochimique de Bmf qui avait d'abord été démontré dans un modèle de cellules cancérigènes et qui impliquait l'action de multiples protéines de type BH3 dans la médiation de l'apoptose [428].

Les recherches effectuées dans notre laboratoire sur les modèles surexprimant la catalase indiquent donc que l'élévation du taux de glucose induit l'apoptose via la génération de ROS. Les observations effectuées dans le cadre de nos expériences suggèrent un important rôle du gène dans la régulation de l'apoptose de cellules de tubules proximaux rénaux qui pourraient en faire une cible pharmacologique dans le but de prévenir les dommages liés à la néphropathie diabétique.

4.5.4 Caractérisation de la caspase-12

Un autre gène étudié dans le cadre de l'analyse de micro-puces de souris db/db comparées avec db/db-Cat-Tg est le gène pro-apoptotique de la caspase-12, dont la surexpression fut ensuite validée par PCR en temps réel et sur lequel notre groupe a effectué une publication [509].

Cette première étude se joint ainsi aux travaux effectués dans notre laboratoire par Liu et al. ayant pour but de mieux définir la relation entre le stress du réticulum endoplasmique et les complications rénales liées au diabète [510]. Par l'utilisation de rats diabétiques induits par injection de STZ, ceux-ci ont démontré une augmentation de l'expression de gènes pro-apoptotiques liés au stress du réticulum endoplasmique, soit CHOP, JNK et la caspase-12.

Nos expériences ont réussi à confirmer ces observations dans les souris db/db diabétiques lorsque comparées aux contrôles et aux souris db/db-Cat-Tg. L'expression de caspase-12 semblait ainsi correspondre à une augmentation de l'albuminurie observée *in vivo* dans les

souris db/db. Cette observation fut renforcée par l'utilisation de modèles *ex vivo* et *in vitro*, qui ont permis d'illustrer la relation entre l'albumine et l'augmentation de ROS dans les tubules proximaux. Ainsi, il semble que le rôle pro-apoptotique que pourrait jouer le gène caspase-12 soit relié à la génération de ROS, ce qui expliquerait pourquoi notre modèle transgénique surexprimant la catalase soit en mesure de réduire ses effets.

Une observation importante effectuée dans le cours de cette étude était reliée au fait que nous avons observé la présence d'une protéine de caspase-12 de pleine taille, malgré la présence d'un codon d'arrêt dans la séquence de ce gène. Cela nous indique donc qu'il est possible que ce gène puisse jouer un rôle fonctionnel dans les cellules rénales humaines malgré le fait que certains travaux antérieurs le classifient comme étant un pseudogène étant donné la présence de cette mutation dans la caspase-12 humaine [233]. De plus, diverses études effectuées sur des modèles *in vitro* ont aussi démontré l'expression de différentes isoformes de caspase-12 dans une variété de types cellulaires [511, 512], ainsi que la surexpression de ce gène par induction reliée à l'albumine [257, 513, 514]. Ainsi, les travaux que nous avons effectués par rapport à la caspase-12 indiquent une relation directe entre les ROS et l'apoptose reliée au stress du réticulum endoplasmique.

4.6 Perspectives

4.6.1 Méthodologie de découverte de biomarqueurs

La méthodologie employée au cours de cette thèse consiste en une utilisation séquentielle de technologies de pointes ayant comme objectif un criblage rapide et efficace de différentes cibles d'intérêt clinique. Il est possible de résumer cette méthodologie comme une liste d'étapes à suivre qui pourra être appliquée à d'autres modèles d'étude :

- i. Identification et caractérisation des pathologies reliées à des modèles *in vivo*. Pour ce faire, différents modèles d'animaux transgéniques ou non peuvent être utilisés, tout comme la collecte d'échantillons cliniques.
- ii. Isolation de cellules ou tissus spécifiques (tubules proximaux rénaux dans le cadre de cette thèse) et purification des échantillons d'expression (ARNm, protéines) et d'histologie.
- iii. Utilisation de micro-puces à ADN afin de rapidement observer la presque totalité des voies métaboliques de régulation génétiques du modèle étudié. Identification des gènes différemment exprimés.
- iv. Recherche de littérature et utilisation de bases de données d'annotations génétiques afin de développer différentes hypothèses impliquant les voies métaboliques soupçonnées de jouer un rôle dans les différentes pathologies observées *in vivo*.
- v. Confirmation de l'expression génétique des marqueurs d'intérêt par techniques de PCR en temps réel et Western Blot. Analyse d'immuno-histochimie afin de confirmer la localisation de l'expression.
- vi. Utilisation de modèles *ex vivo* et *in vitro* représentatifs pour mieux étudier un modèle isolé relié aux marqueurs cibles. Caractérisation des propriétés de ces modèles (par exemple, effets pro-apoptotiques ou réaction à la concentration de glucose).
- vii. Caractérisation précliniques et cliniques des niveaux d'expression de ces marqueurs dans un nombre plus élevé d'échantillon. Détermination de niveaux d'expression de marqueurs associés dans les échantillons biologiques tels que l'urine ou le plasma.

Ainsi, cette approche permet de rapidement tester de multiples biomarqueurs reliés de façon spécifique à un type cellulaire précis, ce qui diminue les chances d'échantillons négatifs reliés à une différence dans les types cellulaires isolés ou à l'impureté des échantillons. Dans les pathologies rénales, de telles approches utilisant les micro-puces sont déjà en cours d'utilisation pour les carcinomes rénaux [515] ainsi que pour les transplantations rénales [516-518].

4.6.2 Techniques de microdissection par capture au laser

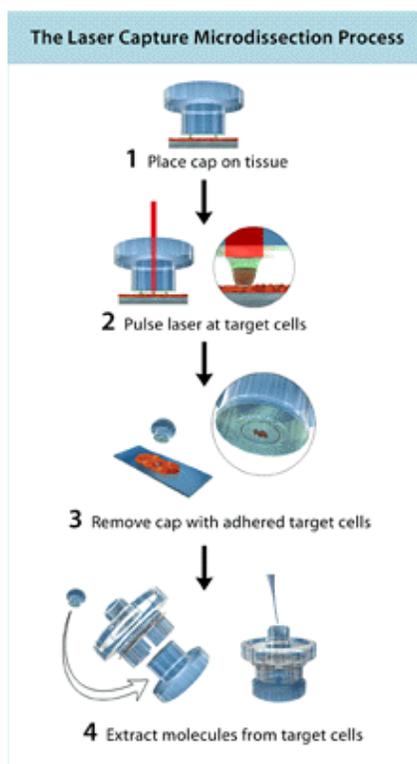


Figure 4-2. Procédure de préparation pour la microdissection et capture au laser. (Arcturus inc.)

Une des techniques envisagées pour l'amélioration du processus de découverte de biomarqueurs est l'utilisation de la technologie de microdissection par capture au laser (LCM), qui sont présentement employée dans les pathologies liées au cancer [519] et à la glomérulosclérose [520]. En effet, même si les protocoles d'isolation cellulaire de tubules proximaux sont efficaces et génèrent normalement des échantillons très purs, cela nécessite le développement d'un protocole d'isolation très précis qui requiert de longues mises au points, en plus des heures de manipulations nécessaires à l'isolation de ces échantillons, ce qui entraîne une dégradation possible des échantillons. De plus, l'isolation par gradient des tubules nécessite la perte ou une isolation non-spécifique des autres types cellulaires, ce qui nécessite de posséder une certaine quantité de matériel biologique au départ pour être en mesure de récolter suffisamment d'échantillons. Or, ces conditions sont rarement retrouvées lorsque l'on travaille avec des échantillons cliniques provenant de biopsies.

Mais, en combinant l'utilisation de techniques de cryogénie des échantillons avec une technique de microdissection par capture au laser, il est possible de rapidement et efficacement isoler les cellules ciblées, permettant une isolation très spécifique de leur ARN, ADN ou protéines. Ainsi, cette combinaison de techniques permettrait le transfert et l'application de notre méthodologie de découvertes de biomarqueurs sur des échantillons cliniques.

4.6.3 Conclusions

Initiée par différentes observations impliquant le rôle des tubules proximaux dans le développement précoce de pathologies rénales (en particulier de la néphropathie diabétique), cette thèse est parvenue à approfondir les connaissances dans ce domaine de différentes manières.

En premier lieu, l'utilisation de la technologie des micro-puces a rendu possible l'identification à haut débit de plusieurs nouveaux facteurs liés à des conditions diabétiques, notamment les gènes *Bmf* et *Caspase-12*. Ceux-ci ont fait l'objet d'expériences plus approfondies confirmant leur implication dans les pathologies affectant les tubules proximaux (section 2 et [521]). Cette utilisation de la technologie des micro-puces pourra donc être envisagée pour l'identification d'autres marqueurs d'intérêt liés à la progression de la néphropathie diabétique.

De plus, les résultats des expériences effectuées dans cette thèse ont permis d'identifier une meilleure synthèse des voies métaboliques reliées à l'augmentation du système RAS et des ROS dans les tubules proximaux (Figure 4-3), tel qu'illustré par les expériences entreprises sur les modèles transgéniques [495].

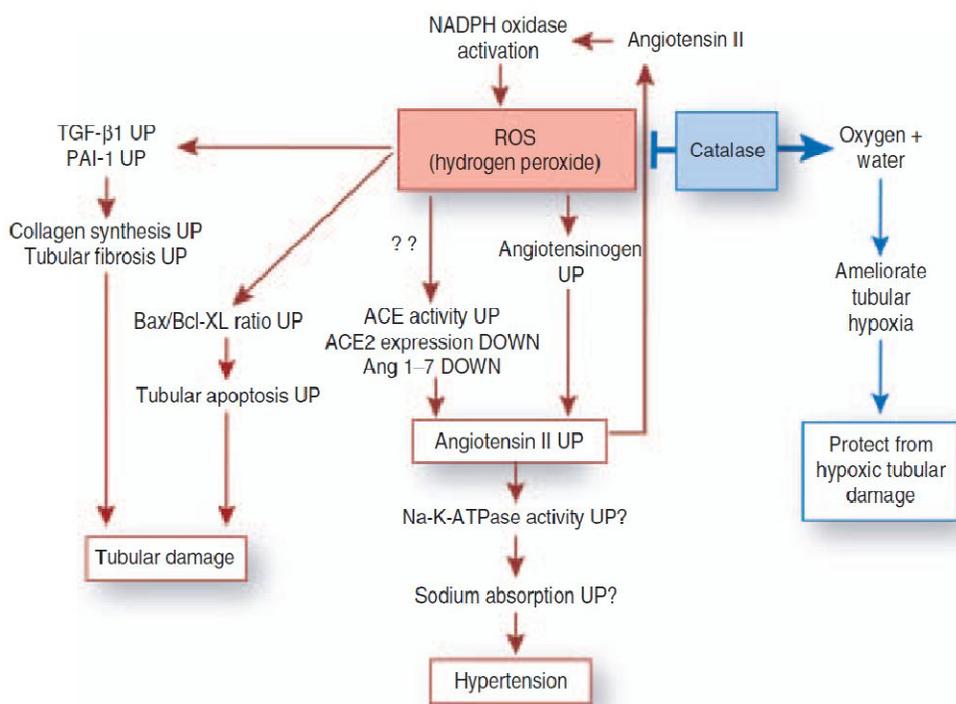


Figure 4-3. Les effets présumés de réno-protection de la catalase sur le développement des maladies rénales chroniques [522].

L'augmentation de ROS (bloqués par la catalase) induite par les NADPH oxydases va provoquer une activation de différentes voies métaboliques, notamment celles reliées à l'inflammation (TGF-β, PAI-I, MCP-I), à la fibrose (Col IV) et à l'apoptose (Bax, Caspase-3).

Or, une publication par Thallas-Bonke *et al.* [523] sur des cellules rénales a démontré une relation entre Ang II et l'activation des PKC à travers la génération des ROS (en particulier de PKC- α). Ainsi, tel que démontré par les expériences de Lee *et al.* [96] et différents autres groupes [494, 524] (Figure 4-4), il est probable que l'activation des PKC induise l'activation des NADPH oxydases suivant la phosphorylation de PKC sur les membranes rénales.

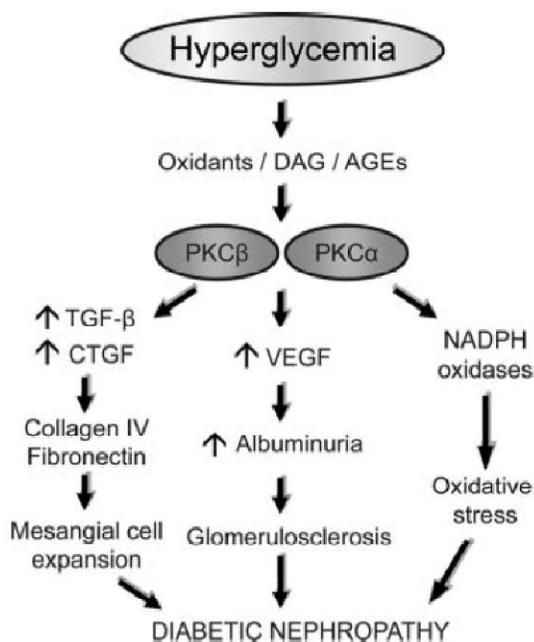


Figure 4-4. L'activation des PKC peut être le résultat d'une hausse des agents oxydatifs, qui peuvent être initiés par différents facteurs tels que l'hyperglycémie [525].

Mis en synthèse, ces résultats permettent donc de comprendre de façon générale la nature du développement de pathologies liées à une amplification des voies métaboliques reliées à la l'activation du système RAS et à surexpression de ROS dans les tubules proximaux.

Chapitre 5 - Annexes

5.1 Analyse de bases de données publiques reliées aux expériences de micro-puces sur des sujets humain

Afin de mieux caractériser le lien clinique de nos études sur le gène *bmf* dans le rein, une recherche de résultats d'expériences de micro-puces a été effectuée. Pour cela, les résultats de base de différentes études cliniques ont été analysées grâce au module Bioconductor et GC-RMA [444-448] (Tableau 5-1).

Tableau 5-1. Résultat des analyses de données de micro-puces sur des échantillons cliniques

ID	Description and lien	Puce utilisée	Résultats des analyses
GSE-1009	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
GSE-1563	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
GSE-21374	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.
GSE-7392	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 <i>bmf</i> probeset between normal and fibrotic allograft one year post-transplant.
GSE-11166	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 <i>bmf</i> probeset at 3 months following transplant, which remained elevated in 2 years of observation.
EMEXP-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 <i>bmf</i> probeset.

Ainsi, il a été possible de déterminer, dans une étude clinique longitudinale de reins transplantés (E-GEOD 11166), d’observer une augmentation significative (Tableau 5-2 et Figure 5-1) de l’expression du gène bmf 3 mois suivant la transplantation. Cette augmentation s’est maintenue au cours des 24 mois d’observation de l’étude.

Tableau 5-2. Rapport d’analyse de l’ANOVA pour le probeset 226530_at (Bmf) de l’étude E-GEOD 11166.

ANOVA Report – Live Donors					
Groups	Number of samples	Sum	Average	Variance	
0 months	14	204.449	14.603	13.194	
3 months	14	354.015	25.287	72.397	
6 months	13	385.013	29.616	168.143	
12 months	15	331.419	22.095	60.237	
24 months	13	302.776	23.290	37.025	

ANOVA Live Donors						
Variation Source	Squares Sum	Deg. freedom	Squares Avg.	F	Probability	Critical F
Time	1641.46	4	410.37	5.9	0.00039	2.52
Inside groups	4418.02	64	69.03			
Total	6059.48	68				

Ces résultats coïncident avec les résultats de la publication d’un article reliée à cette étude, qui a conclu à une augmentation des voies du système du complément suivant les transplantations rénales [526]. Cela semble indiquer que les dommages rénaux reliés au développement de voies reliées à l’expression du système immunitaire et de l’inflammation semblent reliées à l’expression de bmf dans le rein.

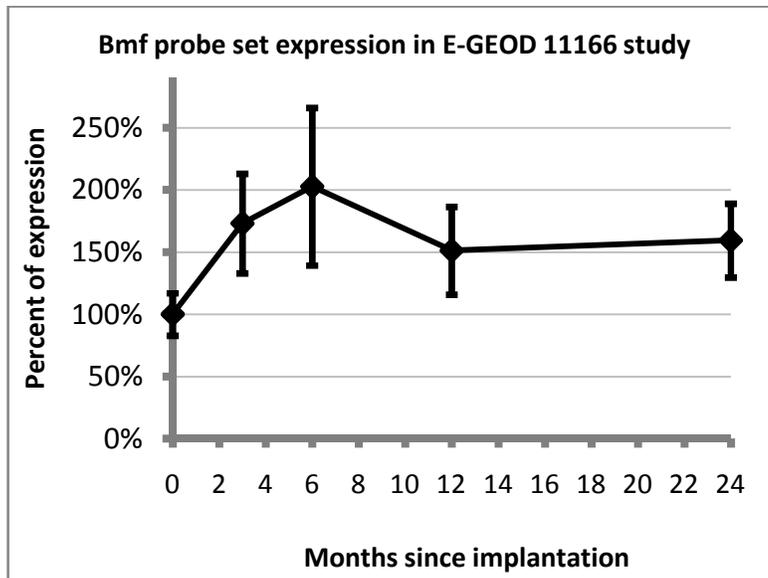


Figure 5-1. Expression du probeset 226530_at de l’étude E-GEOD 11166.

5.2 Niveaux ioniques urinaires de modèles de souris transgéniques

D'après les données d'analyse ionique effectuées par le service de biochimie de l'hôpital Hôtel-Dieu de Montréal, il a été possible de déterminer une diminution significative des niveaux de sodium urinaires dans les souris surexprimant l'angiotensinogène (Figure 5-2, N=8 pour chaque groupe). Cependant, les taux de potassium urinaires n'ont pas semblés être significativement différents.

Ces données semblent ainsi pointer vers une diminution potentielle de la réabsorption de sodium qui serait induite par une hausse du système RAS intrarénal dans les souris transgéniques pour l'angiotensinogène. Cependant, les taux de potassium urinaires n'ont pas semblés être significativement différents entre chaque groupe.

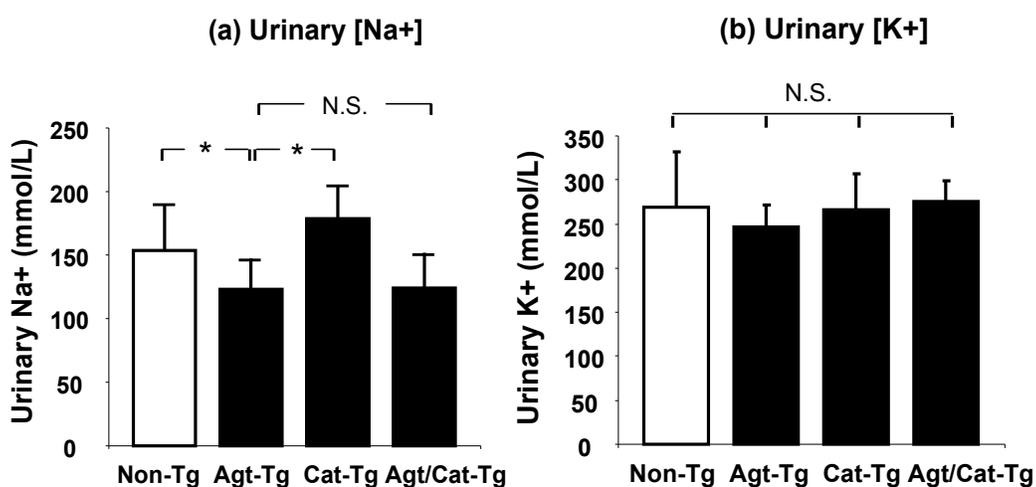


Figure 5-2. Niveaux ioniques urinaires des modèles de souris transgéniques (Agt/Cat).

Chapitre 6 - Références

1. Anatomie générale du rein. <http://www.medicalorama.com/encyclopedie/15657>.
2. http://www.ivy-rose.co.uk/Topics/Urinary_System_Nephron_Diagram.htm.
3. Anatomie générale du néphron. <http://www.medicalorama.com/encyclopedie/15657>.
4. <https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/senior/metabolism/renal/index.htm>.
5. Schlondorff, D. and T. Mori, *Contributions of mesangial cells to glomerular immune functions*. *Klin Wochenschr*, 1990. **68**(22): p. 1138-44.
6. <http://www.aspenatlas.com/photopost/showphoto.php?photo=451&si=Skeletal>.
7. <http://www.lib.mcg.edu/edu/eshuphysio/program/section7/7ch06/7ch06p05.htm>.
8. <http://www.bu.edu/histology/p/1600800a.htm>.
9. <http://www.lib.mcg.edu/edu/eshuphysio/program/section7/7ch03/7ch03p17.htm>.
10. http://cellbio.utmb.edu/microanatomy/kidney/JG_lab.htm.
11. Whittembury, G., et al., *Effect of para-chloromercuribenzenesulfonic acid and temperature on cell water osmotic permeability of proximal straight tubules*. *Biochim Biophys Acta*, 1984. **775**(3): p. 365-73.
12. van Hoek, A.N., et al., *Functional unit of 30 kDa for proximal tubule water channels as revealed by radiation inactivation*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(25): p. 16633-5.
13. Van Hoek, A.N., et al., *A 30 kDa functional size for the erythrocyte water channel determined in situ by radiation inactivation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **184**(3): p. 1331-8.
14. Preston, G.M. and P. Agre, *Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(24): p. 11110-4.
15. Preston, G.M., et al., *Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein*. *Science*, 1992. **256**(5055): p. 385-7.
16. Zeidel, M.L., et al., *Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein*. *Biochemistry*, 1992. **31**(33): p. 7436-40.
17. Nielsen, S., et al., *CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron*. *J Cell Biol*, 1993. **120**(2): p. 371-83.
18. *Structure des aquaporines*. http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/LIPIDS/Fig12_24Aquaporin.GIF.
19. Ma, T., et al., *Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(8): p. 4296-9.
20. Preston, G.M., et al., *Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels*. *Science*, 1994. **265**(5178): p. 1585-7.
21. King, L.S., et al., *Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(3): p. 175-9.
22. Noda, Y. and S. Sasaki, *Trafficking mechanism of water channel aquaporin-2*. *Biol Cell*, 2005. **97**(12): p. 885-92.
23. Yang, B., et al., *Mouse model of inducible nephrogenic diabetes insipidus produced by floxed aquaporin-2 gene deletion*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **291**(2): p. F465-72.

24. Rosenthal, W., et al., *Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus*. *Nature*, 1992. **359**(6392): p. 233-5.
25. Hochberg, Z., et al., *Autosomal recessive nephrogenic diabetes insipidus caused by an aquaporin-2 mutation*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. **82**(2): p. 686-9.
26. Kamsteeg, E.J., et al., *An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus*. *EMBO J*, 1999. **18**(9): p. 2394-400.
27. Terris, J., et al., *Long-term regulation of four renal aquaporins in rats*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(2 Pt 2): p. F414-22.
28. Ma, T., et al., *Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(8): p. 4386-91.
29. Roudier, N., et al., *AQP3 deficiency in humans and the molecular basis of a novel blood group system, GIL*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(48): p. 45854-9.
30. Ma, T., et al., *Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(5): p. 957-62.
31. Sorani, M.D., et al., *Novel variants in human Aquaporin-4 reduce cellular water permeability*. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(15): p. 2379-89.
32. Sohara, E., et al., *Defective water and glycerol transport in the proximal tubules of AQP7 knockout mice*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. **289**(6): p. F1195-200.
33. Ceperuelo-Mallafre, V., et al., *Adipose tissue expression of the glycerol channel aquaporin-7 gene is altered in severe obesity but not in type 2 diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(9): p. 3640-5.
34. Okada, S., et al., *Aquaporin-11 knockout mice and polycystic kidney disease animals share a common mechanism of cyst formation*. *FASEB J*, 2008. **22**(10): p. 3672-84.
35. http://teaching.path.cam.ac.uk/Normal/UR_Urogenital/KD_Kidney/N_UR_KD_09small.jpg.
36. http://www.path.vghtpe.gov.tw/chinese/html/Activity/MonthlyCase/spc/2004-06-23%20Cystic%20nephroma.files/slide0341_image026.jpg.
37. *Diabetic Nephropathy- Symptoms and Diagnosis*. http://www.allhealthsite.com/wp-content/uploads/2009/02/diabetic_nephropathy_jpg.jpg.
38. <http://library.med.utah.edu/WebPath/RENAHTML/RENALIDX.html>.
39. <http://www.webmd.com/a-to-z-guides/understanding-kidney-disease-basic-information>.
40. <http://kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs/yourkidneys/>.
41. Jefferson, J.A., S.J. Shankland, and R.H. Pichler, *Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint*. *Kidney Int*, 2008. **74**(1): p. 22-36.
42. http://www.kidney.org/professionals/kls/pdf/fag_gfr.pdf.
43. Grassmann, A., et al., *End-stage renal disease: global demographics in 2005 and observed trends*. *Artif Organs*, 2006. **30**(12): p. 895-7.
44. Collins, A.J., et al., *The state of chronic kidney disease, ESRD, and morbidity and mortality in the first year of dialysis*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009. **4** Suppl 1: p. S5-11.
45. *Incidence of end-stage renal disease among persons with diabetes--United States, 1990-2002*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2005. **54**(43): p. 1097-100.
46. <http://www.diabetes.ca/Files/prevalence-and-costs.pdf>.
47. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 813-20.

48. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(6): p. L1005-28.
49. Newsholme, P., et al., *Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity*. J Physiol, 2007. **583**(Pt 1): p. 9-24.
50. Cover, *Schematic of the balance between NO and reactive oxygen species (ROS) that modulates NO bioavailability*. Hypertension, 2008. **51**(1): p. 1.
51. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C., *Free radicals in biology and medicine (3rd ed.)*. 1999: Oxford University Press.
52. Siems, W.G., T. Grune, and H. Esterbauer, *4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine*. Life Sci, 1995. **57**(8): p. 785-9.
53. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
54. Stadtman, E.R., *Role of oxidant species in aging*. Curr Med Chem, 2004. **11**(9): p. 1105-12.
55. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, *Diabetic Nephropathy*,. DIABETES CARE,, JANUARY 2003. **26**(SUPPLEMENT 1,).
56. Schrijvers, B.F., A.S. De Vriese, and A. Flyvbjerg, *From hyperglycemia to diabetic kidney disease: the role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines*. Endocr Rev, 2004. **25**(6): p. 971-1010.
57. Mauer SM, S.M., Ellis EN, Sutherland DER, and G.F. Brown DM, *Structural-functional relationships in diabetic nephropathy*. J Clin Invest, 1984. **74**: p. 1143-1155.
58. Mason RM, W.N., *Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**: p. 1358--1373.
59. Zeisberg M, E.M., Hamano Y, Neilson EG, Ziyadeh F, and K. R., *Differential expression of type IV collagen isoforms in rat glomerular endothelial and mesangial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **295**: p. 401-407.
60. Kimmelstiel P, W.C., *Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney*. Am J Pathol, 1936. **12**: p. 82-97.
61. S., A., *Structure-function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy*. J Am Soc Nephrol, 1994. **5**: p. 1165-1172.
62. RA., D., *Diabetic nephropathy: etiologic and therapeutic considerations*. Diab Rev, 1995. **3**: p. 510-564.
63. Dalla Vestra, M., et al., *Structural involvement in type 1 and type 2 diabetic nephropathy*. Diabetes Metab, 2000. **26 Suppl 4**: p. 8-14.
64. Shankland, S.J., *The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis*. Kidney Int, 2006. **69**(12): p. 2131-47.
65. Wolf, G., S. Chen, and F.N. Ziyadeh, *From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1626-34.
66. Pagtalunan, M.E., et al., *Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes*. J Clin Invest, 1997. **99**(2): p. 342-8.
67. White, K.E., et al., *Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 3083-9.

68. Steffes, M.W., et al., *Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients*. *Kidney Int*, 2001. **59**(6): p. 2104-13.
69. Dalla Vestra, M., et al., *Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2003. **52**(4): p. 1031-5.
70. Petermann, A.T., et al., *Podocytes that detach in experimental membranous nephropathy are viable*. *Kidney Int*, 2003. **64**(4): p. 1222-31.
71. 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.
72. Siu, B., et al., *Reduction in podocyte density as a pathologic feature in early diabetic nephropathy in rodents: prevention by lipoic acid treatment*. *BMC Nephrol*, 2006. **7**: p. 6.
73. Yoo, T.H., et al., *Activation of the renin-angiotensin system within podocytes in diabetes*. *Kidney Int*, 2007. **71**(10): p. 1019-27.
74. Rincon-Choles, H., et al., *ZO-1 expression and phosphorylation in diabetic nephropathy*. *Diabetes*, 2006. **55**(4): p. 894-900.
75. Dai, T., et al., *Glucose and diabetes: effects on podocyte and glomerular p38MAPK, heat shock protein 25, and actin cytoskeleton*. *Kidney Int*, 2006. **69**(5): p. 806-14.
76. Miyata, T., et al., *Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine*. *Kidney Int*, 1998. **53**(2): p. 416-22.
77. Beisswenger, P.J., et al., *Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes*. *Diabetes*, 1995. **44**(7): p. 824-9.
78. Makita, Z., et al., *Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy*. *N Engl J Med*, 1991. **325**(12): p. 836-42.
79. Tanji, N., et al., *Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(9): p. 1656-66.
80. Li, J. and A.M. Schmidt, *Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(26): p. 16498-506.
81. Forbes, J.M., et al., *Renoprotective effects of a novel inhibitor of advanced glycation*. *Diabetologia*, 2001. **44**(1): p. 108-14.
82. Forbes, J.M., et al., *The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes*. *Faseb J*, 2003. **17**(12): p. 1762-4.
83. Vlassara, H., et al., *Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(24): p. 11704-8.
84. Soulis-Liparota, T., et al., *Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat*. *Diabetes*, 1991. **40**(10): p. 1328-34.
85. Jerums G, P.S., Forbes J, Osicka T, and Cooper M., *Evolving concepts in advanced glycation, diabetic nephropathy, and diabetic vascular disease*. *Arch Biochem Biophys*, 2003. **419**: p. 55-62.
86. Neeper, M., et al., *Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(21): p. 14998-5004.
87. Schmidt, A.M., et al., *Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(21): p. 14987-97.

88. Vlassara, H., *The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications*. Diabetes Metab Res Rev, 2001. **17**(6): p. 436-43.
89. Soulis, T., et al., *Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury*. Diabetologia, 1997. **40**(6): p. 619-28.
90. Twigg, S.M., et al., *Renal connective tissue growth factor induction in experimental diabetes is prevented by aminoguanidine*. Endocrinology, 2002. **143**(12): p. 4907-15.
91. Wendt, T.M., et al., *RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. Am J Pathol, 2003. **162**(4): p. 1123-37.
92. Oldfield, M.D., et al., *Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE)*. J Clin Invest, 2001. **108**(12): p. 1853-63.
93. Morcos, M., et al., *Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy*. Diabetes, 2002. **51**(12): p. 3532-44.
94. Yamamoto, Y., et al., *Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice*. J Clin Invest, 2001. **108**(2): p. 261-8.
95. Calcutt, N.A., et al., *Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(5): p. 417-29.
96. Lee, H.B., et al., *Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells*. Kidney Int, 2004. **65**(4): p. 1170-9.
97. Ishii, H., et al., *Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor*. Science, 1996. **272**(5262): p. 728-31.
98. Koya, D., et al., *Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats*. J Clin Invest, 1997. **100**(1): p. 115-26.
99. 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.
100. Cohen, M.P., et al., *Glycated albumin stimulation of PKC-beta activity is linked to increased collagen IV in mesangial cells*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 2): p. F684-90.
101. Fumo, P., G.S. Kuncio, and F.N. Ziyadeh, *PKC and high glucose stimulate collagen alpha 1 (IV) transcriptional activity in a reporter mesangial cell line*. Am J Physiol, 1994. **267**(4 Pt 2): p. F632-8.
102. Isono, M., et al., *Extracellular signal-regulated kinase mediates stimulation of TGF-beta1 and matrix by high glucose in mesangial cells*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(12): p. 2222-30.
103. Glogowski, E.A., et al., *High glucose alters the response of mesangial cell protein kinase C isoforms to endothelin-1*. Kidney Int, 1999. **55**(2): p. 486-99.
104. Haneda, M., et al., *Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions*. Diabetes, 1997. **46**(5): p. 847-53.
105. Awazu, M., et al., *Mechanisms of mitogen-activated protein kinase activation in experimental diabetes*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(4): p. 738-45.
106. Ha, H. and H.B. Lee, *Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose*. Kidney Int Suppl, 2000. **77**: p. S19-25.
107. Gopalakrishna, R. and S. Jaken, *Protein kinase C signaling and oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(9): p. 1349-61.

108. Leask, A. and D.J. Abraham, *TGF-beta signaling and the fibrotic response*. *Faseb J*, 2004. **18**(7): p. 816-27.
109. Wolf, G. and F.N. Ziyadeh, *The role of angiotensin II in diabetic nephropathy: emphasis on nonhemodynamic mechanisms*. *Am J Kidney Dis*, 1997. **29**(1): p. 153-63.
110. Ziyadeh, F.N., *Mediators of diabetic renal disease: the case for tgf-Beta as the major mediator*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15 Suppl 1**: p. S55-7.
111. Schiffer M, v.G.G., Bitzer M, Susztak K, Bottinger EP., *Smad proteins and transforming growth factor-b signaling*. *Kidney Int*, 2000. **58**(Suppl 77): p. S45-S52.
112. Herpin, A., C. Lelong, and P. Favrel, *Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans*. *Dev Comp Immunol*, 2004. **28**(5): p. 461-85.
113. Hui, A.Y. and S.L. Friedman, *Molecular basis of hepatic fibrosis*. *Expert Rev Mol Med*, 2003. **5**(5): p. 1-23.
114. Murphy, M., et al., *Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(9): p. 5830-4.
115. Qi, W., et al., *Integrated actions of transforming growth factor-beta1 and connective tissue growth factor in renal fibrosis*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. **288**(4): p. F800-9.
116. Wang, S.N. and R. Hirschberg, *Growth factor ultrafiltration in experimental diabetic nephropathy contributes to interstitial fibrosis*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. **278**(4): p. F554-60.
117. Wang, S.N., J. LaPage, and R. Hirschberg, *Role of glomerular ultrafiltration of growth factors in progressive interstitial fibrosis in diabetic nephropathy*. *Kidney Int*, 2000. **57**(3): p. 1002-14.
118. Hong, S.W., et al., *Increased glomerular and tubular expression of transforming growth factor-beta1, its type II receptor, and activation of the Smad signaling pathway in the db/db mouse*. *Am J Pathol*, 2001. **158**(5): p. 1653-63.
119. 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.
120. Benigni, A., et al., *Add-on anti-TGF-beta antibody to ACE inhibitor arrests progressive diabetic nephropathy in the rat*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(7): p. 1816-24.
121. Panchapakesan, U., X.M. Chen, and C.A. Pollock, *Drug insight: thiazolidinediones and diabetic nephropathy--relevance to renoprotection*. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2005. **1**(1): p. 33-43.
122. Fukami, K., et al., *AGEs activate mesangial TGF-beta-Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction*. *Kidney Int*, 2004. **66**(6): p. 2137-47.
123. Viberti, G.C. and K. Earle, *Predisposition to essential hypertension and the development of diabetic nephropathy*. *J Am Soc Nephrol*, 1992. **3**(4 Suppl): p. S27-33.
124. Viberti, G., *Why do we have to invoke genetic susceptibility for diabetic nephropathy?* *Kidney Int*, 1999. **55**(6): p. 2526-7.
125. Hostetter, T.H., H.G. Rennke, and B.M. Brenner, *The case for intrarenal hypertension in the initiation and progression of diabetic and other glomerulopathies*. *Am J Med*, 1982. **72**(3): p. 375-80.
126. Bernadet-Monrozies, P., et al., *[The effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on the progression of chronic renal failure]*. *Presse Med*, 2002. **31**(36): p. 1714-20.

127. Endlich, N. and K. Endlich, *Stretch, tension and adhesion - adaptive mechanisms of the actin cytoskeleton in podocytes*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(3-4): p. 229-34.
128. Ziyadeh, F.N., et al., *Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta*. J Clin Invest, 1994. **93**(2): p. 536-42.
129. Gruden, G., et al., *Mechanical stretch-induced fibronectin and transforming growth factor-beta1 production in human mesangial cells is p38 mitogen-activated protein kinase-dependent*. Diabetes, 2000. **49**(4): p. 655-61.
130. Gruden, G., et al., *Mechanical stretch induces monocyte chemoattractant activity via an NF-kappaB-dependent monocyte chemoattractant protein-1-mediated pathway in human mesangial cells: inhibition by rosiglitazone*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(3): p. 688-96.
131. Riser, B.L., et al., *Cyclic stretching of mesangial cells up-regulates intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte adherence: a possible new mechanism for glomerulosclerosis*. Am J Pathol, 2001. **158**(1): p. 11-7.
132. Petermann, A.T., et al., *Mechanical stress reduces podocyte proliferation in vitro*. Kidney Int, 2002. **61**(1): p. 40-50.
133. Durvasula, R.V., et al., *Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain*. Kidney Int, 2004. **65**(1): p. 30-9.
134. Chen, H.C., et al., *Altering expression of alpha3beta1 integrin on podocytes of human and rats with diabetes*. Life Sci, 2000. **67**(19): p. 2345-53.
135. Dessapt CBM, H.A., Viberti G, Gnudi L., *TGF- α 1 and mechanical stretch reduce murine podocyte adhesion to extracellular matrix substrate and modulate α 1 integrin expression/maturation in vitro*. Diabetologia, 2005. **48**((Suppl 1)): p. A28 (abstract).
136. Bakris, G.L., et al., *Renal sodium-glucose transport: role in diabetes mellitus and potential clinical implications*. Kidney Int, 2009. **75**(12): p. 1272-7.
137. Freitas, H.S., et al., *Na(+)-glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats correlates with glycemic levels: involvement of hepatocyte nuclear factor-1alpha expression and activity*. Endocrinology, 2008. **149**(2): p. 717-24.
138. Li, J.M. and A.M. Shah, *ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8 Suppl 3): p. S221-6.
139. Griendling, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res, 2000. **86**(5): p. 494-501.
140. Zalba, G., et al., *Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase*. Hypertension, 2001. **38**(6): p. 1395-9.
141. Babior, B.M., *NADPH oxidase*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(1): p. 42-7.
142. Chabrashvili, T., et al., *Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney*. Hypertension, 2002. **39**(2): p. 269-74.
143. Touyz, R.M., G. Yao, and E.L. Schiffrin, *c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(6): p. 981-7.
144. Bokoch, G.M. and T. Zhao, *Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1533-48.
145. <http://pathology.emory.edu/Lambeth/nadphpage.html>.
146. Geiszt, M., *NADPH oxidases: new kids on the block*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 289-99.

147. Cave, A.C., et al., *NADPH oxidases in cardiovascular health and disease*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(5-6): p. 691-728.
148. Griendling, K.K., *NADPH oxidases: new regulators of old functions*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1443-5.
149. Guichard, C., et al., *NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes?* Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 5): p. 920-9.
150. Etoh, T., et al., *Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventive insulin treatment*. Diabetologia, 2003. **46**(10): p. 1428-37.
151. 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.
152. Ha, H. and H.B. Lee, *Reactive oxygen species and matrix remodeling in diabetic kidney*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8 Suppl 3): p. S246-9.
153. Kakimoto, M., et al., *Accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and mitochondrial DNA deletion in kidney of diabetic rats*. Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1588-95.
154. Shigenaga MK, G.C., Ames BN, *Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**: p. 9697-9701.
155. Kanauchi, M., H. Nishioka, and T. Hashimoto, *Oxidative DNA damage and tubulointerstitial injury in diabetic nephropathy*. Nephron, 2002. **91**(2): p. 327-9.
156. Houstis, N., E.D. Rosen, and E.S. Lander, *Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance*. Nature, 2006. **440**(7086): p. 944-8.
157. Kersten, S., B. Desvergne, and W. Wahli, *Roles of PPARs in health and disease*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 421-4.
158. Desvergne, B. and W. Wahli, *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism*. Endocr Rev, 1999. **20**(5): p. 649-88.
159. Fajas, L., M.B. Debril, and J. Auwerx, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: from adipogenesis to carcinogenesis*. J Mol Endocrinol, 2001. **27**(1): p. 1-9.
160. Guan, Y. and M.D. Breyer, *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease*. Kidney Int, 2001. **60**(1): p. 14-30.
161. Willson, T.M., M.H. Lambert, and S.A. Kliewer, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 341-67.
162. Scott, C.L., *Diagnosis, prevention, and intervention for the metabolic syndrome*. Am J Cardiol, 2003. **92**(1A): p. 35i-42i.
163. Ginsberg, H.N., *Treatment for patients with the metabolic syndrome*. Am J Cardiol, 2003. **91**(7A): p. 29E-39E.
164. Gurnell, M., et al., *The metabolic syndrome: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its therapeutic modulation*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2412-21.
165. Daynes, R.A. and D.C. Jones, *Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 748-59.
166. Guan, Y., et al., *Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in urinary tract of rabbits and humans*. Am J Physiol, 1997. **273**(6 Pt 2): p. F1013-22.
167. Ruan, X.Z., et al., *PPAR agonists protect mesangial cells from interleukin 1beta-induced intracellular lipid accumulation by activating the ABCA1 cholesterol efflux pathway*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(3): p. 593-600.
168. Portilla, D., *Energy metabolism and cytotoxicity*. Semin Nephrol, 2003. **23**(5): p. 432-8.

169. Mishra, R., et al., *Adipose differentiation-related protein and regulators of lipid homeostasis identified by gene expression profiling in the murine db/db diabetic kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(5): p. F913-21.
170. Fried, L.F., T.J. Orchard, and B.L. Kasiske, *Effect of lipid reduction on the progression of renal disease: a meta-analysis*. Kidney Int, 2001. **59**(1): p. 260-9.
171. Kim, H., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist treatment in a transgenic model of type 2 diabetes reverses the lipotoxic state and improves glucose homeostasis*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1770-8.
172. Aasum, E., et al., *Cardiac function and metabolism in Type 2 diabetic mice after treatment with BM 17.0744, a novel PPAR-alpha activator*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(3): p. H949-57.
173. Koh, E.H., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation prevents diabetes in OLETF rats: comparison with PPAR-gamma activation*. Diabetes, 2003. **52**(9): p. 2331-7.
174. Park, C.W., et al., *PPARalpha agonist fenofibrate improves diabetic nephropathy in db/db mice*. Kidney Int, 2006. **69**(9): p. 1511-7.
175. Wilmer, W.A., et al., *PPAR-alpha ligands inhibit H2O2-mediated activation of transforming growth factor-beta1 in human mesangial cells*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(6): p. 877-84.
176. Kamijo, Y., et al., *Identification of functions of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in proximal tubules*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(7): p. 1691-702.
177. Guan, Y., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity is associated with renal microvasculature*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **281**(6): p. F1036-46.
178. Iglesias, P. and J.J. Diez, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in renal disease*. Eur J Endocrinol, 2006. **154**(5): p. 613-21.
179. Sarafidis, P.A. and G.L. Bakris, *Protection of the kidney by thiazolidinediones: an assessment from bench to bedside*. Kidney Int, 2006. **70**(7): p. 1223-33.
180. Yano, Y., et al., *The differential effects of angiotensin II type 1 receptor blockers on microalbuminuria in relation to low-grade inflammation in metabolic hypertensive patients*. Am J Hypertens, 2007. **20**(5): p. 565-72.
181. Zheng, F. and Y. Guan, *Thiazolidinediones: a novel class of drugs for the prevention of diabetic nephropathy?* Kidney Int, 2007. **72**(11): p. 1301-3.
182. Imano, E., et al., *Effect of troglitazone on microalbuminuria in patients with incipient diabetic nephropathy*. Diabetes Care, 1998. **21**(12): p. 2135-9.
183. Nakamura, T., et al., *Comparative effects of pioglitazone, glibenclamide, and voglibose on urinary endothelin-1 and albumin excretion in diabetes patients*. J Diabetes Complications, 2000. **14**(5): p. 250-4.
184. Ohtomo, S., et al., *Thiazolidinediones provide better renoprotection than insulin in an obese, hypertensive type II diabetic rat model*. Kidney Int, 2007. **72**(12): p. 1512-9.
185. Wolffenbuttel, B.H., et al., *Addition of low-dose rosiglitazone to sulphonylurea therapy improves glycaemic control in Type 2 diabetic patients*. Diabet Med, 2000. **17**(1): p. 40-7.
186. Baylis, C., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor [gamma] agonist provides superior renal protection versus angiotensin-converting enzyme inhibition in a rat model of type 2 diabetes with obesity*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(3): p. 854-60.
187. Routh, R.E., J.H. Johnson, and K.J. McCarthy, *Troglitazone suppresses the secretion of type I collagen by mesangial cells in vitro*. Kidney Int, 2002. **61**(4): p. 1365-76.
188. Zheng, F., et al., *Upregulation of type I collagen by TGF-beta in mesangial cells is blocked by PPARgamma activation*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **282**(4): p. F639-48.

189. Kanjanabuch, T., et al., *PPAR-gamma agonist protects podocytes from injury*. *Kidney Int*, 2007. **71**(12): p. 1232-9.
190. Li, H., et al., *EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism*. *Kidney Int*, 2005. **67**(3): p. 867-74.
191. Panchapakesan, U., C.A. Pollock, and X.M. Chen, *The effect of high glucose and PPAR-gamma agonists on PPAR-gamma expression and function in HK-2 cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **287**(3): p. F528-34.
192. Nicholas, S.B., et al., *Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mesangial cells*. *Hypertension*, 2001. **37**(2 Part 2): p. 722-7.
193. Ohga, S., et al., *Thiazolidinedione ameliorates renal injury in experimental diabetic rats through anti-inflammatory effects mediated by inhibition of NF-kappaB activation*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **292**(4): p. F1141-50.
194. Guan, Y., et al., *Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPARgamma stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption*. *Nat Med*, 2005. **11**(8): p. 861-6.
195. Ruan, X., F. Zheng, and Y. Guan, *PPARs and the kidney in metabolic syndrome*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008.
196. Berfield, A.K., et al., *IGF-1 induces rat glomerular mesangial cells to accumulate triglyceride*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **290**(1): p. F138-47.
197. Proctor, G., et al., *Regulation of renal fatty acid and cholesterol metabolism, inflammation, and fibrosis in Akita and OVE26 mice with type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2006. **55**(9): p. 2502-9.
198. Hao, C.M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation promotes cell survival following hypertonic stress*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(24): p. 21341-5.
199. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
200. Czerski, L. and G. Nunez, *Apoptosome formation and caspase activation: is it different in the heart?* *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **37**(3): p. 643-52.
201. Nagata, S., *Fas ligand-induced apoptosis*. *Annu Rev Genet*, 1999. **33**: p. 29-55.
202. Uren, R.T., et al., *Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(3): p. 2266-74.
203. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. *Cell*, 1998. **94**(4): p. 491-501.
204. Zhang, N., et al., *The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes*. *Cell Res*, 2005. **15**(10): p. 749-69.
205. Kadowaki, H., H. Nishitoh, and H. Ichijo, *Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases*. *J Chem Neuroanat*, 2004. **28**(1-2): p. 93-100.
206. Harding, H.P., et al., *Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells*. *Mol Cell*, 2000. **6**(5): p. 1099-108.
207. Harding, H.P., et al., *Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival*. *Mol Cell*, 2001. **7**(6): p. 1153-63.
208. Harding, H.P., Y. Zhang, and D. Ron, *Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase*. *Nature*, 1999. **397**(6716): p. 271-4.
209. Haze, K., et al., *Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress*. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(11): p. 3787-99.

210. Yoshida, H., et al., *Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors.* J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33741-9.
211. Yoshida, H., et al., *ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(18): p. 6755-67.
212. Iwawaki, T., et al., *Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(2): p. 158-64.
213. Tirasophon, W., A.A. Welihinda, and R.J. Kaufman, *A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells.* Genes Dev, 1998. **12**(12): p. 1812-24.
214. Wang, X.Z., et al., *Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses.* Embo J, 1998. **17**(19): p. 5708-17.
215. Mann, D.L., *Targeted cancer therapeutics: the heartbreak of success.* Nat Med, 2006. **12**(8): p. 881-2.
216. Delepine, M., et al., *EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome.* Nat Genet, 2000. **25**(4): p. 406-9.
217. Laybutt, D.R., et al., *Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes.* Diabetologia, 2007. **50**(4): p. 752-63.
218. Wang, X.Z., et al., *Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153).* Mol Cell Biol, 1996. **16**(8): p. 4273-80.
219. Ma, Y., et al., *Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response.* J Mol Biol, 2002. **318**(5): p. 1351-65.
220. Ron, D. and J.F. Habener, *CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription.* Genes Dev, 1992. **6**(3): p. 439-53.
221. Zinszner, H., et al., *CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum.* Genes Dev, 1998. **12**(7): p. 982-95.
222. Novoa, I., et al., *Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha.* J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. 1011-22.
223. Brush, M.H., D.C. Weiser, and S. Shenolikar, *Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(4): p. 1292-303.
224. Adler, H.T., et al., *Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 7050-60.
225. Marciniak, S.J., et al., *CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum.* Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3066-77.
226. Yamaguchi, H. and H.G. Wang, *CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells.* J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45495-502.
227. Oyadomari, S., et al., *Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes.* J Clin Invest, 2002. **109**(4): p. 525-32.

228. Tan, Y., et al., *Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 16016-24.
229. Morishima, N., et al., *An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 34287-94.
230. Nakagawa, T. and J. Yuan, *Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis*. J Cell Biol, 2000. **150**(4): p. 887-94.
231. Yoneda, T., et al., *Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 13935-40.
232. Rao, R.V., et al., *Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33869-74.
233. Fischer, H., et al., *Human caspase 12 has acquired deleterious mutations*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(2): p. 722-6.
234. Strasser, A., *The role of BH3-only proteins in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 189-200.
235. McCullough, K.D., et al., *Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(4): p. 1249-59.
236. Contreras, J.L., et al., *Coupling endoplasmic reticulum stress to cell death program in isolated human pancreatic islets: effects of gene transfer of Bcl-2*. Transpl Int, 2003. **16**(7): p. 537-42.
237. Scorrano, L., et al., *BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis*. Science, 2003. **300**(5616): p. 135-9.
238. Zong, W.X., et al., *Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis*. J Cell Biol, 2003. **162**(1): p. 59-69.
239. Wei, M.C., et al., *Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death*. Science, 2001. **292**(5517): p. 727-30.
240. Kretzler, M., *Regulation of adhesive interaction between podocytes and glomerular basement membrane*. Microsc Res Tech, 2002. **57**(4): p. 247-53.
241. Menini, S., et al., *Increased glomerular cell (podocyte) apoptosis in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus: role in the development of diabetic glomerular disease*. Diabetologia, 2007. **50**(12): p. 2591-9.
242. Dalla Vestra, M., et al., *Role of mesangial expansion in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. J Nephrol, 2001. **14 Suppl 4**: p. S51-7.
243. 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.
244. Yamagishi, S., et al., *Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20309-15.
245. Okado, T., et al., *Smad7 mediates transforming growth factor-beta-induced apoptosis in mesangial cells*. Kidney Int, 2002. **62**(4): p. 1178-86.
246. Mishra, R., et al., *High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells*. Kidney Int, 2005. **67**(1): p. 82-93.
247. Jung, D.S., et al., *FR167653 Inhibits Fibronectin Expression and Apoptosis in Diabetic Glomeruli and in High Glucose-Stimulated Mesangial Cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008.

248. Ishii, N., et al., *Glucose loading induces DNA fragmentation in rat proximal tubular cells*. *Metabolism*, 1996. **45**(11): p. 1348-53.
249. Ortiz, A., F.N. Ziyadeh, and E.G. Neilson, *Expression of apoptosis-regulatory genes in renal proximal tubular epithelial cells exposed to high ambient glucose and in diabetic kidneys*. *J Investig Med*, 1997. **45**(2): p. 50-6.
250. Kumar, D., et al., *Tubular and interstitial cell apoptosis in the streptozotocin-diabetic rat kidney*. *Nephron Exp Nephrol*, 2004. **96**(3): p. e77-88.
251. 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.
252. Allen, D.A., et al., *High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases*. *Faseb J*, 2003. **17**(8): p. 908-10.
253. Liu, F., et al., *Overexpression of angiotensinogen increases tubular apoptosis in diabetes*. *J Am Soc Nephrol*, 2008. **19**(2): p. 269-80.
254. 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.
255. Brezniceanu, M.L., et al., *Catalase overexpression attenuates angiotensinogen expression and apoptosis in diabetic mice*. *Kidney Int*, 2007. **71**(9): p. 912-23.
256. Erkan, E., P. Devarajan, and G.J. Schwartz, *Mitochondria are the major targets in albumin-induced apoptosis in proximal tubule cells*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(4): p. 1199-208.
257. Ohse, T., et al., *Albumin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal proximal tubular cells*. *Kidney Int*, 2006. **70**(8): p. 1447-55.
258. Harrison, D.G., et al., *Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease*. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2003. **4**(2): p. 51-61.
259. Ruiz-Ortega, M., et al., *Proinflammatory actions of angiotensins*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2001. **10**(3): p. 321-9.
260. Capecchi, M.R., *Targeted gene replacement*. *Sci Am*, 1994. **270**(3): p. 52-9.
261. Cole, J., et al., *Mice lacking endothelial angiotensin-converting enzyme have a normal blood pressure*. *Circ Res*, 2002. **90**(1): p. 87-92.
262. Xiao, H.D., et al., *Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death*. *Am J Pathol*, 2004. **165**(3): p. 1019-32.
263. Campbell, D.J., et al., *Effect of reduced angiotensin-converting enzyme gene expression and angiotensin-converting enzyme inhibition on angiotensin and bradykinin peptide levels in mice*. *Hypertension*, 2004. **43**(4): p. 854-9.
264. Kregel, J.H., et al., *Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice*. *Nature*, 1995. **375**(6527): p. 146-8.
265. Navar, L.G., et al., *Intrarenal production of angiotensin II*. *Semin Nephrol*, 1997. **17**(5): p. 412-22.
266. Locatelli, F., P. Pozzoni, and L. Del Vecchio, *Renal manifestations in the metabolic syndrome*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(4 Suppl 2): p. S81-5.
267. Sachtelli, S., et al., *RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney*. *Kidney Int*, 2006. **69**(6): p. 1016-23.
268. Ingelfinger, J.R., *Angiotensin-converting enzyme 2: implications for blood pressure and kidney disease*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009. **18**(1): p. 79-84.

269. 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.
270. 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.
271. 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.
272. Ferrario, C.M., et al., *Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2*. Circulation, 2005. **111**(20): p. 2605-10.
273. Santos, R.A., et al., *Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8258-63.
274. Santos, R.A. and A.J. Ferreira, *Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2007. **16**(2): p. 122-8.
275. Sealey JE, L.J., *The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis.*, in *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, B.B. Laragh JH, Editor. 1990, Raven Press: New York. p. 1287-1317.
276. Gould, A.B. and D. Green, *Kinetics of the human renin and human substrate reaction*. Cardiovasc Res, 1971. **5**(1): p. 86-9.
277. Bohlender, J., et al., *Angiotensinogen concentrations and renin clearance : implications for blood pressure regulation*. Hypertension, 2000. **35**(3): p. 780-6.
278. Knepper, M.A. and H.L. Brooks, *Regulation of the sodium transporters NHE3, NKCC2 and NCC in the kidney*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001. **10**(5): p. 655-9.
279. Schultheis, P.J., et al., *Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 282-5.
280. Lorenz, J.N., et al., *Micropuncture analysis of single-nephron function in NHE3-deficient mice*. Am J Physiol, 1999. **277**(3 Pt 2): p. F447-53.
281. Diaz-Sylvester, P.L., et al., *Effect of chronic inhibition of converting enzyme on proximal tubule acidification*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **294**(6): p. R2014-20.
282. Li, X.C. and J.L. Zhuo, *Selective knockdown of AT1 receptors by RNA interference inhibits Val5-ANG II endocytosis and NHE-3 expression in immortalized rabbit proximal tubule cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(1): p. C367-78.
283. Quigley, R., *Androgens stimulate proximal tubule transport*. Gend Med, 2008. **5 Suppl A**: p. S114-20.
284. Azuma, K.K., et al., *Renal Na⁺/H⁺ exchanger isoforms and their regulation by thyroid hormone*. Am J Physiol, 1996. **270**(2 Pt 1): p. C585-92.
285. Banday, A.A. and M.F. Lokhandwala, *Loss of biphasic effect on Na/K-ATPase activity by angiotensin II involves defective angiotensin type 1 receptor-nitric oxide signaling*. Hypertension, 2008. **52**(6): p. 1099-105.
286. Nielsen, S., et al., *Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney*. Am J Physiol, 1998. **275**(6 Pt 2): p. F885-93.
287. Takahashi, N., et al., *Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5434-9.
288. Lotscher, M., et al., *Role of microtubules in the rapid regulation of renal phosphate transport in response to acute alterations in dietary phosphate content*. J Clin Invest, 1997. **99**(6): p. 1302-12.

289. Hirano, K., et al., *Adaptation of low-phosphate diet in renal brush borders of spontaneously hypertensive rats*. *Contrib Nephrol*, 1991. **90**: p. 59-64.
290. Magyar, C.E. and A.A. McDonough, *Molecular mechanisms of sodium transport inhibition in proximal tubule during acute hypertension*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2000. **9**(2): p. 149-56.
291. Soleimani, M. and C.E. Burnham, *Physiologic and molecular aspects of the Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter in health and disease processes*. *Kidney Int*, 2000. **57**(2): p. 371-84.
292. Soleimani, M. and P.S. Aronson, *Ionic mechanism of Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in rabbit renal basolateral membrane vesicles*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(31): p. 18302-8.
293. Wang, X., et al., *The regulation of proximal tubular salt transport in hypertension: an update*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009. **18**(5): p. 412-20.
294. *Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system*, ed. M.I.P. Mohan K. Raizada, Colin Sumners. 1993.
295. Kobori, H., et al., *The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease*. *Pharmacol Rev*, 2007. **59**(3): p. 251-87.
296. Burns, K.D., *Angiotensin II and its receptors in the diabetic kidney*. *Am J Kidney Dis*, 2000. **36**(3): p. 449-467.
297. Burns, K.D., T. Homma, and R.C. Harris, *The intrarenal renin-angiotensin system*. *Semin Nephrol*, 1993. **13**(1): p. 13-30.
298. Ingelfinger, J.R., et al., *In situ hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. An hypothesis for the intrarenal renin angiotensin system*. *J Clin Invest*, 1990. **85**(2): p. 417-23.
299. Wang, T.T., et al., *Effect of glucose on the expression of the angiotensinogen gene in opossum kidney cells*. *Kidney Int*, 1998. **53**(2): p. 312-9.
300. Seikaly, M.G., B.S. Arant, Jr., and F.D. Senej, Jr., *Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat*. *J Clin Invest*, 1990. **86**(4): p. 1352-7.
301. Braam, B., et al., *Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats*. *Am J Physiol*, 1993. **264**(5 Pt 2): p. F891-8.
302. Becker, B.N., et al., *Mechanical stretch/relaxation stimulates a cellular renin-angiotensin system in cultured rat mesangial cells*. *Exp Nephrol*, 1998. **6**(1): p. 57-66.
303. Lai, K.N., et al., *Gene expression of the renin-angiotensin system in human kidney*. *J Hypertens*, 1998. **16**(1): p. 91-102.
304. Paul, M., A. Poyan Mehr, and R. Kreutz, *Physiology of local renin-angiotensin systems*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(3): p. 747-803.
305. Navar, L.G., H. Kobori, and M. Prieto-Carrasquero, *Intrarenal angiotensin II and hypertension*. *Curr Hypertens Rep*, 2003. **5**(2): p. 135-43.
306. Navar, L.G., *The role of the kidneys in hypertension*. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2005. **7**(9): p. 542-9.
307. Tanimoto, K., et al., *Angiotensinogen-deficient mice with hypotension*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(50): p. 31334-7.
308. Esther, C.R., Jr., et al., *Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility*. *Lab Invest*, 1996. **74**(5): p. 953-65.
309. Kim, H.S., et al., *Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(7): p. 2735-9.
310. Peters, J., *Molecular basis of human hypertension: the role of angiotensin*. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 1995. **9**(3): p. 657-78.
311. Caulfield, M., et al., *Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension*. *N Engl J Med*, 1994. **330**(23): p. 1629-33.

312. Xiao, H.D., et al., *Role of bradykinin in angiotensin-converting enzyme knockout mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(6): p. H1969-77.
313. Ishida, J., et al., *Rescue of angiotensinogen-knockout mice*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **252**(3): p. 610-6.
314. Sigmund, C.D. and K.W. Gross, *Structure, expression, and regulation of the murine renin genes*. Hypertension, 1991. **18**(4): p. 446-57.
315. Takahashi, N., et al., *Ren1c homozygous null mice are hypotensive and polyuric, but heterozygotes are indistinguishable from wild-type*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(1): p. 125-32.
316. Santos, R.A., M.J. Campagnole-Santos, and S.P. Andrade, *Angiotensin-(1-7): an update*. Regul Pept, 2000. **91**(1-3): p. 45-62.
317. Brosnihan, K.B., P. Li, and C.M. Ferrario, *Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide*. Hypertension, 1996. **27**(3 Pt 2): p. 523-8.
318. Li, N., et al., *The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **288**(2): p. F353-62.
319. Oudit, G.Y., et al., *Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis*. Am J Pathol, 2006. **168**(6): p. 1808-20.
320. Gurley, S.B., et al., *Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2218-25.
321. Iwai, N. and T. Inagami, *Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor*. FEBS Lett, 1992. **298**(2-3): p. 257-60.
322. Sasamura, H., et al., *Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **185**(1): p. 253-9.
323. Ito, M., et al., *Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3521-5.
324. Chen, X., et al., *Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse*. Am J Physiol, 1997. **272**(3 Pt 2): p. F299-304.
325. Davisson, R.L., et al., *Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain*. J Clin Invest, 2000. **106**(1): p. 103-6.
326. Oliverio, M.I., et al., *Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15496-501.
327. Ichiki, T., et al., *Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor*. Nature, 1995. **377**(6551): p. 748-50.
328. Gross, V., M. Obst, and F.C. Luft, *Insights into angiotensin II receptor function through AT2 receptor knockout mice*. Acta Physiol Scand, 2004. **181**(4): p. 487-94.
329. Obst V.Gross, L.F.C., *Insights into angiotensin II receptor function through AT2 receptor knockout mice*. Acta Physiol Scand, 2004. **181**: p. 487-494.
330. Smithies, O. and H.S. Kim, *Targeted gene duplication and disruption for analyzing quantitative genetic traits in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3612-5.
331. Sugaya, T., et al., *Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia*. J Biol Chem, 1995. **270**(32): p. 18719-22.
332. Hatae, T., et al., *Comparative studies on species-specific reactivity between renin and angiotensinogen*. Mol Cell Biochem, 1994. **131**(1): p. 43-7.

333. Merrill, D.C., et al., *Chronic hypertension and altered baroreflex responses in transgenic mice containing the human renin and human angiotensinogen genes*. J Clin Invest, 1996. **97**(4): p. 1047-55.
334. Didion, S.P., C.D. Sigmund, and F.M. Faraci, *Impaired endothelial function in transgenic mice expressing both human renin and human angiotensinogen*. Stroke, 2000. **31**(3): p. 760-4; discussion 765.
335. Toole, J.J., N.D. Hastie, and W.A. Held, *An abundant androgen-regulated mRNA in the mouse kidney*. Cell, 1979. **17**(2): p. 441-8.
336. Virlon, B., et al., *Serial microanalysis of renal transcriptomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15286-91.
337. Meseguer, A. and J.F. Catterall, *Mouse kidney androgen-regulated protein messenger ribonucleic acid is expressed in the proximal convoluted tubules*. Mol Endocrinol, 1987. **1**(8): p. 535-41.
338. Ding, Y., et al., *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**(44): p. 28142-8.
339. Lavoie, J.L., K.D. Lake-Bruse, and C.D. Sigmund, *Increased blood pressure in transgenic mice expressing both human renin and angiotensinogen in the renal proximal tubule*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(5): p. F965-71.
340. Ryan, M.J., et al., *HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney*. Kidney Int, 1994. **45**(1): p. 48-57.
341. Liu, B.C., et al., *Effect of irbesartan on angiotensin II-induced hypertrophy of human proximal tubular cells*. Chin Med J (Engl), 2004. **117**(4): p. 547-51.
342. Satou, R., et al., *Costimulation with angiotensin II and interleukin 6 augments angiotensinogen expression in cultured human renal proximal tubular cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(1): p. F283-9.
343. Tang, S.S., et al., *Temperature-sensitive SV40 immortalized rat proximal tubule cell line has functional renin-angiotensin system*. Am J Physiol, 1995. **268**(3 Pt 2): p. F435-46.
344. Evans, A.L., et al., *Improved system for measuring systolic blood pressure in the conscious rat*. Med Biol Eng Comput, 1994. **32**(1): p. 101-2.
345. Anderson, N.H., et al., *Telemetry for cardiovascular monitoring in a pharmacological study: new approaches to data analysis*. Hypertension, 1999. **33**(1 Pt 2): p. 248-55.
346. Brockway, B.P., P.A. Mills, and S.H. Azar, *A new method for continuous chronic measurement and recording of blood pressure, heart rate and activity in the rat via radio-telemetry*. Clin Exp Hypertens A, 1991. **13**(5): p. 885-95.
347. Zimpelmann, J., Wehbi G, Bhorbani M, Navar LG, Imig JD, Levine DZ, Burns KD., *Effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on the proximal tubule renin-angiotensin system in the rat*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**:8A.
348. Zhang SL, F.J., Hohman TC, Tang S-S, Inglefinger JR, Chan JSD, *Molecular mechanism of glucose action on angiotensinogen gene expression in rat proximal tubular cells*. Kidney Int, 1999. **55**: p. 454-464.
349. Blantz RC, K.K., Tucker BJ, *Angiotensin II effects upon the glomerular microcirculation and ultrafiltration coefficient of the rat*. J Clin Invest, 1976. **57**(2): p. 419-434.
350. Myers BD, D.W., Brenner BM, *Effects of norepinephrine and angiotensin II on the determinants of glomerular ultrafiltration and proximal tubule fluid reabsorption in the rat*. Circ Res, 1975. **37**(1): p. 101-110.
351. Zatz, R., et al., *Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension*. J Clin Invest, 1986. **77**(6): p. 1925-30.

352. Anderson S, M.T., Rennke HG, Brenner BM, *Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass.* J Clin Invest, 1985. **76**: p. 612-619.
353. Imanishi, M., et al., *Glomerular hypertension as one cause of albuminuria in type II diabetic patients.* Diabetologia, 1999. **42**(8): p. 999-1005.
354. Wolf, G. and E.G. Neilson, *Angiotensin II as a renal growth factor.* J Am Soc Nephrol, 1993. **3**(9): p. 1531-40.
355. Weigert, C., et al., *Angiotensin II induces human TGF-beta 1 promoter activation: similarity to hyperglycaemia.* Diabetologia, 2002. **45**(6): p. 890-8.
356. Marrero, M.B., et al., *Role of the JAK/STAT signaling pathway in diabetic nephropathy.* Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(4): p. F762-8.
357. Simon, M., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in human renal ontogenesis and in adult kidney.* Am J Physiol, 1995. **268**(2 Pt 2): p. F240-50.
358. Williams, B., et al., *Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells.* Hypertension, 1995. **25**(5): p. 913-7.
359. Hovind, P., et al., *Elevated vascular endothelial growth factor in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy.* Kidney Int Suppl, 2000. **75**: p. S56-61.
360. Wolff, J., <http://en.wikipedia.org/wiki/Fibrinolysis>.
361. Gerstein, H.C., et al., *Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals.* Jama, 2001. **286**(4): p. 421-6.
362. Mogensen, C.E. and C.K. Christensen, *Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients.* N Engl J Med, 1984. **311**(2): p. 89-93.
363. *Should all patients with type 1 diabetes mellitus and microalbuminuria receive angiotensin-converting enzyme inhibitors? A meta-analysis of individual patient data.* Ann Intern Med, 2001. **134**(5): p. 370-9.
364. Tatti, P., et al., *Outcome results of the Fosinopril Versus Amlodipine Cardiovascular Events Randomized Trial (FACET) in patients with hypertension and NIDDM.* Diabetes Care, 1998. **21**(4): p. 597-603.
365. Estacio, R.O., et al., *Effect of blood pressure control on diabetic microvascular complications in patients with hypertension and type 2 diabetes.* Diabetes Care, 2000. **23 Suppl 2**: p. B54-64.
366. Agardh, C.D., et al., *Greater reduction of urinary albumin excretion in hypertensive type II diabetic patients with incipient nephropathy by lisinopril than by nifedipine.* J Hum Hypertens, 1996. **10**(3): p. 185-92.
367. Remuzzi, G., M. Macia, and P. Ruggenenti, *Prevention and treatment of diabetic renal disease in type 2 diabetes: the BENEDICT study.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4 Suppl 2): p. S90-7.
368. Scheen, A.J., *Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system.* Drugs, 2004. **64**(22): p. 2537-65.
369. Bjorck, S., et al., *Renal protective effect of enalapril in diabetic nephropathy.* Bmj, 1992. **304**(6823): p. 339-43.
370. Andersen, S., et al., *Long-term renoprotective effects of losartan in diabetic nephropathy: interaction with ACE insertion/deletion genotype?* Diabetes Care, 2003. **26**(5): p. 1501-6.
371. 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.

372. 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.
373. Patel, A., et al., *Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial): a randomised controlled trial*. Lancet, 2007. **370**(9590): p. 829-40.
374. Dahl, L.K. and M. Heine, *Primary role of renal homografts in setting chronic blood pressure levels in rats*. Circ Res, 1975. **36**(6): p. 692-6.
375. Curtis, J.J., et al., *Remission of essential hypertension after renal transplantation*. N Engl J Med, 1983. **309**(17): p. 1009-15.
376. Kopkan, L., et al., *The role of intrarenal angiotensin II in the development of hypertension in Ren-2 transgenic rats*. J Hypertens, 2005. **23**(8): p. 1531-9.
377. Crowley, S.D., et al., *Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(47): p. 17985-90.
378. Coffman, T.M. and S.D. Crowley, *Kidney in hypertension: guyton redux*. Hypertension, 2008. **51**(4): p. 811-6.
379. Crowley, S.D., et al., *Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system*. J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 1092-9.
380. Oliverio, M.I., et al., *Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation*. Am J Physiol, 1997. **272**(4 Pt 2): p. F515-20.
381. Coffman, T.M., *A genetic approach for studying the physiology of the type 1A (AT1A) angiotensin receptor*. Semin Nephrol, 1997. **17**(5): p. 404-11.
382. Zhu, Z., et al., *Angiotensin AT1B receptor mediates calcium signaling in vascular smooth muscle cells of AT1A receptor-deficient mice*. Hypertension, 1998. **31**(5): p. 1171-7.
383. Meyrier, A., *Hypertensive nephrosclerosis pathogenesis, diagnosis and management*. Saudi J Kidney Dis Transpl, 1999. **10**(3): p. 267-74.
384. Marcantoni, C., et al., *Hypertensive nephrosclerosis in African Americans versus Caucasians*. Kidney Int, 2002. **62**(1): p. 172-80.
385. Tracy, R.E., *Age trends of renal arteriolar hyalinization explored with the aid of serial sections*. Nephron Clin Pract, 2007. **105**(4): p. c171-7.
386. Luft, F.C., *Hypertensive nephrosclerosis-a cause of end-stage renal disease?* Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(10): p. 1515-7.
387. Wilson, G.L. and E.H. Leiter, *Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. **156**: p. 27-54.
388. Tay, Y.C., et al., *Can murine diabetic nephropathy be separated from superimposed acute renal failure?* Kidney Int, 2005. **68**(1): p. 391-8.
389. <http://jaxmice.jax.org/strain/003548.html>.
390. Breyer, M.D., et al., *Mouse models of diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(1): p. 27-45.
391. Quigley, J.E., et al., *Obesity-Induced Renal Oxidative Stress Contributes to Renal Injury in Salt-Sensitive Hypertension*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009.
392. McCullough, P.A., et al., *Independent components of chronic kidney disease as a cardiovascular risk state: results from the Kidney Early Evaluation Program (KEEP)*. Arch Intern Med, 2007. **167**(11): p. 1122-9.
393. Bowden, D.W., *Genetics of kidney disease*. Kidney Int Suppl, 2003(83): p. S8-12.
394. Freedman, B.I., et al., *Genetic factors in diabetic nephropathy*. Clin J Am Soc Nephrol, 2007. **2**(6): p. 1306-16.

395. Hwang, S.J., et al., *A genome-wide association for kidney function and endocrine-related traits in the NHLBI's Framingham Heart Study*. BMC Med Genet, 2007. **8 Suppl 1**: p. S10.
396. Garrett, M.R., et al., *Genome scan and congenic strains for blood pressure QTL using Dahl salt-sensitive rats*. Genome Res, 1998. **8**(7): p. 711-23.
397. Garrett, M.R., et al., *Identification of blood pressure quantitative trait loci that differentiate two hypertensive strains*. J Hypertens, 2002. **20**(12): p. 2399-406.
398. Sterzel, R.B., et al., *Renal disease and the development of hypertension in salt-sensitive Dahl rats*. Kidney Int, 1988. **33**(6): p. 1119-29.
399. Hampton, J.A., et al., *Morphometric evaluation of the renal arterial system of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats on a high salt diet. II. Interlobular arteries and intralobular arterioles*. Lab Invest, 1989. **60**(6): p. 839-46.
400. Packard, M., et al., *Investigating the effect of genetic background on proteinuria and renal injury using two hypertensive strains*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(4): p. F839-46.
401. Garrett, M.R., H. Dene, and J.P. Rapp, *Time-course genetic analysis of albuminuria in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(5): p. 1175-87.
402. Hoheisel, J.D., *Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(3): p. 200-10.
403. Schena, M., et al., *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*. Science, 1995. **270**(5235): p. 467-70.
404. Schena, M., et al., *Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics*. Trends Biotechnol, 1998. **16**(7): p. 301-6.
405. Dai, M., et al., *Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(20): p. e175.
406. Elo, L.L., et al., *Integrating probe-level expression changes across generations of Affymetrix arrays*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(22): p. e193.
407. Wada, J., et al., *Gene expression profile in streptozotocin-induced diabetic mice kidneys undergoing glomerulosclerosis*. Kidney Int, 2001. **59**(4): p. 1363-73.
408. Susztak, K., et al., *Molecular profiling of diabetic mouse kidney reveals novel genes linked to glomerular disease*. Diabetes, 2004. **53**(3): p. 784-94.
409. Hsieh, T.J., et al., *Upregulation of osteopontin gene expression in diabetic rat proximal tubular cells revealed by microarray profiling*. Kidney Int, 2006. **69**(6): p. 1005-15.
410. Tornavaca, O., et al., *Kidney androgen-regulated protein transgenic mice show hypertension and renal alterations mediated by oxidative stress*. Circulation, 2009. **119**(14): p. 1908-17.
411. Bagby, S.P., *Diabetic nephropathy and proximal tubule ROS: challenging our glomerulocentricity*. Kidney Int, 2007. **71**(12): p. 1199-202.
412. Nangaku, M., *Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure*. Intern Med, 2004. **43**(1): p. 9-17.
413. Goestemeyer, A.K., et al., *GLUT2 protein at the rat proximal tubule brush border membrane correlates with protein kinase C (PKC)-beta1 and plasma glucose concentration*. Diabetologia, 2007. **50**(10): p. 2209-17.
414. Najafian, B., et al., *Glomerulotubular junction abnormalities are associated with proteinuria in type 1 diabetes*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4 Suppl 2): p. S53-60.
415. 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.

416. Thevenod, F., *Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium*. Nephron Physiol, 2003. **93**(4): p. p87-93.
417. 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.
418. 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.
419. 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.
420. 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.
421. Hsieh, T.J., et al., *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**(10): p. 4338-49.
422. 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, 2007.
423. Susztak, K. and E.P. Bottinger, *Diabetic nephropathy: a frontier for personalized medicine*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(2): p. 361-7.
424. Ashburner, M., et al., *Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 25-9.
425. 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.
426. 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.
427. 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.
428. 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.
429. Day, C.L., et al., *Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 3): p. 597-605.
430. Show, M.D., et al., *Testicular expression and distribution of the rat bcl2 modifying factor in response to reduced intratesticular testosterone*. Biol Reprod, 2004. **70**(4): p. 1153-61.
431. Schmelzle, T., et al., *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**(10): p. 3787-92.
432. Hsieh, T.J., et al., *Reactive oxygen species blockade and action of insulin on expression of angiotensinogen gene in proximal tubular cells*. J Endocrinol, 2004. **183**(3): p. 535-50.
433. 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.
434. Zhang, S.L., et al., *Effect of renin-angiotensin system blockade on the expression of the angiotensinogen gene and induction of hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells*. Exp Nephrol, 2001. **9**(2): p. 109-17.
435. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.

436. Moustakas, A., S. Souchelnytskyi, and C.H. Heldin, *Smad regulation in TGF-beta signal transduction*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 24): p. 4359-69.
437. Leivonen, S.K., et al., *Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression in human gingival fibroblasts. Evidence for cross-talk between Smad3 and p38 signaling pathways*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46338-46.
438. Zhang, M., D. Fraser, and A. Phillips, *ERK, p38, and Smad signaling pathways differentially regulate transforming growth factor-beta1 autoinduction in proximal tubular epithelial cells*. Am J Pathol, 2006. **169**(4): p. 1282-93.
439. Verzola, D., et al., *Apoptosis in the kidneys of patients with type II diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2007. **72**(10): p. 1262-72.
440. Drummond, K. and M. Mauer, *The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1580-7.
441. 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.
442. Marcussen, N., *Tubulointerstitial damage leads to atubular glomeruli: significance and possible role in progression*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15 Suppl 6**: p. 74-5.
443. Ingelfinger, J.R., et al., *Rat proximal tubule cell line transformed with origin-defective SV40 DNA: autocrine ANG II feedback*. Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 2): p. F218-27.
444. Smyth, G.K., *Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments*. Stat Appl Genet Mol Biol, 2004. **3**: p. Article3.
445. Smyth, G.K., J. Michaud, and H.S. Scott, *Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments*. Bioinformatics, 2005. **21**(9): p. 2067-75.
446. Wettenhall, J.M., et al., *affyImGUI: a graphical user interface for linear modeling of single channel microarray data*. Bioinformatics, 2006. **22**(7): p. 897-9.
447. Gentleman, R.C., et al., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome Biol, 2004. **5**(10): p. R80.
448. Wu, Z., et al., *A Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays*. Journal of the American Statistical Association. **99**(468): p. 909.
449. Brezniceanu, M.L., et al., *Transforming growth factor-beta 1 stimulates angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells*. Kidney Int, 2006. **69**(11): p. 1977-85.
450. Wolf, G. and F.N. Ziyadeh, *Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy*. Kidney Int, 1999. **56**(2): p. 393-405.
451. Ibrahim, H.N. and T.H. Hostetter, *Diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 1997. **8**(3): p. 487-93.
452. Thomas, M.C., W.C. Burns, and M.E. Cooper, *Tubular changes in early diabetic nephropathy*. Adv Chronic Kidney Dis, 2005. **12**(2): p. 177-86.
453. Kang, M.J., et al., *Effect of glucose on stress-activated protein kinase activity in mesangial cells and diabetic glomeruli*. Kidney Int, 1999. **55**(6): p. 2203-14.
454. Igarashi, M., et al., *Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways*. J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 185-95.
455. Ayo, S.H., et al., *High glucose increases diacylglycerol mass and activates protein kinase C in mesangial cell cultures*. Am J Physiol, 1991. **261**(4 Pt 2): p. F571-7.
456. Motley, E.D., et al., *Insulin-induced Akt activation is inhibited by angiotensin II in the vasculature through protein kinase C-alpha*. Hypertension, 2003. **41**(3 Pt 2): p. 775-80.

457. Fukuda, N., et al., *Endogenous angiotensin II suppresses insulin signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats*. J Hypertens, 2001. **19**(9): p. 1651-8.
458. Ziyadeh, F.N., et al., *High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collagen gene transcription in proximal tubule*. Am J Physiol, 1990. **259**(4 Pt 2): p. F704-14.
459. Wolf, G., et al., *The influence of glucose concentration on angiotensin II-induced hypertrophy of proximal tubular cells in culture*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **176**(2): p. 902-9.
460. Hug, H. and T.F. Sarre, *Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?* Biochem J, 1993. **291** (Pt 2): p. 329-43.
461. Ding, Y. and C.D. Sigmund, *Androgen-dependent regulation of human angiotensinogen expression in KAP-hAGT transgenic mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **280**(1): p. F54-60.
462. Davisson, R.L., et al., *Novel mechanism of hypertension revealed by cell-specific targeting of human angiotensinogen in transgenic mice*. Physiol Genomics, 1999. **1**(1): p. 3-9.
463. Sigmund, C.D., *Genetic manipulation of the renin-angiotensin system: targeted expression of the renin-angiotensin system in the kidney*. Am J Hypertens, 2001. **14**(6 Pt 2): p. 33S-37S.
464. Clase, C.M., A.X. Garg, and B.A. Kiberd, *Classifying kidney problems: can we avoid framing risks as diseases?* BMJ, 2004. **329**(7471): p. 912-5.
465. Johnson, C.A., et al., *Clinical practice guidelines for chronic kidney disease in adults: Part II. Glomerular filtration rate, proteinuria, and other markers*. Am Fam Physician, 2004. **70**(6): p. 1091-7.
466. Saccomani, G., K.D. Mitchell, and L.G. Navar, *Angiotensin II stimulation of Na(+)-H+ exchange in proximal tubule cells*. Am J Physiol, 1990. **258**(5 Pt 2): p. F1188-95.
467. Komlosi, P., et al., *Angiotensin I conversion to angiotensin II stimulates cortical collecting duct sodium transport*. Hypertension, 2003. **42**(2): p. 195-9.
468. Wang, C.T., L.G. Navar, and K.D. Mitchell, *Proximal tubular fluid angiotensin II levels in angiotensin II-induced hypertensive rats*. J Hypertens, 2003. **21**(2): p. 353-60.
469. Qi, W., et al., *Transforming growth factor-beta/connective tissue growth factor axis in the kidney*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(1): p. 9-13.
470. Kim, S.J., et al., *p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NFkappa B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 33501-8.
471. Fintha, A., et al., *Angiotensin II activates plasminogen activator inhibitor-1 promoter in renal tubular epithelial cells via the AT1 receptor*. Acta Physiol Hung, 2007. **94**(1-2): p. 19-30.
472. Bolzan, A.D. and M.S. Bianchi, *Genotoxicity of streptozotocin*. Mutat Res, 2002. **512**(2-3): p. 121-34.
473. Ryer, E.J., et al., *Protein kinase C delta induces apoptosis of vascular smooth muscle cells through induction of the tumor suppressor p53 by both p38-dependent and p38-independent mechanisms*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35310-7.
474. Perfettini, J.L., et al., *Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 279-89.
475. Najafian, B., et al., *Atubular glomeruli and glomerulotubular junction abnormalities in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(4): p. 908-17.
476. 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.

477. Wolf, G., *Role of reactive oxygen species in angiotensin II-mediated renal growth, differentiation, and apoptosis*. *Antioxid Redox Signal*, 2005. **7**(9-10): p. 1337-45.
478. Bhaskaran, M., et al., *Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **284**(5): p. F955-65.
479. Taylor, N.E., et al., *NADPH oxidase in the renal medulla causes oxidative stress and contributes to salt-sensitive hypertension in Dahl S rats*. *Hypertension*, 2006. **47**(4): p. 692-8.
480. Park, Y.M., et al., *NAD(P)H oxidase inhibitor prevents blood pressure elevation and cardiovascular hypertrophy in aldosterone-infused rats*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **313**(3): p. 812-7.
481. Virdis, A., et al., *Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice*. *J Hypertens*, 2004. **22**(3): p. 535-42.
482. Simons, J.M., et al., *Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils*. *Free Radic Biol Med*, 1990. **8**(3): p. 251-8.
483. Ximenes, V.F., et al., *The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition*. *Arch Biochem Biophys*, 2007. **457**(2): p. 134-41.
484. Heumuller, S., et al., *Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant*. *Hypertension*, 2008. **51**(2): p. 211-7.
485. Percy, M.E., *Catalase: an old enzyme with a new role?* *Can J Biochem Cell Biol*, 1984. **62**(10): p. 1006-14.
486. Soli, A.H., et al., *Insulin receptor deficiency in genetic and acquired obesity*. *J Clin Invest*, 1975. **56**(4): p. 769-80.
487. Sharma, K., P. McCue, and S.R. Dunn, *Diabetic kidney disease in the db/db mouse*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **284**(6): p. F1138-44.
488. Toyama, K., et al., *Temperature-sensitive SV40-immortalized rat middle ear epithelial cells*. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2004. **113**(12): p. 967-74.
489. Roberts, A.B., B.K. McCune, and M.B. Sporn, *TGF-beta: regulation of extracellular matrix*. *Kidney Int*, 1992. **41**(3): p. 557-9.
490. Wolf, G. and F.N. Ziyadeh, *Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy*. *Nephron Physiol*, 2007. **106**(2): p. p26-31.
491. Powell, D.W., et al., *Renal tubulointerstitial fibrosis in OVE26 type 1 diabetic mice*. *Nephron Exp Nephrol*, 2009. **111**(1): p. e11-9.
492. 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.
493. Wei, W., et al., *Oxidative stress, diabetes, and diabetic complications*. *Hemoglobin*, 2009. **33**(5): p. 370-7.
494. Ohshiro, Y., et al., *Reduction of diabetes-induced oxidative stress, fibrotic cytokine expression, and renal dysfunction in protein kinase Cbeta-null mice*. *Diabetes*, 2006. **55**(11): p. 3112-20.
495. Godin, N., et al., *Catalase overexpression prevents hypertension and tubular apoptosis in angiotensinogen transgenic mice*. *Kidney Int*.
496. Amao, O.L., *Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene and protein expression in diabetic patients without nephropathy*. *Kidney Int*, 2009. **75**(10): p. 1118-9.
497. Dilauro, M. and K.D. Burns, *Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney*. *ScientificWorldJournal*, 2009. **9**: p. 522-35.

498. Burgelova, M., et al., *Impairment of the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas axis contributes to the acceleration of two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension*. *J Hypertens*, 2009. **27**(10): p. 1988-2000.
499. Oudit, G.Y., et al., *Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy*. *Diabetes*. **59**(2): p. 529-38.
500. Katovich, M.J., J.L. Grobe, and M.K. Raizada, *Angiotensin-(1-7) as an antihypertensive, antifibrotic target*. *Curr Hypertens Rep*, 2008. **10**(3): p. 227-32.
501. Ferrario, C.M., et al., *Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors*. *Kidney Int*, 2005. **68**(5): p. 2189-96.
502. Navar, L.G., et al., *Concentrations and actions of intraluminal angiotensin II*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10 Suppl 11**: p. S189-95.
503. Hsiao, L.L., et al., *Prospective use of DNA microarrays for evaluating renal function and disease*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2000. **9**(3): p. 253-8.
504. Wada, J., H. Makino, and Y.S. Kanwar, *Gene expression and identification of gene therapy targets in diabetic nephropathy*. *Kidney Int*, 2002. **61**(1 Suppl): p. S73-8.
505. Denton, M.D., et al., *DNA microarrays: applicability to renal physiology and disease*. *J Nephrol*, 2002. **15 Suppl 5**: p. S184-91.
506. Baelde, H.J., et al., *Gene expression profiling in glomeruli from human kidneys with diabetic nephropathy*. *Am J Kidney Dis*, 2004. **43**(4): p. 636-50.
507. Cohen, C.D., et al., *Improved elucidation of biological processes linked to diabetic nephropathy by single probe-based microarray data analysis*. *PLoS One*, 2008. **3**(8): p. e2937.
508. 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.
509. Brezniceanu, M.L., et al., *Reactive Oxygen Species Promote Caspase-12 Expression and Tubular Apoptosis in Diabetic Nephropathy*. *J Am Soc Nephrol*.
510. Liu, G., et al., *Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress involved in diabetic kidney disease*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **370**(4): p. 651-6.
511. Iuchi, K., Y. Hatano, and T. Yagura, *Heterocyclic organobismuth(III) induces apoptosis of human promyelocytic leukemic cells through activation of caspases and mitochondrial perturbation*. *Biochem Pharmacol*, 2008. **76**(8): p. 974-86.
512. Saleh, M., et al., *Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms*. *Nature*, 2004. **429**(6987): p. 75-9.
513. Shiraishi, H., et al., *ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 19): p. 3958-66.
514. Reich, H., et al., *Albumin activates ERK via EGF receptor in human renal epithelial cells*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(5): p. 1266-78.
515. Osunkoya, A.O., et al., *Diagnostic biomarkers for renal cell carcinoma: selection using novel bioinformatics systems for microarray data analysis*. *Hum Pathol*, 2009. **40**(12): p. 1671-8.
516. Kurian, S.M., et al., *Biomarkers for early and late stage chronic allograft nephropathy by proteogenomic profiling of peripheral blood*. *PLoS One*, 2009. **4**(7): p. e6212.
517. Scherer, A., et al., *Transcriptome changes in renal allograft protocol biopsies at 3 months precede the onset of interstitial fibrosis/tubular atrophy (IF/TA) at 6 months*. *Nephrol Dial Transplant*, 2009. **24**(8): p. 2567-75.

518. Wilflingseder, J., et al., *Molecular predictors for anaemia after kidney transplantation*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(3): p. 1015-23.
519. Buchner, A., et al., *[Transcriptome analyses in renal cell carcinoma. Combination of laser microdissection and microarrays]*. Urologe A, 2007. **46**(9): p. 1170-5.
520. Bennett, M.R., et al., *Laser capture microdissection-microarray analysis of focal segmental glomerulosclerosis glomeruli*. Nephron Exp Nephrol, 2007. **107**(1): p. e30-40.
521. Brezniceanu, M.L., et al., *Reactive oxygen species promote caspase-12 expression and tubular apoptosis in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol. **21**(6): p. 943-54.
522. Satoh, M., *Benefits of catalase overexpression in renal proximal tubular cells*. Kidney Int. **77**(12): p. 1060-2.
523. Thallas-Bonke, V., et al., *Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C-alpha-dependent pathway*. Diabetes, 2008. **57**(2): p. 460-9.
524. Kelly, D.J., et al., *Protein kinase C-beta inhibition attenuates the progression of nephropathy in non-diabetic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(6): p. 1782-90.
525. Geraldes, P. and G.L. King, *Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications*. Circ Res. **106**(8): p. 1319-31.
526. Naesens, M., et al., *Expression of complement components differs between kidney allografts from living and deceased donors*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(8): p. 1839-51.